

# MARGINS-II

Identifizierung und Quantifizierung der Antibiotikaresistenzgen-  
Hintergrundbelastung von Abwasser und Oberflächengewässern in  
Österreich





# MARGINS-II

Identifizierung und Quantifizierung der Antibiotikaresistenzgen-Hintergrundbelastung von Abwasser und Oberflächengewässern in Österreich



 Bundesministerium  
Land- und Forstwirtschaft,  
Regionen und Wasserwirtschaft

 Bundesministerium  
Soziales, Gesundheit, Pflege  
und Konsumentenschutz



Wien, 2023

## Impressum

Projektnehmer/in: AGES - Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Department für Integrative Risikobewertung/Daten-Statistik-Risikobewertung - DSR in Kooperation mit der Technischen Universität Wien, Institut für Wassergüte und Ressourcenmanagement  
Adresse: Spargelfeldstrasse 191, 1220 Wien (AGES) / Lilienthalgasse 21 OD, 1030 Wien (TU Wien)

Projektleiter/in Margins-II: Norbert Kreuzinger / Julia Vierheilig

Tel.: +43(0)1-58801-22622 / -22637

E-Mail: [norbkreu@iwag.tuwien.ac.at](mailto:norbkreu@iwag.tuwien.ac.at) / [julia.vierheilig@tuwien.ac.at](mailto:julia.vierheilig@tuwien.ac.at)

Projektmitarbeiter/innen: Irina Dielacher, Katarzyna Slipko, Elena Radu, Sonia Galazka, Amandine Masseron, Gabriela Eder, Heidemarie Schaar, Daniela Reif, Caroline Kreuzinger, Jannis Krampe, Melanie Kuffner, Karin Weyermair, Irina Korschineck, Sílvia Cervero-Aragó, Julia Derx, Rita Linke, Markus Wögerbauer

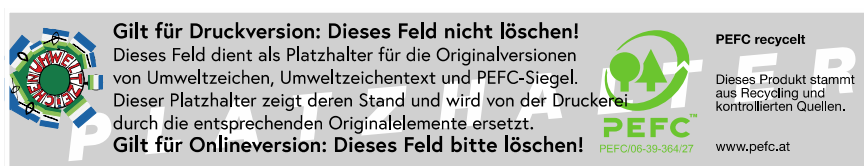
Kooperationspartner: Ingenetix GmbH, Wien; Bundesamt für Wasserwirtschaft, Institut für Kulturtechnik und Bodenwasserhaushalt, Petzenkirchen; ICC Water & Health, Österreich

Finanzierungsstellen: BMASGK und BML

Projektlaufzeit: 2019 - 2022

Danksagung: Herzlichen Dank an das vom BMLRT geförderte Projekt "Untersuchung von Abwässern und Gewässern auf unterschiedliche toxikologische Endpunkte" für die Unterstützung bei der Probenahme (Oberflächengewässer und Kläranlagen 2019) und Bereitstellung von Daten (Spurenstoffkonzentrationen), das Projekt Antiversa (gefördert vom FWF) für die Möglichkeit der Synergienutzung bei Beprobungen und Analysen einiger Oberflächengewässer, das ANSWER Projekt (gefördert von der Europäischen Union) sowie das Projekt KomOzAk II (gefördert von BMLRT) für die Daten zur weitergehenden Abwasserreinigung und das Projekt ESR17-070 (gefördert durch den WWTF) und JF\_2019\_15 ('Swim City', gefördert durch die OeAW) für die Unterstützung durch die Zurverfügungstellung von Oberflächenwasserproben (Jahresverlauf Alte Donau).

Alle Rechte vorbehalten.



Wien, 2023. Stand: 12. Juni 2023

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>6</b>
<b>Summary</b> .....	<b>8</b>
<b>Einleitung</b> .....	<b>10</b>
1.1 Hintergrund und Motivation .....	10
1.2 Zielsetzung und Fragestellungen .....	11
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>13</b>
2.1 Probenahme .....	13
2.2 Aufkonzentrierung der Biomasse (Filtration, ...) .....	16
2.3 DNA-Extraktion (inkl. Qualitäts- und Konzentrationsbestimmung) .....	17
2.4 Auswahl der untersuchten Antibiotikaresistenzgene .....	18
2.5 Methodische Experimente .....	19
2.5.1 Verwendete Kläranlagenproben für die methodischen Experimente .....	20
2.5.2 Auswirkungen des Probenahmeverfahrens (i) .....	21
2.5.3 Auswirkung der Probenlagerung bei 4 °C (ii).....	22
2.5.4 Auswirkungen unterschiedlicher Probenprozessierung (iii).....	23
2.6 Monitoring von Kläranlagen und Oberflächengewässern.....	25
2.6.1 Räumliche Untersuchung österreichischer Kläranlagen .....	26
2.6.2 Zeitlich hochaufgelöstes Monitoring ausgewählter Kläranlagen .....	28
2.6.3 Räumliche Untersuchung österreichischer Oberflächengewässer .....	31
2.6.4 Saisonales und zeitlich hochaufgelöstes Monitoring ausgewählter Oberflächengewässer .....	32
2.7 Entfernung von ARGs durch weitergehende Abwasserbehandlung .....	34
2.8 qPCR TaqMan Assays.....	35
2.9 Hochdurchsatz-Gen-Profilung (SmartChip-Analysen) .....	42
2.10 Chemische Analysen von Antibiotika und anderen Spurenstoffen.....	44
2.11 Amplikonsequenzierung (16S rRNA Gen).....	46
<b>3 Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>48</b>

3.1	Ergebnisse der methodischen Experimente.....	48
3.1.1	Auswirkungen der Abwasserprobenahme: Stich- und Mischproben (i) .....	48
3.1.2	Auswirkung der Probenlagerung bei 4 °C (ii).....	51
3.1.3	Auswirkungen unterschiedlicher Probenprozessierung (iii).....	58
3.2	Ergebnisse des Monitorings von Kläranlagen und Oberflächengewässern .....	69
3.2.1	Räumliche Untersuchung österreichischer Kläranlagen .....	70
3.2.2	Zeitlich hochaufgelöstes Monitoring ausgewählter Kläranlagen .....	88
3.2.3	Räumliche Untersuchung österreichischer Oberflächengewässer .....	98
3.2.4	Saisonales und zeitlich hochaufgelöstes Monitoring ausgewählter Oberflächengewässer .....	107
3.2.5	Amplikonsequenzierung (16S rRNA Gen).....	119
3.2.6	Chemische Analysen ausgewählter Kläranlagen und Oberflächengewässer .....	120
3.2.7	Statistische Auswertung der Daten .....	123
3.3	Entfernung von ARGs durch weitergehende Abwasserbehandlung .....	125
<b>4</b>	<b>Schlussfolgerungen.....</b>	<b>133</b>
4.1	Auswirkungen der verwendeten Methodik auf die Quantifizierung von ARG und andere molekularbiologische Analysen .....	133
4.2	Situation der ARG-Hintergrundbelastung von österreichischen Kläranlagen und Oberflächengewässern.....	136
4.3	Situation der ARG-Hintergrundbelastung in Kläranlagen weltweit .....	139
4.4	Potentielle Gefahren der detektierten ARGs für die menschliche Gesundheit .....	140
4.5	Potential weitergehender Abwasserreinigungsverfahren in Hinblick auf ARG- Reduzierung.....	141
4.6	Handlungsoptionen und -empfehlungen .....	141
<b>5</b>	<b>Anhang 1 – Zusätzliche Ergebnisse chemischer Messungen.....</b>	<b>143</b>
<b>6</b>	<b>Anhang 2 – Zusätzliche Ergebnisse aus dem Hochdurchsatz-Gen-Profilng.....</b>	<b>152</b>
<b>7</b>	<b>Anhang 3 – Factsheets .....</b>	<b>153</b>
7.1	Factsheet 1 – Methodische Ansätze zum quantitativen Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen in Abwasser und Oberflächengewässern .....	153

7.2 Factsheet 2 – Antibiotikaresistenzen- Hintergrundbelastung von Abwasser und Oberflächengewässern in Österreich.....	155
7.3 Factsheet 3 – Zukünftige Überwachungsstrategie.....	157
<b>Referenzen.....</b>	<b>158</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>164</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>166</b>
<b>Abkürzungen.....</b>	<b>171</b>

# Zusammenfassung

Das steigende Bewusstsein über die Zunahme von antibiotikaresistenten Bakterien (ARBs) und Antibiotikaresistenzgenen (ARGs) in den letzten Jahren und die Einstufung dieser Thematik als globale Gesundheitsbedrohung durch die WHO hat auch die Bedeutung der Umwelt in den Fokus gerückt. Eine sehr große Anzahl an ARGs kommt ganz natürlich in der Umwelt vor. Werden sie jedoch auf Krankheitserreger übertragen, stellt dies eine potentielle Bedrohung für die Gesundheit von Mensch und Tier dar. Bei multiresistenten Erregern ist die Wahrscheinlichkeit eines Therapieversagen besonders hoch. Zu den gesundheitsgefährdenden ARGs zählt man derzeit vor allem ESBL-Gene (*bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM-1</sub>*, *bla<sub>OXA</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, etc) sowie *vanA* und *mcr1*. Als besonders gefährliche ARB gelten multiresistente *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas spp.* und *Acinetobacter baumannii*. Antibiotikaresistenzen in der aquatischen Umwelt in Österreich waren bereits Gegenstand einiger Studien, systematische Datenerhebungen fehlten jedoch bisher. Ziel des MARGINS-II Projektes war es daher eine erste systematische Untersuchung der ARG-Hintergrundbelastung von österr. Abwasser und Oberflächengewässern (OFGs) durchzuführen. Im Zuge dessen wurden verschiedene österr. Kläranlagen (KAs), sowie OFGs auf sieben ausgewählte ARGs (*sul1*, *ermB*, *tetW*, *vanA*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *npt2* und *npt3*) mittels qPCR untersucht. Für ausgewählte Proben wurden zusätzlich weitere Untersuchungen (Hochdurchsatz Gen-Profiling und Amplikonsequenzierungen) durchgeführt. Um methodische Einflüsse auf nachgeschaltete Analysen wie qPCR beurteilen zu können, wurden in einem ersten Schritt Kläranlagen-Proben hingehend der (i) Art der Probenahme, (ii) Lagerung der Proben und (iii) unterschiedlicher Probenprozessierung untersucht. Basierend auf den Ergebnissen der methodischen Experimente konnte schließlich ein standardisierter Arbeitsablauf für die Aufarbeitung der KA- und OFG-Proben zur Analyse der sieben ARGs mittels qPCR etabliert werden. Die Ergebnisse des systematischen Überwachungsprogramms zeigen, dass in den untersuchten KAs alle sieben ARGs detektiert werden konnten. Am häufigsten wurden die ARGs *sul1* und *ermB*, am seltensten *vanA* und *npt3* detektiert. Die Reduktion der ARG-Konzentrationen zwischen Zu- und Ablauf der betrachteten KAs betrug zwischen 1,3 und 4,3 LOG-Stufen. Durch weitergehende Abwasserbehandlungsverfahren kann diese Reduktionsleistung weiter verbessert werden, wofür zwei Beispiele gezeigt werden: i) Multibarrierensystem (Ozonung & nachgeschaltete granulierte Aktivkohlestufe), wodurch die ARG-Entfernung um ca. 1 weitere LOG-Stufe gesteigert werden konnte und ii) Membranfiltration, welche eine Entfernungsleistung von bis zu 4 LOG-Stufen zeigte. In den untersuchten OFGs konnten ebenfalls alle sieben ARGs detektiert werden, jedoch *vanA* und *npt3* nur in einzelnen wenigen Proben mit meist sehr geringen Konzentrationen. Am häufigsten wurden auch hier die ARGs *sul1* und *ermB* detektiert. Die Konzentrationen



mancher ARGs (z. B. *ermB*) waren in den OFGs um bis zu 5 LOG-Stufen niedriger als in den KA-Abläufen. OFG-Probenahmestellen mit anthropogenem Einfluss wiesen in der Regel eine höhere ARG-Konzentration auf, als Proben aus unberührteren Gebieten. Zusammenfassend kann dieser Bericht einen umfassenden Überblick über die ARG-Belastung in aquatischen Systemen in Österreich vermitteln und als Basis für die Entwicklung zukünftiger Untersuchungsstrategien im Sinne eines „One-Health“ Ansatzes dienen. Um potentielle Gefährdungen für den Menschen zu minimieren, ist die regelmäßige Überwachung in Kläranlagen und Oberflächengewässern unabdingbar. Dabei sind für eine bessere Risikoabschätzung letztendlich neben dem Einsatz molekularbiologischer Methoden auch komplementäre kultivierungsbasierte Verfahren nötig.

# Summary

The growing awareness of the increase in antibiotic-resistant bacteria (ARBs) and antibiotic-resistant genes (ARGs) in recent years and the classification of this issue as a global health threat by the WHO has also brought the importance of the environment into focus. Many ARGs occur naturally in the environment. However, if they are transferred to pathogens, this poses a potential threat to human and animal health. In the case of multiresistant pathogens, the probability of treatment failure is particularly high. Currently ranked as the most dangerous ARGs are ESBL genes (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, etc) as well as *vanA* and *mcr1*. Multiresistant *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas* spp. and *Acinetobacter baumannii* are considered particularly dangerous ARBs. Antibiotic resistance in the aquatic environment in Austria has already been the subject of several studies, but systematic data collection on this issue has been lacking. Therefore, the aim of the MARGINS-II project was to conduct a first systematic investigation of the ARG background contamination of Austrian wastewater and surface waters (SWs). In the course of this project, various Austrian wastewater treatment plants (WWTPs) and surface waters were analysed for seven ARGs (*sul1*, *ermB*, *tetW*, *vanA*, *bla*<sub>TEM-1</sub>, *npt2* und *npt3*) by qPCR. For selected samples, additional investigations (high-throughput gene profiling and amplicon sequencing) were carried out. In order to assess methodological influences on downstream analyses such as qPCR, wastewater treatment plant samples were examined in a first step with regard to (i) the type of sampling, (ii) storage of the samples, and (iii) different sample processing procedures. Finally, based on the results of the methodological experiments, a standardised workflow for the processing of WWTP and SW samples for the analysis of the seven ARGs could be established. The results of the systematic monitoring campaign show that all seven ARGs could be detected in the investigated WWTPs. The ARGs *sul1* and *ermB* were detected most frequently, *vanA* and *npt3* least frequently. The reduction of ARG concentrations between influent and effluent of the considered WWTPs was between 1.3 and 4.3 LOG levels. This reduction performance can be further improved by advanced wastewater treatment processes, for which two examples are shown: i) multi-barrier system (ozonation & downstream stage with granulated activated carbon), which increased the ARG removal by approx. 1 additional LOG level and ii) membrane filtration, which showed a removal rate of up to 4 LOG levels. In the investigated SWs, also all seven ARGs could be detected but *vanA* and *npt3* only in a few individual samples with generally very low concentrations. The ARGs *sul1* and *ermB* were also detected most frequently here. The concentrations of some ARGs (e.g. *ermB*) were up to 5 LOG levels lower in the SWs than in the WWTPs effluents. SW sampling sites with anthropogenic influence (e.g. due to WWTP discharge) generally had higher ARG

concentrations than samples from more pristine areas. In conclusion, this report can provide a comprehensive overview of ARG pollution in aquatic systems in Austria and serve as a basis for the development of future investigation strategies in the sense of a "One-Health" approach. In order to minimise potential hazards for humans, regular monitoring in WWTPs and surface waters is indispensable. Ultimately, the use of molecular biological methods needs to be additionally complemented by cultivation-based methods for better risk assessment.

# Einleitung

## 1.1 Hintergrund und Motivation

Antimikrobielle Resistenz (AMR) wurde von der Weltgesundheitsorganisation (WHO, 2019a) zu einer der zehn größten globalen Bedrohungen für die öffentliche Gesundheit erklärt. Die Bedeutung der Umwelt für die Entwicklung von Resistenzen sowie für die Vermehrung und Verbreitung von antibiotikaresistenten Bakterien (ARBs) und Antibiotikaresistenzgenen (ARGs) wurde in den letzten Jahrzehnten zunehmend erkannt (Manaia et al., 2020). Folglich ist eine harmonisierte Überwachung von Antibiotikaresistenzen (AR) im Sinne eines One-Health-Ansatzes, der nicht nur klinische und veterinärmedizinische Bereiche untersucht, sondern auch alle potenziell wichtigen Umweltkompartimente einbezieht, von großer Bedeutung für die Bewältigung künftiger Herausforderungen. Eine solche ganzheitliche Betrachtungsweise ist unabdingbar, um die Verringerung der Ausbreitung von AMR über Ökosystemgrenzen hinweg zu unterstützen. Obwohl zahlreiche Überwachungskampagnen ARBs und ARGs in verschiedenen natürlichen und konstruierten Umgebungen untersucht haben, gibt es kaum systematisch erhobene Daten über ihre Hintergrundkonzentrationen in der Umwelt. Gegenwärtig ist weder bekannt, welche ARGs noch in welcher Menge diese ARGs in der aquatischen Umwelt (Oberflächengewässer, Abwasser → Margins-II) sowie in landwirtschaftlich genutzten Böden (→ Margins-I) in Österreich vorkommen. Für die öffentliche Gesundheit ist es daher von zentralem Interesse, einen Überblick über den Status quo bezüglich ARG-Hintergrundbelastung in diesen Ökosystemen zu gewinnen, um im Rahmen einer Risikoabschätzung ermitteln zu können, welches Gefahrenpotential von diesen ARG-Umweltreservoirs ausgeht und darauf aufbauend überlegen zu können, welche Risikomanagementmaßnahmen (eventuell) zu setzen sind, um diese Gefahren zu minimieren.

Kläranlagen sind weitgehend als Hotspots für ARBs und ARGs bekannt, in denen Mikroorganismen unterschiedlicher Herkunft und Eigenschaften aufeinandertreffen und unter diversem Selektionsdruck (z. B. subinhibitorische Konzentrationen von Antibiotika, Schwermetallen, Bioziden, Aushungern, Temperaturänderungen) gemeinsam existieren. Es wird angenommen, dass diese Bedingungen zur Entstehung und Verbreitung von ARBs und ARGs in Kläranlagen beitragen (Czekalski et al., 2015; Pazda et al., 2019). Diverse Studien zeigen die unterschiedlichen Vorkommnisse von Antibiotikaresistenzen (AR) in Kläranlagen. Jede Kläranlage hat ihre eigene spezifische Biozönose, die von der Art des Abwassers abhängt, die sie erhält. Darüber hinaus unterscheiden sich Kläranlagen durch angewandte technologische Lösungen und/oder betriebliche Parameter (Rizzo et al., 2013). Schließlich haben auch das Wetter und das Klima (Temperatur) einen Einfluss auf die Art der Bakterien,

die in Kläranlagen vorkommen können. Daher ist die Evaluierung der Hintergrundwerte von AR in Kläranlagen in einer bestimmten Region (wie z. B. Österreich oder der EU) von entscheidender Bedeutung für zukünftige Gesetzgebungen und Vorschriften (BMSGPK, 2022; EC, 2017).

Nachdem das Abwasser in der Kläranlage gereinigt wurde, wird das Wasser wieder in die Umwelt, über beispielsweise Oberflächengewässer, eingeleitet. Bestenfalls sollen Kläranlagen, deren gereinigtes Abwasser wieder in Gewässer eingeleitet wird, als kritische Barriere für Antibiotika und ARGs dienen. Jedoch geht man auch davon aus, dass Kläranlagenabwässer ein wichtiger Eintragspfad für Antibiotika und ARGs in Gewässer sind (Guo et al., 2017; Wang et al., 2021). Auch die Landwirtschaft, die Industrie sowie der Mensch können Einfluss auf das Vorkommen von ARGs in der Umwelt und somit auch in Oberflächengewässer haben (Jiang et al., 2018; Wang et al., 2019).

## 1.2 Zielsetzung und Fragestellungen

Ziel der vorliegenden Studie Margins war es, neben der Hintergrundbelastung in landwirtschaftlich genutzten Böden (Margins-I), die Hintergrundbelastung von Abwässern und Oberflächengewässern (Margins-II) mit ARGs in Österreich systematisch zu ermitteln. Für Österreich liegen diesbezüglich zwar vereinzelte Untersuchungen aus Stichproben bzw. einzelnen Kläranlagen vor, jedoch keine systematisch erhobenen Daten, welche unter anderem folgende Aspekte berücksichtigen:

- Untersuchung repräsentativer Stellen (Kläranlagen und Oberflächengewässer)
- Untersuchung eines Belastungsgradienten (z. B. Referenzstellen vs. Überblicksmessstellen)
- Berücksichtigung einer zeitlichen Dynamik (Fluktuation im Jahresverlauf)
- Auswahl der Stellen bezüglich Verknüpfbarkeit mit thematisch anders gelagerten Untersuchungen (z. B. organische Spurenstoffe inkl. Antibiotikakonzentrationen)

Das angestrebte Untersuchungsprogramm sollte primär eine Ersterhebung der Situation für Österreich darstellen und steht im Einklang mit den Vorgaben der EU zum One-Health-Konzept zur Eindämmung von Antibiotikaresistenzen und zur Schwerpunktsetzung im Nationalen Aktionsplan zur Antibiotikaresistenz (BMSGPK, 2022; EC, 2017).

Im Detail werden folgende Projektziele verfolgt:

- Charakterisierung der Antibiotikaresistenzbelastung von Abwässern und Oberflächengewässern (Bestimmung des Status-quo; qualitatives Screening)
- Quantifizierung von klinisch/veterinärmedizinisch relevanten ARGs in den getesteten Umweltkompartimenten (Status-quo; ARG-spezifische Quantifizierung)
- Evidenzbasierte Identifikation von Ökosystemen, die ein hohes Risiko für die Verbreitung von klinisch/veterinärmedizinisch relevanten ARGs darstellen (Risikobewertungselement)
- Überlegungen zur Identifizierung von Critical Control Points und Strategien zur Minimierung der Ausbreitung von klinisch/veterinärmedizinisch relevanten ARGs in den Umwelthabitaten zur Unterstützung eines Risikomanagements in Österreich.

Um den Einfluss verschiedener Probenahmeverfahren und der zur Verarbeitung der Proben angewandten Methodik auf das Endergebnis der nachgeschalteten Analysen (qPCR, Amplikonsequenzierung der bakteriellen 16S rRNA Gene) zu erfassen, wurden zu Beginn einige methodische Experimente durchgeführt.

Darüber hinaus wird hier auch auf die systematische Evaluierung der Reduktion von ARGs durch weitergehende Abwasserbehandlungsverfahren wie i) einem Multibarrierensystem bestehend aus Ozonung und nachgeschalteter granulierter Aktivkohlestufe (GAK) und ii) der Membranfiltration eingegangen, die im Zuge anderer Forschungsprojekte erarbeitet wurden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Probenahme

Im Rahmen des Projekts Margins-II wurden zwischen Mai 2018 und September 2021 Proben von insgesamt 20 österreichischen Kläranlagen (Zu-, Ablauf, Belebtschlamm) und 26 versch. Oberflächengewässerstellen genommen. Eine Übersicht der beprobten Kläranlagen ist in Tabelle 1, der beprobten Oberflächengewässerstellen in Tabelle 2 dargestellt. Detaillierte Infos zu den einzelnen Probenahmezeitpunkten sind bei den jeweiligen Probenahmeserien in den Kapiteln 2.5 und 2.6 zu finden. Die Kläranlagen werden im weiteren Verlauf des Textes anonymisiert dargestellt.

Tabelle 1: Beprobte Kläranlagen.

Bezeichnung Kläranlage	Bundesland	Koord. (UTM) - Rechtswert	Koord. (UTM) - Hochwert	Bemessungswert (EW60)*	Angeschl. Einwohner*
ARA Eisenstadt	Bgld.	640158,42	441812,28	54.000	21.000
ARA Frauenkirchen	Bgld.	668620,78	442584,88	7.250	3.000
ARA Alland/Mayerling	NÖ	606329,14	463906,19	10.000	3.606
ARA Klosterneuburg	NÖ	623043,43	492643,31	55.000	31.608
ARA Baden	NÖ	618667,84	459154,89	45.000	27.000
ARA Bad Vöslau	NÖ	617160,32	456239,79	10.5000	47.000
ARA Schwechat Liesingtal	NÖ	638691,07	475510,26	370.000	51.000
ARA Schwechat Fischatal	NÖ	638691,07	475510,26	370.000	51.000
ARA Wiener Neustadt	NÖ	620207,90	441288,69	260.000	84.000
ARA Korneuburg	NÖ	622286,32	496867,20	65.000	40.000
ARA Himberg	NÖ	631379,37	470444,35	20.000	6.217
ARA Guntramsdorf	NÖ	623619,09	464612,48	27.000	10.000

ARA RHV Oberes Kremstal	OÖ	458596,03	456592,80	45.000	18.121
ARA Graz-Gössendorf	Stmk.	562656,32	346318,30	500.000	310.000
ARA Raabtal/Fladnitz	Stmk.	597325,97	342545,65	35.000	19.361
ARA Hall i.T. Fritzens	T	269675,59	379849,16	120.000	55.000
ARA Ischgl	T	170178,02	351724,19	50.000	2.498
ARA Hohenems	Vbg.	123013,87	391669,37	170.000	43.686
ARA Rotachtal	Vbg.	138729,57	407497,65	16.400	3.073
ARA ebs Wien	W	632875,12	479465,54	4.000.000	1.900.000

\*Stand 2020. ARA, Abwasserreinigungsanlage; Bgld., Burgenland; NÖ, Niederösterreich; OÖ, Oberösterreich; Stmk., Steiermark; T, Tirol; Vbg., Vorarlberg; W, Wien.

Zu- und Ablaufproben von Kläranlagen wurden in der Regel als 24 Std. volumenproportionale Tagesmischproben (TMP, C.V.V.T – constant volume variable time) mit Hilfe automatischer Probenehmer gezogen. Während der 24-stündigen Probenahmezeit wurden die Proben direkt im Probenehmer auf 4 °C gekühlt und anschließend in das Labor der Kläranlage gebracht, wo sie gründlich gemischt und in sterile Gebinde (0,5 – 1,0 l) umgefüllt wurden. Anschließend erfolgte der gekühlte Transport in das Labor der TU Wien, wo sie bis zur weiteren Aufarbeitung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert wurden. Eine Ausnahme bildeten die Kläranlagenproben des Monitorings im Juli und August 2019, wo wöchentliche Mischproben (WMP) von Zu- und Abläufen von neun verschiedenen Kläranlagen in Österreich untersucht wurden. Bei der Probenahme wurden Synergien mit dem vom BMLRT - Sektion Wasser geförderten und vom Umweltbundesamt Wien und der TU-Wien durchgeführten Projekt "Untersuchung von Abwässern und Gewässern auf unterschiedliche toxikologische Endpunkte" genutzt. Die Beprobung erfolgte während einer ausgeprägter Trockenwetterperiode vor und während der Probenahme. Um Kreuzkontaminationen sowie nicht ausschließbare Fehler beim Mischen der mengenproportionalen Wochenmischproben zu erhalten, erfolgte das Mischen der Probe nicht extern vor Ort, sondern wurde im Labor des Instituts für Wassergüte und Ressourcenmanagement durchgeführt. Zudem wurde nicht auf das große Volumen der für das o.g. Projekt vor Ort gemischten Proben zurückgegriffen, sondern die einzelnen Tagesmischproben aus den gekühlten Standardprobenehmern vor Ort in eigene, sterile Gebinde (0,25 l) gefüllt, die gemeinsam mit der „Hauptprobe“ gekühlt weitergeschickt wurden. Traten anderweitige Abweichungen bei der Probenahme von Kläranlagen auf, wie dies beispielsweise bei den methodischen Versuchen (Kapitel 2.5) teilweise der Fall war, wird auf diese im entsprechenden Kapitel näher eingegangen.



Tabelle 2: Beprobte Oberflächengewässerstellen.

Bezeichnung Oberflächengewässerstelle	Bundesland	Gewässerart	Probenahmejahr
Inn	T	Fluss	2019
Reichramingbach	OÖ	Fluss	2019
Raab	Stmk.	Fluss	2019, 2021
Wulka	Bgld.	Fluss	2019
Erlauf	NÖ	Fluss	2019
Antiesen	OÖ	Fluss	2019
Donau	OÖ	Fluss	2019
Dornbirner Ach	Vbg.	Fluss	2019, 2021
Alte Donau Ost	W	Stadtgewässer	2020
Alte Donau West	W	Stadtgewässer	2020
Wasserpark	W	Stadtgewässer	2020
Heustadlwasser	W	Stadtgewässer	2020
Stadtpark	W	Stadtgewässer	2020
Neue Donau West	W	Stadtgewässer	2020
Neue Donau Ost	W	Stadtgewässer	2020
Schwechat	NÖ	Fluss – oberhalb Kläranlage	2021, Winter und Sommer
Schwechat	NÖ	Fluss – unterhalb Kläranlage	2021, Winter und Sommer
Schwechat	NÖ	Fluss – unberührte Natur (Wald)	2021, Winter und Sommer
Schwechat	NÖ	Fluss – unberührte Natur (Wiesen)	2021, Winter und Sommer
Schwechat	NÖ	Fluss – Mittelabschnitt	2021, Winter und Sommer
Schwechat	NÖ	Fluss – bewohnte Umgebung	2021, Winter und Sommer

Schwechat	NÖ	Fluss – Wiener Becken	2021, Winter und Sommer
Liesing	NÖ	Fluss – unberührte Natur	2021, Winter und Sommer
Liesing	NÖ	Fluss – Landwirtschaft in Umgebung	2021, Winter und Sommer
Liesing	NÖ	Fluss – vor Stadtgebiet	2021, Winter und Sommer
Alte Donau	W	Stadtgewässer	2018 – 2020, monatlich (n = 23)

Bgld., Burgenland; NÖ, Niederösterreich; OÖ, Oberösterreich; Stmk., Steiermark; T, Tirol; Vbg., Vorarlberg; W, Wien.

Proben von Oberflächengewässern wurden als Stichproben in sterilen Gebinden (0,5 - 1,0 l) genommen. Dabei wurde der Probenbehälter an einer geeigneten Stelle etwa 20 cm tief unter die Wasseroberfläche gehalten und aufgefüllt, entleert und nochmal durch das gleiche Prozedere befüllt, verschlossen und bis zum Transport ins Labor kühl gelagert. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben im Labor im Kühlschrank auf 4 °C aufbewahrt.

Für die Versuche in Kapitel 2.5.4 gibt es Abweichungen gegenüber dem normalen Arbeitsablauf (siehe Tabelle 6).

## 2.2 Aufkonzentrierung der Biomasse (Filtration, ...)

Die Biomasse der Kläranlagen- und Oberflächengewässerproben wurde nach der Beprobung meistens sofort, zumindest aber innerhalb von max. 10 Tagen (nach Lagerung bei 4 °C) mittels Filtration aufkonzentriert. Zur Filtration von Kläranlagen-Zuläufen wurden Zellulosemischester-Filter mit einer Filterporengröße von 0,45 µm verwendet (GN-6 Metricel®, 0,45 µm, 50 mm S-Pack white, Pall Corporation). Das filtrierte Volumen der Zulaufproben belief sich auf 30 ml bis 130 ml pro Filter. Die Kläranlagenablauf- sowie Oberflächengewässerproben wurden auf Zellulosemischester-Filtern mit einer Filterporengröße von 0,2 µm filtriert (Typ 11327, Sartorius). Die Oberflächengewässerproben aus Tabelle 15 wurden auf 0,22 µm Polycarbonatfilter (Isopore™, 0,2 µm PC Membrane, 47mm, Merck) filtriert, wobei Unterlegfilter (Glass Microfibre Filter 691, 47 mm, VWR) verwendet wurden. Das Volumen der Ablauf- und Oberflächengewässerproben belief sich auf 100 ml bis 1.000 ml pro Filter. Als Qualitätskontrolle dienten leere Filter mit der jeweiligen Porengröße (Filtrationskontrollen). Einige Kläranlagenproben und Belebtschlämme wurden im Rahmen der methodischen Versuche

(Kapitel 2.5) zum Teil anders filtriert oder auch mittels Zentrifugation aufkonzentriert. Hierauf wird im entsprechenden Kapitel näher eingegangen.

### 2.3 DNA-Extraktion (inkl. Qualitäts- und Konzentrationsbestimmung)

Alle aufkonzentrierten Proben (Filter und abzentrifugierte Proben) wurden bis zur DNA-Extraktion gefroren gelagert (- 20 °C oder - 80 °C). Zulauf- und Ablaufproben wurden in der Regel mit dem DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN), Belebtschlamm- und Biofilm-Proben mit dem DNeasy PowerSoil Kit (QIAGEN), entsprechend den Herstellerprotokollen (inkl. weniger Abweichungen) bearbeitet. Zur Qualitätskontrolle dienten Extraktionen ohne Probenzugabe (Extraktionskontrollen).

Die Filter von den Wasserproben, die mit dem DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN) extrahiert wurden, wurden vor dem Einfrieren mit einer sterilen Schere in Stücke geschnitten. Vor der Extraktion wurden sie dann in sterile Schraubröhrchen mit Beads aus dem PowerWater DNA Bead Tube überführt, PW1-Puffer (1 ml) hinzugefügt und in der FastPrep-24 5G (MP Biomedicals) in 2 Zyklen, jeweils 40 s mit 6 m/s, mechanisch lysiert. Nach der Lyse wurden alle Schritte entsprechend dem Protokoll mit nachfolgenden Abweichungen durchgeführt: Bei der Elution wurden 50 µl Wasser in molekularbiologischer Qualität (statt dem mitgelieferten Elutionsbuffer) in die Mitte der weißen Filtermembran gegeben. Danach wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei  $13.000 \times g$  für 1 Minute zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt, so dass am Ende insgesamt 100 µl DNA-Extrakt eluiert wurde.

Bei den Proben von den Oberflächengewässerstellen an der Liesing und Schwechat (n = 20) wurde eine andere DNA-Extraktionsmethode verwendet. Diese Proben wurden durch Bead-Beating in Gegenwart von Phosphatpuffer, 10 % (w/v) SDS und Phenol extrahiert (Angel et al., 2012) (siehe Angel et al., 2020) für das vollständige Protokoll). Das Bead-Beating wurde zweimal wiederholt, um auch schwerer zu lysierende Zellen mechanisch aufzuschließen. Die Überstände aus jedem Schritt wurden gemischt und die Nukleinsäuren durch Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und Chloroform/Isoamylalkohol gereinigt. Die Nukleinsäuren wurden mit 20 prozentigem (w/v) Polyethylenglykol ausgefällt, in eiskaltem 75 prozentigem (v/v) Ethanol gewaschen und in sterilem 10 mM TRIS-Puffer resuspendiert.

Der Belebtschlamm und der Biofilm wurden standardmäßig zentrifugiert und der Überstand vor dem Einfrieren entfernt. Vor der Extraktion wurde das gefrorene Pellet in Puffer aus dem PowerBead Tube des Kits durch Auf- und Abpipettieren aufgelöst und in dieses Röhrchen überführt. Lösung C1 (60 µl) wurde zugegeben und die Proben wurden in der FastPrep-24 5G

(MP Biomedicals) in 2 Zyklen, je 40 s mit 6 m/s, mechanisch lysiert. Nach der Lyse wurden alle Schritte entsprechend des Protokolls durchgeführt.

Traten anderweitige Abweichungen bei der DNA-Extraktion auf, wie dies beispielsweise bei den methodischen Versuchen mit Kläranlagenproben (Kapitel 2.5) teilweise der Fall war, wird auf diese im entsprechenden Kapitel näher eingegangen.

Die aus Zulauf, Ablauf, Schlamm und Oberflächengewässer extrahierte DNA wurde durch spektrophotometrische Messung mit der  $\mu$ Küvette am Eppendorf BioSpectrometer® fluorescence quantifiziert (A260) und auf ihre Qualität hin überprüft (Verhältnisse A260/A280, A260/A230). Für ausgewählte Proben (z. B. für die Sequenzierung) wurde die DNA-Konzentration zusätzlich auch durch eine sensitivere und generell weniger fehleranfällige Methode mittels Fluoreszenz mit dem Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Invitrogen) bestimmt.

## 2.4 Auswahl der untersuchten Antibiotikaresistenzgene

Die quantitative Bestimmung der Antibiotikaresistenzgene (ARGs) erfolgte in erster Linie mittels TaqMan qPCR (s. Kapitel 2.8). Hierfür wurden exemplarisch sieben ARGs herangezogen: *sul1*, *ermB*, *vanA*, *tet(W)*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *aph(3')-IIa* (oft auch als „*npt2*“ bezeichnet) und *aph(3')-IIIa* (oft auch als „*npt3*“ bezeichnet). Diese wurden zu Beginn des Projekts nach den folgenden Kriterien sorgfältig ausgewählt:

- a. Toleranz gegenüber kritisch wichtigen (z. B. Aminoglykoside, Glykopeptide, Makrolide, Penicilline) und sehr wichtigen (z. B. Sulfonamide, Tetracycline) Antibiotika für die Human- und Veterinärmedizin (Pärnänen et al., 2019; Pazda et al., 2019; Scott et al., 2019; WHO, 2019b).
- b. Antibiotikaeinsatz in der Tierhaltung und Veterinärmedizin in Österreich (Fuchs and Fuchs, 2021).
- c. In der einschlägigen wissenschaftlichen Literatur berichtete Prävalenz in der Umwelt, besonders im Abwasser (Pärnänen et al., 2019; Pazda et al., 2019).

Sie vermitteln Resistenz gegen 6 verschiedene Antibiotikaklassen (Sulfonamide, Makrolide, Glycopeptide, Aminoglykoside,  $\beta$ -Lactame, Tetracycline), die von großer Bedeutung für Human- und Veterinärmedizin sind (Stedtfeld et al., 2018).

Die ausgewählten ARGs repräsentieren 4 verschiedene Resistenzmechanismen: Inaktivierung des Antibiotikums (*bla<sub>TEM-1</sub>*, *npt2*, *npt3*), Ribosomenschutz (*tet(W)*), Ersatz des zellulären Ziels (*sul1*), Modifikation des zellulären Targets (*ermB*, *vanA*) (Muziasari et al., 2016).

Ausgewählte Proben wurden zudem mittels Hochdurchsatz-Gen-Profiling (Resistomap Oy, Finnland) auf bis zu 95 ARGs hin untersucht, um einen umfassenden Überblick über das Spektrum der in der Umwelt vorhandenen ARGs zu bekommen.

## 2.5 Methodische Experimente

In einem ersten Schritt wurden die Prozesse definiert, die bei der molekularbiologischen Analyse größere Abweichungen verursachen können: (i) Entnahme von Stich- oder Mischproben mit unterschiedlicher Zeitintegration, (ii) Lagerungsbedingungen der Proben und (iii) unterschiedliche Probenvorbehandlungen. Um diese möglichen Unterschiede zu bewerten und um die bestmögliche Methode für die Bearbeitung des vorliegenden Projekts zu finden, wurden mehrere methodische Experimente geplant und durchgeführt. Dabei wurden im Detail die Auswirkungen der folgenden Prozesse auf resultierende DNA-Konzentrationen und die Quantifizierung mittels qPCR von 16S rRNA Gen sowie *sul1* und *ermB* als Beispiele für ARGs betrachtet:

- (i) Abwasserprobenahme (Zu- und Ablauf): Stichprobe, Tagesmischprobe (TMP, 24 Std.), Wochenmischprobe (WMP, 7 T.)
- (ii) Lagerungsbedingungen der Proben (Zu- und Ablauf): 0, 1, 2, 3, 7 und 14 Tage bei 4 °C
- (iii) Probenprozessierung (Zu-, Ablauf und Belebtschlamm)
  - Unterschiedliche Probenvorbehandlungen
    - Homogenisierung/Probenaufschluss (9.500 rpm, 20.500 rpm, Ultraschallbehandlung)
    - Zugabe von SDS & Proteinase K
  - Unterschiedliche Methoden der Aufkonzentrierung: Filtration (unterschiedliche Filter und Filterkombinationen), Zentrifugation (mit unterschiedlichen Volumina)
  - Sofortige DNA-Extraktion vs. Filterlagerung
  - Verschiedene Zellyse-Methoden im Zuge der DNA-Extraktionen (Vortex, Bead-beating)

Die methodischen Arbeiten sollen dabei zentral die für die quantitativen Aussagen herangezogenen Methoden von der Probenahme bis zum Zahlenwert hin evaluieren, um entsprechend solide und valide Ergebnisse zu erhalten. In Abbildung 1 sind die einzelnen Aspekte des methodischen Ansatzes zusammengefasst.

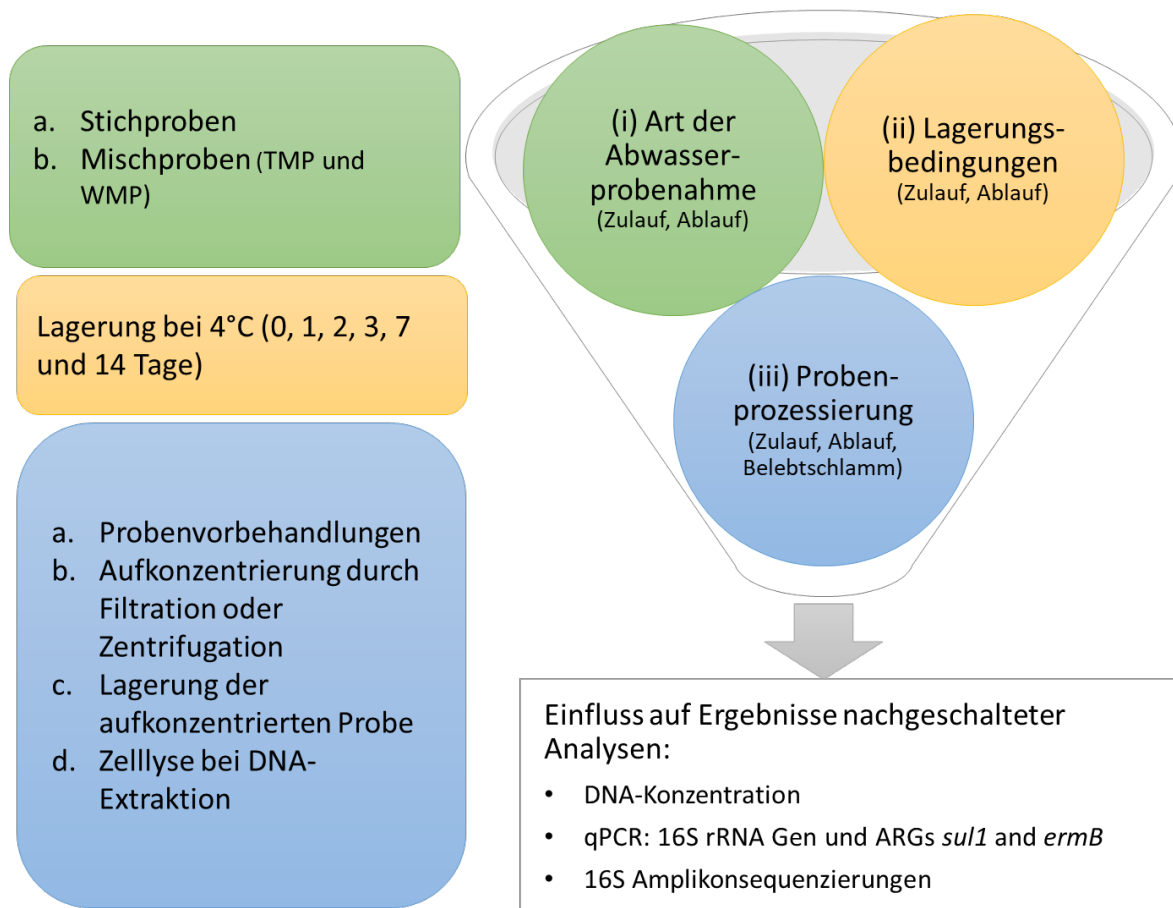


Abbildung 1: Überblick über die einzelnen Aspekte der methodischen Untersuchungen.

### 2.5.1 Verwendete Kläranlagenproben für die methodischen Experimente

Die meisten durchgeführten methodischen Untersuchungen erfolgten mit Proben von Kläranlagenzu- und/oder -ablauf. Bei einigen Versuchen zu den Lagerungsbedingungen der Proben (ii) und den unterschiedlichen Probenvorbehandlung (iii) wurde zusätzlich auch Belebtschlamm herangezogen.

Für die methodischen Experimente wurden Proben von zwei österreichischen kommunalen Kläranlagen verwendet. Eine Zusammenstellung aller im Rahmen dieses Projektes beprobten Kläranlagen findet sich in Tabelle 1 (s. Kapitel 2.1). Am 04.09.2019 wurden von KA6 je 1 Probe von Zulauf, Ablauf und Belebtschlamm für Vorversuche zur Auswirkung von Lagerungsbedingungen der Proben (ii) und unterschiedlichen Probenvorbehandlung (iii) genommen. Der Schwebstoffgehalt der Ablaufprobe lag bei 2 mg/l. Im Jänner 2020 wurden nochmals Proben von KA6 (Zu- und Ablauf) für intensive methodische Versuche zur

Auswirkung der Abwasserprobenahme (i) sowie der Probenlagerung (ii) entnommen. Für die Versuche zur Auswirkung der Abwasserprobenahme wurden jeweils drei TMP (23.01.2020), drei Stichproben (28.01.2020) und drei WMP (22. - 28.01.2020) von Zu- und Ablauf genommen. Für die Versuche zur Probenlagerung (ii) wurde der Zu- und Ablauf der gleichen Kläranlage am 22.01.2020 beprobt (n = 2). Für den Zulauf wurde ein Probenvolumen von 5,0 l und für den Ablauf von 1,0 l genommen. Außerdem wurden im Dezember 2019 (04.12.2019) Probenahmen an der KA20 durchgeführt, um zusätzliche Untersuchungen mit verschiedenen Lagerungsbedingungen der Proben (ii) und Probenvorbehandlungen (iii) vorzunehmen. Hierbei wurde je 1 Zu-, Ablauf- und Belebtschlammprobe genommen und für Amplikonsequenzierungen des 16S rRNA Gens verwendet (n = 18).

## 2.5.2 Auswirkungen des Probenahmeverfahrens (i)

In einem ersten methodischen Experiment wurde der Einfluss unterschiedlicher Probenahmeverfahren von Zu- und Ablauf der Kläranlage 6 hingehend auf DNA-, 16S rRNA Gen- und exemplarische ARGs-Konzentrationen hin untersucht. Dabei wurden Stichproben, Tagesmischproben (TMP; 24 Stunden) und Wochenmischproben (WMP; 7 Tage) genommen (n = 17) und miteinander verglichen. Es wurden jeweils 3 biologische Replikate pro Probenart genommen (ausgenommen Stichprobe-Ablauf: 2 Replikate, siehe Tabelle 3). Die Proben wurden dann entsprechend des normalen Arbeitsablaufs verarbeitet und molekularbiologisch untersucht: Nach der Filtration wurde die DNA-Extraktion durchgeführt und die DNA (Qualität und Konzentration) spektrophotometrisch gemessen. Anschließend wurde mittels qPCR TaqMan assays das 16S rRNA Gen und die ARGs (*ermB* und *sul1*) quantitativ gemessen. Zusätzlich wurden eine TMP und eine WMP des Zulaufs exemplarisch mittels Hochdurchsatz-Gen-Profilings untersucht, um die Auswirkungen der Abwasserprobenahme auf diese Art der Analyse zu evaluieren. Dabei wurden 71 ARGs untersucht, die in Tabelle 21 zusammengefasst sind.

Tabelle 3: Untersuchte Proben im methodischen Versuch zur Art der Abwasserprobenahme.

Probenbezeichnung	Probenart	Replikate
Stichprobe-Zulauf	Stichprobe	3
TMP-Zulauf	TMP (24 Stunden)	3
WMP-Zulauf	WMP (7 Tage)	3
Stichprobe-Ablauf	Stichprobe	2

TMP-Ablauf	TMP (24 Stunden)	3
WMP-Ablauf	WMP (7 Tage)	3

### 2.5.3 Auswirkung der Probenlagerung bei 4 °C (ii)

Ein weiteres methodisches Experiment beschäftigte sich mit dem Einfluss der Probenlagerung auf die Ergebnisse molekularbiologischer Analysen. Für einen Vorversuch wurden hierfür am 04.09.2019 von KA6 je 1 Probe von Zulauf, Ablauf und Belebtschlamm entnommen. Diese Proben wurden vor der Aufkonzentrierung 48 Stunden bei 4 °C gelagert, um zu sehen, ob die Lagerung Auswirkungen auf DNA-, 16S rRNA Gen- und ARG-Konzentrationen hat (Tabelle 4). Die Aufkonzentrierung der Proben erfolgte dabei mit 0,45 µm-Filtern (Zulauf 40 ml und Ablauf 400 ml) bzw. Zentrifugation bei 5.000 × g für 10 Minuten (Belebtschlamm). Anschließend wurden die Proben entsprechend des normalen Arbeitsablaufs weiterprozessiert.

Tabelle 4: Untersuchte Proben im Vorversuch zur Lagerdauer bei 4 °C für 48 Stunden (KA6).

Probenbezeichnung	Probenart	Lagerdauer bei 4 °C [Tage]	Replikate
ZU (o. L.)	ARA-Zulauf	0	1
ZU (m. L.)	ARA-Zulauf	2	1
AB (o. L.)	ARA-Ablauf	0	1
AB (m. L.)	ARA-Ablauf	2	1
BS (o. L.)	Belebtschlamm	0	1
BS (m. L.)	Belebtschlamm	2	1

Um ein umfassenderes Bild über die Auswirkungen der Probenlagerung zu bekommen, wurden von der KA6 im Jänner 2020 erneut der Zu- und Ablauf beprobt. Diese Proben wurden über 14 Tage bei 4 °C gelagert, um die Auswirkungen einer längeren Lagerdauer auf DNA-, 16S rRNA Gen und ARG-Konzentrationen zu evaluieren. Jeweils nach 0, 1, 2, 3, 7 und 14 Tagen Lagerung bei 4 °C wurden 2 biologische Replikate pro Zeitpunkt entsprechend des normalen Arbeitsablaufs filtriert und anschließend die DNA extrahiert (Tabelle 5). Die extrahierte DNA wurde in jeweils 2 technischen Replikaten gemessen. Anschließend wurde das 16S rRNA-Gen und die ARGs *sul1* und *ermB* mittels qPCR gemessen. Es wurden auch Aliquots von selbigen Proben zum Vergleich bei Raumtemperatur gelagert, filtriert und eingefroren. Da man für



nachfolgende Analysen wie generell üblich jedoch grundsätzlich Proben untersuchte, die bei 4 °C gelagert wurden, wurden diese Filter nicht weiter analysiert, da sie für das vorliegende Projekt nicht relevant waren. Außerdem wurden im Dezember 2019 weitere Lagerungsversuche über 7 Tage mit Proben der KA20 (Ablauf, Zulauf, Belebtschlamm) durchgeführt und mittels Amplikonsequenzierung (16S rRNA Gen) analysiert. Zu- und Ablauf wurden zusätzlich auch nach 3 Tagen Lagerung beprobt. Daten zu ARGs wurden im Rahmen dieses Versuches allerdings nicht erhoben, weshalb die Ergebnisse hieraus in diesem Bericht nicht dargestellt sind.

Tabelle 5: Lagerdauer von Zu- und Ablaufproben über 14 Tage bei 4 °C (KA6).

Probenbezeichnung	Lagerdauer bei 4 °C [Tage]	Replikate
T0_Zulauf	0	2
T1_Zulauf	1	2
T2_Zulauf	2	2
T3_Zulauf	3	2
T7_Zulauf	7	2
T14_Zulauf	14	2
T0_Ablauf	0	2
T1_Ablauf	1	2
T2_Ablauf	2	2
T3_Ablauf	3	1
T7_Ablauf	7	2
T14_Ablauf	14	2

#### 2.5.4 Auswirkungen unterschiedlicher Probenprozessierung (iii)

In weiteren methodischen Experimenten wurden die Auswirkungen auf Zu-, Ablauf- und Belebtschlamm-Proben bei unterschiedlicher Probenprozessierung auf daraus resultierenden DNA-, 16S rRNA Gen- und ARG-Konzentrationen einer Kläranlage (KA6) untersucht: (a.) Bei einem Teil der gesammelten Proben wurden die Proben unterschiedlich vorbehandelt, (b) in einem weiteren Schritt wurden für die Proben unterschiedliche Methoden der

Aufkonzentrierung gewählt. (c) Anschließend wurden die aufkonzentrierten Proben auf verschiedene Arten bis zur DNA-Extraktion gelagert. (d) Bei der DNA-Extraktion wurden unterschiedliche Methoden für die Zellyse gewählt. Die untersuchten Permutationen bzw. Änderungen gegenüber dem normalen Arbeitsablauf sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Die DNA-Konzentrationen von allen Extrakten wurde photometrisch gemessen und anschließend wurden das 16S rRNA Gen, sowie die ARGs *sul1* und *ermB* quantitativ mittels qPCR gemessen. Davor wurde mit Proben von KA20 ein Vorexperiment zur Evaluierung unterschiedlicher Probenprozessierungen gemacht, wo die Zusammensetzungen der bakteriellen Gemeinschaften mittels Amplikonsequenzierung (16S rRNA Gen) analysiert wurden. Da hierfür keine ARG-Untersuchungen gemacht wurden, sind diese Daten im gegenständlichen Bericht nicht enthalten.

Tabelle 6: Unterschiedliche Probenprozessierungen von Zu-, Ablauf- und Belebtschlammproben (KA6).

Probenprozessierung	Zulauf Kläranlage	Belebtschlamm	Ablauf Kläranlage	Replikate pro Probe
a.) Probenvorbehandlungen				
keine Vorbehandlung*	x	x	x	
Homogenisierung 9.500 rpm, 2 min	x	x	-	1
Homogenisierung 20.500 rpm, 15 sek.	x	x	-	1
Ultraschall 30 min, 50 °C	x	x	-	1
SDS + Proteinase K 30 min, 50 °C	x	x	-	1
b.) Aufkonzentrierung durch Filtration oder Zentrifugation				
0,45 µm Filter	x	x	x	1
0,22 µm Filter	-	-	x	1
Kombinierte Filtration (0,22 µm über 0,45 µm)	-	-	x	1
Zentrifugation	x (8.000 × g, 10 min)	x (5.000 × g, 10 min)	-	1

c.) Lagerung der aufkonzentrierten Probe				
Sofortige Extraktion	x	x	x	
Filter-/Pelletlagerung, - 80 °C, 48 Std.	<b>x*</b>	<b>x*</b>	<b>x*</b>	
d.) Zellyse bei DNA-Extraktion				
FastPrep 6 m/s, 40 s x 4	x	x	x	1
FastPrep 4 m/s, 40 s x 2	<b>x</b>	<b>x</b>	<b>x</b>	1
FastPrep 4m/s, 40s x 4	x	x	x	1
Vortex, max (8.000 rpm), 30 min	x	x	x	1

**x** (in fetter Schriftart) markiert die üblicherweise im aufarbeitenden Labor (TU Wien) verwendete Methodik. \* Außerhalb der methodischen Versuche wurden die Proben oftmals auch länger als 48 Stunden bei - 20 °C oder - 80 °C gelagert.

## 2.6 Monitoring von Kläranlagen und Oberflächengewässern

Nach dem methodischen Teil des Projektes folgte die Untersuchung und Überwachung von 19 verschiedenen Kläranlagen und 26 Oberflächengewässern in Österreich auf das Vorkommen von Antibiotikaresistenzgenen (ARGs) mit verschiedenen molekularbiologischen Methoden. Zum einen wurden sieben ausgewählte ARGs (*sul1*, *ermB*, *vanA*, *tetW*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *npt2* und *npt3*) mittels qPCR quantifiziert. Zum anderen wurden einige Proben zusätzlich mittels Hochdurchsatz-Gen-Profilings (SmartChip-Analysen) untersucht, um einen umfassenderen Überblick über das Vorhandensein und die Abundanz von Antibiotikaresistenzgenen (ARGs), Integrons und mobilen genetischen Elementen (MGEs) zu bekommen. Es wurden Kläranlagen und Oberflächengewässer aus verschiedenen Teilen Österreichs ausgewählt, um einen möglichst guten räumlichen Überblick bezüglich der Hintergrundbelastung von Abwässern und Oberflächengewässern mit ARGs in Österreich zu bekommen (s. Tabelle 1, Tabelle 2). Daneben wurden an ausgewählten Kläranlagen und Oberflächen-gewässerstellen zusätzlich zeitlich hochaufgelöste Untersuchungen vorgenommen, um einen genaueren Einblick in die zeitliche Dynamik hinsichtlich der ARGs zu bekommen. Im Detail wurden folgende Untersuchungen vorgenommen:

- Räumliche Untersuchung von Antibiotikaresistenzen in Zuläufen und Abläufen verschiedener österreichischer Kläranlagen (n = 19) → s. 2.6.1
  - Analyse von Proben aus dem Zu- und Ablauf 9 verschiedener Kläranlagen im Jahr 2019 (n = 18) mittels qPCR und durch Hochdurchsatz-Gen-Profilings. Außerdem gab es noch unterstützende Analysen: Amplikonsequenzierungen des 16S rRNA Gens

- (Zuläufe n = 13; Abläufe n = 13) und chemische Analyse von Antibiotika (Zuläufe n = 9; Abläufe n = 9)
- Untersuchung der Kläranlagenzu- und -abläufe vom Sommer 2021, größtenteils aus der gleichen Serie wie 2019 (n = 10) mittels qPCR (n = 5) und durch Hochdurchsatz-Gen-Profilings (n = 6)
  - Analyse von Proben aus Zuläufen verschiedener Kläranlagen im April/Mai 2020 (n = 16) mittels qPCR
  - Zeitlich höher aufgelöstes Monitoring ausgewählter Kläranlagen in Österreich mittels qPCR → s. 2.6.2
    - Einjähriges Monitoring einer ausgewählten Kläranlage (KA6) mit Probenahme alle 1 bis 3 Monate, Ablauf und Zulauf (n = 12)
    - Intensive Überwachung einer ausgewählten Kläranlage (KA9) mit wöchentlicher Probenahme von Dezember 2020 bis März 2021 (n = 16)
    - Einjähriges Monitoring einer ausgewählten Kläranlage (KA9) mit monatlicher Probenahme des Zulaufes (n = 12)
  - Untersuchung verschiedener österreichischer Oberflächengewässer 2.6.3 und 2.6.4
    - Analyse von Proben aus verschiedenen Oberflächengewässern von August 2019 (n=8) mittels qPCR und teilweise zusätzlich durch Hochdurchsatz-Gen-Profilings (n = 4) sowie unterstützende Analysen: Amplikonsequenzierung des 16S rRNA Gens (n = 8) und chemische Analyse von Antibiotika (n = 8)
    - Wiederholte Untersuchung von Proben der Oberflächengewässer Wulka und Raab von September 2021 mittels Hochdurchsatz-Gen-Profilings (n = 2)
    - Analyse von Proben von verschiedenen Stadtgewässern in Wien von August 2020 (n = 7) mittels qPCR
  - Zeitlich höher aufgelöstes Monitoring ausgewählter Oberflächengewässer in Österreich → s. 2.6.4
    - Monatliches Monitoring einer Probenahmestelle der Alten Donau von 2018 bis 2020 (n = 24) mittels qPCR
    - Analyse von Proben im Jahreszeitenvergleich (Sommer/Winter) von zwei verschiedenen Oberflächengewässern aus dem Jahr 2021 (n = 20) mittels qPCR und zusätzlich Hochdurchsatz-Gen-Profilings von Biofilm-Proben einiger dieser Stellen (n = 10)

### 2.6.1 Räumliche Untersuchung österreichischer Kläranlagen

Im Juli und August 2019 wurden wöchentliche Mischproben (WMP) von Zu- und Abläufen von neun verschiedenen Kläranlagen in Österreich gesammelt. Bei der Probenahme wurden

Synergien mit dem vom BMLRT - Sektion Wasser geförderten und vom Umweltbundesamt Wien und der TU-Wien durchgeführten Projekt "Untersuchung von Abwässern und Gewässern auf unterschiedliche toxikologische Endpunkte" genutzt. Für sechs der Kläranlagen aus diesem Monitoringprogramm erfolgte eine weitere Probenahme im Jahr 2021. Hierbei wurden Tagesmischproben (TMP) genommen und filtriert. Im weiteren Verlauf wurden die Proben von fünf dieser Anlagen extrahiert und (teilweise) in die weiteren Analysen inkludiert. Nach der Filtration und DNA-Extraktion wurden folgende Analysen durchgeführt: (i) qPCR von 16S rRNA Gen und sieben verschiedenen ARGs (*sul1*, *ermB*, *vanA*, *tetW*, *bla<sub>TEM-1</sub>* und *npt2* und *npt3*), (ii) Amplikonsequenzierungen des 16S rRNA Gens zur Bewertung der Zusammensetzung der jeweiligen Biozönose (für die Proben von 2019) und (iii) SmartChip für ARGs (von Resistomap Oy), ein qPCR-Array für eine große Anzahl von ARGs, der einen Überblick über die ARGs in den Proben ermöglicht. Die Kläranlagenproben (n = 18) aus dem Jahr 2019 wurden mittels dieser Technologie auf 71 ARGs hin untersucht, die ausgewählten Proben aus dem Sommer/Herbst 2021 in einer separaten Analyse auf 95 ARGs hin. Außerdem wurden für diese Proben aus dem Jahr 2019 chemische Analysen für 20 verschiedene Antibiotika durchgeführt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Beprobung verschiedener österreichischer Kläranlagen.

(Monitoringprogramme 2019 und 2021, n = 28, je 14 Zulauf- und 14 Ablaufproben)

Kläranlagen-bezeichnung	Probenahmestellen	Probenahmezeitraum 1 (WMPs)	Probenahmedatum 2 (TMPs)
Kläranlage 1	Zulauf, Ablauf	29.07. - 04.08.2019	11.08.2021
Kläranlage 2	Zulauf, Ablauf	29.07. - 04.08.2019	n.v.
Kläranlage 3	Zulauf, Ablauf	05.08. - 12.08.2019	n.v.
Kläranlage 4	Zulauf, Ablauf	29.07. - 04.08.2019	n.v.
Kläranlage 5	Zulauf, Ablauf	19.07. - 26.07.2019	20.09.2021 <sup>3*</sup>
Kläranlage 6	Zulauf, Ablauf	05.08. - 11.08.2019	21.09.2021 <sup>1*</sup>
Kläranlage 7	Zulauf, Ablauf	12.08. - 19.08.2019	n.v.
Kläranlage 8	Zulauf, Ablauf	18.07. - 25.07.2019	21.09.2021 <sup>3*</sup>
Kläranlage 9	Zulauf, Ablauf	08.08. - 15.08.2019	11.08.2021 <sup>2</sup>

WMP, Wochenmischprobe; TMP, Tagesmischprobe; n.v., nicht verfügbar; <sup>1</sup> nur 16S rRNA Gen und *sul1* analysiert; <sup>2</sup> nur 16S rRNA Gen, *sul1* und *ermB* analysiert; <sup>3</sup> Hochdurchsatz-Gen-Profilung (keine qPCR-Daten); Aufarbeitung der Proben nach Standard-Arbeitsablauf, \* Abweichung: vortex (5 min) statt FastPrep (6 m/s, 40s x 2) bei der DNA-Extraktion.

Darüber hinaus wurden im April/Mai 2020 Zulaufproben (TMP) von 16 verschiedenen Kläranlagen in ganz Österreich gesammelt. Nach Filtration und DNA-Extraktion der Proben wurden sie mittels qPCR-Analysen auf sieben verschiedene ARGs (*sul1*, *ermB*, *vanA*, *tetW*, *npt2*, *npt3* und *bla<sub>TEM-1</sub>*) hin untersucht (Tabelle 8).

Tabelle 8: Beprobung verschiedener österreichischer Kläranlagen Zuläufe.  
(April/Mai 2020, n = 16)

Kläranlagenbezeichnung	Probenahmestelle	Probenahmedatum	Probenart
Kläranlage 2	Zulauf	11.05.2020	TMP
Kläranlage 4	Zulauf	29.04.2020	TMP
Kläranlage 5	Zulauf	22.04.2020	TMP
Kläranlage 6	Zulauf	03.05.2020	TMP
Kläranlage 8	Zulauf	22.04.2020	TMP
Kläranlage 9	Zulauf	04.05.2020	TMP
Kläranlage 10	Zulauf	11.05.2020	TMP
Kläranlage 11	Zulauf	11.05.2020	TMP
Kläranlage 12	Zulauf	27.04.2020	TMP
Kläranlage 13	Zulauf	27.04.2020	TMP
Kläranlage 14	Zulauf	04.05.2020	TMP
Kläranlage 15	Zulauf	27.04.2020	TMP
Kläranlage 16	Zulauf	27.04.2020	TMP
Kläranlage 17	Zulauf	10.04.2020	TMP
Kläranlage 18	Zulauf	27.04.2020	TMP
Kläranlage 19	Zulauf	27.04.2020	TMP

TMP, Tagesmischprobe.

## 2.6.2 Zeitlich hochaufgelöstes Monitoring ausgewählter Kläranlagen

Die Kläranlage 6 und die Kläranlage 9 wurden für ein zeitlich hochaufgelöstes Monitoring ausgewählt, um einen genaueren Einblick in die zeitliche Dynamik hinsichtlich der ARGs zu

bekommen. Dazu wurden von der Kläranlage 6 über ein Jahr (August 2019 bis Juli 2020) alle 1 bis 5 Monate wöchentliche Mischproben des Zu- und Ablaufes gesammelt (Tabelle 9). Weiters wurden von der Kläranlage 9 monatliche Zulaufproben über ein Jahr (Oktober 2020 – September 2021) untersucht (Tabelle 10). Zusätzlich wurden von derselben Kläranlage Tagesmischproben des Zulaufs alle 1 - 2 Wochen im Zeitraum von Dezember 2020 bis März 2021 entnommen (Tabelle 11). Nach Filtration und DNA-Extraktion der Proben wurden sie mittels qPCR-Analysen auf sieben verschiedene ARGs (*sul1*, *ermB*, *vanA*, *tetW*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *npt2* und *npt3*) hin untersucht.

Tabelle 9: Monitoring von Kläranlage 6 über 1 Jahr.  
(August 2019 – Juli 2020, n = 6)

Kläranlagenbezeichnung	Probenahmestelle	Probenahmezeitraum	Probenart
Kläranlage 6	Zulauf, Ablauf	05.08. - 11.08.2019	WMP
Kläranlage 6	Zulauf, Ablauf	03.09. - 04.09.2019	TMP
Kläranlage 6	Zulauf, Ablauf	21.01. - 28.01.2020	WMP
Kläranlage 6	Zulauf, Ablauf	26.02. - 03.03.2020	WMP
Kläranlage 6	Zulauf, Ablauf	02.04. - 08.04.2020	WMP
Kläranlage 6	Zulauf, Ablauf	23.07. - 29.07.2020	WMP

TMP, Tagesmischprobe; WMP, Wochenmischprobe.

Tabelle 10: Monatliches Monitoring des Zulaufs von Kläranlage 9 über 1 Jahr.  
(Oktober 2020 – September 2021, n = 11)

Kläranlage	Probenahmestelle	Probenahmedatum	Probenart
Kläranlage 9	Zulauf	18.10.2020	TMP
Kläranlage 9	Zulauf	15.11.2020	TMP
Kläranlage 9	Zulauf	10.12.2020	TMP
Kläranlage 9	Zulauf	11.01.2021	TMP
Kläranlage 9	Zulauf	09.02.2021	TMP
Kläranlage 9	Zulauf	14.03.2021	TMP

Kläranlage 9	Zulauf	14.04.2021	TMP
Kläranlage 9	Zulauf	19.05.2021	TMP
Kläranlage 9	Zulauf	13.06.2021	TMP
Kläranlage 9	Zulauf	13.07.2021	TMP
Kläranlage 9	Zulauf	09.09.2021	TMP

TMP, Tagesmischprobe.

Tabelle 11: Wöchentliches Monitoring des Zulaufs von Kläranlage 9.  
(Dezember - März 2020, n = 16)

Kläranlagenbezeichnung	Probenahmestelle	Probenahmedatum	Probenart
Kläranlage 9	Zulauf	01.12.2020	TMP
Kläranlage 9	Zulauf	10.12.2020	TMP
Kläranlage 9	Zulauf	24.12.2020	TMP
Kläranlage 9	Zulauf	27.12.2020	TMP
Kläranlage 9	Zulauf	31.12.2020	TMP
Kläranlage 9	Zulauf	03.01.2021	TMP
Kläranlage 9	Zulauf	11.01.2021	TMP
Kläranlage 9	Zulauf	19.01.2021	TMP
Kläranlage 9	Zulauf	25.01.2021	TMP
Kläranlage 9	Zulauf	02.02.2021	TMP
Kläranlage 9	Zulauf	09.02.2021	TMP
Kläranlage 9	Zulauf	16.02.2021	TMP
Kläranlage 9	Zulauf	28.02.2021	TMP
Kläranlage 9	Zulauf	07.03.2021	TMP
Kläranlage 9	Zulauf	14.03.2021	TMP
Kläranlage 9	Zulauf	21.03.2021	TMP

TMP, Tagesmischprobe.



### 2.6.3 Räumliche Untersuchung österreichischer Oberflächengewässer

Im August 2019 wurden Stichproben von acht verschiedenen Oberflächengewässern in ganz Österreich gesammelt. Bei der Probenahme wurden wie bereits bei den untersuchten Kläranlagen (2.6.1) Synergien mit dem vom BMRLT - Sektion Wasser geförderten und vom Umweltbundesamt Wien und der TU-Wien durchgeführten Projekt "Untersuchung von Abwässern und Gewässern auf unterschiedliche toxikologische Endpunkte" genutzt. Nach der DNA-Extraktion der Proben wurde die Konzentration ausgewählter ARGs (*sul1*, *ermB*, *vanA*, *tetW*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *npt2* und *npt3*) mittels qPCR bestimmt. Später wurden für ausgewählte Proben (n = 6) weitere Analysen durchgeführt: Amplikon-Sequenzierungen (16S rRNA Gen) zur Untersuchung der Zusammensetzung der jeweiligen Biozöosen und Hochdurchsatz-Gen-Profilings für ARGs (von Resistomap Oy), ein qPCR-Array für eine große Anzahl von ARGs, was einen Überblick über die ARGs in den Proben ermöglicht. Die Proben wurden mittels dieser Technologie auf 71 ARGs hin untersucht (gemeinsam mit den 9 Kläranlagenproben aus dem Monitoring 2019). 2021 wurden zwei dieser OFG erneut beprobt (Wulka und Raab), die ebenfalls mittels Hochdurchsatz-Gen-Profilings auf 96 ARGs hin untersucht wurden. Außerdem wurden chemische Analysen für 20 Antibiotika durchgeführt (Tabelle 12).

Tabelle 12: Untersuchung ausgewählter Gewässer in Österreich.  
(Monitoringprogramme 2019 und 2021, n = 11)

Oberflächengewässer	Probenahmedatum 1	Probenahmedatum 2
Inn	27.08.2019 <sup>1,2</sup>	n.v.
Reichramingbach	27.08.2019 <sup>1,2</sup>	n.v.
Raab	16.08.2019 <sup>1,2</sup>	05.09.2021 <sup>2</sup>
Wulka	16.08.2019 <sup>1,2</sup>	11.08.2021 <sup>2</sup>
Erlauf	16.08.2019 <sup>1,2</sup>	n.v.
Antiesen	23.08.2019 <sup>1,2</sup>	n.v.
Donau	23.08.2019 <sup>1,2</sup>	n.v.
Dornbirner Ach	23.08.2019 <sup>1,2</sup>	21.09.2021 (n.a.)*

n.v., nicht verfügbar; n.a., nicht analysiert; <sup>1</sup>qPCR-Analysen vorhanden; <sup>2</sup>Hochdurchsatz-Gen-Profilings (keine qPCR-Daten); Aufarbeitung der Proben nach Standard-Arbeitsablauf, \*Abweichung: vortex (5 min) statt FastPrep (6 m/s, 40s x 2) bei der DNA-Extraktion.

Darüber hinaus wurden in Wien im Sommer 2020 (05.08.2020) Stichproben von sieben unterschiedliche Stadtgewässern genommen, um verschiedene ARGs (*sul1*, *ermB*, *vanA*, *tetW*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *npt2* und *npt3*) mittels qPCR zu untersuchen.

Tabelle 13: Untersuchung ausgewählter Stadtgewässer in Wien.  
(2020, n = 7)

Oberflächengewässer	Probenahmedatum
Alte Donau Ost	05.08.2020
Alte Donau West	05.08.2020
Wasserpark	05.08.2020
Heustadlwasser	05.08.2020
Stadtpark	05.08.2020
Neue Donau West	05.08.2020
Neue Donau Ost	05.08.2020

#### 2.6.4 Saisonales und zeitlich hochaufgelöstes Monitoring ausgewählter Oberflächengewässer

An einer ausgewählten Stelle der Alten Donau in Wien wurden über einen längeren Zeitraum monatlich Stichproben gezogen (Juni 2018 - Sept 2020) und mittels qPCR auf verschiedene ARGs (*sul1*, *ermB*, *vanA*, *tetW*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *npt2* und *npt3*) untersucht (Tabelle 14). Außerdem wurden von ausgewählten Stellen der Flüsse Schwechat und Liesing im Winter 2021 (07.01.2021) und im Sommer 2021 (11.08.2021) für ein saisonales Monitoring Stichproben genommen (Tabelle 15) und mittels qPCR auf die sieben ausgewählten ARGs untersucht. Von denselben Probenahmestellen wurden Biofilm-Proben auch mittels Hochdurchsatz-Gen-Profiling auf eine größere Anzahl von 95 ARGs (gemeinsam mit den Kläranlagenproben KA1, KA5, KA8, und den OFG von 2021) analysiert.

Tabelle 14: Zeitlich höher aufgelöste Beprobung der Alten Donau in Wien.  
Beprobung: Juni 2018 bis Sept 2020.

Monat	Probenahme 2018	Probenahme 2019	Probenahme 2020
01	-	08.01.2019	14.01.2020
02	-	05.02.2019	24.02.2020
03	-	05.03.2019	-
04	-	02.04.2019	-
05	-	07.05.2019	05.05.2020
06	12.06.2018	04.06.2019	09.06.2020
07	10.07.2018	09.07.2019	07.07.2020
08	07.08.2018	06.08.2019	-
09	11.09.2018	03.09.2019	-
10	16.10.2018	08.10.2019	-
11	13.11.2018	05.11.2019	-
12	11.12.2018	10.12.2019	-

Tabelle 15: Saisonales Monitoring von Schwechat und Liesing.  
Beprobung: Winter 2021 (07.01.2021) und Sommer 2021 (11.08.2021).

Oberflächengewässer	Jahreszeit	Probenahmestelle
Schwechat	Winter, Sommer	Mittelbereich – vor Kläranlage
Schwechat	Winter, Sommer	Mittelbereich – nach Kläranlage
Schwechat	Winter, Sommer	Unberührte Natur - Wald
Schwechat	Winter, Sommer	Unberührte Natur - Wiese
Schwechat	Winter, Sommer	Mittelbereich
Schwechat	Winter, Sommer	Besiedeltes Gebiet
Schwechat	Winter, Sommer	Wiener Becken
Liesing	Winter, Sommer	Unberührte Natur
Liesing	Winter, Sommer	Landwirtschaftlicher Einfluss
Liesing	Winter, Sommer	Vorstadt

## 2.7 Entfernung von ARGs durch weitergehende Abwasserbehandlung

Um die Reduktion von ARGs durch weitergehende Abwasserbehandlung systematisch zu evaluieren, wurden im Rahmen des EU-Projekts ANSWER (ANTibioticS and mobile resistance elements in WastEwater Reuse applications: risks and innovative solutions - Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 675530) Untersuchungen in einem Multibarrierensystem bestehend aus Ozonung und nachgeschalteter granulierter Aktivkohlestufe (GAK) durchgeführt, welche teilweise auch im Bericht des Forschungsprojektes KomOzAk II (Weitergehende Reinigung kommunaler Abwässer mit Ozon sowie Aktivkohle für die Entfernung organischer Spurenstoffe – Toxikologie und allgemeine Anwendbarkeit) enthalten sind (Krampe et al., 2020).

Die Untersuchungen im erwähnten Multibarrierensystem bestehend aus Ozonung und nachgeschalteter granulierter Aktivkohlestufe (GAK) erfolgten auf der Kläranlage 20. Eine detaillierte Beschreibung des Systems ist in den Endberichten der beiden Forschungsprojekte KomOzAk I (Kreuzinger et al., 2015) und KomOzAk II (Krampe et al., 2020) zu finden. Der mittlere CSB im Kläranlagenablauf lag bei 14,9 mg/l und der DOC bei 4,3 mg/l. Die Ozonung erfolgte in drei seriell betriebenen Ozonreaktoren (9 - 40 min Aufenthaltszeit, je nach Durchfluss) und einem granulierten Aktivkohledruckfilter mit 13,5 min Kontaktzeit. Die Ozondosisregelung basierte auf einem UV-DOC-Korrelationsmodell mittels Online-UV-Spektrometer. Die effektive spezifische Ozondosis (d.h. mit Nitritkompensation) lag zumeist zwischen 0,4 und 0,7 g O<sub>3</sub>/g DOC. Von Mai 2018 bis Mai 2019 erfolgten monatliche Routinebeprobungen im Ablauf der einzelnen Anlagenteile. Zusätzlich wurden zwei Tagesmesskampagnen durchgeführt, an denen die Ozondosis bei konstanter Abwassermatrix von 0,2 bis 0,9 g O<sub>3</sub>/g DOC (0,27 / 0,57 / 0,78 / 0,92) variiert wurde. Anschließend wurden in ausgewählten Proben 216 ARGs mittels Hochdurchsatz-Gen-Profilings (Resistomap Oy, Finnland) bestimmt.

Die Untersuchungen zur Reduktion von Antibiotikaresistenzen bei der Membranfiltration sollte anhand eines Projektes gezeigt werden, bei dem der Rückhalt von freier extrazellulärer DNA für 10 unterschiedliche Membrantypen mit einem MWCO zwischen 0,3 µm und 150 Da (Mikrofiltration bis Umkehrosmose) in destilliertem Wasser und vorfiltriertem Kläranlagenablauf (0,3 µm) evaluiert wurde. Dabei sollten die Fragestellungen geklärt werden, ob (i) die Kläranlagenmatrix den Rückhalt freier extrazellulärer DNA beeinflusst, (ii) welchen Mechanismus der Siebeffekt durch den freie extrazelluläre DNA zurückgehalten wird, darstellt und (iii) wie Größe, Konformation und DNA Konzentration das Rückhaltevermögen der Membran beeinflussen. Der detaillierte Ablauf dieser Studie ist in Slipko et al., 2019 nachzulesen.

## 2.8 qPCR TaqMan Assays

Die qPCR TaqMan-Assays für die sieben ausgewählten ARGs (*sul1*, *ermB*, *vanA*, *tet(W)*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *npt2* und *npt3*) wurden von Ingenetix (Wien, Österreich) entwickelt und hergestellt. Die ARG-Konzentrationen wurden mittels TaqMan-qPCR in der DNA analysiert, die aus den gesammelten Proben extrahiert wurde. Daneben wurde auch das bakterielle 16S ribosomale RNA Gen mit einem von Ingenetix (Wien, Österreich) entwickelten qPCR TaqMan assay quantifiziert. Die 16S rRNA ist eine Komponente der 30S Untereinheit eines bakteriellen Ribosoms. Sie wird herangezogen, um die Gesamtheit aller Bakterien in den Proben zu bestimmen und damit die relativen ARG-Häufigkeiten berechnen zu können. Da die Zahl der 16S rRNA-Gene pro Zelle zwischen 1 - 15 Kopien variieren kann, ist ein direkter Rückschluss auf die Anzahl der vorhandenen Bakterien in der Probe nicht ohne weiteres möglich. Zudem erlaubt der molekularbiologische Nachweis des 16S rRNA Genfragments keine Aussage darüber, ob es von toten oder lebenden Bakterien stammt oder es sich um freie, extrazelluläre DNA handelt.

Die qPCR-Läufe wurden mittels Lightcycler 480 (Roche, Österreich) und Applied Biosystems QuantStudio™ 6 Pro Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific) durchgeführt. Für das Vorhandensein bakterieller DNA wird das bakterielle 16S ribosomale RNA Gen (16S rRNA Gen) mittels TaqMan qPCR in den Proben bestimmt. Der Wert des 16S rRNA Gens gibt die Anzahl an Genkopien dieses Amplikons an.

Die 10 µl qPCR-Reaktionsmischung (für Lightcycler 480 und QuantStudio 6 Pro) bestand aus 2,5 µl Wasser in molekularbiologischer Qualität, 0,5 µl des jeweiligen TaqMan Assays (Ingenetix, Österreich) mit den jeweils spezifischen Primern und fluoreszenzmarkierten Sonden, 5 µl Master Mix (für Lightcycler 480: LightCycler® 480 Probes Master von Roche; für QuantStudio 6 Pro: TaqMan Fast Advanced Mastermix (with UNG) und TaqMan Fast Advanced Mastermix (without UNG) von Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) und 2 µl DNA-Extrakt (ggf. verdünnt) bzw. zur Generierung der Standardkurve 2 µl des jeweiligen Quantifizierungsstandard (in verschiedenen Verdünnungen) bzw. im Falle der Negativkontrolle 2 µl Wasser in molekularbiologischer Qualität. Die verwendeten Sonden wurden in einer Endkonzentration von je 0,2 µM eingesetzt. Ein Überblick über die Markierungen der verwendeten Sonden ist in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: Markierung der Sonden für die verschiedenen Gene.

Gene	<i>sul1, vanA, tet(W), bla<sub>TEM-1</sub>, npt2</i>	<i>ermB, npt3</i>	16S rRNA Gen
Label (am 5' Ende)	FAM	Yakima Yellow	Cy5
Quencher (am 3' Ende)	TAMRA	BHQ-1	BHQ-2

Da im gesamten Projektzeitraum mehrere Personen an verschiedenen qPCR-Geräten und mit unterschiedlichen qPCR-Reagenzien gearbeitet haben, gab es unterschiedliche Temperatureinstellungen, die verwendet wurden. In den nachfolgenden Tabellen (Tabelle 17, Tabelle 18, Tabelle 19) sind diese Einstellungen für die damit analysierten Gene zusammengefasst.

Tabelle 17: Temperaturprotokoll der qPCR am LightCycler® 480 System (Roche).  
Projektzeitraum: 2019 – 2020.

Gen	16S rRNA Gen, <i>sul1, ermB</i>
<b>Mastermix</b>	LightCycler® 480 Probes Master
<b>Aktivierungsschritt</b>	1x 95 °C / 2 min
<b>Zyklus</b>	45x
- <b>Denaturierung</b>	95 °C / 5 s
- <b>Hybridisierung (Akquisition)</b>	60 °C / 1 min

Tabelle 18: Temperaturprotokoll der qPCR am LightCycler® 480 System (Roche).  
Projektzeitraum: 2021 – 2022.

Gen	16S rRNA Gen, <i>vanA, tetW, bla<sub>TEM-1</sub>, npt2</i> und <i>npt3</i>
<b>Mastermix</b>	LightCycler® 480 Probes Master
<b>Aktivierungsschritt</b>	1x 95 °C / 10 min
<b>Zyklus</b>	45x
- <b>Denaturierung</b>	95 °C / 10 s
- <b>Hybridisierung (Akquisition)</b>	60 °C / 30 s
- <b>Elongation</b>	72 °C / 10 s
<b>Abkühlung</b>	40 °C / 10 s

Tabelle 19: Temperaturprotokoll der qPCR am Applied Biosystems QuantStudio™ 6 Pro Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific). Projektzeitraum: 2021 – 2022.

Gene	16S rRNA Gen	<i>sul1, ermB, vanA</i>	<i>tetW</i>
<b>Mastermix</b>	TaqMan Fast Advanced Mastermix (mit UNG)	TaqMan Fast Advanced Mastermix (mit UNG)	TaqMan Fast Advanced Mastermix (ohne UNG)
<b>UNG Inkubation</b>	1x 50 °C / 2 min	1x 50 °C / 2 min	-
<b>Aktivierungsschritt</b>	95 °C / 20 s	95 °C / 2 min	1x95 °C / 2 min
<b>Zyklus</b>	45x	45x	45x
- <b>Denaturierung</b>	95 °C / 5 s	95 °C / 5 s	95 °C / 5 s
- <b>Hybridisierung (Akquisition)</b>	60 °C / 1 min	60 °C / 1 min	60 °C / 1 min

Alle qPCR-Reaktionen für das 16S rRNA Gen wurden in zwei technischen Replikaten durchgeführt, während alle qPCR-Reaktionen für die sieben ARGs in drei technischen Replikaten durchgeführt wurden. Für die Negativkontrolle wurde Wasser in molekularbiologischer Qualität als Template verwendet. Für die absolute Quantifizierung wurde eine logarithmische Verdünnungsreihe des jeweiligen Quantifizierungsstandards verwendet. Als Standard für die Quantifizierung des 16S rRNA Gens sowie der ARGs *sul1*, *ermB* und *vanA* wurden die einzelsträngigen Positivkontrollen von Ingenetix, Austria verwendet (je 10<sup>8</sup> Kopien/μl). Für alle qPCR-Messungen ab Juni 2022 wurden die Positivkontrollen neu quantifiziert (mittels digitaler PCR, dPCR). Wichen diese Quantifizierungen mehr als 10 % von den angegebenen Werten ab, wurde die Quantifizierung auf Basis der dPCR-Werte vorgenommen. Da es bei der dPCR-Quantifizierung des *vanA* Standards technische Probleme gab, die zu unplausiblen Werten führte, wurde die Quantifizierung dieses Standards auf Basis von fluorimetrischen Messungen mit dem Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Invitrogen, by Thermo Fisher Scientific) vorgenommen. Für die übrigen ARGs (*tetW*, *bla*<sub>TEM</sub>, *npt2* und *npt3*) wurden doppelsträngige DNA-Standards verwendet, die durch Amplifikation der einzelsträngigen Positivkontrollen von Ingenetix, Austria und anschließende Aufreinigung mittels der „AMPure XP Beads“ (Beckman Coulter, USA) Methode hergestellt wurden. Die Konzentration des aufgereinigten doppelsträngigen DNA-Quantifizierungsstandards wurde anschließend mit dem Qubit Fluorometer 2.0 und dem Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Österreich) laut Herstellerangaben gemessen. Anhand der Amplikongröße, Avogadro-Konstante und der durchschnittlichen Masse eines Basenpaars konnten die genauen Kopienzahlen ermittelt werden. Die Berechnung der Kopienzahl pro Mikroliter erfolgte nach Formel 1:

Formel 1: Berechnung der Kopienzahl pro Mikroliter

$$\frac{\text{Kopienzahl}}{\mu\text{L}} = \frac{\text{X ng} \times 6,0221 \times 10^{23} \text{ Moleküle/Mol}}{\left(\text{N} \times 660 \frac{\text{g}}{\text{Mol}} \times 1 \times \frac{10^9 \text{ ng}}{\text{g}}\right)}$$

X, Amplikon-Konzentration [ng/μL]; N, dsDNA/Amplikon-Länge (Basenpaare); Avogadro-Konstante:  $6,022 \times 10^{23}$  Moleküle/Mol; durchschnittliche molekulare Masse der doppelsträngigen DNA (Basenpaar): 660 g/Mol; Konversion zu Nanogramm:  $1 \times 10^9$  ng/g

Für die Standardkurve wurden meist jeweils Verdünnungen von  $10^8$  Genkopien/μl bis  $10^{-1}$  Genkopien/μl analysiert. Alle Standardkonzentrationen sowie Proben wurden in Duplikaten (für das 16S rRNA Gen) oder Triplikaten (für alle ARG-Targets) gemessen. Für das 16S rRNA Gen wurden die Proben dafür in der Regel in jeweils zumindest 2 Verdünnungsstufen (außer Kläranlagenproben von 2019 und Proben aus dem zeitlich aufgelösten Monitoring der Alten Donau; aufgrund von Mangel an Probenvolumen nur in einer Verdünnung gemessen) quantitativ mittels qPCR gemessen (unverdünnt, 1 : 5, 1 : 10, 1 : 25; abhängig von der jeweiligen Probe), um etwaige Inhibitionen zu entdecken. Wurden beim Vergleich der Messung zweier Verdünnungsstufen Inhibitionen festgestellt, wurde die jeweilige Probe nochmals in einer höheren Verdünnung gemessen. Dabei wurde Inhibition durch Berechnung eines Faktors ermittelt ( $\sqrt{\text{Verdünnungsfaktor}}$  zwischen den beiden Verdünnungen, z. B.  $\sqrt{5}$ , wenn die Probe unverdünnt und 1 : 5 gemessen wurde). Von den gemessenen CT-Werten wurden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung gebildet. Es wurden Differenzen zwischen den Mittelwerten der Replikate von den beiden Verdünnungen gebildet. Von diesen beiden Mittelwerten wurde die Differenz vom Faktor gebildet. Ergaben diese Werte  $> 0,5$  wurde dies als Inhibition zwischen den beiden Verdünnungen definiert. Diese Proben wurden nochmals höher verdünnt (z. B. 1 : 25) und das Prozedere wurde wiederholt. Die Messung der ARGs erfolgte dann in der geringsten Verdünnung, in der keine Inhibition auf die qPCR-Reaktion detektiert wurde.

Die qPCR-TaqMan-Assays wurden in Anlehnung an die PEI-Richtlinie (Paul-Ehrlich-Institut) für alle ausgewählten ARGs und das 16S rRNA Gen (Bustin et al., 2009) auf dem Lightcycler 480 (Roche, Österreich) und dem QuantStudio™ 6 Pro Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific) validiert. Es wurden semilogarithmische Verdünnungen der ssDNA bzw. dsDNA Standards hergestellt (0,51 – 1.000.000 Kopien/Assay, Lightcycler 480 - Messung 2019; 0,51 – 8.000 Kopien/Assay, Lightcycler 480 - Messung 2022; 1,56 – 4864 Kopien/Assay, QuantStudio™ 6 Pro Real-Time PCR System – Messung 2022). Die qPCR-Messung jeder Verdünnungsstufe wurde in acht (Lightcycler 480) bzw. sieben (QuantStudio™ 6 Pro Real-Time PCR System) Replikaten pro Lauf in drei unabhängigen PCR-Läufen durchgeführt. Es wurde eine statistische Analyse für die resultierenden 24 Datenpunkte pro Verdünnungsschritt durchgeführt und die Probit-Regressi-



onsanalyse zur Bestimmung der 95 %igen Nachweisgrenze verwendet. Für die Berechnung der LOQ ist die Verwendung einer Kalibrationskurve erforderlich. Jede logarithmierte Verdünnung wird gegen den entsprechenden Ct-Wert aufgetragen. Anschließend wird eine Regressionskurve mittels linearer Regression geschätzt. Die Bestimmungsgrenze wurde mit nachfolgender Formel berechnet:  $LOQ = 10 \times \sigma / S$  ( $\sigma$  = Standardabweichung der Response-Variablen;  $S$  = Steigung der Kalibrationskurve). Die Inter- und Intra-Assay-Variabilität wurde anhand der Standardabweichung und des Variationskoeffizienten für jeden Verdünnungsschritt berechnet (Tabelle 20).

Tabelle 20: Validierungsdaten für die mittels TaqMan qPCR getesteten ARGs und das 16S rRNA Gen unter Verwendung von ssDNA-Standards und dsDNA Standards.

TaqMan qPCR assay	Standard	Anzahl der Messungen	Effizienz	Slope values	Intra-Assay Variabilität (%)	Inter-Assay Variabilität (%)	LOD (Kopien /Reaktion)	LOQ (Kopien /Reaktion)
<i>sul1</i> <sup>1</sup>	ssDNA	24	1,91 – 1,94	-3,54 – -3,47	0,36 – 4,94	1,04 – 3,75	16,4	79,3
<i>ermB</i> <sup>1</sup>	ssDNA	24	1,97 – 1,97	-3,38 – -3,39	0,15 – 6,17	0,98 – 3,79	17	151
<i>tet(W)</i> <sup>2</sup>	dsDNA	24	0,9878– 0,9956	-3,66 – -3,30	0,40 – 3,40	0,32 – 0,73	8,6	625,6
<i>npt2</i> <sup>2</sup>	dsDNA	24	0,9964 – 0,9992	-3,12 – -3,03	0,23 – 2,50	0,04 – 0,47	5,3	271,8
<i>npt3</i> <sup>2</sup>	dsDNA	24	0,9944 – 0,9994	-3,22 – -3,11	0,20 – 1,70	0,03 – 0,53	3,5	73,7
<i>bla<sub>TEM-1</sub></i> <sup>2</sup>	dsDNA	24	0,9995 – 0,9998	-3,45 – -3,36	0,21 – 1,13	0,07 – 0,35	4,4	18,7
<i>vanA</i> <sup>2</sup>	dsDNA	24	0,9983 – 0,9998	-3,42 – -3,35	0,12 – 3,13	0,12 – 0,79	2,7	26,1
<i>vanA</i> <sup>3</sup>	ssDNA	21					28,1	144,3

<sup>1</sup> Im Projektzeitraum 2019 – 2020 mit Lightcycler 480 gemessen; <sup>2</sup> im Projektzeitraum 2021 – 2022 mit Lightcycler 480 gemessen; <sup>3</sup> im Projektzeitraum 2021 – 2022 mit QuantStudio™ 6 Pro Real-Time PCR System gemessen.

Nach erfolgreicher Beendigung des qPCR-Programmes erfolgte die Auswertung der qPCR-Daten. Dabei wurden die einzelnen „Runs“ zuerst mittels „Design & Analysis 2.5.0“-Software (Thermo Fisher Scientific) auf wichtige Qualitätsmerkmale überprüft:

1. Der Threshold wurde automatisch von der Software festgelegt.
2. Überprüfung der Negativkontrolle (NTC), dass diese auch negativ ist. Im Falle positiver NTCs bei den ARGs wäre der qPCR-Lauf zu wiederholen. Da es bei qPCR-Analysen des 16S rRNA Gens auch in der Negativkontrolle positive Ct-Werte gab, wurde hier für jeden qPCR-Lauf ein eigener Threshold auf Basis des niedrigsten Ct-Wertes in der Negativkontrolle definiert. Alle Werte, die über diesem Wert lagen, wurden als negativ für das 16S rRNA Gen definiert.
3. Überprüfung der Prozesskontrollen (Filtrations- und Extraktionskontrolle), dass diese auch negativ sind. Traten in der Prozesskontrolle positive Ct-Werte auf, was in erster Linie bei den qPCR-Analysen des 16S rRNA Gens vorkam und nur sehr vereinzelt in den ARG-Messungen, wurde für den jeweiligen qPCR-Lauf ein Threshold definiert, der dem niedrigsten positiven Ct-Wert der Prozesskontrolle entsprach. Alle Werte, die über diesem Wert lagen, wurden als negativ gewertet und nur Werte die ganz deutlich unter diesem Wert lagen ( $\Delta CT \geq 3$ ) in die weiteren Analysen einbezogen.
4. Überprüfung der Standardgerade:
  - a. Effizienz und  $R^2$ : Nur Messungen, wo die Effizienz zwischen 90 % und 110 % lag und der  $R^2$ -Wert  $> 98$  % war, wurden in die Auswertungen einbezogen. Waren diese Kriterien nicht erfüllt, wurden die Daten verworfen und die Messungen ggf. wiederholt.
  - b. Standardabweichung: Eine Standardabweichung von  $CT \leq 0,5$  zwischen den gemessenen technischen Replikaten wurde als zulässig definiert. Bei der Messung von Triplikaten wurde bei einer Standardabweichung von  $CT > 0,5$  das Replikat, das am weitesten vom Mittelwert abwich, eliminiert. Wurde bei der Messung von Duplikaten eine Standardabweichung von  $CT > 0,5$  beobachtet, wurden die Messungen auf Plausibilität geprüft. Hierbei wurden die durchschnittlichen Abstände der CT-Werte zwischen den einzelnen Verdünnungen analysiert und ggf. jenes Replikat ausgeschlossen, das weiter vom durchschnittlichen Abstand zwischen den Verdünnungen abwich. Führte die Prüfung auf Plausibilität zu keinem eindeutigen Ergebnis, wurde diese Standardverdünnung entweder komplett ausgeschlossen (soweit dies zulässig war) oder ggf. die Messung wiederholt.
  - c. Verdünnungen  $< 1$  Kopie/ $\mu$ l wurden bei der Berechnung der Standardgerade grundsätzlich ausgeschlossen, da bei diesen niedrigen Konzentrationen in der qPCR generell keine verlässlichen Werte mehr erhalten werden können.
5. Überprüfung der analysierten Proben in der Software:
  - a. Quantifizierungsbereich: Überprüfung der analysierten Proben, ob sie in den Bereich der Standardkurve fallen. Wurden CT-Werte außerhalb der

Standardkurve beobachtet, wurden die Messungen (ggf. mit höheren Verdünnungen der Proben) wiederholt.

- b. Standardabweichung: Eine Standardabweichung von  $CT \leq 1,0$  zwischen den gemessenen technischen Replikaten wurde als zulässig definiert. Bei der Messung von Triplikaten wurde bei einer Standardabweichung von  $CT > 1,0$  das Replikat, das am weitesten vom Mittelwert abwich, eliminiert. Bei der Messung von Duplikaten, wo die Standardabweichung von  $CT > 1,0$  war, wurde die Messung dieser Probe wiederholt.
6. Die CT-Werte und die mit Hilfe der Standardkurve von der qPCR-Software berechneten Kopienzahlen/Reaktion wurden dann in ein Excel-Dokument übertragen.
  7. Weitere schrittweise Berechnungen und Qualitätsprüfungen in Excel:
    - a. Einzelne Replikate wurden ausgeschlossen, wenn Kopien/Reaktion  $< 1$  waren.
    - b. Eine Probe wurde als negativ/nicht (quantitativ) detektierbar/nicht (quantitativ) nachweisbar gewertet, wenn
      - Alle technischen Replikate einer Probe (3 von 3 bzw. 2 von 2) in der qPCR kein Signal lieferten oder nur zu einem Ergebnis  $< 1$  Kopie/Reaktion führten.
      - Nur 1 technisches Replikat einer Probe ein Signal bzw. einen Wert  $\geq 1$  Kopie/Reaktion lieferte (1 von 3 bzw. 1 von 2).
      - Der Geometrische Mittelwert der einzelnen Replikate (Kopien/Reaktion)  $< LOD$  des entsprechenden Gen-Targets (siehe Tabelle 20) lagen.
    - c. Positive Werte wurden anschließend in Kopien/ $\mu$ l DNA-Extrakt umgerechnet.
    - d. Die Werte wurden mit dem Verdünnungsfaktor entsprechend der in der PCR-Reaktion verwendeten Probenverdünnung multipliziert und anschließend auf die Kopienzahl im Gesamtvolumen des DNA-Extrakts (100  $\mu$ l) hochgerechnet, was der Kopienzahl in der eingesetzten Probenmenge entspricht.
    - e. Schlussendlich wurde der Wert durch das eingesetzte Filtrationsvolumen dividiert, wodurch man den Wert in der Einheit Kopien/ml erhielt.
    - f. Von den einzelnen Replikaten wurden Mittelwerte gebildet (geometrischer Mittelwert) und die Standardabweichung wurde ermittelt.
    - g. Die einzelnen Replikate wurden für die graphische Darstellung logarithmiert (LOG) und schließlich wurde davon ein Mittelwert (arithmetischer Mittelwert) und eine Standardabweichung gebildet.
    - h. Diese Werte wurden in Balkendiagrammen dargestellt.

## 2.9 Hochdurchsatz-Gen-Profilung (SmartChip-Analysen)

Einige Proben wurden für SmartChip-Analysen ausgewählt, um einen umfassenderen Überblick über das Vorhandensein und die Abundanz von Antibiotikaresistenzgenen (ARGs), Integrons und mobilen genetischen Elementen (MGEs) zu bekommen. In einer ersten Analyse wurden alle Kläranlagenproben aus dem Jahr 2019 aus Tabelle 7 und die Gewässerproben Inn, Raab, Wulka und Reichramingbach aus Tabelle 12 sowie eine WMP und eine TMP des Zulaufes aus 2.5.2 auf das 16S rRNA Gen und 70 ARGs in einem qPCR-System, analysiert (Muziasari et al., 2017; Stedtfeld et al., 2018). In einer zweiten Analyse wurden die Biofilm-Proben aus dem Winter 2021 von Schwechat und Liesing (Tabelle 15) auf das 16S rRNA Gen und 35 verschiedene ARGs mittels Hochdurchsatzverfahren (SmartChip) untersucht. In einer dritten Analyse wurden Kläranlagenproben aus 2021 (Tabelle 7), OFG-Proben aus 2021 (Tabelle 12) sowie Biofilm-Proben aus dem Sommer 2021 von Schwechat und Liesing (Tabelle 15) auf das 16S rRNA Gen sowie auf 95 ARGs analysiert. Diese 96 Gene setzen sich aus den überlappenden ARGs der ersten beiden Analysen und einigen zusätzlich sorgfältig ausgewählten ARGs zusammen. Somit sind in der Tabelle 21 alle Gene dargestellt, die im Hochdurchsatzverfahren (SmartChip) untersucht wurden.

Tabelle 21: Alle untersuchten ARGs und 16SrRNA Gen durch SmartChip-Analysen (Resistomap) (n = 96), Zeitraum 2019 – 2021\*.

Familie	ARGs	Familie	ARGs	Familie	ARGs
Aminoglykoside	<i>aadA_1</i> <sup>1</sup>	MGE	<i>IS1247_2</i> <sup>1</sup>	Phenicol	<i>floR_1</i> <sup>2</sup>
Aminoglykoside	<i>strB</i> <sup>1</sup>	MGE	<i>ISAb3</i> <sup>1</sup>	Quinolone	<i>qnrS2</i> <sup>1</sup>
Aminoglykoside	<i>aadA5_2</i> <sup>1</sup>	MGE	<i>tnpA_5</i> <sup>1</sup>	Quinolone	<i>qnrB</i> <sup>1,2</sup>
Aminoglykoside	<i>aac3-VI</i> <sup>2</sup>	MGE	<i>tnpA_21</i>	Quinolone	<i>qnrS_1</i> <sup>1,2</sup>
Aminoglykoside	<i>aac(6')-Ib_3</i> <sup>2</sup>	MGE	<i>Tn5</i> <sup>1,2</sup>	Quinolone	<i>qnrA</i> <sup>1,2</sup>
Aminoglykoside	<i>aph3-ib</i> <sup>2</sup>	MGE	<i>tnpA_3</i> <sup>1</sup>	Sulfonamide	<i>sul1_2</i> <sup>1</sup>
Aminoglykoside	<i>aph3-via</i> <sup>2</sup>	MGE	<i>IS613</i> <sup>1</sup>	Sulfonamide	<i>sul1_1</i> <sup>2</sup>
Beta Lactam	<i>blaCMY2</i> <sup>1,2</sup>	MGE	<i>Tp614</i> <sup>1</sup>	Sulfonamide	<i>sul2_2</i> <sup>1</sup>
Beta Lactam	<i>blaGES</i> <sup>1</sup>	MGE	<i>tnpA_4</i> <sup>1</sup>	Sulfonamide	<i>sul4</i> <sup>1</sup>
Beta Lactam	<i>cphA_1</i> <sup>1</sup>	MGE	<i>trfA</i> <sup>1</sup>	Sulfonamide	<i>folA_1</i> <sup>1</sup>
Beta Lactam	<i>blaOXY1</i> <sup>1</sup>	MGE	<i>mobA</i> <sup>1</sup>	Sulfonamide	<i>folP_2</i> <sup>1</sup>

Beta Lactam	<i>blaCTX-M</i> <sup>1,2</sup>	MGE	<i>orf37-IS26</i> <sup>2</sup>	Tetracycline	<i>tet39</i> <sup>1</sup>
Beta Lactam	<i>blaVEB</i> <sup>1</sup>	MGE	<i>IncP_oriT</i> <sup>2</sup>	Tetracycline	<i>tetM</i> <sup>1</sup>
Beta Lactam	<i>blaMOX/blaCMY</i> <sup>1</sup>	MGE	<i>IncW_trwAB</i> <sup>2</sup>	Tetracycline	<i>tetQ</i> <sup>1</sup>
Beta Lactam	<i>blaSHV11</i> <sup>1</sup>	MLSB	<i>ermB_2</i> <sup>1</sup>	Tetracycline	<i>tetW</i> <sup>1,2</sup>
Beta Lactam	<i>blaFOX</i> <sup>1</sup>	MLSB	<i>ermB_1</i> <sup>2</sup>	Tetracycline	<i>tetE</i> <sup>1</sup>
Beta Lactam	<i>blaIMP_1</i>	MLSB	<i>lnuB</i> <sup>1</sup>	Tetracycline	<i>tetO_2</i> <sup>1</sup>
Beta Lactam	<i>blaOXA51</i>	MLSB	<i>mphA_1</i> <sup>2</sup>	Tetracycline	<i>tetO_1</i> <sup>2</sup>
Beta Lactam	<i>blaSFO</i> <sup>1</sup>	MLSB	<i>ermF_1</i> <sup>1,2</sup>	Tetracycline	<i>tetM_2</i> <sup>2</sup>
Beta Lactam	<i>blaVIM</i> <sup>2</sup>	MLSB	<i>mefA</i> <sup>1</sup>	Tetracycline	<i>tet32</i> <sup>1</sup>
Beta Lactam	<i>blaTEM</i> <sup>2</sup>	MLSB	<i>lnuC</i> <sup>1</sup>	Trimethoprim	<i>dfrA1_1</i> <sup>1,2</sup>
Beta Lactam	<i>blaCMY2</i>	MLSB	<i>ereA</i> <sup>1</sup>	Trimethoprim	<i>dfrA21</i> <sup>1</sup>
Beta Lactam	<i>blaIMP_1</i>	MLSB	<i>ereA_2</i> <sup>1</sup>	Trimethoprim	<i>dfrA12</i> <sup>1</sup>
Beta Lactam	<i>blaOXA58</i> <sup>2</sup>	Other	<i>merA</i> <sup>1</sup>	Trimethoprim	<i>dfrB</i> <sup>1</sup>
Beta Lactam	<i>blaOXA48</i> <sup>2</sup>	Other	<i>qacEΔ1_2</i> <sup>1</sup>	Vancomycin	<i>vanC_1</i> <sup>1</sup>
Beta Lactam	<i>cfxA</i> <sup>1</sup>	Other	<i>qacEΔ1_1</i>	Vancomycin	<i>vanA</i> <sup>1,2</sup>
Integrans	<i>intl1_1</i> <sup>2</sup>	Other	<i>crAss64</i> <sup>1</sup>	Vancomycin	<i>vanB_1</i> <sup>1</sup>
Integrans	<i>intl1_2</i>	Other	<i>crAss56</i> <sup>2</sup>	Taxonomic	<i>P. aeruginosa</i> <sup>2</sup>
Integrans	<i>intl3</i>	Other	<i>nimE</i> <sup>1</sup>	Taxonomic	<i>Enterococci</i> <sup>1,2</sup>
MDR	<i>qacF/H</i> <sup>1</sup>	Other	<i>mcr1</i> <sup>2</sup>	16S rRNA	16S rRNA Gen <sup>1,2</sup>
MDR	<i>mdtH</i> <sup>1</sup>	Other	<i>mcr3</i> <sup>2</sup>		
MGE	<i>ISPps</i> <sup>1</sup>	Phenicol	<i>catB3</i> <sup>1</sup>		
MGE	<i>tnpA_1</i> <sup>1</sup>	Phenicol	<i>cmlA_2</i> <sup>2</sup>		

<sup>1</sup>, Gene, die bei der ersten Analyse untersucht wurden (n = 71) – Kläranlagen und OFG 2019 (Tabelle 7 und Tabelle 12), TMP und WMP exemplarisch (Kapitel 2.5.2)

<sup>2</sup>, Gene, die bei der zweiten Analyse untersucht wurden (n = 36) – Biofilm-Proben Liesing, Schwechat Winter 2021 (Tabelle 15)

\*, In der dritten Analyse wurden alle aufgezählten Gene (n = 96) untersucht – Kläranlagen und OFG 2021 (Tabelle 7, Tabelle 12) und Biofilm-Proben Liesing, Schwechat Sommer 2021 (Tabelle 15); Weiters wurden die Proben aus dem Multibarriersystem zur weitergehenden Abwasserreinigung auf insgesamt 215 ARGs untersucht (Krampe et al., 2020), die hier nicht aufgezählt sind.

Der Schwellenwert von CT 27 wurde als Nachweisgrenze verwendet (Muziasari et al., 2017, 2016; Zhu et al., 2013). Die Schmelzkurvenanalyse und die PCR-Effizienz wurden an allen Proben für jedes Primer-Set durchgeführt. Amplikons mit unspezifischen Schmelzkurven und multiplen Peaks, basierend auf der Steigung des Schmelzprofils, wurden als falsch positiv eingestuft und aus der Analyse exkludiert. Der SmartChip hat 5,184 Reaktionsvertiefungen mit einem Volumen von 100 nl und wurde mit dem SmartChip Multisample Nanodispenser befüllt. qPCR-Zyklusbedingungen und die anfängliche Datenverarbeitung erfolgten wie zuvor beschrieben (Wang et al., 2014). Die qPCR-Reagenzien wurden wie vom Hersteller empfohlen verwendet. Dabei wurde der mittlere CT von drei technischen Replikaten in jeder qPCR verwendet, um die  $\Delta$ CT-Werte zu berechnen. Wenn die Gene nur in einem der drei technischen Replikate nachgewiesen wurden, wurden sie entfernt. Die 2- $\Delta$ CT-Methode (Schmittgen and Livak, 2008) mit  $\Delta$ CT = (CT detektiertes Gen - CT 16S rRNA Gen) wurde verwendet, um die relativen Abundanzen des detektierten Gens im Verhältnis zum 16S rRNA Gen in jeder Probe zu berechnen.

## 2.10 Chemische Analysen von Antibiotika und anderen Spurenstoffen

Für die Proben aus dem Monitoringprogramm 2019 (je 9 Kläranlagenzu- und -abläufe sowie 8 Oberflächengewässer) wurden chemische Analysen auf Antibiotika durchgeführt. Hierbei wurden, wie auch bei der Probenahme, Synergien mit dem Projekt „Untersuchung von Abwässern und Gewässern auf unterschiedliche toxikologische Endpunkte“ (gefördert vom BMLRT) genutzt. Basierend auf einer chemischen Multitarget-Analysemethode wurden 20 Antibiotika aus verschiedenen Antibiotikaklassen analysiert (Tabelle 22). Außerdem wurden die Proben noch auf zahlreiche Arzneimittelrückstände, Umweltgifte sowie Röntgenkontrastmittel, die in Tabelle 23 zusammengefasst sind, analysiert. Details zur Analysemethode sowie LODs und LOQs sind im Endbericht (Tabelle 14) des oben genannten Projektes zusammengefasst (Braun et al., 2020).

Tabelle 22: Analyisierte Antibiotika mit zugehöriger Antibiotikaklasse.

Antibiotikum	Antibiotikaklasse
Trimethoprim	Diaminopyrimidine
Clindamycin	Lincosamid
Azithromycin, Clarithromycin, Erythromycin, Josamycin, Roxithromycin	Makrolide

Metronidazol	Nitroimidazole
Sulfadiazin, Sulfadimethoxin, Sulfadimidin (=Sulfamethazin), Sulfadoxin, Sulfamethoxazol, Sulfathiazol	Sulfonamide
Doxycyclin, Oxytetracyclin	Tetracycline
Amoxicillin, Ampicillin, Penicillin G, Penicillin V	Beta-Laktame

Tabelle 23: Weitere analysierte Spurenstoffe mit zugehöriger Gruppe.

Spurenstoffe	Arzneimittelgruppe/chemische Gruppe
Diclofenac, Ibuprofen, Mefenaminsäure, Naproxen, Ketoprofen, Paracetamol, Phenazon, Tramadol	Antirheumatika Analgetika
Propyphenazon	Analgetika/Antiphlogistika
Gliclazid, Metformin, Sitagliptin	Antidiabetika
Carbamazepin, Gabapentin, Levetiracetam, Oxcarbazepin, Primidon	Antiepileptika
Capecitabin	Antineoplasten
Clopidogrel	Thrombozytenaggregationshemmer
Valaciclovir	Virostatika
Atenolol, Bisoprolol, Carvedilol, Metoprolol, Propranolol, Sotalol	Betablocker
Salbutamol, Theophyllin	Bronchodilatator
Terbutalin	Sympathomimetika
Canrenon, Furosemid, Hydrochlorothiazid	Diuretika
Codein, Guaifenesin	Expektorantien
Atorvastatin, Bezafibrat, Clofibrinsäure, Fenofibrat, Gemfibrozil,	Lipidsenker
4-Acetylaminoantipyrin, 4-Formylaminoantipyrin, Acetylsulfamethoxazol, CBZ-DiOH, Dehydro-Erythromycin	Metabolite

Enalapril, Irbesartan, Vasartan,	Renin-Angiotensin Blocker
Bupropion, Citalopram, Duloxetine, Koffein, Sertralin, Trazodon, Venlafaxin, Diazepam, Oxazepam, Prothipendyl, Quetiapin, Temazepam	Psychoanaleptika/Psycholeptika
Amidotrizoesäure, Iohexol, Iomeprol, Iopamidol, Iopromid, Ioversol	Röntgenkontrastmittel
Amlodipin, Verpamil, Pentoxifyllin	Vasodilatoren
Acenaphthen, Acenaphthylen, Anthracen, Benzo(a)anthracen, Benzo(a)pyren, Benzo(b)fluoranthren, Benzo(g,h,i)perylene, Benzo(k)fluoranthren, Chrysen, Dibenzo(a,h)anthracen, Fluoranthren, Flouren, Indeno(1,2,3-c,d)pyren, Naphthalin, Phenanthren, Pyren	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH)
1,2,3,4,6,7,8-Heptachloridbenzofuran, 1,2,3,4,7,8,9-Heptachloridbenzofuran, 1,2,3,4,7,8-Hexachloridbenzofuran, 1,2,3,6,7,8-Hexachloridbenzofuran, 1,2,3,7,8,9-Hexachloridbenzofuran, 1,2,3,7,8-Pentachloridbenzofuran, 2,3,4,6,7,8-Hexachloridbenzofuran, 2,3,4,7,8-Pentachloridbenzofuran, 2,3,7,8-Tetrachloridbenzofuran, Octachloridbenzofuran, Octachloridbenzo-p-dioxin	Furane
1,2,3,4,6,7,8-Heptachloridbenzo-p-dioxin, 1,2,3,4,7,8-Hexachloridbenzo-p-dioxin, 1,2,3,7,8,9-Hexachloridbenzo-p-dioxin, 1,2,3,7,8-Pentachloridbenzo-p-dioxin, 2,3,7,8-Tetrachloridbenzo-p-dioxin	Dioxine
PCB 77, PCB 81, PCB 105, PCB 114, PCB 118, PCB 123, PCB 126, PCB 156, PCB 157, PCB 167, PCB 169, PCB 189	Polychlorierte Biphenyle (PCB)

## 2.11 Amplikonsequenzierung (16S rRNA Gen)

Für ausgewählte Proben des Monitoringprogramms aus dem Jahr 2019 (Kläranlagen und Oberflächengewässer) sowie für die Proben aus dem methodischen Versuch zu verschiedenen Lagerungsbedingungen der Proben und Probenvorbehandlungen (KA20) wurden die Zusammensetzungen der bakteriellen Gemeinschaften mittels Amplikonsequenzierung des 16S rRNA Gens untersucht. Die aus den ausgewählten Proben extrahierte DNA wurde für die Sequenzierung an die LGC Genomics GmbH (Deutschland) geschickt. Die Nextera-Zwei-Schritt-PCR-Amplifikation wurde mit dem Primer-Set 341F-785R für Illumina (V3-V4-Region des 16S rRNA Gens) durchgeführt und es folgte die Sequenzierung mit der Illumina MiSeq V3-



Technologie mit einer Tiefe von 250.000 reads. Zusammen mit MARGINS-I wurden 108 Proben analysiert, was zu insgesamt 40 Millionen reads führte.

Die reads aus der Amplikonsequenzierung des 16S rRNA Gens, die für die Proben aus dem Monitoring 2019 erhalten wurden, wurden unter Verwendung des öffentlichen Servers auf [usegalaxy.org](https://usegalaxy.org) (Version 20.0, 11) auf ihre Qualität hin analysiert, getrimmt und fusioniert (Vorwärts- und Rückwärts-Reads). Anschließend wurden die fusionierten reads in OTUs (operational taxonomic units) geclustert und dann mit SILVAngs (Version: 1.9.5/1.4.3) die taxonomische Annotation durchgeführt. Die Daten wurden anschließend mit KRONA-Plots visualisiert.

# 3 Ergebnisse und Diskussion

## 3.1 Ergebnisse der methodischen Experimente

### 3.1.1 Auswirkungen der Abwasserprobenahme: Stich- und Mischproben (i)

Die Ergebnisse zur Untersuchung der Auswirkungen unterschiedlicher Arten der Abwasserprobenahme (Stich- und Mischproben) auf die hier verwendeten molekularbiologischen Analysen sind in Abbildung 2 (Zulauf, DNA-Konzentration), Abbildung 3 (Zulauf, ARG-Konzentration), Abbildung 4 (Ablauf, DNA-Konzentration) und Abbildung 5 (Ablauf, ARG-Konzentration) dargestellt.

Die photometrisch bestimmten DNA-Konzentrationen ( $A_{260}$ , Absorption bei 260 nm) der Extrakte zeigten beim Zulauf nur geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Arten der Abwasserprobenahme. Die Konzentrationen waren bei den Stichproben am höchsten (Mittelwert (MW) = 244 ng/ $\mu$ l). Dagegen wurde die geringste Menge (MW = 179 ng/ $\mu$ l) bei den Tagesmischproben (TMP, 24 Std.) gemessen Abbildung 2.

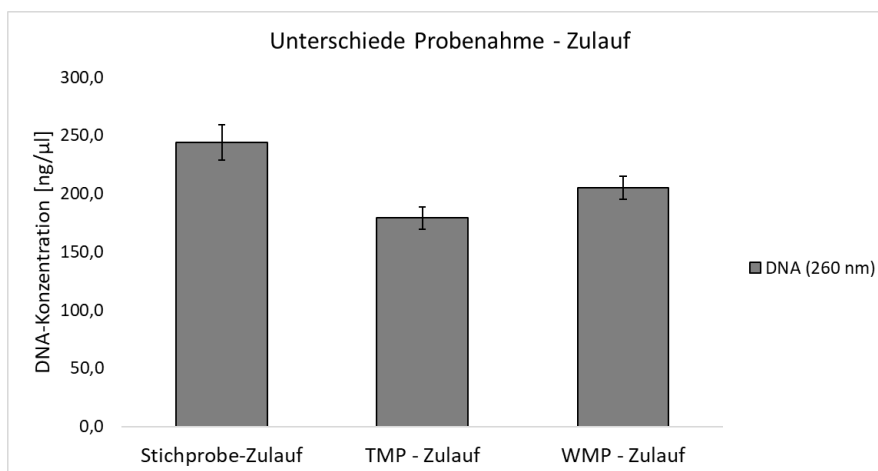


Abbildung 2: DNA-Konzentration bei unterschiedlichen Arten der Abwasserprobenahme im Kläranlagenzulauf.

Dargestellt ist die photometrisch bestimmte DNA-Konzentration ( $A_{260}$ ) in ng/ $\mu$ l. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen zwischen den biologischen Replikaten (je  $n = 3$ ). TMP, Tagesmischprobe (24 Stunden); WMP, Wochenmischprobe (7 Tage).

Das 16S rRNA Gen wurde in allen Proben mit absoluten Häufigkeiten zwischen  $8,1 \times 10^8$  und  $2,4 \times 10^9$  Genkopien/ml detektiert. Das ARG *su11* wurde in allen Proben mit absoluten

Häufigkeiten von  $1,3 \times 10^6$  und  $3,0 \times 10^6$  Genkopien/ml detektiert. Das ARG *ermB* wurde mit absoluten Häufigkeiten von  $4,0 \times 10^7$  und  $8,2 \times 10^7$  Genkopien/ml detektiert. Es konnte kein deutlicher Unterschied in der Quantifizierung der Gene zwischen den Extrakten der unterschiedlichen Arten der Probenahme festgestellt werden (Abbildung 3).

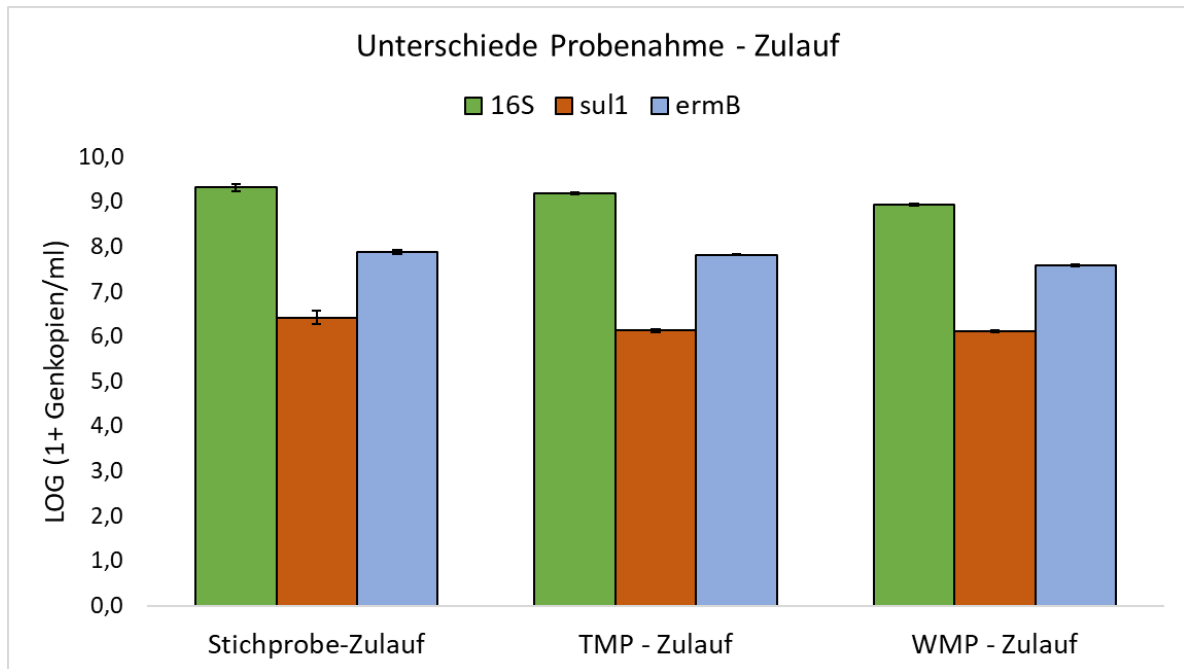


Abbildung 3: Absolute Genabundanz bei unterschiedlichen Arten der Abwasserprobenahme im Kläranlagenzulauf.

Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Werte des bakteriellen 16S rRNA Gens und der ARGs *sul1* und *ermB*. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet, als LOG (1 + Genkopien/ml Probe); die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen zwischen den biologischen Replikaten (je n = 3). TMP, Tagesmischprobe (24 Stunden); WMP, Wochenmischprobe (7 Tage).

In den Extrakten des Ablaufes war die DNA-Konzentration bei den Stichproben, wie auch schon im Zulauf, am höchsten (MW = 203 ng/μl). Die Wochenmischprobe (WMP, 7 Tage) zeigte die geringste Konzentration an DNA in dieser Probenserie (MW = 136 ng/μl) (Abbildung 4).

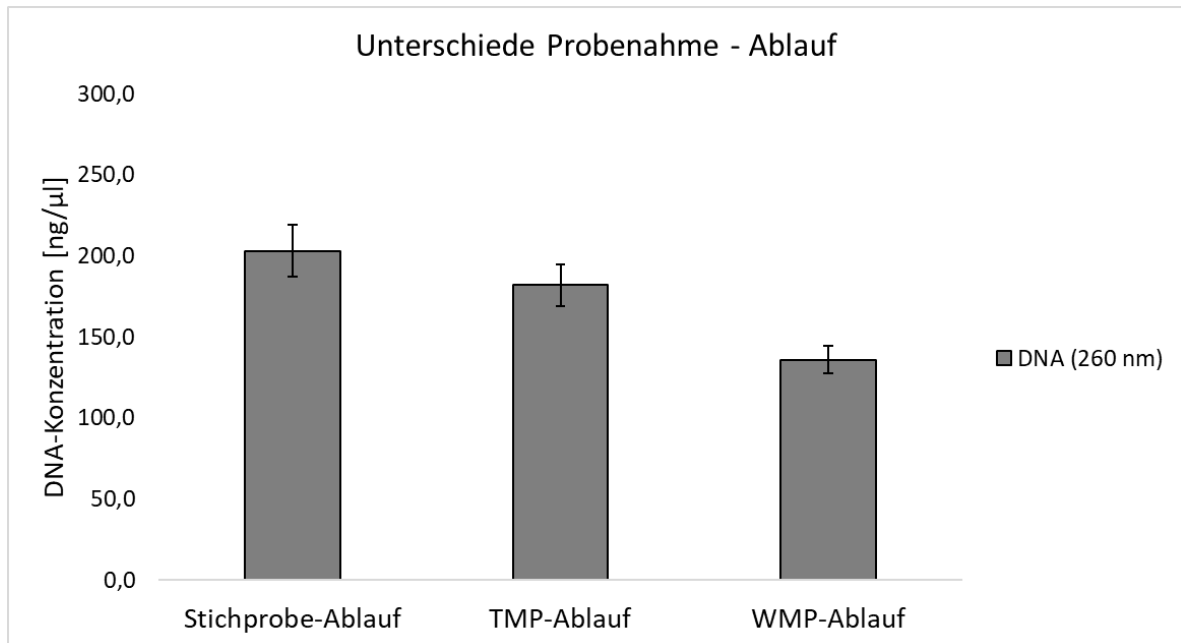


Abbildung 4: DNA-Konzentration bei unterschiedlichen Arten der Abwasserprobenahme im Kläranlagenablauf.

Dargestellt ist die photometrisch bestimmte DNA-Konzentration ( $A_{260}$ ) in  $\text{ng}/\mu\text{l}$ . Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen zwischen den biologischen Replikaten (je  $n = 3$  für TMP und WMP,  $n = 2$  für Stichprobe). TMP, Tagesmischprobe (24 Stunden); WMP, Wochenmischprobe (7 Tage).

Das 16S rRNA Gen wurde mit absoluten Häufigkeiten von  $1,6 \times 10^7$  bis  $3,6 \times 10^7$  Genkopien/ml detektiert. Das ARG *su11* wurde mit absoluten Häufigkeiten von  $1,3 \times 10^4$  bis  $3,5 \times 10^4$  Genkopien/ml detektiert. Das ARG *ermB* wurde mit absoluten Häufigkeiten von  $3,4 \times 10^4$  bis  $8,7 \times 10^4$  Genkopien/ml detektiert. Die Quantifizierung der absoluten Genabundanz mittels qPCR TaqMan assays zeigte demnach keine deutlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Arten der Probenahmen (Abbildung 5).

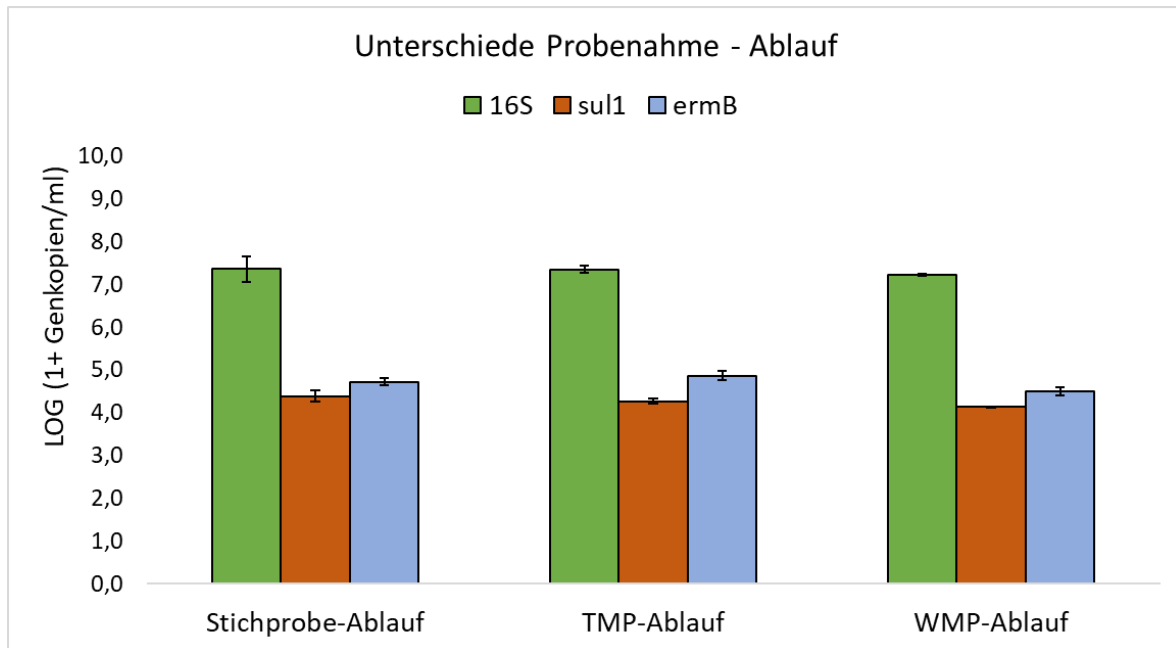


Abbildung 5: Absolute Genabundanz bei unterschiedlichen Arten der Abwasserprobenahme im Kläranlagenablauf.

Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Werte des bakteriellen 16S rRNA Gens und der ARGs *sul1* und *ermB*. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet, als LOG (1 + Genkopien/ml Probe); die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen zwischen den biologischen Replikaten (je n = 3 für TMP und WMP, n = 2 für Stichprobe). TMP, Tagesmischprobe (24 Stunden); WMP, Wochenmischprobe (7 Tage).

Im Zuge einer Hochdurchsatz Gen-Profilierung-Analyse (Resistomap) wurden das bakterielle 16S rRNA Gen und 70 ARGs analysiert. Für die WMP des Zulaufes konnten man 44 und für die TMP des Zulaufes 54 verschiedene Gene detektieren. Diese teilen sich hauptsächlich auf die Gruppen MGE, Tetracycline und Beta-Laktame auf. Es konnten in der TMP also mehr verschiedene ARGs gefunden werden, als in der Wochenmischprobe. Bezieht man sich dabei auf die relativen Häufigkeiten der ARGs am 16S rRNA Gen zeigt sich kein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Proben. Das wiederum bestätigt was auch in der Analyse mittels qPCR gefunden wurde.

### 3.1.2 Auswirkung der Probenlagerung bei 4 °C (ii)

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Lagerungsversuche von Kläranlagenproben bei 4 °C dargestellt. Die Ergebnisse des Vorversuchs bei dem Zu-, Ablauf und Belebtschlamm-Proben bei 4 °C für 48 Stunden gelagert wurden, sind in Abbildung 6 (DNA-Konzentrationen) und

Abbildung 7 (16S rRNA Gen- und ARG-Konzentrationen) abgebildet. Die Ergebnisse des anschließenden Lagerungsversuchs, bei dem Zu- und Abläufe über 14 Tage bei 4 °C gelagert wurden, sind in Abbildung 8 (DNA-Konzentrationen, Zulauf), Abbildung 9 (16S rRNA Gen- und ARG-Konzentrationen, Zulauf), Abbildung 10 (DNA-Konzentrationen, Ablauf) und Abbildung 11 (16S rRNA Gen- und ARG-Konzentrationen, Ablauf) gezeigt.

Die Lagerung der Probe von 48 Stunden bei 4 °C führte vor allem bei der Ablauf- und der Belebtschlamm-Probe zu einer relativ geringen DNA-Konzentration in den extrahierten Proben (< 50 ng/μl). Die DNA-Konzentration im Zulauf war dagegen sehr hoch (283 ng/μl). Die DNA-Konzentration im Zulauf der nicht gelagerten Probe war verglichen zur gelagerten Probe um fast 100 ng/μl geringer (193 ng/μl). Dagegen fiel die Konzentration im Ablauf der nicht gelagerten Probe viel höher (117 ng/μl) aus, verglichen zur gelagerten Ablaufprobe (13,5 ng/μl). Bei den Belebtschlamm-Proben zeigten sich in beiden Varianten relativ gleiche DNA-Konzentrationen (32 ng/μl mit Lagerung; 37 ng/μl ohne Lagerung).

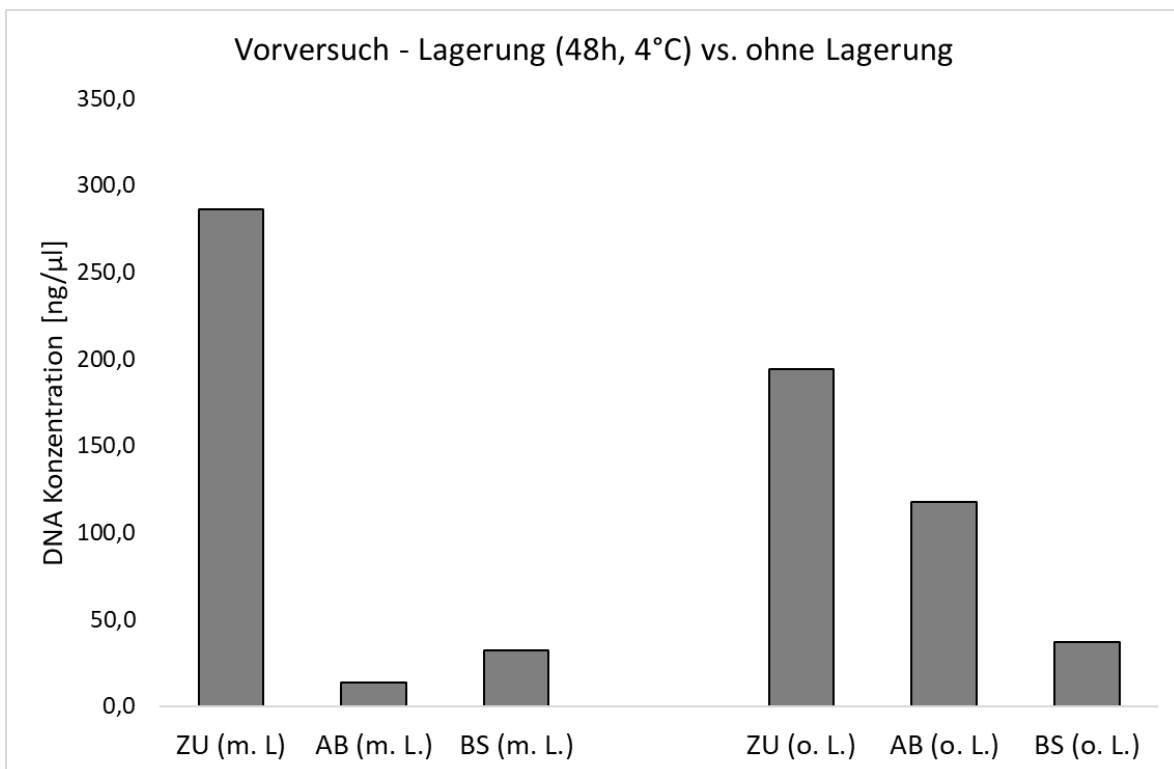


Abbildung 6: DNA-Konzentration ohne und mit Lagerung der Proben (48 Std., 4 °C). Dargestellt ist die photometrisch bestimmte DNA-Konzentration (A260) in ng/μl; n = 1 biologisches Replikat pro Probe. ZU, Zulauf; AB, Ablauf; BS, Belebtschlamm; m. L.; mit Lagerung (48 Std., 4 °C); o. L., ohne Lagerung (Aufarbeitung der Proben nach Standard-Arbeitsablauf; Abweichung: Filtration der Ablaufproben jeweils mit 0,45 μm-Filter).

Die absoluten Abundanzen des 16S rRNA Gens zeigten Quantitäten von  $1,2 \times 10^9$  Genkopien/ml in der gelagerten und  $1,5 \times 10^9$  Genkopien/ml in der nicht gelagerten Probe des Zulaufes. Im Belebtschlamm wurden Abundanzen desselben Gens von  $1,5 \times 10^9$  Genkopien/ml in der gelagerten und  $9,0 \times 10^9$  Genkopien/ml in der nicht gelagerten Probe detektiert. Somit lag die 16S rRNA Gen-Konzentration des nicht gelagerte Belebtschlamm verglichen zum gelagerten um  $> 0,5$  LOG-Stufen höher. In der gelagerten Ablauf-Probe wurden  $2,3 \times 10^4$  Genkopien/ml des 16S rRNA Gens detektiert, während es in der nicht gelagerten Probe  $2,3 \times 10^7$  Genkopien/ml waren. Hier ist der Unterschied mit 3 LOG Stufen deutlich erkennbar. Für *sul1* wurden  $1,6 \times 10^7$  Genkopien/ml in der gelagerten und  $3,3 \times 10^7$  Genkopien/ml in der nicht gelagerten Probe im Zulauf detektiert. Für den Belebtschlamm wurden für dasselbe Gen  $1,4 \times 10^8$  Genkopien/ml in der gelagerten Probe und  $4,3 \times 10^8$  Genkopien/ml in der nicht gelagerten Probe detektiert. Im Ablauf der gelagerten Proben wurden  $8,1 \times 10^3$  Genkopien/ml von *sul1* detektiert, während dieser Wert in der nicht gelagerten Probe bei  $2,7 \times 10^5$  Genkopien/ml lag und somit um ca. 1,5 LOG-Stufen höher war. Die Quantitäten von *ermB* lagen bei  $2,7 \times 10^8$  Genkopien/ml in der gelagerten Probe und bei  $2,2 \times 10^8$  Genkopien/ml in der nicht gelagerten Probe des Zulaufes. Beim Belebtschlamm wurden in der gelagerten Probe  $4,8 \times 10^7$  Genkopien/ml und in der nicht gelagerten Probe  $9,6 \times 10^7$  Genkopien/ml detektiert. Im Ablauf der gelagerten Probe lag die absolute Häufigkeit des *ermB* Gens bei  $3,6 \times 10^3$  Genkopien/ml, dagegen waren es in der nicht gelagerten Probe  $3,6 \times 10^5$  Genkopien/ml und somit 2 LOG Stufen höher. Größere Unterschiede ( $> 1$  LOG Stufe) in den Abundanzen der untersuchten Gene zwischen gelagerten und nicht gelagerten Proben konnten hier nur im Ablauf ermittelt werden. Dabei waren die Konzentrationen in den nicht gelagerten Proben immer höher als in den für 48 Std. bei 4 °C gelagerten Proben. Auch in den Proben des Belebtschlammes waren die Genabundanzen in den nicht gelagert Proben etwas höher als in den gelagerten Proben. Im Zulauf wurde jedoch das Gegenteil beobachtet (Abbildung 7).

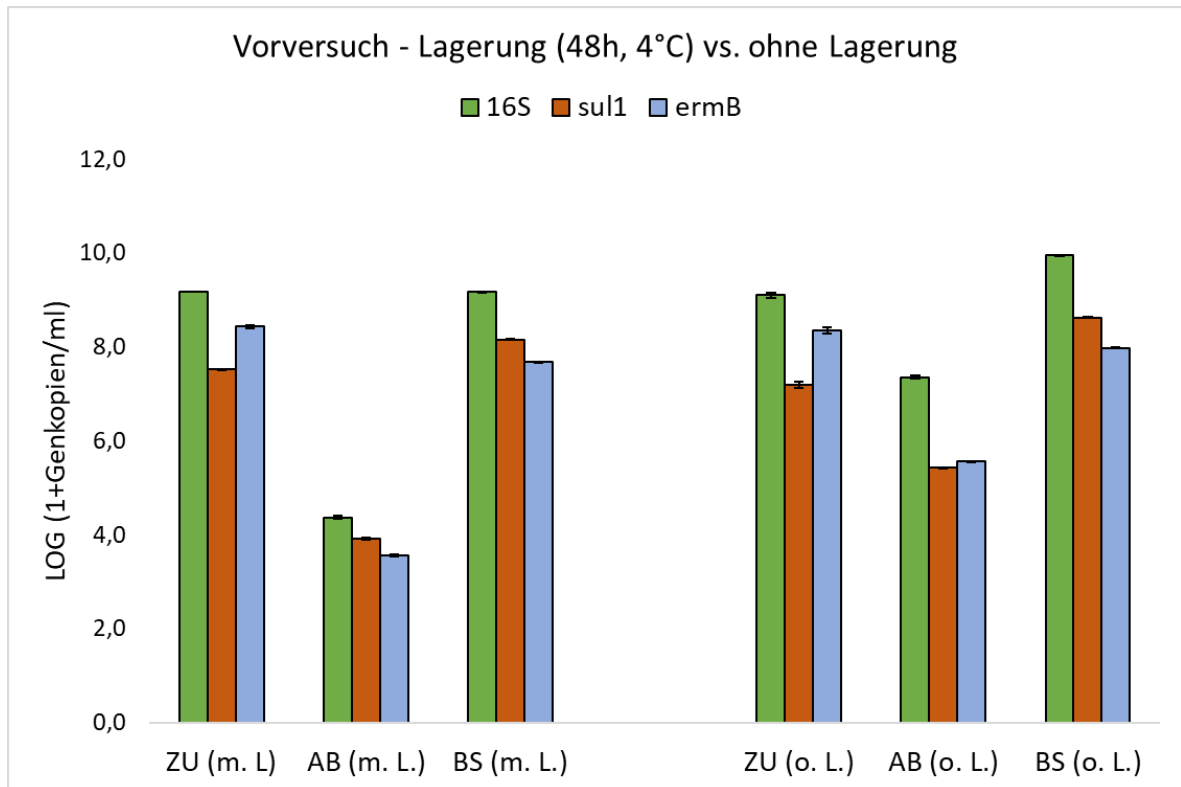


Abbildung 7: Absolute Genabundanz ohne und mit Lagerung der Proben (48 Std., 4 °C). Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Werte des bakteriellen 16S rRNA Gens und der ARGs *sul1* und *ermB*. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet, als LOG (1 + Genkopien/ml Probe), die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen zwischen den technischen Replikaten in der qPCR-Messung (je n = 3 für *sul1* und *ermB*, je n = 2 für 16S rRNA Gen); jeweils n = 1 biologisches Replikat pro Probe. ZU, Zulauf; AB, Ablauf; BS, Belebtschlamm; m. L.; mit Lagerung (48 Std., 4 °C); o. L., ohne Lagerung (Aufarbeitung der Proben nach Standard-Workflow; Abweichung: Filtration der Ablaufproben jeweils mit 0,45 µm-Filter).

In dem anschließenden 14-tägigen Lagerungsversuch nahm die DNA-Konzentration im Zulauf nach Lagerung der Proben von 14 Tagen (bei 4 °C) etwas ab, jedoch sind über die Tage Schwankungen zu erkennen und es ist kein deutlicher Trend sichtbar. Am Tag 0 („T0\_Zulauf“) konnte demnach die höchste durchschnittliche DNA-Konzentration (241 ng/µl) extrahiert werden. Nach 3 Tagen Lagerung war die DNA-Konzentration am niedrigsten (161 ng/µl) (Abbildung 8).



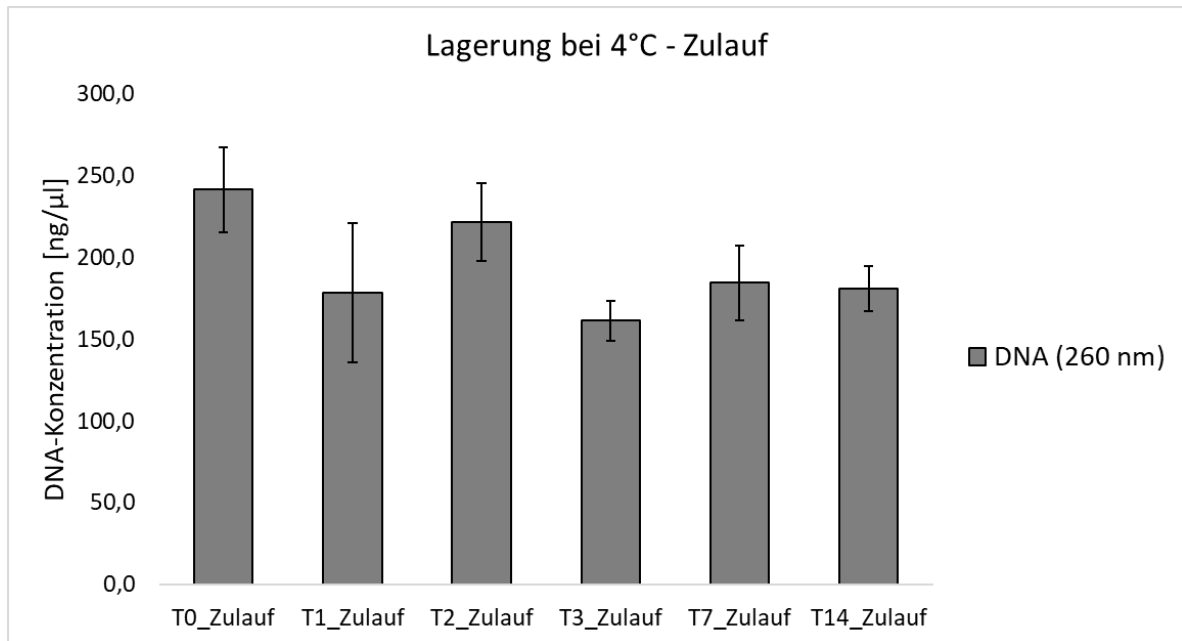


Abbildung 8: DNA-Konzentration bei Lagerung von Kläranlagenzulauf (14 Tage, 4 °C). Dargestellt ist die photometrisch bestimmte DNA-Konzentration (A260) in ng/μl. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen zwischen den biologischen Replikaten (je n = 2). T0, Tag 0 (= Tag der Probenahme); T1, Tag 1 (Probe nach 1 Tag Lagerung bei 4 °C); etc.

Das 16S rRNA Gen wurde in allen Proben mit absoluten Häufigkeiten zwischen  $1,9 \times 10^8$  und  $2,1 \times 10^9$  Genkopien/ml detektiert. Das ARG *sul1* wurde mit absoluten Häufigkeiten von  $1,6 \times 10^5$  und  $1,8 \times 10^6$  Genkopien/ml detektiert. Das ARG *ermB* wurde mit absoluten Häufigkeiten zwischen  $5,7 \times 10^5$  und  $8,2 \times 10^7$  Genkopien/ml detektiert. Jedoch war die Standardabweichung von T3\_Zulauf zwischen den zwei biologischen Replikaten sehr hoch und unterschied sich um fast 2 LOG-Stufen. Die niedrigsten durchschnittlichen absoluten Häufigkeiten in allen Genen wurden in den Proben von Tag 3 detektiert. Es konnte kein deutlicher Trend in den absoluten Genabundanz während der Lagerung der Zulaufprobe von Tag 0 bis Tag 14 festgestellt werden (Abbildung 9).

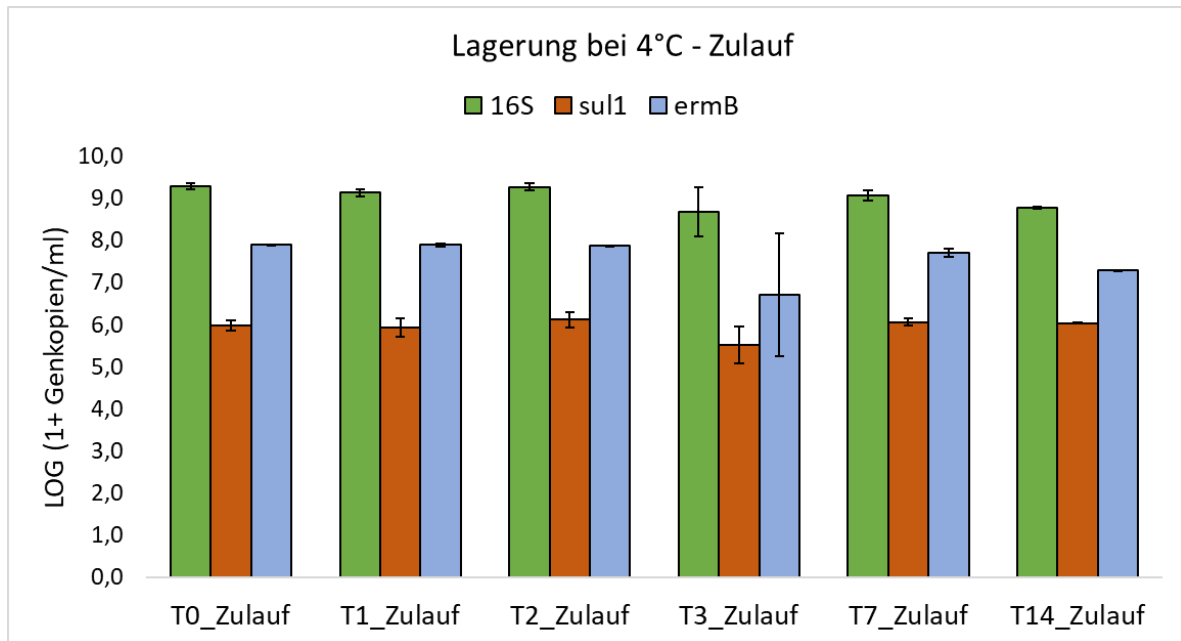


Abbildung 9: Absolute Genabundanz bei Lagerung von Kläranlagenzulauf (14 Tage, 4 °C). Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Werte des bakteriellen 16S rRNA Gens und der ARGs *sul1* und *ermB*. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet, als LOG (1 + Genkopien/ml Probe), die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen zwischen den biologischen Replikaten (je n = 2). T0, Tag 0 (= Tag der Probenahme); T1, Tag 1 (=Probe nach einem Tag Lagerung bei 4 °C); usw.

Für die Lagerung bei 4 °C wurden nach 14 Tagen im Ablauf folgende Ergebnisse ermittelt:

Die DNA-Konzentration der Extrakte nimmt nach Lagerung der Proben von 14 Tagen (bei 4°C) deutlich ab. Am Tag 0 (= T0\_Ablauf) konnte demnach die höchste durchschnittliche DNA-Menge (190 ng/μl). Nach 14 Tagen war die DNA-Konzentration am niedrigsten (33 ng/μl). Es ist ein Trend zu beobachten, nachdem die DNA-Konzentration durch die längere Lagerung abzunehmen scheint (Abbildung 10).

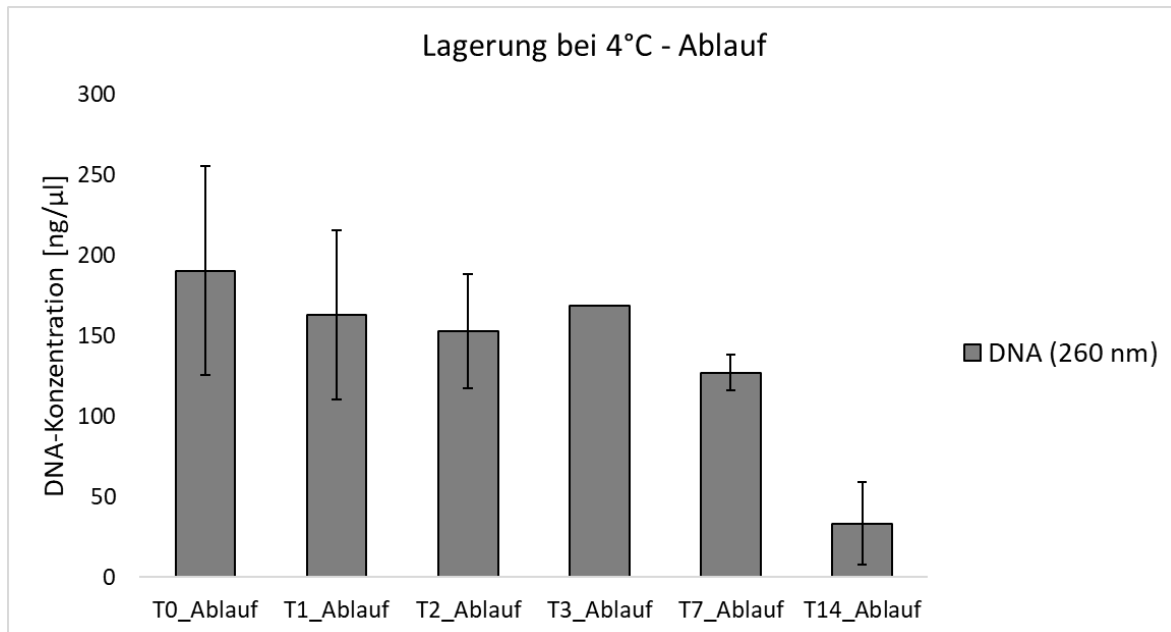


Abbildung 10: DNA-Konzentration bei Lagerung von Kläranlagenablauf (14 Tage, 4 °C). Dargestellt ist die photometrisch bestimmte DNA-Konzentration (A260) in ng/μl. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen zwischen den biologischen Replikaten (je n = 2, außer T3\_Ablauf: n = 1). T0, Tag 0 (= Tag der Probenahme); T1, Tag 1 (Probe nach 1 Tag Lagerung bei 4 °C); etc.

Das 16S rRNA Gen wurde bei dem Lagerungsversuch im Kläranlagenablauf mit absoluten Häufigkeiten zwischen  $1,0 \times 10^6$  und  $2,3 \times 10^7$  Genkopien/ml detektiert. Das ARG *su1* wurde mit absoluten Häufigkeiten zwischen  $1,9 \times 10^3$  und  $3,0 \times 10^4$  Genkopien/ml detektiert. Das ARG *ermB* wurde mit absoluten Häufigkeiten zwischen  $4,2 \times 10^3$  und  $8,0 \times 10^4$  Genkopien/ml detektiert. Dabei war eine Reduktion der Genabundanz von Tag 0 bis Tag 14 von jeweils mindestens 1 LOG Stufe für alle 3 Gene zu beobachten (Abbildung 11).

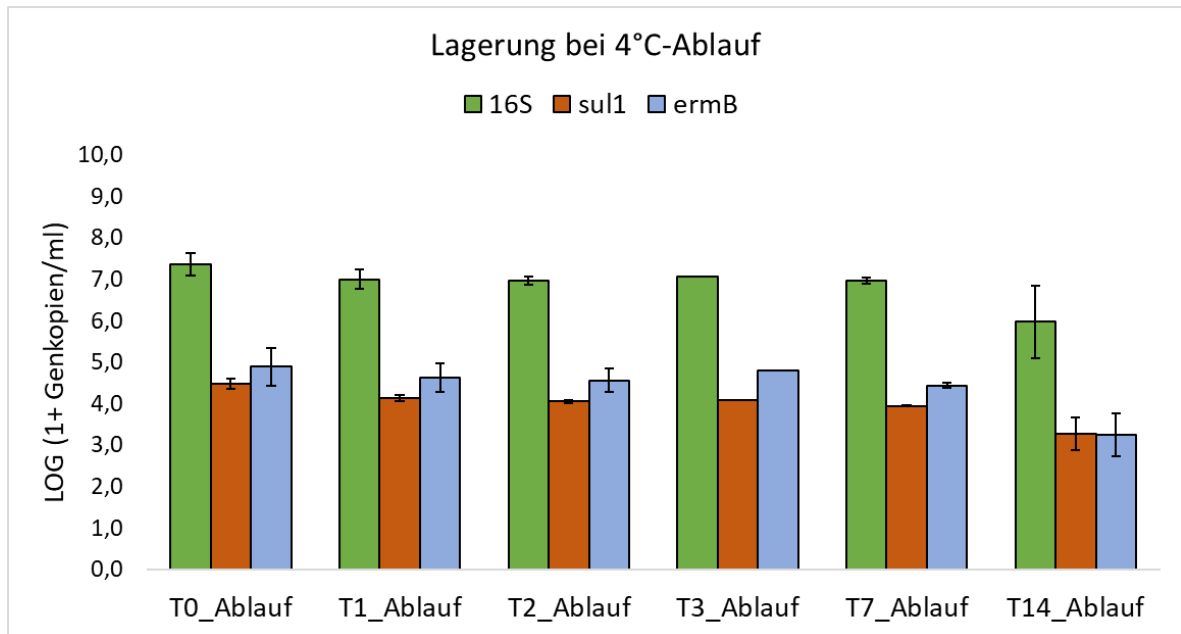


Abbildung 11: Absolute Genabundanz bei Lagerung von Kläranlagenablauf (14 Tage, 4 °C). Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Werte des bakteriellen 16S rRNA Gens und der ARGs *sul1* und *ermB*. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet, als LOG (1 + Genkopien/ml Probe), die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen zwischen den biologischen Replikaten (je n = 2, außer T3\_Ablauf n =1). T0, Tag 0 (= Tag der Probenahme); T1, Tag 1 (=Probe nach einem Tag Lagerung bei 4 °C); etc.

### 3.1.3 Auswirkungen unterschiedlicher Probenprozessierung (iii)

Die unterschiedlichen Probenprozessierungen von Zulauf- Ablauf und Belebtschlammproben sind nachfolgend graphisch anhand ihrer DNA-Konzentrationen sowie absoluten Abundanz des 16S rRNA Gens sowie der ARG *sul1* und *ermB* dargestellt: Abbildung 12, Abbildung 13, Abbildung 14, Abbildung 15, Abbildung 16, Abbildung 17, Abbildung 18, Abbildung 19, Abbildung 20 und Abbildung 21.

#### 3.1.3.1 Unterschiedliche Probenvorbehandlungen

Die Auswirkungen unterschiedlicher Probenvorbehandlungen auf die photometrisch bestimmte DNA-Konzentration (Abbildung 12) sowie die Konzentration des 16S rRNA Gens und der ARGs *sul1* und *ermB* (Abbildung 13) sind im Folgenden graphisch dargestellt und beschrieben.

Im Zulauf wurde die höchste DNA-Konzentration ohne Vorbehandlung der Probe erreicht (194 ng/μl) und die niedrigste durch die Behandlung mittels Ultraschalles (30 min, 50 °C) (40 ng/μl). Beim Belebtschlamm erreichte man die höchste DNA-Konzentration durch Homogenisierung mit 9.500 rpm für 2 min (43 ng/μl), die niedrigste DNA-Konzentration wurde durch den Einsatz von SDS + Proteinase K (30 min, 50°C) (21,7 ng/μl) erreicht. Die DNA-Konzentrationen reduzieren sich bei Homogenisierung der Zulauf-Probe sowohl bei 9.500 rpm für 2 min, als auch bei 20.000 rpm für 15 Sek. um mindestens 100 ng/μl verglichen mit der Probe ohne Vorbehandlung. Bei den Belebtschlamm-Proben zeigt sich kein deutlicher Unterschied durch Homogenisierung verglichen mit der unbehandelten Probe. Etwas mehr wirkt sich hier der Einsatz von Ultraschall und SDS + Proteinase K aus. Jedoch wurde für die Proben des Belebtschlammes generell nur eine niedrige DNA-Ausbeute erreicht. Der Ablauf wurde hier nicht auf verschiedene Vorbehandlungen untersucht, es ist nur die DNA-Konzentration ohne Vorbehandlung mit 72 ng/μl dargestellt (Abbildung 12).

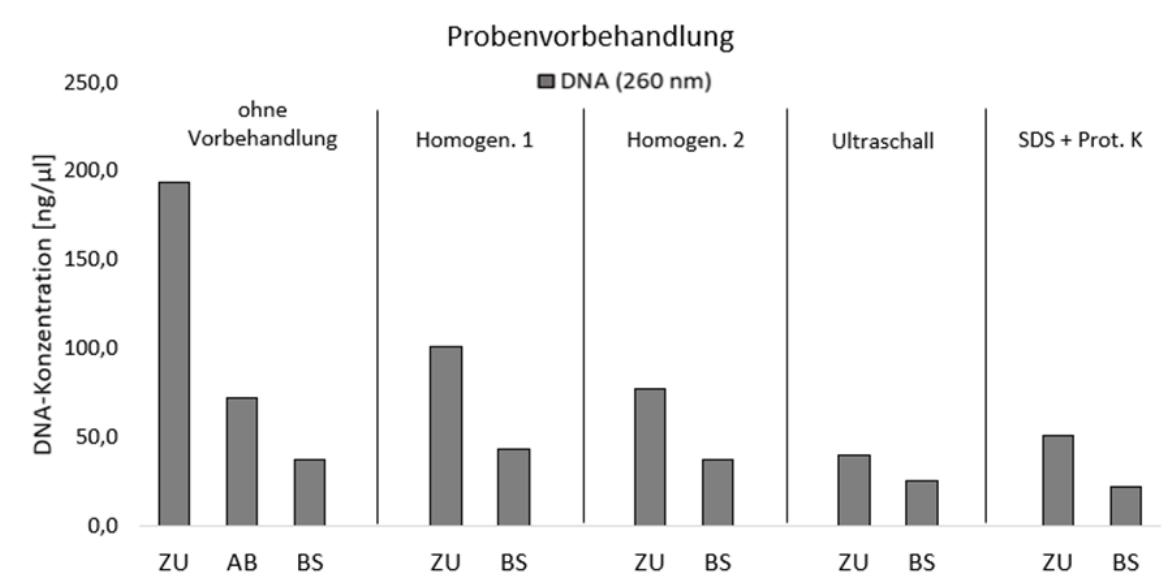


Abbildung 12 DNA Konzentration mit und ohne Probenvorbehandlung.

Dargestellt ist die photometrisch bestimmte DNA-Konzentration ( $A_{260}$ ) in ng/μl;  $n = 1$  für jede Probe; Homogen. 1, Homogenisierung bei 9.500 rpm für 2 min; Homogen. 2, Homogenisierung bei 20.500 rpm für 15 s; Ultraschall: 30 min, 50 °C; SDS + Proteinase K: 30 min, 50 °C.

Die absoluten Abundanzen des 16S rRNA Gens zeigten Quantitäten zwischen  $2,6 \times 10^8$  und  $1,3 \times 10^9$  Genkopien/ml in den Zuläufen, zwischen  $2,3 \times 10^9$  und  $9,8 \times 10^9$  Genkopien/ml in den Belebtschlamm-Proben und  $1,9 \times 10^7$  Genkopien/ml für die untersuchte Ablauf-Probe. Für *sul1* wurden im Zulauf zwischen  $2,8 \times 10^6$  und  $1,6 \times 10^7$  Genkopien/ml, im Belebtschlamm  $1,3$

$\times 10^8$  und  $5,1 \times 10^8$  Genkopien/ml und im Ablauf  $2,3 \times 10^5$  Genkopien/ml detektiert. Die Quantitäten von *ermB* lagen im Zulauf zwischen  $3,7 \times 10^7$  und  $2,3 \times 10^8$  Genkopien/ml, im Belebtschlamm zwischen  $4,3 \times 10^7$  und  $1,0 \times 10^8$  Genkopien/ml und im Ablauf bei  $2,3 \times 10^5$  Genkopien/ml. Anders als bei den DNA-Konzentrationsmessungen zeigten die Proben des Zulaufes und des Belebtschlammes mit einer Vorbehandlung nur eine geringe Reduktion in der Abundanz der analysierten Gene gegenüber den Proben ohne Vorbehandlung. Für den Ablauf gibt es diesbezüglich keinen Vergleich, da nur eine Probe des Ablaufes ohne Vorbehandlung analysiert wurde (Abbildung 13).

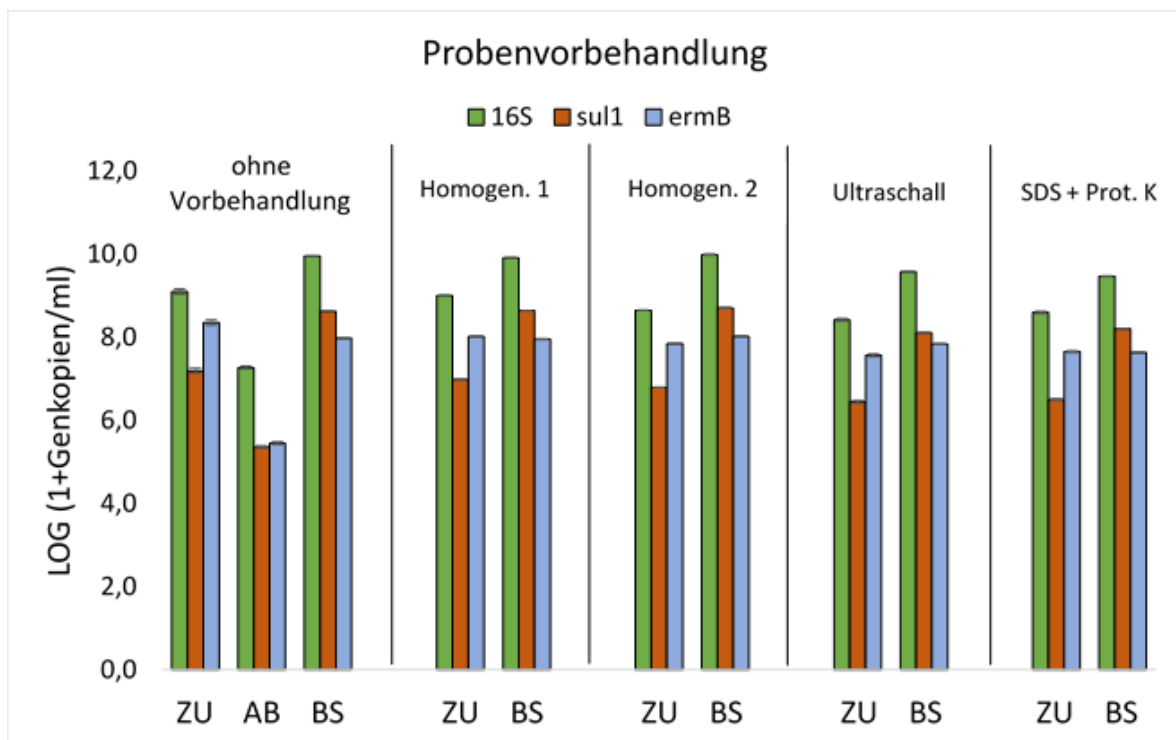


Abbildung 13: Absolute Genabundanz bei unterschiedlicher Probenvorbehandlung. Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Werte des bakteriellen 16S rRNA Gens und der ARGs *sul1* und *ermB*. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet, als LOG (1 + Genkopien/ml Probe), die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen zwischen den qPCR Replikaten (n = 3 für 16S rRNA Gen und für ARGs); je n = 1 pro Probe; Homogen. 1, Homogenisierung bei 9.500 rpm für 2 min; Homogen. 2, Homogenisierung bei 20.500 rpm für 15 s; Ultraschall: 30 min, 50 °C; SDS + Proteinase K: 30 min, 50 °C.

Bei den untersuchten Extrakten des Belebtschlammes wurde die niedrigste DNA-Konzentration ( $37 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) mit dem niedrigsten Probenvolumen von 0,2 ml erhalten, die höchste ( $183 \text{ ng}/\text{ml}$ ) mit dem höchsten Probenvolumen von 2 ml. Es konnte ein linearer

Anstieg der DNA-Menge durch Erhöhung des Probenvolumens bei der Aufkonzentrierung beobachtet werden (Abbildung 14).

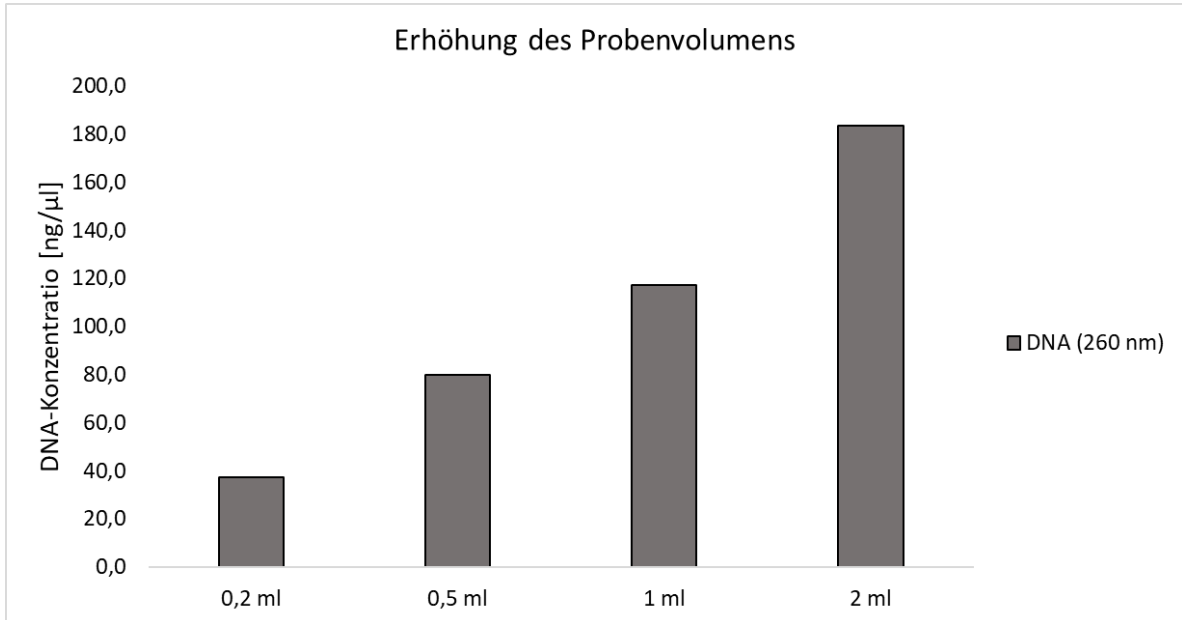


Abbildung 14: DNA-Konzentration bei Erhöhung des Probenvolumens von Belebtschlamm. Dargestellt ist die photometrisch bestimmte DNA-Konzentration ( $A_{260}$ ) in ng/μl.  $n = 1$  für jede Probe.

Die absoluten Abundanzen des 16S rRNA Gens zeigten in den Belebtschlamm-Proben Quantitäten von  $9,0 \times 10^9$  bis  $1,1 \times 10^{10}$  Genkopien/ml. Für *sul1* waren es  $3,0 \times 10^8$  bis  $4,4 \times 10^8$  Genkopien/ml und für *ermB* lagen die Werte zwischen  $7,0 \times 10^7$  bis  $1,0 \times 10^8$  Genkopien/ml. Für die Probennummer 3 waren keine Messungen vorhanden. Anders als bei den DNA-Konzentrationsmessungen konnten hier keine deutlichen Unterschiede in den Quantitäten der analysierten Gene zwischen den verschiedenen Probenvolumina festgestellt werden (Abbildung 15).

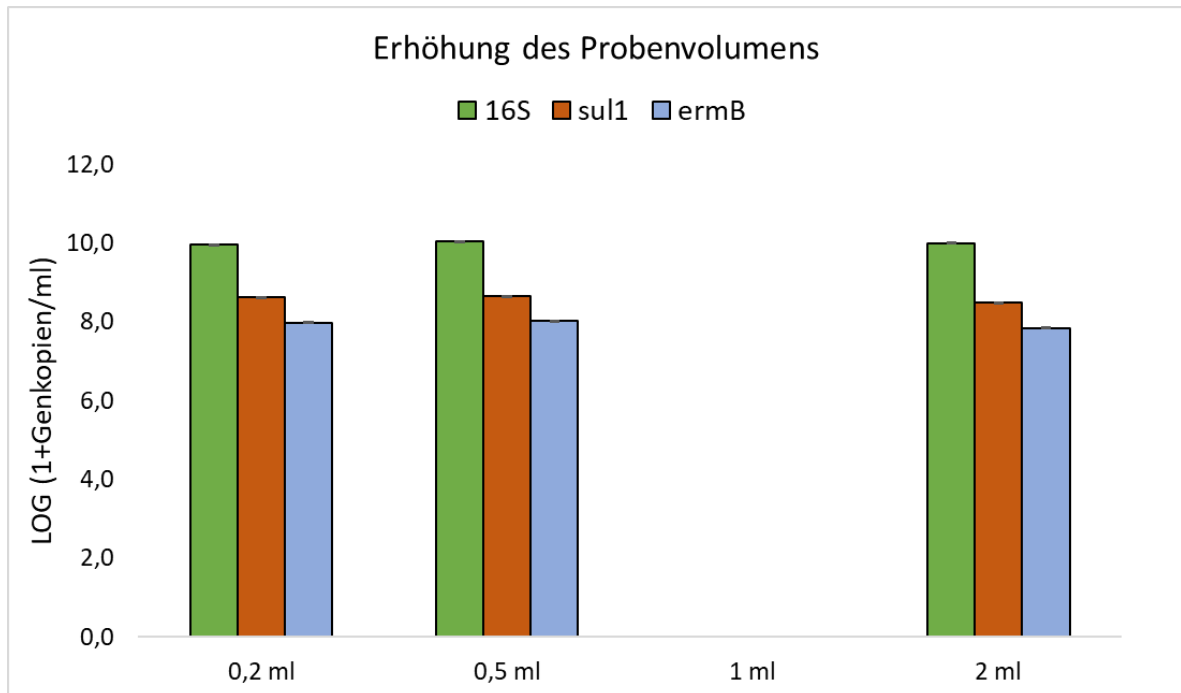


Abbildung 15: Absolute Genabundanz bei Erhöhung des Probenvolumens von Belebtschlamm.

Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Werte des 16S rRNA Gens und der ARGs *sul1* und *ermB*.  $n = 1$  für jede Probe. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet, als  $\text{LOG}(1 + \text{Genkopien/ml Probe})$ , die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen zwischen den qPCR Replikaten ( $n = 3$  für 16S rRNA Gen und für ARGs). Probenextrakt „1ml“ = keine qPCR Ergebnisse vorhanden.

### 3.1.3.2 Verschiedene Methoden zur Aufkonzentrierung der Proben

Bei der Aufkonzentrierung von Zulauf-, Ablauf- und Belebtschlamm-Probe auf einem  $0,45 \mu\text{m}$ -Filter konnten DNA-Konzentrationen  $> 100 \text{ ng}/\mu\text{l}$  bei allen Extrakten der Proben gemessen werden. Vergleichend dazu war die DNA-Konzentration eines Ablauf-Probenextraktes bei Aufkonzentrierung der Probe auf einen  $0,22 \mu\text{m}$ -Filter mit gleichem Volumen (400 ml) deutlich geringer ( $72 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ). Bei der kombinierten Filtration („Filtersandwiches“) gibt es eine sehr hohen DNA-Konzentration ( $225 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) in jenem Extrakt, wo der  $0,45 \mu\text{m}$ -Filter auf dem  $0,22 \mu\text{m}$  Filter lag (AB\_1). Im Gegensatz dazu wurde umgekehrt nur eine sehr geringe DNA-Menge erhalten ( $14 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) (AB\_2). Wurden die Zulauf- und Belebtschlamm-Proben zentrifugiert anstatt filtriert, konnte man DNA-Konzentrationen zwischen  $21 \text{ ng}/\mu\text{l}$  und  $90 \text{ ng}/\mu\text{l}$  erhalten. Hierbei ist zu erwähnen, dass manche Proben zusätzlich auch vorbehandelt wurden: SDS + Proteinase K (ZU\_2, BS\_2) und Ultraschall (ZU\_3, BS\_3). Die Proben ZU\_1 und BS\_1 wurden



nicht vorbehandelt. Es könnte hier auch die Vorbehandlung der Proben zu einer geringeren DNA-Konzentration geführt haben (Abbildung 16).

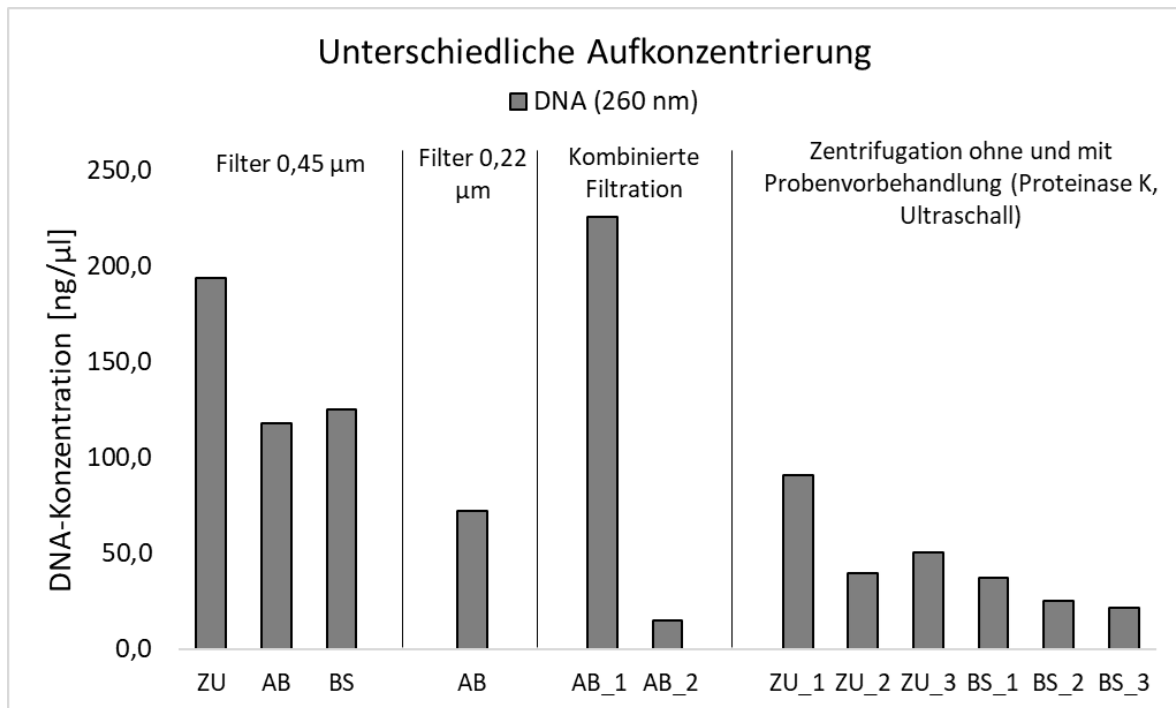


Abbildung 16: DNA-Konzentration nach unterschiedlicher Aufkonzentrierung der Proben. Dargestellt ist die photometrisch bestimmte DNA-Konzentration ( $A_{260}$ ) in  $\text{ng}/\mu\text{l}$ .  $n = 1$  für jede Probe. AB\_1, kombinierte Filtration 0,45  $\mu\text{m}$  auf 0,22  $\mu\text{m}$  Filter (0,45  $\mu\text{m}$  Filter extrahiert); AB\_2, kombinierte Filtration 0,22  $\mu\text{m}$  auf 0,45  $\mu\text{m}$  Filter (0,22  $\mu\text{m}$  Filter extrahiert); ZU\_1, BS\_1 ohne Vorbehandlung; ZU\_2, BS\_2 Proteinase K; ZU\_3, BS\_3 Ultraschall.

Die absoluten Abundanzen des 16S rRNA Gens zeigten Quantitäten zwischen  $2,6 \times 10^8$  und  $1,3 \times 10^9$  Genkopien/ml in den Zuläufen zwischen  $3,0 \times 10^9$  und  $1,1 \times 10^{10}$  Genkopien/ml in den Belebtschlamm-Proben und zwischen  $4,4 \times 10^5$  und  $2,3 \times 10^7$  Genkopien/ml in den Ablauf-Proben. Für *sul1* wurden im Zulauf zwischen  $2,8 \times 10^6$  und  $1,6 \times 10^7$  Genkopien/ml, im Belebtschlamm zwischen  $1,3 \times 10^8$  und  $4,4 \times 10^8$  Genkopien/ml und im Ablauf zwischen  $2,3 \times 10^3$  und  $2,3 \times 10^5$  Genkopien/ml detektiert. Die Quantitäten von *ermB* lagen im Zulauf zwischen  $3,7 \times 10^7$  und  $2,3 \times 10^8$  Genkopien/ml, im Belebtschlamm zwischen  $4,3 \times 10^7$  und  $1,4 \times 10^8$  Genkopien/ml und im Ablauf zwischen  $1,7 \times 10^4$  und  $3,6 \times 10^6$  Genkopien/ml.

Unterschiede in der Genkonzentration durch unterschiedliche Aufkonzentrierungsmethoden der Proben zeigten sich hauptsächlich bei der Filterkombination bei Ablauf-Proben. Wie auch bei der Messung der DNA-Konzentrationen waren die Quantitäten in AB\_1 deutlich höher als in AB\_2 (bis zu 2 LOG-Stufen) (Abbildung 17).

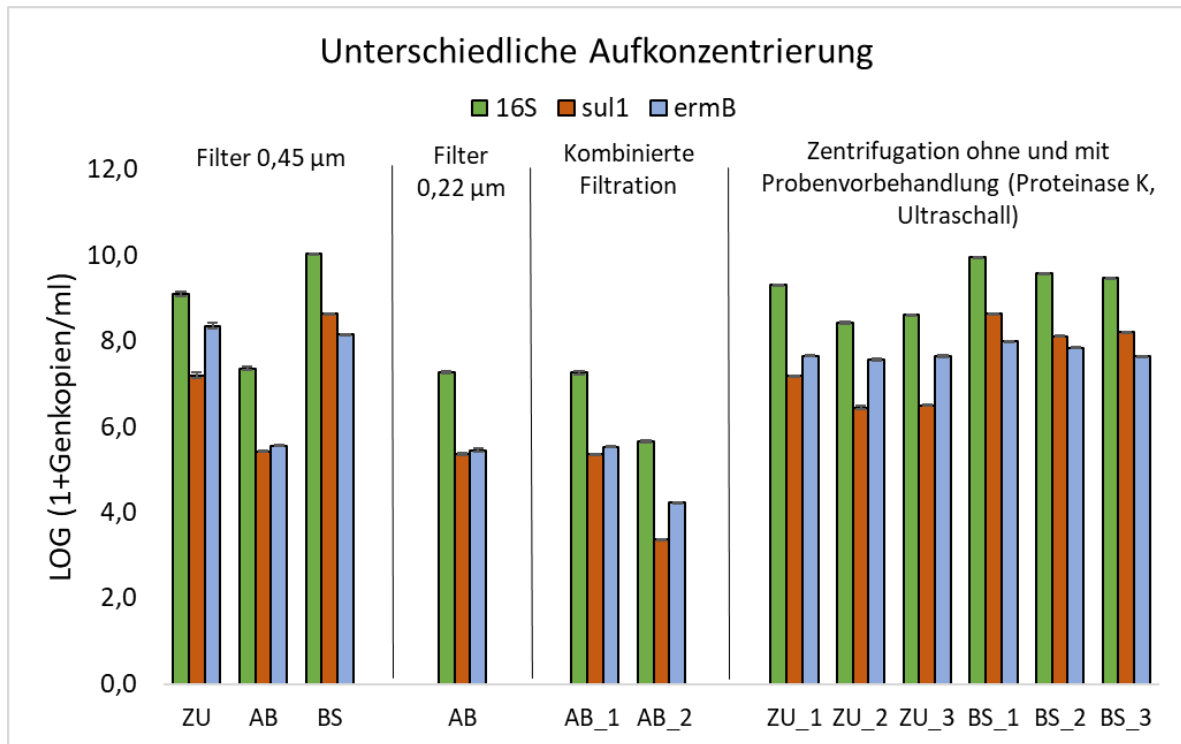


Abbildung 17: Absolute Genabundanz bei unterschiedlicher Aufkonzentrierung der Proben. Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Werte des bakteriellen 16S rRNA Gens und der ARGs *sul1* und *ermB*.  $n = 1$  für jede Probe. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet, als LOG (1 + Genkopien/ml Probe), die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen zwischen den qPCR Replikaten ( $n = 3$  für 16S rRNA Gen und für ARGs). AB\_1, kombinierte Filtration 0,45 µm auf 0,22 µm Filter (0,45 µm Filter extrahiert); AB\_2, kombinierte Filtration 0,22 µm auf 0,45 µm (0,22 µm Filter extrahiert). ZU\_1, BS\_1 ohne Vorbehandlung; ZU\_2, BS\_2 Proteinase K; ZU\_3, BS\_3 Ultraschall.

### 3.1.3.3 Lagerung der aufkonzentrierten Probe

Die DNA-Konzentrationen nach Lagerung der aufkonzentrierten Proben bei  $-80\text{ °C}$  für 48 Std. waren beim Zulauf 232 ng/µl, beim Ablauf 39 ng/µl und beim Belebtschlamm 32 ng/µl. Nach sofortiger Extraktion der aufkonzentrierten Proben lagen die DNA-Konzentrationen des Zulauf-Extraktes bei 193 ng/µl, bei dem des Ablaufs bei 118 ng/µl und bei dem des Belebtschlammes bei 37 ng/µ. Ein deutlicher Unterschied konnte somit nur bei den DNA-Konzentrationen der Ablauf-Proben festgestellt werden, wonach die sofortige Extraktion eine deutliche höhere DNA-Ausbeute brachte (Abbildung 18).

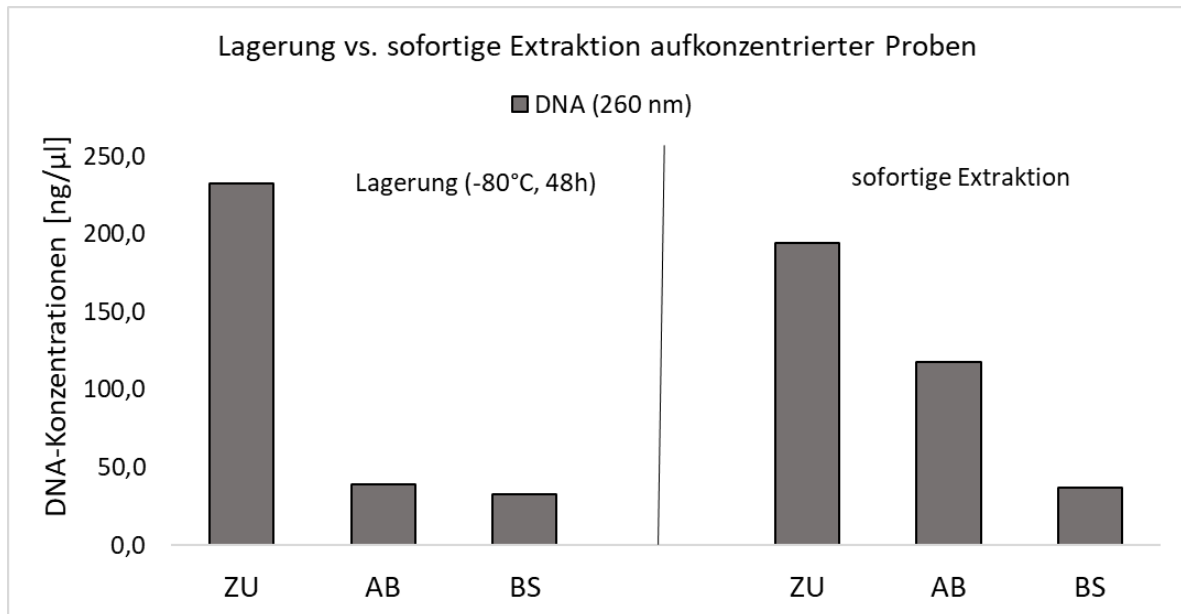


Abbildung 18: DNA-Konzentration mit und ohne Lagerung der aufkonzentrierten Proben (48 Std., - 80 °C).

Dargestellt ist die photometrisch bestimmte DNA-Konzentration (A260) in ng/μl. n = 1 für jede Probe; ZU, Zulauf; AB, Ablauf; BS, Belebtschlamm.

Die absoluten Abundanzen des 16S rRNA Gens zeigten keine nennenswerten Unterschiede zwischen aufkonzentrierter und gelagerter Probe ( $1,2 \times 10^9$  Genkopien/ml) und der sofort extrahierten Probe ( $1,6 \times 10^9$  Genkopien/ml) des Zulaufes. Bei der aufkonzentrierten gelagerten Probe des Ablaufes wurden  $4,4 \times 10^6$  Genkopien/ml und bei der davon sofort extrahierten Probe  $2,3 \times 10^7$  Genkopien/ml des 16S rRNA Gens detektiert. Im Belebtschlamm zeigte sich auch kein deutlicher Unterschied zwischen extrahiert und gelagerter Probe ( $9,2 \times 10^9$  Genkopien/ml) und sofort extrahierter Probe ( $9,0 \times 10^9$  Genkopien/ml) beim 16S rRNA Gen. Für das *sul1* Gen waren es bei der gelagerten aufkonzentrierten Zulauf-Probe  $1,6 \times 10^7$  Genkopien/ml und bei der sofort extrahieren Zulauf-Probe  $2,1 \times 10^7$  Genkopien/ml. Für die gelagerte aufkonzentrierte Ablauf-Probe wurden  $1,2 \times 10^5$  Genkopien/ml und für die sofort extrahierte Probe  $2,7 \times 10^5$  Genkopien/ml detektiert. In der gelagerten Belebtschlamm-Probe wurden  $5,0 \times 10^8$  Genkopien/ml und in der sofort extrahierten  $4,3 \times 10^8$  Genkopien/ml detektiert. Die Quantitäten von *ermB* lagen bei der gelagerten Zulauf-Probe bei  $1,4 \times 10^{10}$  Genkopien/ml und bei der sofort extrahierten Probe bei  $9,0 \times 10^9$  Genkopien/ml. Im Ablauf der aufkonzentrierten, gelagerten Probe wurde *ermB* mit einer Quantität von  $2,5 \times 10^4$  Genkopien/ml und im sofort extrahierten Extrakt mit  $3,6 \times 10^5$  Genkopien/ml detektiert. Für die gelagerte Belebtschlamm-Probe wurden  $7,5 \times 10^7$  Genkopien/ml und in der sofort extrahierten  $9,6 \times 10^7$  Genkopien/ml detektiert. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass es keinen deutlichen Unterschied für die mittels qPCR-Analysen untersuchten Gene macht, ob

aufkonzentrierte Zulauf-, Ablauf- und Belebtschlamm-Proben sofort extrahiert oder bei - 80 °C für zumindest 48 Std. gelagert werden (Abbildung 19).

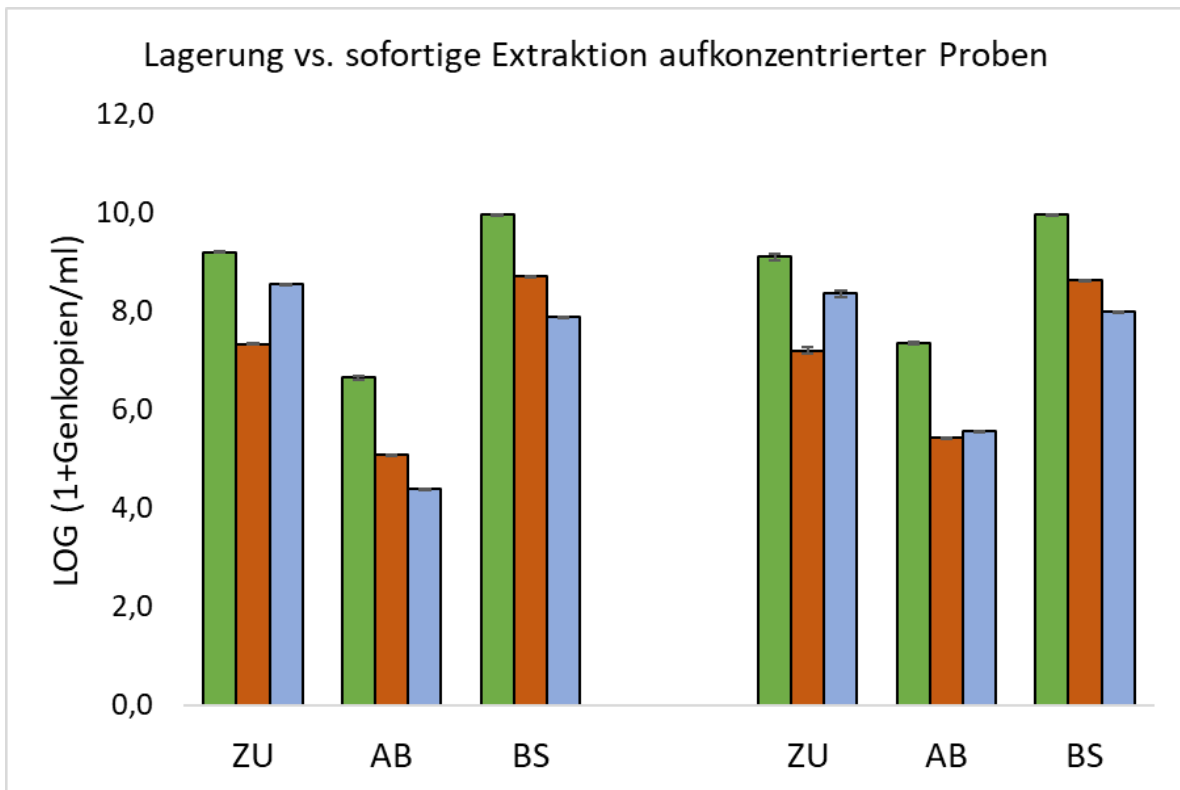


Abbildung 19: Absolute Genabundanz mit und ohne Lagerung der aufkonzentrierten Proben (48 Std., - 80 °C).

Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Werte des bakteriellen 16S rRNA Gens und der ARGs *sul1* und *ermB*. n=1 für jede Probe. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet, als LOG (1 + Genkopien/ml Probe), die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen zwischen den technischen Replikaten (n = 3 für 16S rRNA Gen und für ARGs). ZU, Zulauf; AB, Ablauf; BS, Belebtschlamm.

Im Zuge dieses Experiments wurde eine weitere Probenserie untersucht, bei der der Extraktionspuffer direkt nach Entnahme der Filter aus dem - 80 °C Gefrierschrank bzw. nach Auftauen des Filters nach 20 Minuten zugegeben wurde, um den Effekt einer massiven Temperaturdifferenz von 100 °C (von - 80 °C auf RT bei 20 °C) bei der Pufferzugabe ausschließen zu können. Es zeigte sich dabei kein Effekt (Tabelle 24).

Tabelle 24 Auswirkungen der Pufferzugabe auf den gefrorenen Filter

	Direkte Pufferzugabe auf gefrorenen Filter	Zugabe bei Raumtemperatur nach 20 Minuten Auftauzeit
16S Kopien/ml	$6,4 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$
ermB Kopien/ml	$6,4 \times 10^2$	$5,1 \times 10^2$

### 3.1.3.4 Verschiedene Zell-Lyse-Methoden bei der DNA-Extraktion

Die DNA Konzentrationen zeigten für die Extrakte, bei denen als Zell-Lyse-Methode ein Bead-Beater (BB) verwendet wurde in den Zulauf-Proben Werte zwischen 232 ng/μl und 254 ng/μl, in den Ablauf-Proben Werte zwischen 33 ng/μl und 49 ng/μl und in den Proben des Belebtschlammes Werte zwischen 29 ng/μl und 33 ng/μl. Beim Vortexen als Zell-Lyse-Methode lag die DNA-Konzentration im Zulauf bei 23 ng/μl, im Ablauf bei 41 ng/μl und im Belebtschlamm bei 20 ng/μl. Die Ergebnisse zeigen nur in den Zulauf-Proben deutliche Unterschiede. Demnach bringt die Verwendung eines Bead-Beaters für die Zelllyse eine viel höhere Ausbeute an DNA, als durch das Vortexen. Bei den Ablauf- und Belebtschlamm-Proben konnte das nicht eindeutig beobachtet werden (Abbildung 20).

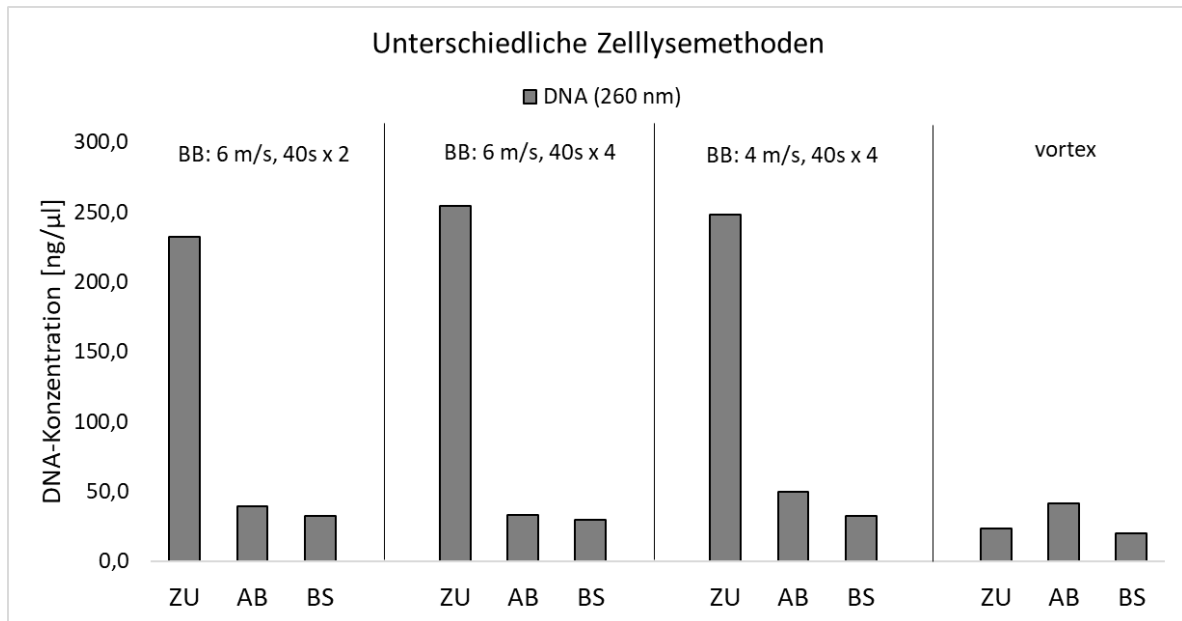


Abbildung 20: DNA-Konzentration bei unterschiedlichen Zellysemethoden in der DNA-Extraktion.

Dargestellt ist die photometrisch bestimmte DNA-Konzentration ( $A_{260}$ ) in  $\text{ng}/\mu\text{l}$ .  $n = 1$  für jede Probe; ZU, Zulauf; AB, Ablauf; BS, Belebtschlamm; BB, Bead-Beater.

Die absoluten Abundanzen des 16S rRNA Gens zeigten Quantitäten zwischen  $9,5 \times 10^8$  und  $1,5 \times 10^9$  Genkopien/ml in den Zuläufen, bei denen die Zellyse mittels Bead-Beater erfolgte und  $1,5 \times 10^7$  Genkopien/ml beim Vortexen als Zell-Lyse-Methode. Die 16S rRNA Gen Quantitäten in den Abläufen lagen zwischen  $6,4 \times 10^5$  und  $5,0 \times 10^6$  Genkopien/ml bei der Verwendung eines Bead-Beaters und bei  $1,9 \times 10^6$  Genkopien/ml beim Vortexen. Für die Belebtschlamm-Proben wurden bei allen Zell-Lyse-Methoden Werte zwischen  $7,3 \times 10^9$  und  $9,2 \times 10^9$  Genkopien/ml des 16S rRNA-Gens erhalten und zeigten somit keine deutlichen Unterschiede. Die absoluten Abundanzen des ARG *su1* zeigten Quantitäten von  $1,5 \times 10^6$  (Vortexen) und  $2,1 \times 10^7$  Genkopien/ml in den Zuläufen. In den Abläufen lag *su1* im Bereich von  $4,8 \times 10^4$  (Vortexen) bis  $1,5 \times 10^5$  Genkopien/ml. Im Belebtschlamm lag *su1* im Bereich von  $5,0 \times 10^8$  bis  $5,7 \times 10^8$  Genkopien/ml für alle Zell-Lyse-Methoden. Die absoluten Abundanzen des ARG *ermB* zeigten Quantitäten von bis zu  $3,7 \times 10^8$  Genkopien/ml in den Zuläufen, bei denen die Zellyse mittels Bead-Beater erfolgte. Durch die Verwendung des Vortex waren es  $3,2 \times 10^6$  Genkopien/ml. In den Abläufen lag *ermB* im Bereich von  $2,1 \times 10^4$  und  $4,0 \times 10^4$  (Vortexen) Genkopien/ml und zeigte somit keine deutlichen Unterschiede. Im Belebtschlamm lagen die Werte im Bereich von  $7,5 \times 10^7$  und  $9,5 \times 10^7$  (Vortexen) Genkopien/ml, was auch keine erheblichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Methoden zeigte. Zusammenfassend konnten auch hier nur auffällige Ergebnisse in den Proben des Zulaufes beobachtet werden. Dabei sind die detektierten Genkopien bei den gevortexten Proben um bis zu 2-LOG Stufen niedriger, als jene, die mittels Bead-Beater bearbeitet wurden. Die verschiedenen

Einstellungen des Bead-Beaters zeigen jedoch keinen großen Einfluss auf die Konzentrationen der analysierten Gene. Für Ablauf- und Belebtschlamm-Proben hatten die unterschiedlichen Zell-Lyse-Methoden keinen nennenswerten Einfluss auf die Ergebnisse (Abbildung 21).

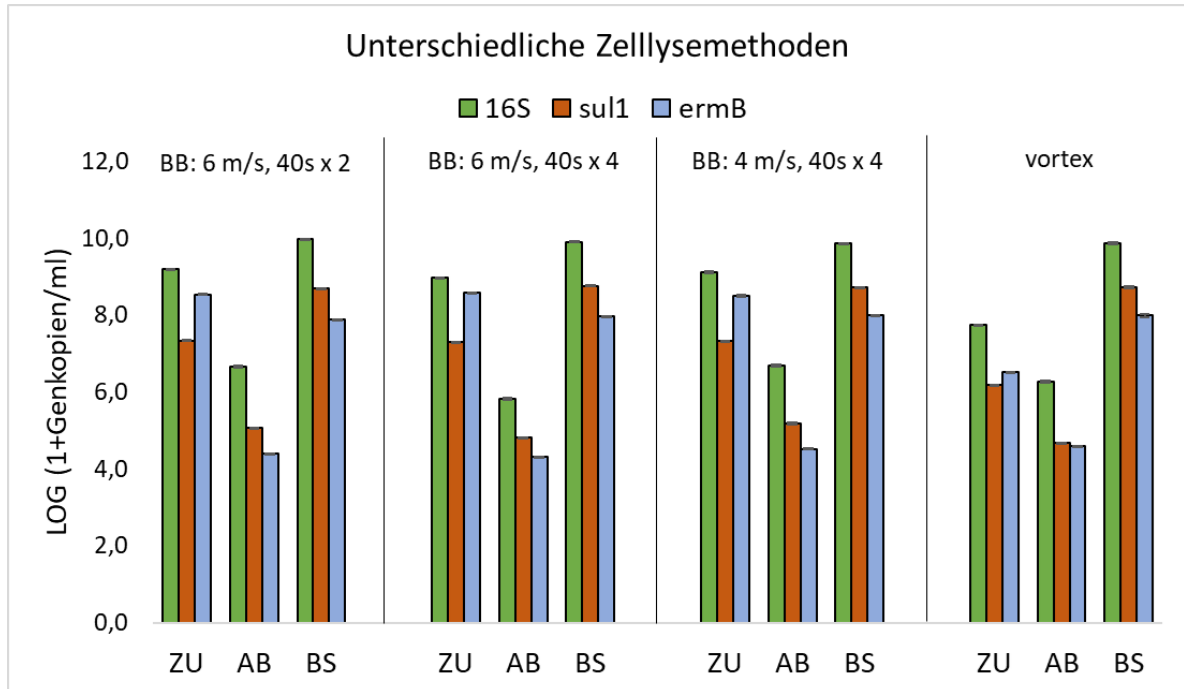


Abbildung 21: Absolute Genabundanz bei unterschiedlichen Zellysemethoden in der DNA-Extraktion.

Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Werte des bakteriellen 16S rRNA Gens und der ARGs *sul1* und *ermB*.  $n = 1$  für jede Probe. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet, als LOG (1 + Genkopien/ml Probe), die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen zwischen den qPCR Replikaten ( $n = 3$  für 16S rRNA Gen und für ARGs). ZU, Zulauf; AB, Ablauf; BS, Belebtschlamm; BB, Bead-Beater.

### 3.2 Ergebnisse des Monitorings von Kläranlagen und Oberflächengewässern

Im Folgenden sind die Ergebnisse des räumlichen Monitorings von österreichischen Kläranlagen (s. Kapitel 3.2.1) und Oberflächengewässern (s. Kapitel 3.2.3) sowie zu den saisonalen und zeitlich hochaufgelösten Untersuchungsprogrammen (Kläranlagen: s. Kapitel 3.2.2, Oberflächengewässer: s. Kapitel 3.2.4) dargestellt.

### 3.2.1 Räumliche Untersuchung österreichischer Kläranlagen

Die Ergebnisse zur räumlichen Untersuchung österreichischer Kläranlagen sind in Abbildung 22 (Übersicht ARG-Hintergrundbelastung), Abbildung 23 (zusätzlich Übersicht ARG-Hintergrundbelastung - Kläranlagenzuläufe 2020) Abbildung 24 (Absolute Abundanzen, qPCR), Abbildung 25 (relative Häufigkeiten, qPCR), Abbildung 26 (LOG-Reduktion, qPCR), Abbildung 27 (Anzahl ARGs, SmartChip), Abbildung 28 (Relative Häufigkeit, SmartChip) und Anhang 2 - Abbildung 74 (Heatmap, SmartChip).

Die Übersicht der räumlichen Untersuchung österreichischer Kläranlagen mittels qPCR zeigt, dass die Konzentrationen des 16S rRNA Gens im Zulauf zwischen  $9,0 \times 10^7$  und  $1,2 \times 10^9$  Genkopien/ml und im Ablauf bei  $2,4 \times 10^6$  bis  $5,4 \times 10^7$  Genkopien/ml liegen. Das ARG *sul1* liegt zwischen  $2,0 \times 10^5$  bis  $1,5 \times 10^7$  Genkopien/ml im Zulauf und zwischen  $1,8 \times 10^4$  und  $2,4 \times 10^5$  Genkopien/ml im Ablauf. Das ARG *ermB* liegt zwischen  $2,1 \times 10^7$  und  $8,5 \times 10^8$  Genkopien/ml im Zulauf und zwischen  $3,6 \times 10^3$  und  $3,8 \times 10^4$  Genkopien/ml im Ablauf. Das ARG *vanA* konnte nur in einzelnen Zulauf-Proben aus Kläranlagen, die 2020 beprobt wurden mit  $8,4 \times 10^2$  bis  $1,4 \times 10^3$  Genkopien/ml detektiert werden. Das ARG *tetW* wurde in den untersuchten Zuläufen der verschiedenen Kläranlagen mit absoluten Konzentrationen zwischen  $3,2 \times 10^3$  bis  $8,1 \times 10^5$  Genkopien/ml nachgewiesen, in den Abläufen dagegen mit maximal 908 Genkopien/ml. *Bla<sub>TEM-1</sub>* zeigte sich in den KA-Zuläufen mit absoluten Häufigkeiten zwischen  $2,0 \times 10^3$  und  $9,3 \times 10^4$  Genkopien/ml und in den Abläufen mit maximal 83 Genkopien/ml. Das ARG *npt2* wurde in den Zuläufen mit Werten zwischen 45 und  $3,3 \times 10^3$  Genkopien/ml detektiert, während es in den Abläufen nur in 2 Proben mit maximal 12 Genkopien/ml quantitativ nachgewiesen werden konnte. Für das ARG *npt3* wurden absolute Häufigkeiten in den Zuläufen zwischen  $1,6 \times 10^3$  und  $1,8 \times 10^5$  Genkopien/ml detektiert, in den Abläufen beliefen sich die Werte auf maximal 71 Genkopien/ml (Abbildung 22).



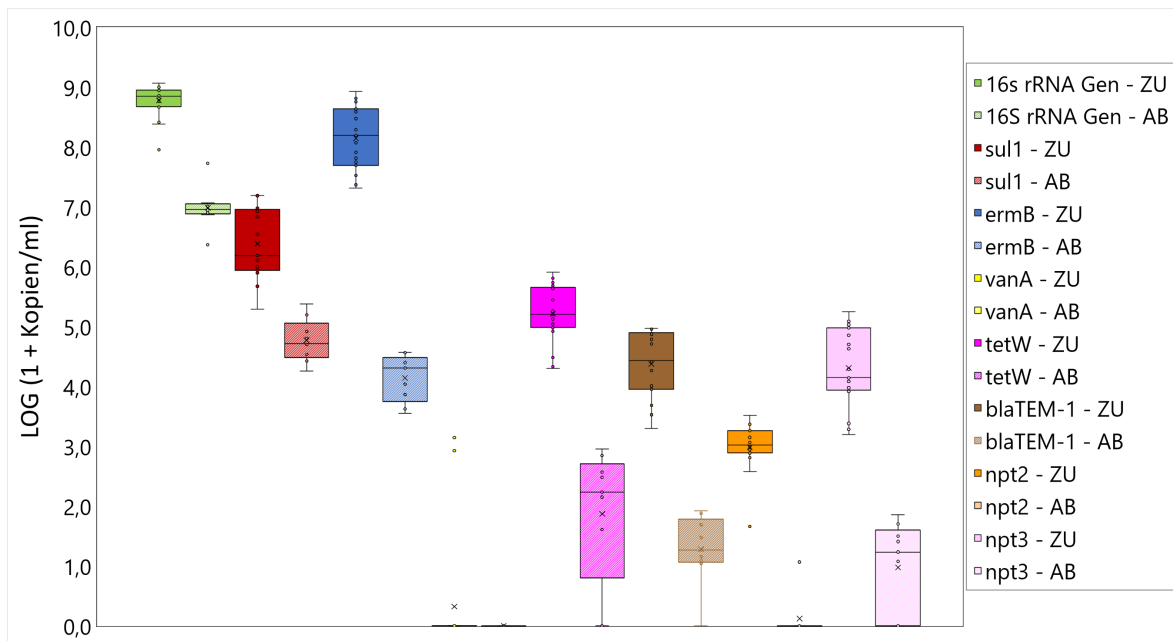


Abbildung 22: Übersicht der ARG-Hintergrundbelastung in den untersuchten österreichischen Kläranlagen.

Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Mittelwerte der sieben ausgewählten ARGs (*sul1*, *ermB*, *vanA*, *tetW*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *npt2* und *npt3*) und des bakteriellen 16S rRNA Gens als Boxplots. Sie zeigen die Streuungen der Konzentrationen der genannten Gene in allen untersuchten Kläranlagen (außer KA 20) für Zu- und Abläufe. Bei Mehrfachbeprobung einer KA wurden Ergebnisse jeweils nur von der ersten Beprobung im Projektzeitraum einbezogen. Die Box selbst zeigt dabei den Bereich zwischen oberem (75 %) und unterem (25 %) Quartil an. Außerdem sind noch Median (horizontale Linie), Mittelwert (x), Minimum (untere Antenne) und Maximum (obere Antenne) sowie die Werte der einzelnen ARGs (Punkte) dargestellt. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet, als LOG (1 + Genkopien/ml Probe).  $n_{\text{Zulauf}} = 19$  TMP und WMP,  $n_{\text{Ablauf}} = 9$  WMP. ZU, Zulauf; AB, Ablauf; TMP, Tagesmischprobe (24 Std.); WMP, Wochenmischprobe (7 Tage).

Die Zuläufe der KA 2, KA 4, KA 5, KA 6, KA 8 und KA 9 wurden nochmals im Mai 2020 gemeinsam mit noch anderen Kläranlagen beprobt und analysiert (Ergebnisse qPCR siehe Abbildung 29). Da im Zuge dessen in den Zuläufen der KA4 und der KA9, im Gegensatz zu den Proben aus 2019, auch das ARG *vanA* quantitativ detektiert werden konnte, wurde eine zusätzliche Übersichtsgrafik der analysierten KAs aus dem Jahr 2020 erstellt (Abbildung 23).

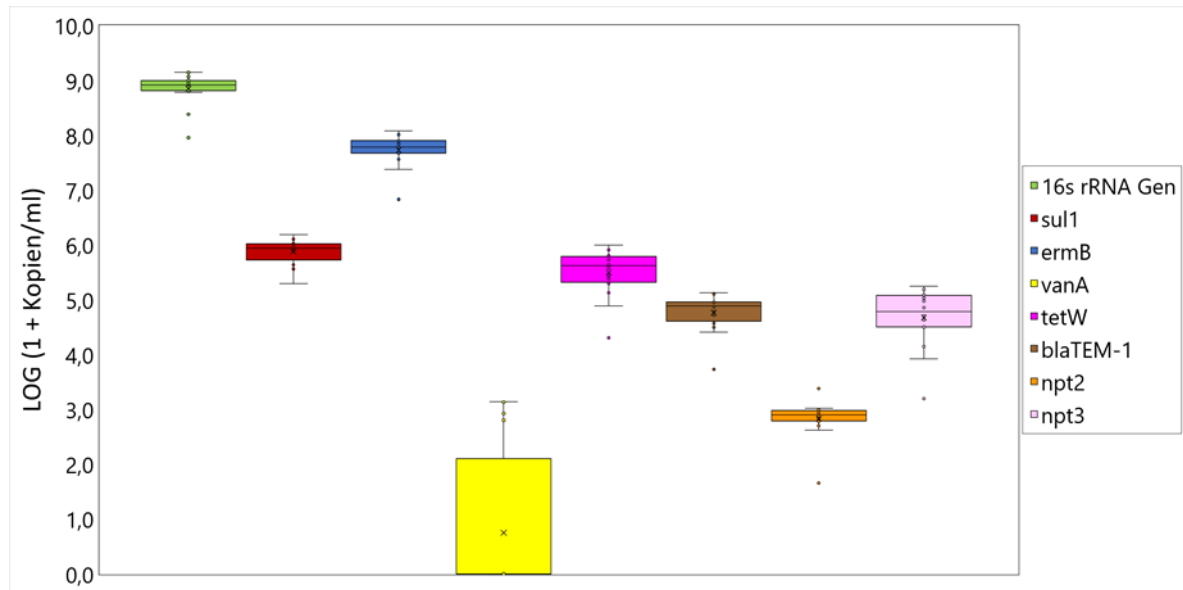


Abbildung 23: Übersicht der ARG-Hintergrundbelastung in österreichischen Kläranlagenzuläufen (Mai 2020).

Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Mittelwerte der sieben ausgewählten ARGs (*sul1*, *ermB*, *vanA*, *tetW*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *npt2* und *npt3*) und des bakteriellen 16S rRNA Gens als Boxplots. Sie zeigen die Streuungen der Konzentrationen der genannten Gene in allen untersuchten Kläranlagenzuläufen aus dem Mai 2020. Die Box selbst zeigt dabei den Bereich zwischen oberem (75 %) und unterem (25 %) Quartil an. Außerdem sind noch Median (horizontale Linie), Mittelwert (x), Minimum (untere Antenne) und Maximum (obere Antenne) sowie die Werte der einzelnen ARGs (Punkte) dargestellt. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet, als LOG (1 + Genkopien/ml Probe). n = 16; TMP, Tagesmischproben (24 Std.).

Das 16S rRNA Gen konnte in allen Zuläufen der untersuchten Kläranlagen aus dem Monitoring 2019 zwischen  $2,6 \times 10^8$  (KA3\_ZU 2019) und  $1,0 \times 10^9$  Genkopien/ml (KA7\_ZU 2019) nachgewiesen werden. Bei den Abläufen wurden absoluten Häufigkeiten zwischen  $2,4 \times 10^6$  (KA8\_AB\_2019) und  $5,4 \times 10^7$  Genkopien/ml (KA1\_AB\_2019) detektiert. Das ARG *sul1* konnte ebenfalls in allen Zu- und Abläufen der untersuchten Kläranlagen quantitativ nachgewiesen werden. Es wurden absoluten Häufigkeiten für die Zuläufe von  $3,5 \times 10^6$  (KA3\_ZU 2019) und  $1,5 \times 10^7$  Genkopien/ml (KA7\_ZU 2019) detektiert. In den Abläufen wurden für *sul1* Quantitäten zwischen  $1,8 \times 10^4$  (KA8\_AB 2019) und  $2,4 \times 10^5$  (KA6\_AB 2019) Genkopien/ml detektiert. Das ARG *ermB* konnte in allen Zu- und Abläufen dieser Kläranlagen quantitativ detektiert werden. Bei den Zuläufen wurden absolute Häufigkeit zwischen  $2,0 \times 10^7$  (KA8\_ZU 2019) und  $1,5 \times 10^8$  (KA3\_ZU 2019) Genkopien/ml quantifiziert. Für die Abläufe wurden absolute Häufigkeiten von wenigstens  $3,5 \times 10^3$  (KA2\_AB 2019) und höchstens  $3,7 \times 10^4$  (KA9\_AB 2019) *ermB* Genkopien/ml nachgewiesen. Das ARG *vanA* konnte in keiner dieser Kläranlagenproben aus dem Sommer 2019 quantitativ nachgewiesen werden. Das ARG *tetW*

wurde in allen Zuläufen dieser Kläranlagen detektiert. Dabei wurden absolute Häufigkeiten zwischen  $3,2 \times 10^3$  Genkopien/ml (KA2\_ZU 2019) und  $1,6 \times 10^5$  Genkopien/ml (KA8\_ZU 2019) detektiert. Bei den Abläufen von den Kläranlagen 2 und 7 (KA2\_AB 2019 und KA7\_AB 2019) konnte das Resistenzgen nicht quantitativ nachgewiesen werden. Bei allen anderen Abläufen aus dieser Kläranlagen-Serie konnte das Gen quantitativ nachgewiesen werden, mit absoluten Häufigkeiten von wenigstens 40 Genkopien/ml (KA8\_AB 2019) und höchstens 908 Genkopien/ml (KA3\_AB 2019). Das ARG *bla*<sub>TEM-1</sub> konnte in allen Kläranlagenzuläufen quantitativ detektiert werden. Dabei wurden absolute Häufigkeit zwischen  $2,0 \times 10^3$  Genkopien/ml (KA3\_ZU 2019) und  $5,1 \times 10^4$  Genkopien/ml (KA5\_ZU 2019) detektiert. Für die Kläranlagen-Abläufe konnten für *bla*<sub>TEM-1</sub> wenigstens 10 Genkopien/ml (KA7\_AB 2019) und höchstens 83 Genkopien/ml (KA3\_AB 2019) detektiert werden. Im Ablauf der Kläranlagen 2 (KA2\_AB 2019) konnte das Resistenzgen nicht quantitativ nachgewiesen werden. Das ARG *npt2* konnte bei allen Kläranlagenzuläufen quantitativ detektiert werden. Dabei wurden absolute Häufigkeit zwischen  $3,7 \times 10^2$  Genkopien/ml (KA3\_AB 2019) und  $3,2 \times 10^3$  Genkopien/ml (KA5\_AB 2019) quantifiziert. In den Abläufen konnte *npt2* nur bei der Kläranlage 9 (KA9\_AB 2019) mit 12 Genkopien/ml nachgewiesen werden. Bei allen anderen Kläranlagen konnte das Resistenzgen im Ablauf nicht quantitativ detektiert werden. Das ARG *npt3* wurde in allen Kläranlagen-Zuläufen detektiert. Es wurden absolute Häufigkeit von wenigstens  $1,9 \times 10^3$  Genkopien/ml (KA2\_ZU 2019) und höchstens  $1,9 \times 10^4$  Genkopien/ml (KA5\_ZU 2019) nachgewiesen. Für die Abläufe konnten mindestens 12 Genkopien/ml (KA1\_AB 2019) und maximal 71 Genkopien/ml (KA3\_AB 2019) detektiert werden. Bei den Abläufen der Kläranlagen 2, 7 und 8 (KA2\_AB 2019, KA7\_AB 2019 und KA8\_AB 2019) konnte dieses ARG nicht quantitativ nachgewiesen werden (Abbildung 24). Die ARGs der untersuchten Kläranlagen sind nachfolgend in Abbildung 25 auch als relative Häufigkeit zum 16S rRNA Gen dargestellt.

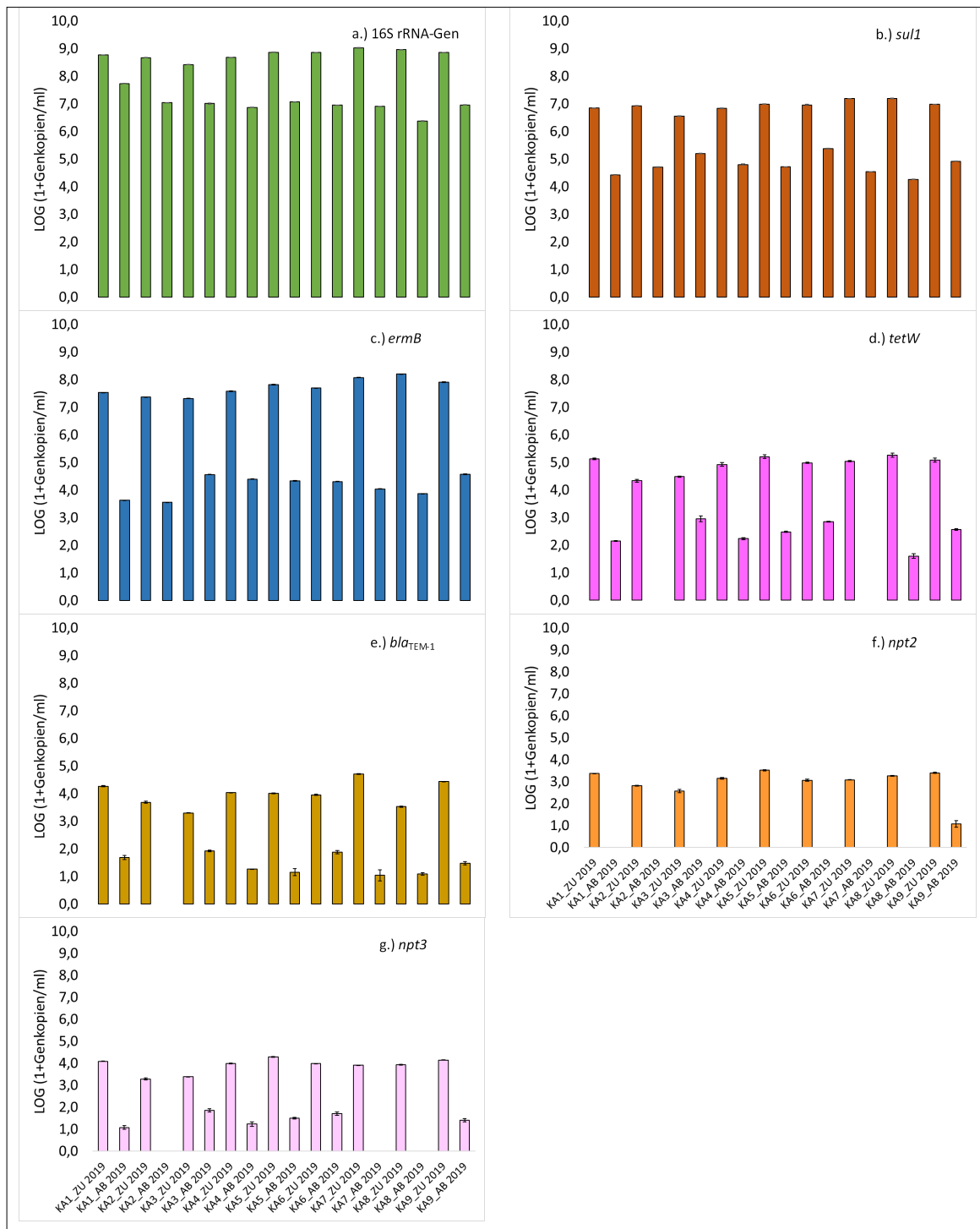


Abbildung 24: Absolute Genabundanz in verschiedenen Kläranlagen Österreichs (2019). Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Werte des bakteriellen 16S rRNA Gens und der sieben ausgewählten ARGs (*sul1*, *ermB*, *vanA*, *tetW*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *npt2* und *npt3*) in den untersuchten WMPs. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet, als LOG (1 + Genkopien/ml Probe); die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen zwischen den qPCR

Replikaten (n = 2 für 16S rRNA Gen, n = 3 für ARGs); KA, Kläranlage; ZU, Zulauf; AB, Ablauf; WMP, Wochenmischprobe (7 Tage).

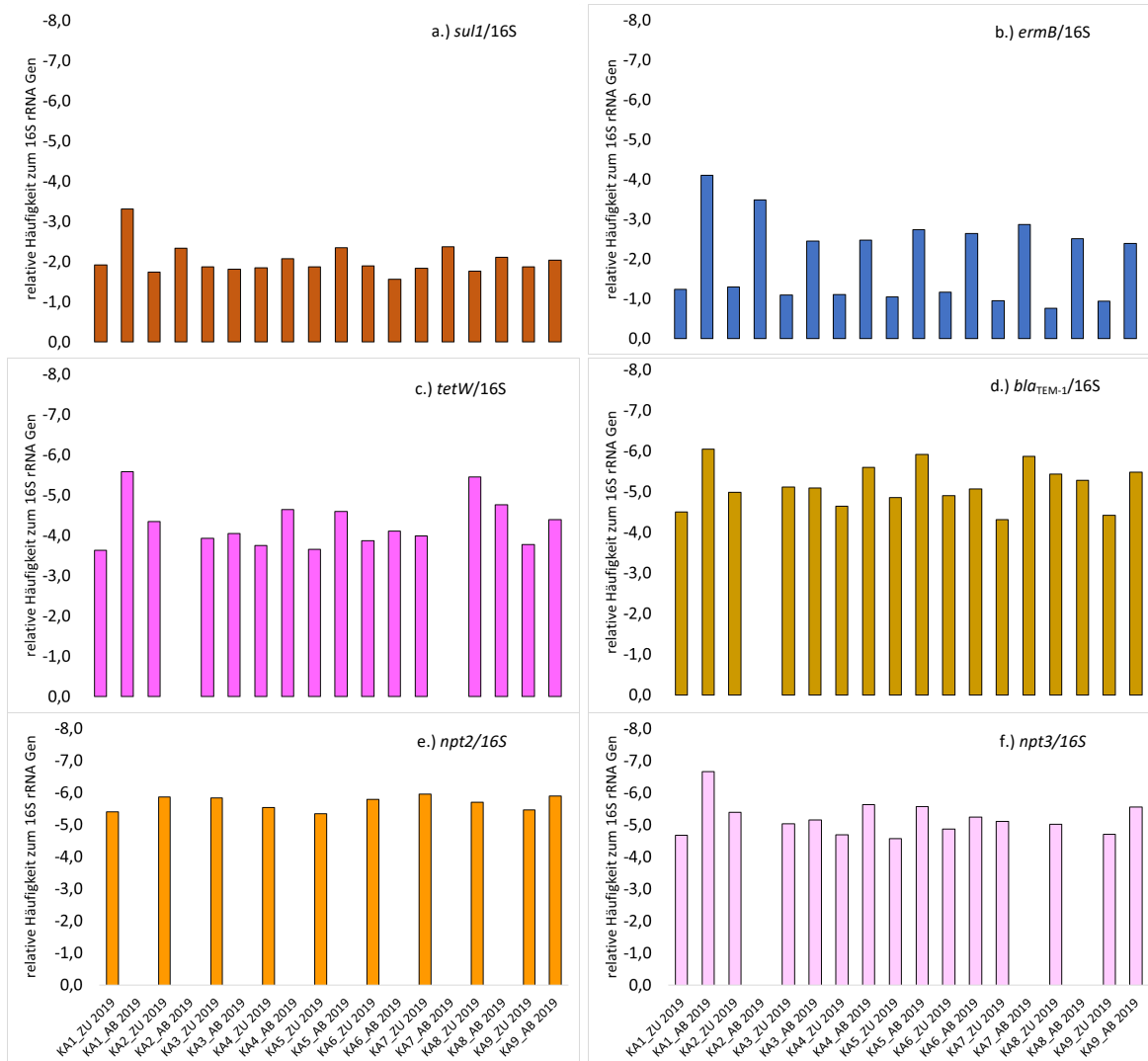


Abbildung 25: Relative ARG-Häufigkeiten in verschiedenen Kläranlagen Österreichs (2019). Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Mittelwerte der sieben ausgewählten ARGs (*sul1*, *ermB*, *vanA*, *tetW*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *npt2* und *npt3*) zum Mittelwert des bakteriellen 16S rRNA Gens in den untersuchten WMPs. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet. KA, Kläranlage; ZU, Zulauf; AB, Ablauf; WMP, Wochenmischprobe (7 Tage).

Die Reduktionen der untersuchten Gene, die durch die Abwasserreinigung in diesen Kläranlagen im Ablauf erzielt wurden, zeigen für das 16S rRNA Gen eine Verminderung der Genkonzentration um 1,0 bis 2,6 LOG-Stufen, für *sul1* 1,3 bis 2,9 LOG-Stufen, für *ermB* 2,7 bis 4,3 LOG-Stufen, für *tetW* 1,5 bis 3,6 LOG-Stufen, für *bla<sub>TEM-1</sub>* 1,3 bis 3,6 LOG Stufen, für *npt2* 2,3 LOG-Stufen und für *npt3* 1,5 bis 3,0 LOG-Stufen (Abbildung 26).

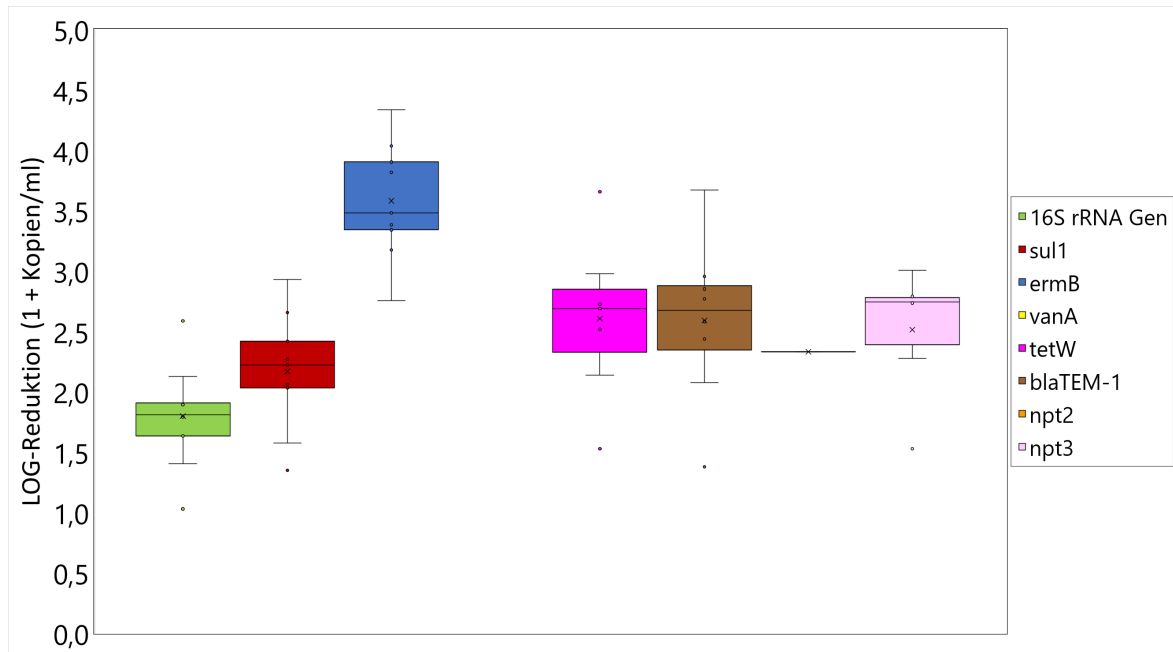


Abbildung 26: Absolute LOG-Reduktion der untersuchten Gene in 9 österreichischen Kläranlagen (2019).

Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Konzentrationsunterschiede des bakteriellen 16S rRNA Gens und der sieben ausgewählten ARGs (*sul1*, *ermB*, *vanA*, *tetW*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *npt2* und *npt3*) zwischen Kläranlagenzu- und -abläufen als Boxplots. Die Box selbst zeigt dabei den Bereich zwischen oberem (75 %) und unterem (25 %) Quartil an. Außerdem sind noch Median (horizontale Linie), Mittelwert (x), Minimum (untere Antenne) und Maximum (obere Antenne) sowie die Einzelwerte (Punkte) dargestellt. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet, als LOG Reduktion (1 + Genkopien/ml Probe). n = 9 jeweils für Zu- und Abläufe.

Im Zuge des Hochdurchsatz-Gen-Profilings (SmartChip Analyse, Resistomap) wurden die DNA-Extrakte der Kläranlagen-Proben aus dem Monitoring Sommer 2019 auf das 16S rRNA Gen und 71 Gene, darunter ARGs, Integrons und mobile genetische Elemente, untersucht. Alle untersuchten 71 Gene werden hier nachfolgend zusammenfassend als ARGs bezeichnet. Die untersuchten ARGs sind in der Tabelle 21 dargestellt. Die Gene, die detektiert wurden sind in Abbildung 27 so dargestellt, dass sie den jeweiligen Antibiotikaklassen und Gruppen zugeteilt sind.

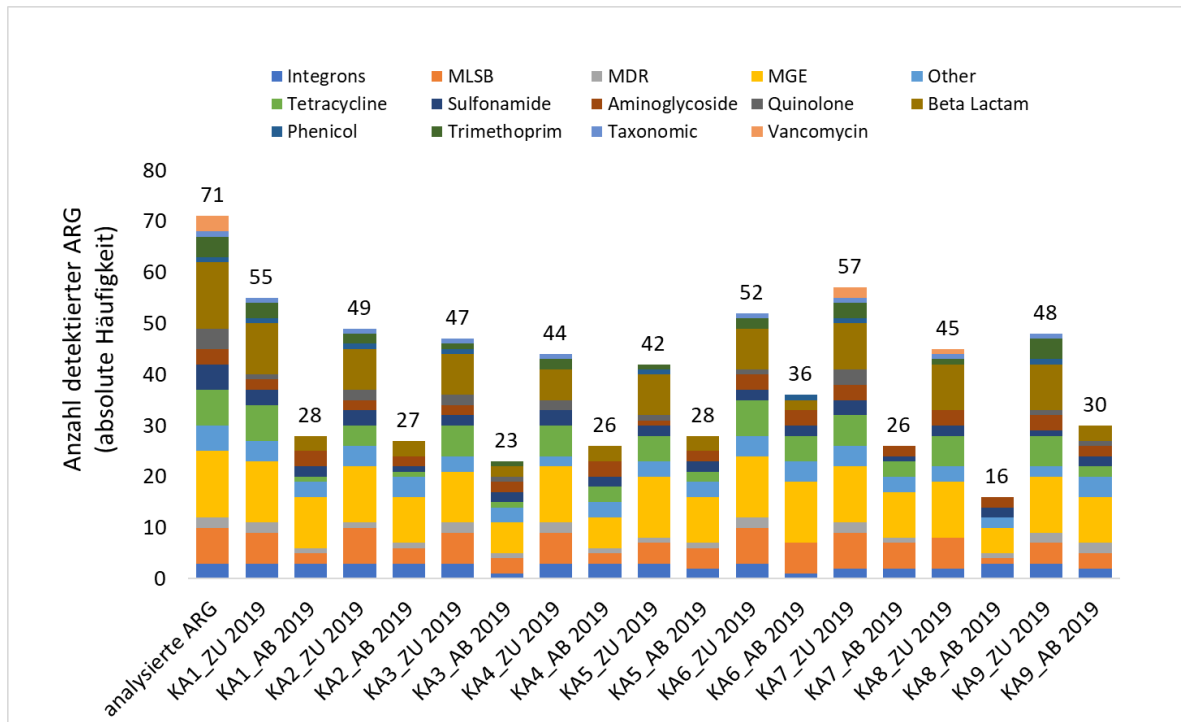


Abbildung 27: Anzahl detektierter ARGs mittels Hochdurchsatz-Gen-Profilung - Kläranlagen 2019.

Dargestellt sind Ergebnisse aus den SmartChip-Analysen (Resistomap) als gestapelte Säulen. n = 71 untersuchte ARGs; farbliche Einteilung in Antibiotikaklassen; KA1\_ZU 2019, Kläranlage 1 Zulauf 2019; KA1\_AB 2019, Kläranlage 1 Ablauf 2019; usw.

Die höchste Anzahl an ARGs wurde im Zulauf der Kläranlage 7 (KA7\_ZU 2019) gefunden. Hier wurden 57 verschiedene ARGs detektiert, wobei die Gene am häufigsten aus den drei Gruppen MGE (mobile genetische Elemente), Beta Lactame und MLSB (Macrolid-Lincosamid-Streptogramin B) stammten. Die niedrigste Anzahl an unterschiedlich detektierten Genen wurde im Ablauf der Kläranlage 8 (KA8\_AB 2019) mit 16 verschiedenen ARGs gefunden. Dabei stammten sie am häufigsten aus der Gruppe MGE (Abbildung 27, Anhang 2 - Abbildung 74). In dieser Analyse mittels Hochdurchsatz-Gen-Profilung wurden die Proben auch auf die ARGs *sul1*, *ermB*, *tetW* und *vanA*, die ebenfalls mittels qPCR ermittelt wurden, untersucht. *Sul1* konnte in allen Kläranlagen Zu- und Abläufen, außer KA2\_AB 2019, KA3\_ZU 2019, KA5\_ZU 2019, KA5\_AB 2019, KA7\_AB 2019, KA8\_AB 2019 und KA9\_ZU 2019, detektiert werden. *ErmB* konnte überall, außer in KA1\_AB 2019, KA4\_AB 2019, KA5\_AB 2019 und KA9\_AB 2019 detektiert werden. *TetW* konnte nicht in KA1\_AB 2019, KA2\_ZU 2019, KA2\_AB 2019, KA5\_AB 2019, KA6\_ZU 2019, KA7\_AB 2019, KA9\_ZU 2019 und KA9\_AB 2019 nachgewiesen werden. *VanA* wurde nur in KA8\_ZU 2019 detektiert. Vor allem die Ergebnisse von den ARGs *sul1* und *ermB* decken sich nicht mit den qPCR Ergebnissen, die dort in allen Kläranlagen Zu- und Abläufen mit relativ hohen Konzentrationen vorkamen. Das ARG *tetW* wurde bei den qPCR-

Analysen nur in KA2\_AB 2019 und KA7\_AB 2019 nicht detektiert. *VanA* konnte dagegen in der qPCR-Analyse bei diesen Kläranlagen Proben nie nachgewiesen werden (vgl. mit Abbildung 24). Die relativen Häufigkeiten dieser Gene am 16S rRNA Gen sind zusätzlich in Abbildung 28 dargestellt. Dabei zeigen die ARGs-Konzentrationen in den Zuläufen untereinander ein sehr ähnliches Bild (mit einer Streuung zwischen -3,4 und -2,0 LOG) für alle Kläranlagen, während sie sich in den Abläufen mehr unterscheiden. Im Ablauf der KA1 sind die Konzentrationen demnach am niedrigsten (mit einer Streuung zwischen -4,3 bis -3,1 LOG). Dagegen sind sie in den Abläufen der KA5 und KA6 am höchsten (mit einer Streuung zwischen -3,3 bis -2,0 LOG) und befinden sich somit im Konzentrationsbereich der Zuläufe. Im Ablauf der KA6 war auch die Anzahl an verschiedenen detektierten ARGs am höchsten (Abbildung 27).

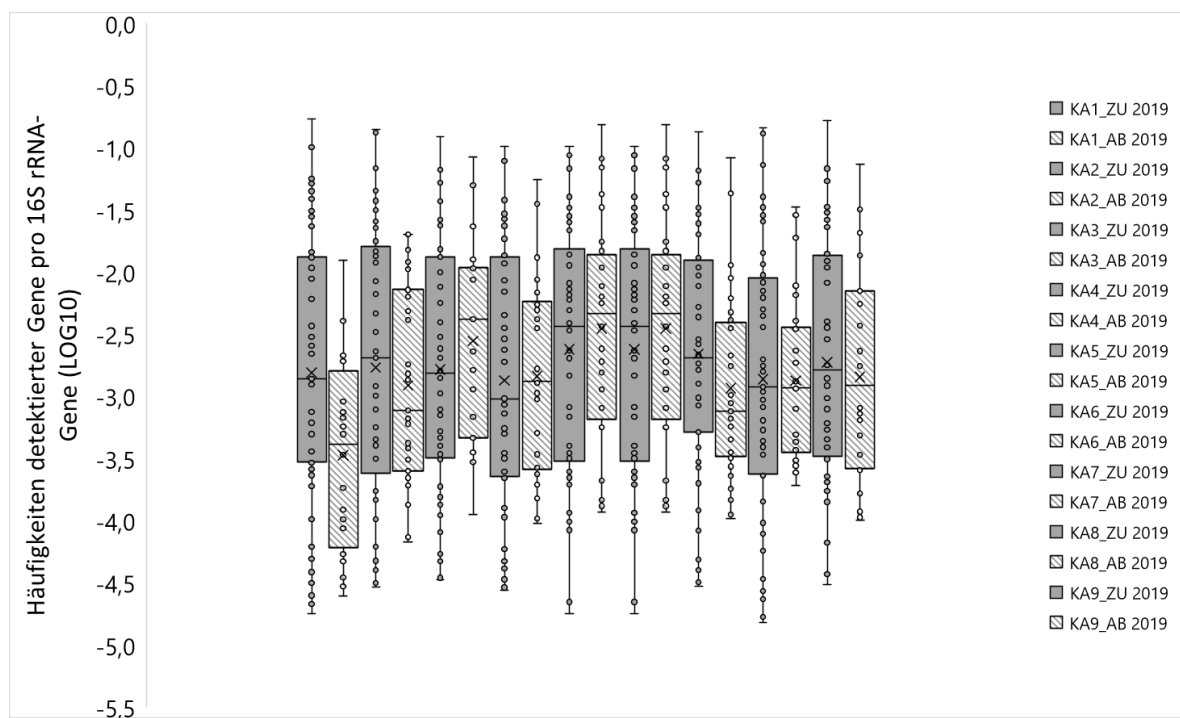


Abbildung 28: Relative Häufigkeiten detektiertes ARGs aus dem Hochdurchsatz-Gen-Profilierung - Kläranlagen 2019.

Dargestellt sind Ergebnisse aus den SmartChip-Analysen (Resistomap) als Boxplots. Sie zeigen die Streuungen der Konzentrationen aller analysierten ARGs bezogen auf die Konzentrationen des bakteriellen 16S rRNA Gens in den jeweiligen Kläranlagenzu- und -abläufen. Die Box selbst zeigt dabei den Bereich zwischen oberem (75 %) und unterem (25 %) Quartil an. Außerdem sind noch Median (horizontale Linie), Mittelwert (x), Minimum (untere Antenne) und Maximum (obere Antenne) sowie die Werte der einzelnen ARGs (Punkte) dargestellt. Die



Ergebnisse sind logarithmisch (LOG 10) dargestellt. n = 71 untersuchte ARGs; KA1\_ZU 2019, Kläranlage 1 Zulauf 2019; KA1\_AB 2019, Kläranlage 1 Ablauf 2019; usw.

Die Ergebnisse der räumlichen Untersuchung österreichischer Kläranlagen-Zuläufe aus April/Mai 2020 sind in den nachfolgenden Graphiken Abbildung 29 und Abbildung 30 dargestellt.

Das 16S rRNA Gen konnte in allen untersuchten Kläranlagen-Zuläufen, die im April/Mai 2020 untersucht wurden, mit absoluten Häufigkeiten zwischen  $9,0 \times 10^7$  (KA17\_ZU 2020) und  $1,4 \times 10^9$  Genkopien/ml (KA8\_ZU 2020) nachgewiesen werden. Das ARG *su1* konnte ebenfalls in allen Kläranlagen quantitativ nachgewiesen werden. Es wurden absolute Häufigkeiten zwischen  $1,9 \times 10^5$  (KA17\_ZU 2019) und  $1,5 \times 10^6$  (KA14\_ZU 2020) Genkopien/ml detektiert. Das ARG *ermB* konnte ebenfalls in allen Kläranlagen quantitativ detektiert werden. Es wurden absolute Häufigkeiten zwischen  $6,8 \times 10^6$  (KA17\_ZU 2020) und  $1,2 \times 10^8$  (KA8\_ZU 2020) Genkopien/ml quantifiziert. Das ARG *vanA* konnte in den Kläranlagen 4, 9, 10 und 15 (KA4\_ZU 2020, KA9\_ZU 2020, KA10\_ZU 2020 und KA15\_ZU 2020) mit absoluten Häufigkeiten von 123 (KA9\_ZU 2020) bis 1391 (KA10\_ZU 2020) Genkopien/ml quantifiziert werden. Bei allen anderen Kläranlagen in dieser Serie konnte dieses Gen nicht quantitativ nachgewiesen werden. Das ARG *tetW* wurde in allen Zuläufen der in diesem Zeitraum untersuchten Kläranlagen detektiert. Dabei wurden absolute Häufigkeiten zwischen  $2,0 \times 10^4$  (KA17\_ZU 2020) und  $1,0 \times 10^6$  (KA9\_ZU 2020) Genkopien/ml detektiert. Das ARG *bla<sub>TEM-1</sub>* konnte in allen Kläranlagen quantitativ detektiert werden. Dabei wurden absolute Häufigkeit zwischen  $5,3 \times 10^3$  (KA17\_ZU 2020) und  $1,3 \times 10^5$  (KA9\_ZU 2020) Genkopien/ml detektiert. Das ARG *npt2* konnte bei allen Kläranlagen quantitativ detektiert werden. Dabei wurden absoluten Häufigkeit von 45 (KA17\_ZU 2020) und  $2,4 \times 10^3$  (KA14\_AB 2020) Genkopien/ml quantifiziert. Das ARG *npt3* wurde ebenfalls in allen Kläranlagen detektiert. Es wurden absolute Häufigkeit von wenigstens  $1,6 \times 10^3$  (KA17\_ZU 2020) und höchstens  $1,8 \times 10^5$  (KA15\_ZU 2020) Genkopien/ml nachgewiesen (Abbildung 29). Die ARGs der untersuchten Kläranlagen sind nachfolgend in Abbildung 30 auch als relative Häufigkeit zum 16S rRNA Gen logarithmisch dargestellt.



Abbildung 29: Absolute Genabundanz in verschiedenen Kläranlagenzuläufen Österreichs (April/Mai 2020).

Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Werte der sieben ausgewählten ARGs (*sul1*, *ermB*, *vanA*, *tetW*, *bla*<sub>TEM-1</sub>, *npt2* und *npt3*) und des bakteriellen 16S rRNA Gens in den untersuchten TMPs (Tagesmischproben, 24 Std.). Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet, als LOG (1 + Genkopien/ml Probe); die Fehlerbalken zeigen die

Standardabweichungen zwischen den qPCR Replikaten (n = 2 für 16S rRNA Gen, n = 3 für ARGs) KA, Kläranlage; ZU, Zulauf; AB, Ablauf.

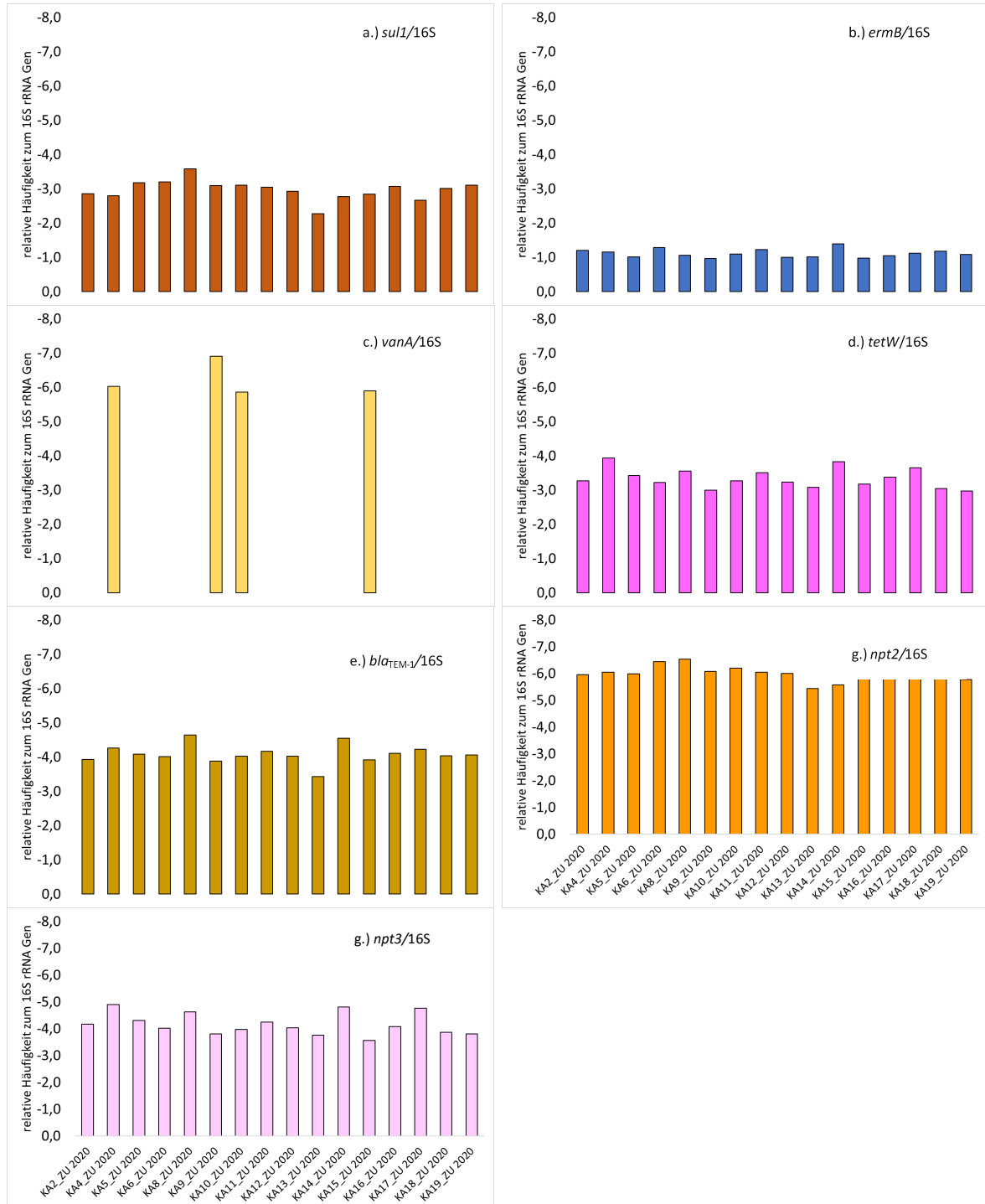


Abbildung 30: Relative ARG-Häufigkeiten verschiedener Zulaufe von Kläranlagen in Österreich (April/Mai 2020).

Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen ARGs (*sul1*, *ermB*, *vanA*, *tetW*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *npt2* und *npt3*) zum Mittelwert des bakteriellen 16S rRNA Gens in den untersuchten TMPs (Tagesmischproben, 24 Std.). Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet. KA, Kläranlage; ZU, Zulauf; AB, Ablauf.

Absolute und relative Abundanzen von einigen Kläranlagenproben aus dem Sommer 2021, bei denen das 16SrRNA Gen und einzelne ARGs Targets mittels qPCR analysiert worden sind, sind in Abbildung 31 und Abbildung 32 dargestellt. In zwei Übersichtsgrafik, die die Ergebnisse von Kläranlagen aus den Jahren 2019 und 2021 vergleichen, sind in Abbildung 33 und Abbildung 34 dargestellt.

Dabei wurde das 16S rRNA Gen in allen drei Kläranlagen sowohl für Zu- als auch für Ablauf untersucht. Dabei wurden absoluten Häufigkeiten zwischen  $1,6 \times 10^8$  (KA6\_ZU 2021) und  $1,4 \times 10^9$  Genkopien/ml (KA1\_ZU 2021) in den Zuläufen nachgewiesen. In den Abläufen wurden absoluten Häufigkeiten des 16S rRNA Gens zwischen  $5,0 \times 10^4$  (KA9\_AB 2021) und  $1,3 \times 10^7$  (KA1\_AB 2021) Genkopien/ml. Das ARG *sul1* wurde ebenfalls in allen drei Kläranlagen gemessen und quantitativ nachgewiesen. Es wurden in den Zuläufen absolute Häufigkeiten zwischen  $1,8 \times 10^6$  (KA6\_ZU 2021) und  $1,1 \times 10^7$  (KA1\_ZU 2021) Genkopien/ml detektiert. In den Abläufen waren es  $1,1 \times 10^3$  (KA9\_AB 2021) und  $1,1 \times 10^5$  (KA6\_ZU 2021) Genkopien/ml. Das ARG *ermB* wurde nur für die KA 1 und die KA 9 für Zu- und Abläufe gemessen und konnte auch in allen Proben detektiert werden. Es wurde im Zulauf mit max.  $8,1 \times 10^6$  (KA9\_ZU 2021) Genkopien/ml und im Ablauf mit max.  $1,4 \times 10^3$  Genkopien/ml detektiert. Das ARG *vanA* wurde nur für die KA 1 und die KA 9 für Zu- und Abläufe gemessen und konnte nur im Zulauf der KA 9 mit 675 Genkopien/ml detektiert werden. Das ARG *tetW* wurde ebenfalls nur für die KA 1 und die KA 9 für Zu- und Abläufe gemessen und konnte auch in allen Proben detektiert werden. Es wurde im Zulauf mit max.  $6,8 \times 10^5$  (KA1\_ZU 2021) Genkopien/ml und im Ablauf mit max. 571 Genkopien/ml detektiert. Das ARG *bla<sub>TEM-1</sub>* wurde nur für die KA 1 für Zu- und Ablauf sowie für die KA 9 nur für den Zulauf gemessen. Es konnte nur im Zulauf der KA 9 mit 56 Genkopien/ml detektiert werden. Das ARG *npt2* wurde ebenfalls nur für die KA 1 für Zu- und Ablauf sowie für die KA 9 nur für den Zulauf gemessen. Es konnte in allen 3 Proben quantitativ detektiert werden, mit absoluten Häufigkeiten von max.  $3,5 \times 10^3$  Genkopien/ml (KA1\_ZU 2021) und wenigstens 48 (KA1\_AB 2021) Genkopien/ml. Auch das ARG *npt3* wurde nur für die KA 1 für Zu- und Ablauf sowie für die KA 9 nur für den Zulauf gemessen. Es wurden absolute Häufigkeit von max. 50 Genkopien/ml (KA1\_ZU 2021 und KA9\_ZU 2021) detektiert (Abbildung 31). Die ARGs der untersuchten Kläranlagen sind nachfolgend in Abbildung 32 auch als relative Häufigkeit zum 16S rRNA Gen logarithmisch dargestellt.

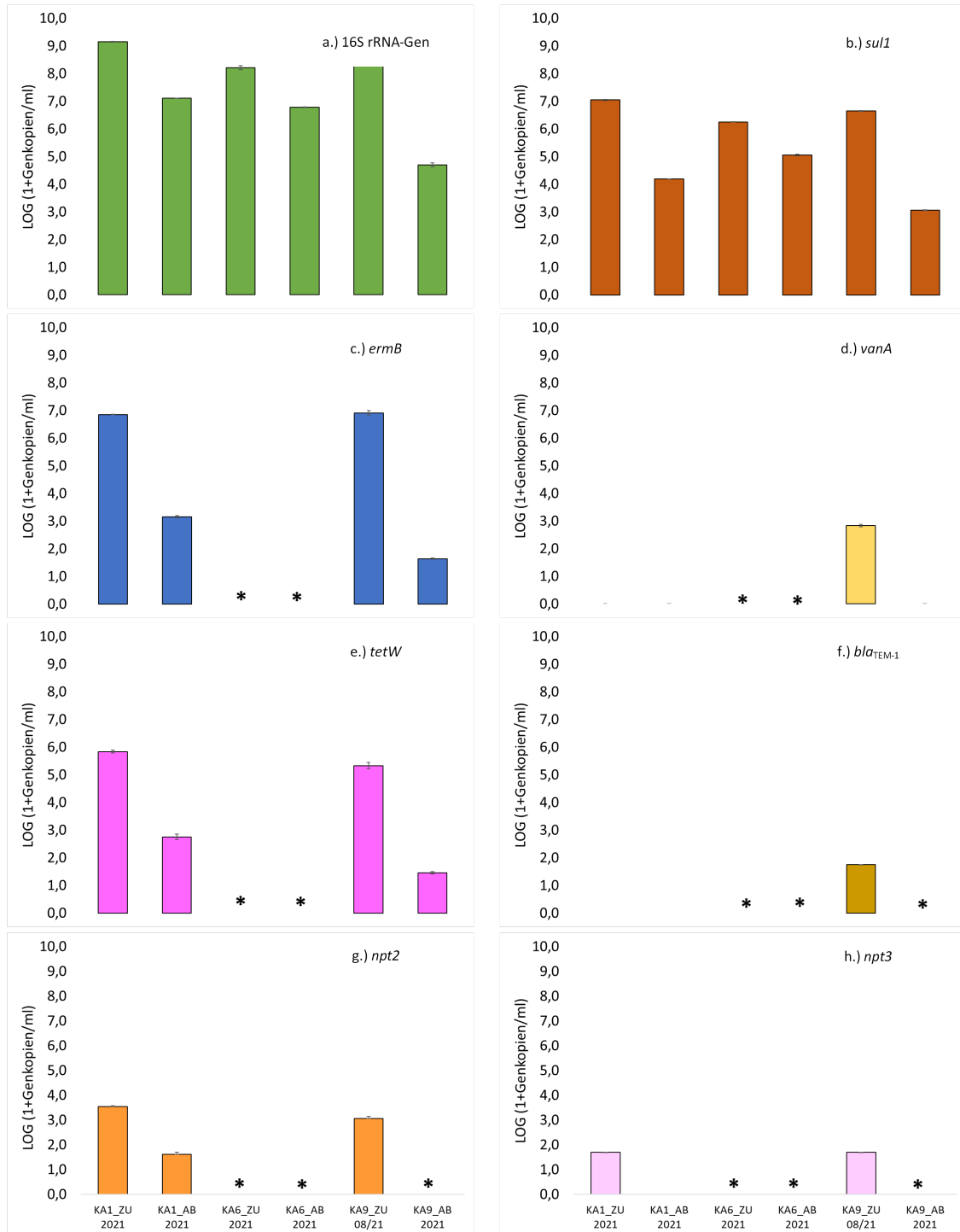


Abbildung 31: Absolute Genabundanz verschiedener Kläranlagen in Österreich (Sommer 2021).

Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Werte des bakteriellen 16S rRNA Gens und der sieben ausgewählten ARGs (*ermB*, *vanA*, *tetW*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *npt2* und *npt3*) in den untersuchten WMPs. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet, als LOG (1 + Genkopien/ml Probe); die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen zwischen den qPCR

Replikaten (n = 2 für 16S rRNA Gen, n = 3 für ARGs); KA1\_ZU 2021, Kläranlage 1 Zulauf 2020; KA1\_AB 2021, Kläranlage 1 Ablauf 2021 etc.; \*, Targets wurden nicht gemessen

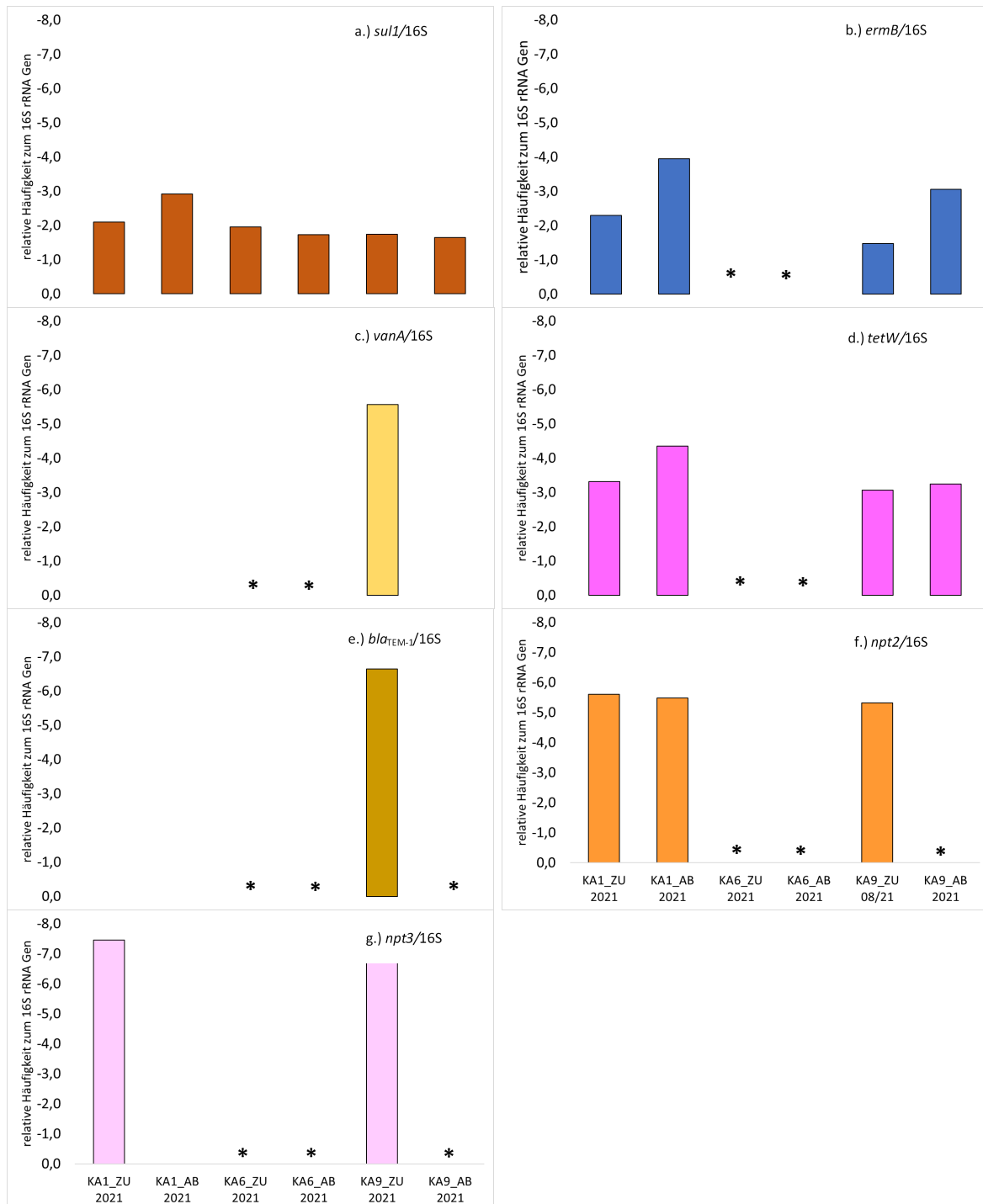


Abbildung 32: Relative ARG-Häufigkeit von verschiedenen Kläranlagen in Österreich (Sommer 2021).

Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Mittelwerte der sieben ausgewählten ARGs (*sul1*, *ermB*, *vanA*, *tetW*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *npt2* und *npt3*) zum Mittelwert des

bakteriellen 16S rRNA Gens in den untersuchten WMPs. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet. \* =Targets wurden nicht gemessen. KA1\_ZU 2021, Kläranlage 1 Zulauf 2021; KA1\_AB 2021, Kläranlage 1 Ablauf 2021 etc.

Die Übersichtsgrafik Abbildung 33 zeigt exemplarisch die absoluten Häufigkeiten des 16S rRNA Gens und der 7 ARGs vergleichend für die Kläranlage 1 für Zu- und Ablauf Proben aus Sommer 2019 und Sommer 2021. Auffällig ist, dass das ARG *bla*<sub>TEM-1</sub> 2019 in der KA 1 im Zu- und Ablauf quantitativ nachgewiesen werden konnte, dagegen in den Proben von 2021 nicht. Das ARG *npt2* konnte in der Ablaufprobe von 2019 nicht quantitativ detektiert werden, dagegen in der Probe von 2021 schon. *Npt3* war in Zu- und Ablauf von den Proben aus 2019 nachweisbar, jedoch aus den Proben von 2021 nur im Zulauf. Es scheint hier in den 2 Jahren zu einem Rückgang der ARGs Konzentrationen von *bla*<sub>TEM-1</sub> und *npt3* in der KA 1 gekommen zu sein. Andererseits zeigen ARGs Konzentrationen von *tetW* und *npt2* einen leichten Anstieg. Ein möglicher Grund könnte sein, dass in dieser Zeit manche Antibiotika weniger oft und manche häufiger eingesetzt wurden. Um diese Theorie zu bestätigen wären aber weitere Untersuchungen notwendig. Möglicherweise wurden auch manche Antibiotika in der Zeit der COVID-19 Pandemie weniger oft verschrieben.

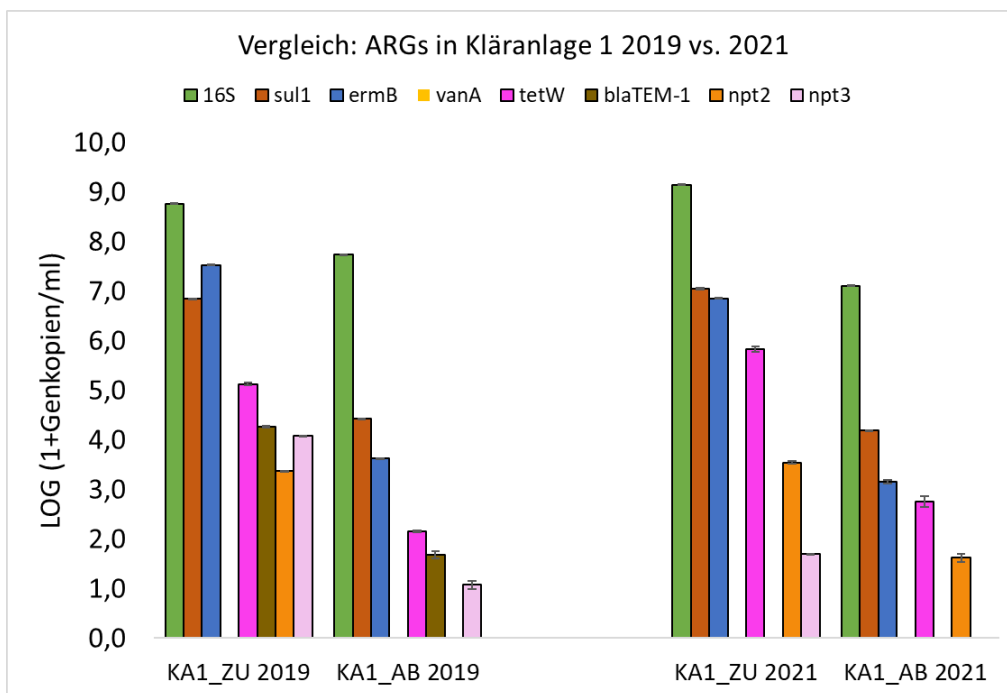


Abbildung 33: Vergleich absoluter Genabundanz von Kläranlage 1 aus den Jahren 2019 und 2021.

Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Werte des bakteriellen 16S rRNA Gens und der sieben ausgewählten ARGs (*sul1*, *ermB*, *vanA*, *tetW*, *bla*<sub>TEM-1</sub>, *npt2* und *npt3*) in den untersuchten WMPs; Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet, als LOG (1 +

Genkopien/ml Probe); die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen zwischen den qPCR Replikaten (n = 2 für 16S rRNA Gen, n = 3 für ARGs); KA1\_ZU 2019, Kläranlage 1 Zulauf 2019; KA1\_AB\_2019, Kläranlage 1 Ablauf 2019; usw.

Im Zuge eines weiteren Hochdurchsatz-Gen-Profilings (SmartChip Analyse, Resistomap) wurden die DNA-Extrakte einiger Kläranlagen-Proben aus dem Sommer 2021 auf das 16S rRNA Gen und 95 ARGs untersucht. Da die Ergebnisse hier mit den Proben aus 2019 verglichen werden sollen, wurden nur die überlappenden 71 ARGs, die auch schon mittels Hochdurchsatz-Gen-Profilings im Jahr 2019 untersucht wurden, dargestellt. Die untersuchten Gene sind in der Tabelle 21 dargestellt. Die Ergebnisse vergleichen die Anzahl an detektierten ARGs in den Kläranlagen 1, 5 und 8 (Zu- und Ablauf) mit den Daten aus 2019 und 2021. In allen Zu- und Abläufen konnten für die Proben aus 2021 mehr verschiedene ARGs detektiert werden, als in den Proben der gleichen Kläranlagen im Jahr 2019. Am deutlichsten ist das in der KA5 sowohl für die Zu- als auch die Ablaufprobe zu sehen. Warum die Unterschiede zwischen den beiden Jahren so groß sind, kann nicht genau erklärt werden. Entweder haben Bakterien in dieser Zeit noch viel mehr verschiedene Resistenzen gegen diverse Antibiotikaklassen gebildet oder es liegt eventuell auch an der Analyse-Methode. Möglicherweise ist diese innerhalb der 2 Jahren sensitiver geworden und somit wurden noch mehr verschiedene ARGs detektiert (Abbildung 34). Zusätzlich sind in der Abbildung 35 die relativen Häufigkeiten zum 16S rRNA Gen dargestellt, um eine Abschätzung bezüglich der ARG-Konzentrationen zu bekommen. Demnach sind die Konzentrationen an detektierten ARGs nur in den Zu- und Abläufen der KA1 und KA8 von 2021 höher (Median < 0,5 LOG) als in selbigen aus dem Jahr 2019. Erstaunlicherweise ist die relative ARG-Konzentration bei KA5, wo ein deutlicher Anstieg der ARG-Anzahl beobachtet wurde, sowohl im Zu- als auch im Ablauf im Jahr 2021 geringer als 2019. Daher zeigt sich hier aufgrund dieser Ergebnisse keine drastische Zunahme an ARG-Konzentrationen in diesen Kläranlagen.



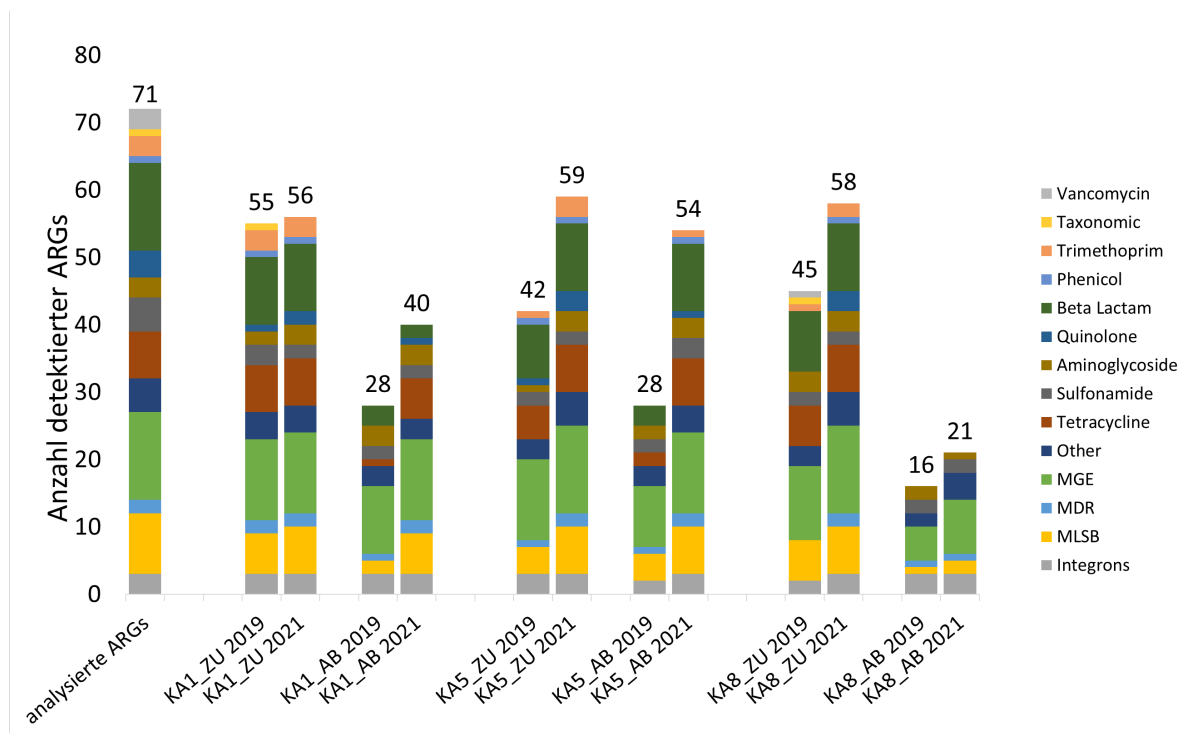


Abbildung 34: Vergleich der Anzahl detektierter ARGs von Kläranlagen aus den Jahren 2019 und 2021 mittels Hochdurchsatz-Gen-Profilung.

Dargestellt sind Ergebnisse aus den SmartChip-Analysen (Resistomap); n = 71 ARGs (n = 95 ARGs für Proben aus dem Jahr 2021; nur überlappende 71 ARGs dargestellt); farbliche Einteilung in Antibiotikaklassen. KA1\_ZU 2019, Kläranlage 1 Zulauf 2019; KA1\_AB 2019, Kläranlage 1 Ablauf 2019; etc.

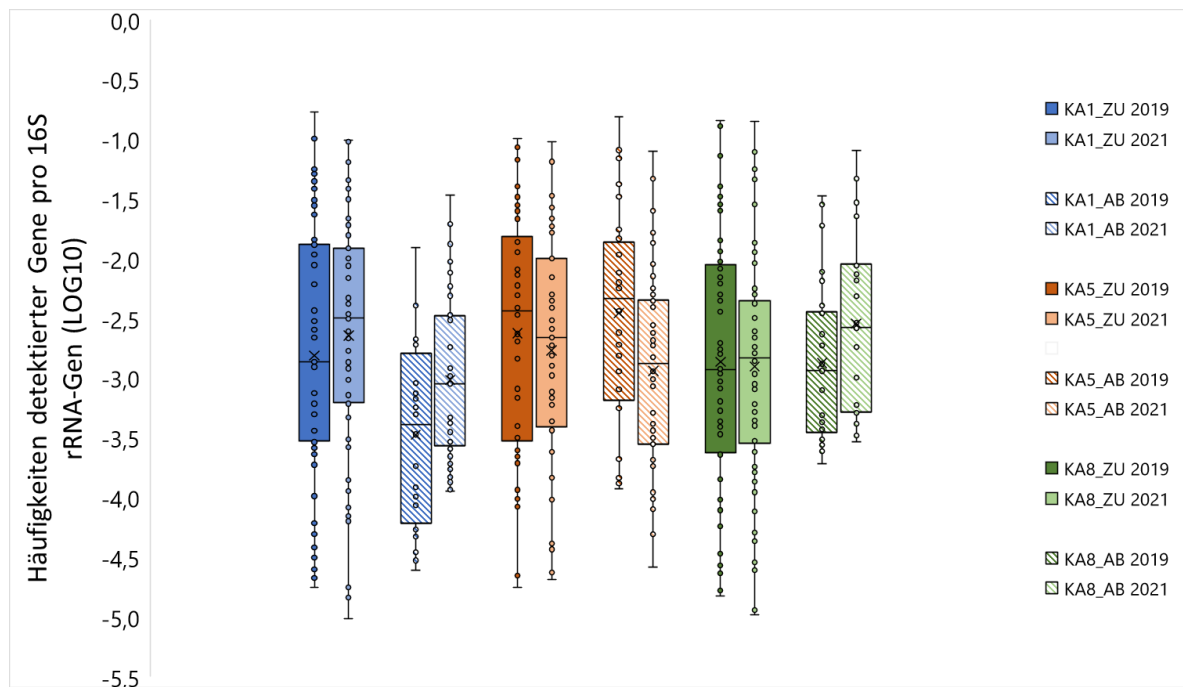


Abbildung 35: Vergleich der relativen Häufigkeiten detektierter ARGs aus dem Hochdurchsatz-Gen-Profilung - Kläranlagen 2019 vs. 2021.

Dargestellt sind Ergebnisse aus den SmartChip-Analysen (Resistomap) als Boxplot-Diagramm. Sie zeigen die Streuungen der Konzentrationen aller analysierten ARGs bezogen auf die Konzentration des bakteriellen 16S rRNA Gens in den jeweiligen Kläranlagenzu- und -abläufen. Die Box selbst zeigt dabei den Bereich zwischen oberem (75 %) und unterem (25 %) Quartil an. Außerdem sind noch Median (horizontale Linie), Mittelwert (x), Minimum (untere Antenne) und Maximum (obere Antenne) sowie die Werte der einzelnen ARGs (Punkte) dargestellt. Die Ergebnisse sind logarithmisch (LOG 10) dargestellt. n = 71 untersuchte ARGs (n = 95 ARGs für Proben aus dem Jahr 2021; nur überlappende 71 ARGs dargestellt); KA1\_ZU 2019, Kläranlage 1 Zulauf 2019; KA1\_AB 2019, Kläranlage 1 Ablauf 2019; usw.

### 3.2.2 Zeitlich hochaufgelöstes Monitoring ausgewählter Kläranlagen

Die Ergebnisse des zeitlich hochaufgelösten Monitorings ausgewählter Kläranlagen sind nachfolgenden in den Abbildungen Abbildung 36, Abbildung 37, Abbildung 38, Abbildung 39, Abbildung 40 und Abbildung 41 dargestellt und beschrieben.

Das 16S rRNA-Gen konnte im zeitlich aufgelösten Monitoring der Kläranlage 6 in allen Zulauf und Ablauf-Proben quantitativ nachgewiesen werden. Bei den Zuläufen wurde die geringste absoluten Abundanzen bei  $4,1 \times 10^8$  (KA6\_ZU 01/20) und die höchsten bei  $3,7 \times 10^9$  Genkopien/ml (KA6\_ZU 07/20) nachgewiesen. In den Abläufen wurden absolute Abundanzen

des 16SrRNA-Gens von wenigstens  $1,6 \times 10^5$  (KA6\_AB 01/20) und höchstens  $5,7 \times 10^7$  (KA6\_AB 02/20) Genkopien/ml detektiert. Das ARGs *sul1* konnte bei allen beprobten Zu- und Abläufen nachgewiesen werden. In den Zuläufen wurde *sul1* mit wenigstens  $1,5 \times 10^6$  (KA6\_ZU 01/20) und höchstens mit  $1,6 \times 10^7$  Genkopien/ml (KA6\_ZU 09/19) detektiert. In den Abläufen wurden das Gen mit wenigstens  $2,5 \times 10^4$  (KA6\_AB 07/20) und höchstens  $2,7 \times 10^6$  (KA6\_AB 09/19) Genkopien/ml nachgewiesen. Das ARG *ermB* konnte in allen Zulauf- und Ablauf Proben dieser Kläranlage quantitativ nachgewiesen werden. In den Zuläufen wurden wenigstens  $8,8 \times 10^6$  (KA6\_ZU 02/20) und höchstens  $2,3 \times 10^8$  Genkopien/ml (KA6\_ZU 09/19) detektiert. In den Abläufen wurden wenigstens  $7,9 \times 10^2$  (KA6\_AB 07/20) und höchstens  $1,1 \times 10^6$  (KA6\_AB 02/20) Genkopien/ml nachgewiesen. Das ARG *vanA* konnte in diesem Untersuchungszeitraum nur in der Probe KA6\_ZU 07/20 mit einer absoluten Häufigkeit von 132 Genkopien/ml nachgewiesen werden. In allen anderen Proben konnte *vanA* nicht quantitativ detektiert werden. Das ARG *tetW* wurde in allen Zu- und Ablauf-Proben der Kläranlage quantitativ nachgewiesen. Es wurden absolute Werte in den Zuläufen von wenigstens  $9,6 \times 10^4$  (KA6\_ZU 08/19) und höchstens  $9,6 \times 10^5$  (KA6\_ZU 04/20) Genkopien/ml nachgewiesen. In den Abläufen konnte *tetW* mit wenigstens  $5,8 \times 10^2$  (KA6\_AB 07/20) und höchstens  $2,9 \times 10^3$  (KA6\_AB 09/19) Genkopien/ml im detektiert werden. Das ARG *bla*<sub>TEM-1</sub> konnte in allen Zu- und Ablauf-Proben der Kläranlage, außer für KA6\_ZU 01/20, KA6\_AB 01/20, KA6\_ZU 07/20 und KA6\_AB 07/20, quantitativ nachgewiesen werden. Es wurden in den Zuläufen zwischen  $9,0 \times 10^3$  (KA6\_ZU 08/19) und  $1,7 \times 10^5$  (KA6\_ZU 09/19) Genkopien/ml nachgewiesen. In den Abläufen konnten zwischen 33 (KA6\_AB 04/20) und 901 (KA6\_AB 09/19) Genkopien/ml detektiert werden. Das ARG *npt2* konnte in allen Zulauf-Proben der Kläranlage, außer in KA6\_ZU 01/20 und KA6\_ZU 07/20, quantitativ nachgewiesen werden. Es wurden zwischen 501 (KA6\_ZU 09/19) und 1170 (KA6\_ZU 04/20) Genkopien/ml quantifiziert. Im Ablauf der Kläranlage konnte *npt2* nur in KA6\_AB 09/19 mit 106 Genkopien/ml quantitativ nachgewiesen werden. Bei allen anderen Ablauf-Proben konnte das Resistenzgen nicht quantitativ detektiert werden. Die Messung von des Probenextraktes KA6\_AB 04/20 wurde aus den Ergebnissen exkludiert, da aufgrund einer sehr hohen Streuung der Ct-Werte aller 3 Replikate kein sicheres Ergebnis ermittelt werden konnte. Aufgrund von Ressourcenknappheit konnte diese Messung auch nicht mehr wiederholt werden. Die betreffende Probe wurde in der Grafik mittels „\*“ markiert. Das ARG *npt3* wurde in allen Zu- und Ablauf-Proben der Kläranlage, außer im Probenextrakt KA6\_AB 01/20, quantitativ nachgewiesen. Dabei wurden Werte zwischen 49 (KA6\_ZU 01/20) und  $1,9 \times 10^5$  (KA6\_ZU 07/20) Genkopien/ nachgewiesen. In den Ablauf-Proben der Kläranlage konnte *npt3* mit Genkopien/ml zwischen 68 (KA6\_AB 04/20) und 380 (KA6\_AB 09/20) detektiert werden (Abbildung 36). Die ARGs der untersuchten Kläranlage sind nachfolgend in Abbildung 37 auch als relative Häufigkeiten zum 16S rRNA Gen dargestellt.

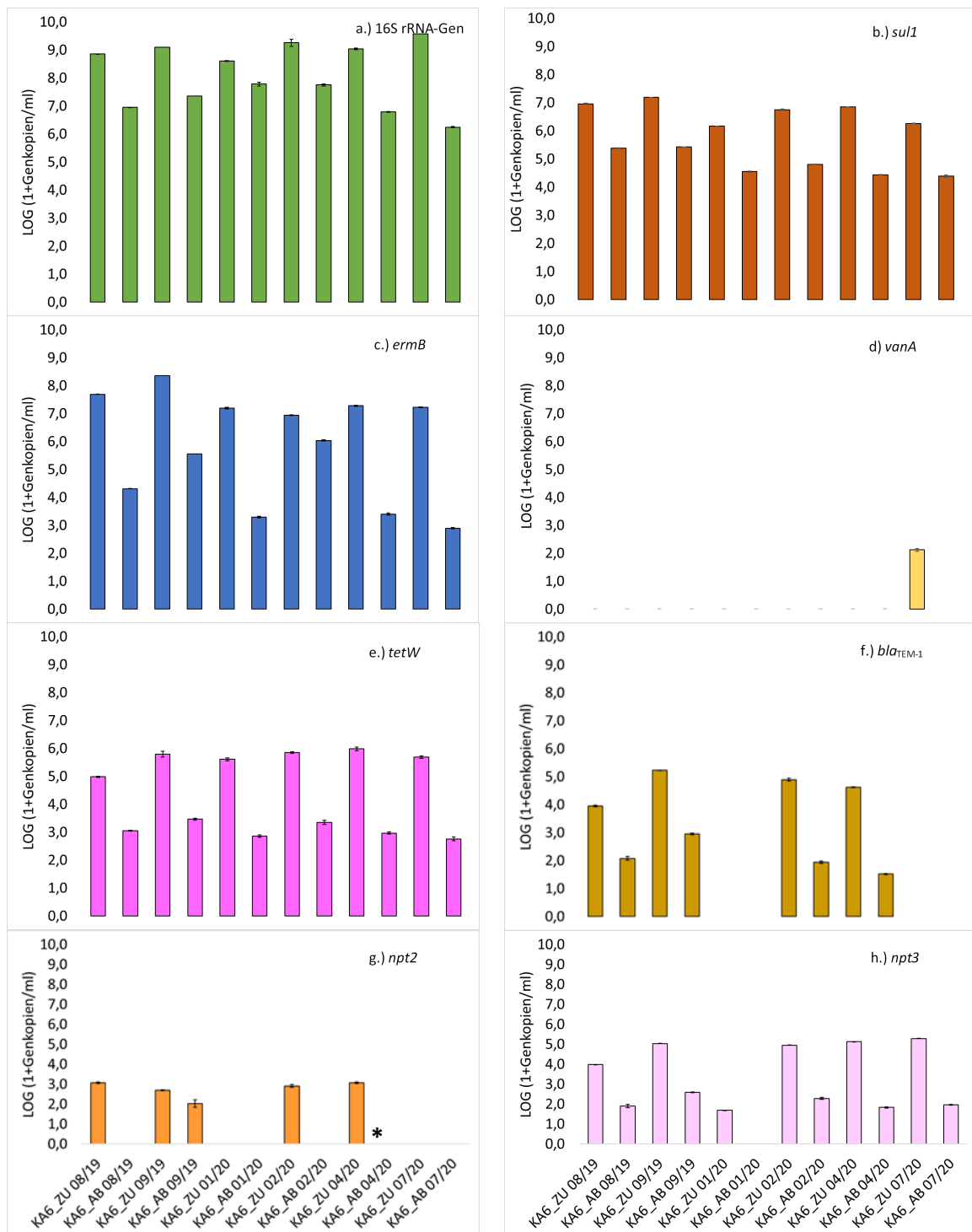


Abbildung 36: Absolute Genabundanz des zeitlich hochaufgelösten Monitorings von Kläranlage 6 (2019/2020).

Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Werte des bakteriellen 16S rRNA Gens und der sieben ausgewählten ARGs (*ermB*, *vanA*, *tetW*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *npt2* und *npt3*) in den untersuchten WMPs. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet, als LOG (1 + Genkopien/ml Probe); die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen zwischen den qPCR

Replikaten (n = 2 für 16S rRNA Gen, n = 3 für ARGs), KA6\_ZU 08/19, Kläranlage 6 Zulauf August 2019; KA6\_AB 08/2019, Kläranlage 6 Ablauf August 2019 etc.; \* = Messergebnis aus Datenanalyse exkludiert.

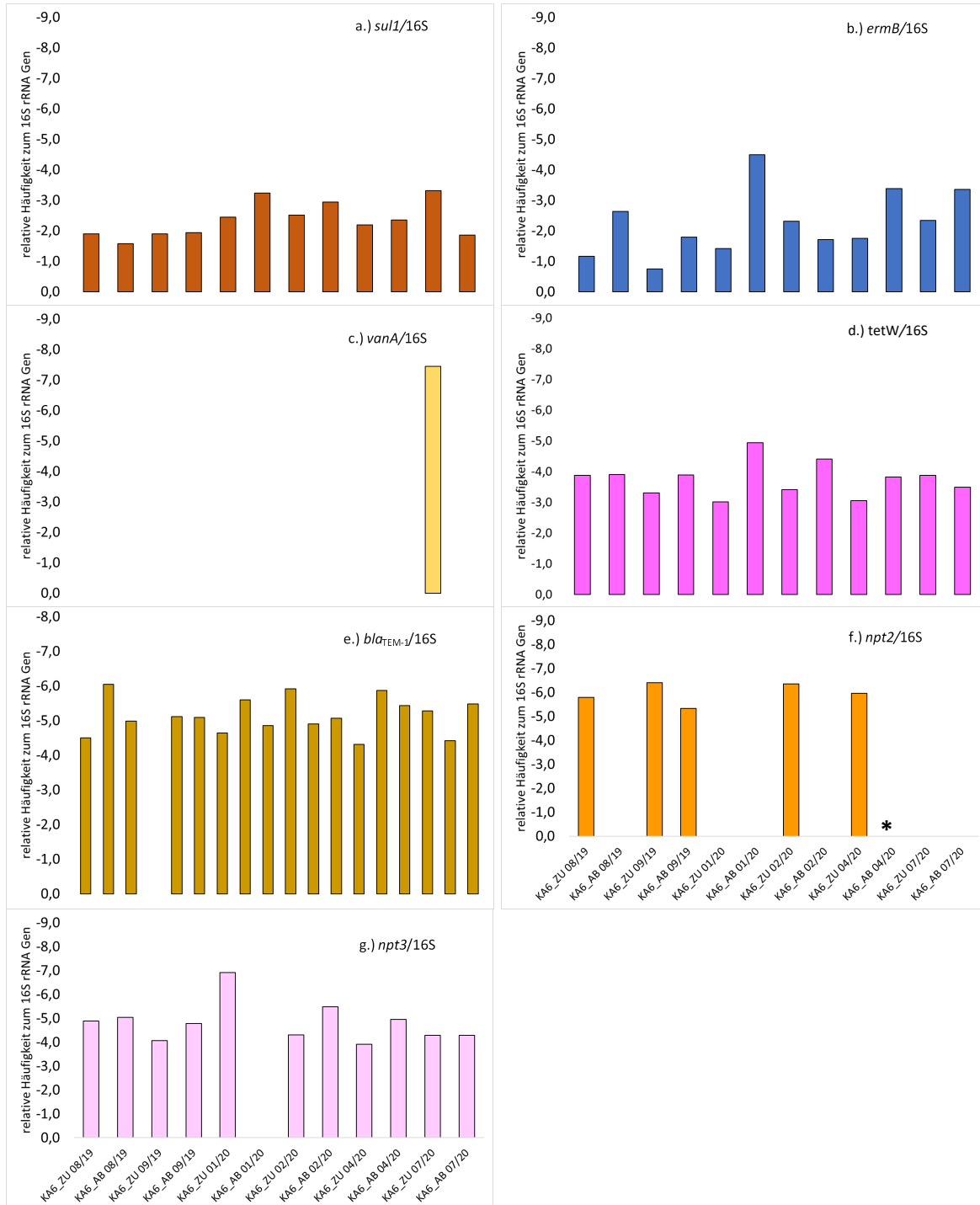


Abbildung 37: Relative ARG-Häufigkeit des zeitlich hochaufgelösten Monitorings von Kläranlage 6 (2019/2020).

Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Mittelwerte der sieben ausgewählten ARGs (*sul1*, *ermB*, *vanA*, *tetW*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *npt2* und *npt3*) zum Mittelwert des bakteriellen 16S rRNA Gens in den untersuchten WMPs. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet. KA6\_ZU 08/19, Kläranlage 6 Zulauf August 2019, KA6\_AB 08/2019, Kläranlage 6 Ablauf August 2019 etc.; \* Messergebnis aus Datenanalyse exkludiert.

Das 16S rRNA-Gen konnte im wöchentlichen Monitoring der Kläranlage 9 in allen Zulauf-Proben quantitativ nachgewiesen werden. Es wurden zwischen  $3,4 \times 10^8$  (KA9\_ZU 070321) und  $1,0 \times 10^9$  (KA9\_ZU 190121) Genkopien/ml nachgewiesen. Das ARG *sul1* konnte ebenfalls bei allen Proben nachgewiesen werden, mit Genkopien/ml zwischen mit  $7,3 \times 10^5$  (KA9\_ZU 311220) und  $9,6 \times 10^6$  (KA9\_ZU 030121). Das ARGs *ermB* konnte ebenfalls in allen Zulauf-Proben dieser Kläranlage quantitativ nachgewiesen werden. Es wurden zwischen  $5,0 \times 10^6$  (KA9\_ZU 241220) und  $4,0 \times 10^7$  Genkopien/ml detektiert. Das ARG *vanA* wurde zwischen  $58$  (KA9\_ZU 271220) und  $3,7 \times 10^3$  (KA9\_ZU 090221) Genkopien/ml quantitativ nachgewiesen. Das ARG *tetW* wurde in allen Zulauf-Proben der Kläranlage nachgewiesen. Es wurden zwischen  $5,3 \times 10^3$  (KA9\_ZU 011220) und  $9,5 \times 10^5$  (KA9\_ZU 090221) Genkopien/ml nachgewiesen. Das ARG *bla<sub>TEM-1</sub>* konnte mit Ausnahme von zwei Proben in allen Proben der Kläranlage detektiert werden. Es wurden absolute Abundanzen zwischen  $1,1 \times 10^4$  (KA9\_ZU 311220) und  $1,5 \times 10^5$  (KA9\_ZU 250121) Genkopien/ml nachgewiesen. Das ARG *npt2* konnte in allen Proben der Kläranlage, außer in den Extrakten der Proben KA9\_ZU 090221, KA9\_ZU 280221, KA9\_ZU 140321 und KA9\_ZU 210321, quantitativ nachgewiesen werden. Es wurden wenigstens  $151$  (KA9\_ZU 311220) und höchstens  $1,0 \times 10^3$  (KA9\_ZU 030121) Genkopien/ml quantifiziert. Das ARG *npt3* konnte in allen Proben der Kläranlage, außer im Extrakt der Proben KA9\_ZU 090221, nachgewiesen werden. Es wurden absolute Abundanzen von wenigstens  $8,7 \times 10^3$  (KA9\_ZU 241220) und höchstens  $1,9 \times 10^5$  (KA9\_ZU 070321) Genkopien/ml nachgewiesen. Bei den ARGs *bla<sub>TEM-1</sub>*, *npt2* und *npt3* mussten Messergebnisse aufgrund zu hoher Streuungen zwischen den in der qPCR erhaltenen Ct-Werten der 3 Replikate der einzelnen Proben aus der Datenanalyse exkludiert werden. Aufgrund von Ressourcenknappheit konnten diese Messungen auch nicht mehr wiederholt werden. Die betreffenden Proben wurden in der graphischen Darstellung mit „\*“ markiert (Abbildung 38). Die ARGs der untersuchten Kläranlage sind nachfolgend in Abbildung 39 auch normalisiert (als relative Häufigkeit zum 16S rRNA Gen) dargestellt.

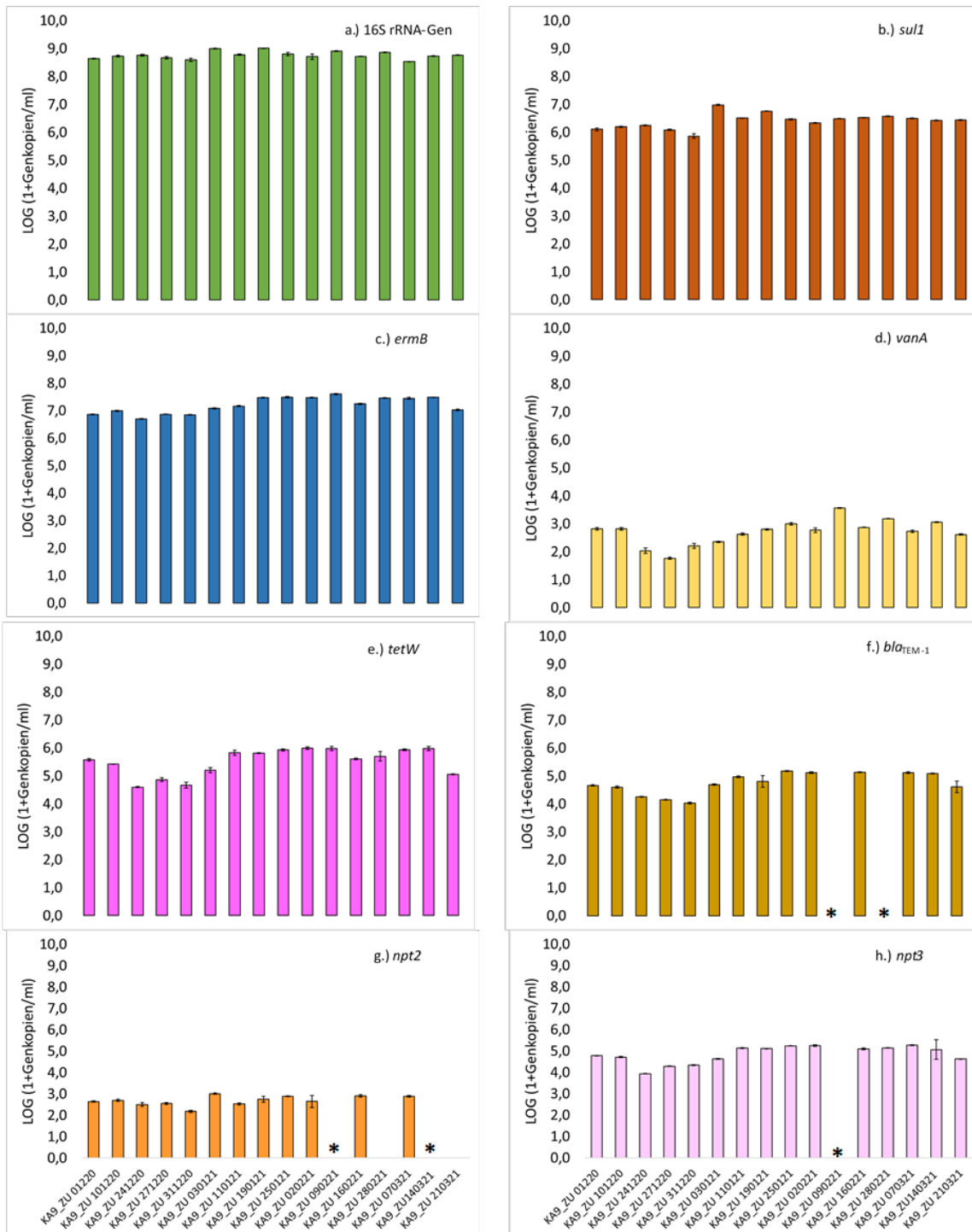


Abbildung 38: Absolute Genabundanz des zeitlich hochaufgelösten Monitorings von Kläranlage 9 (Dez. 2020 bis März 2021)

Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Werte des bakteriellen 16S rRNA Gens und der sieben ausgewählten ARGs (*sul1*, *ermB*, *vanA*, *tetW*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *npt2* und *npt3*) in den untersuchten WMPs. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet, als LOG (1 + Genkopien/ml Probe); die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen zwischen den qPCR

Replikaten (n = 2 für 16S rRNA Gen, n = 3 für ARGs), Kläranlage 9 Zulauf 01. Dezember 2020, etc.; \*, Messergebnisse aus der Datenanalyse exkludiert.

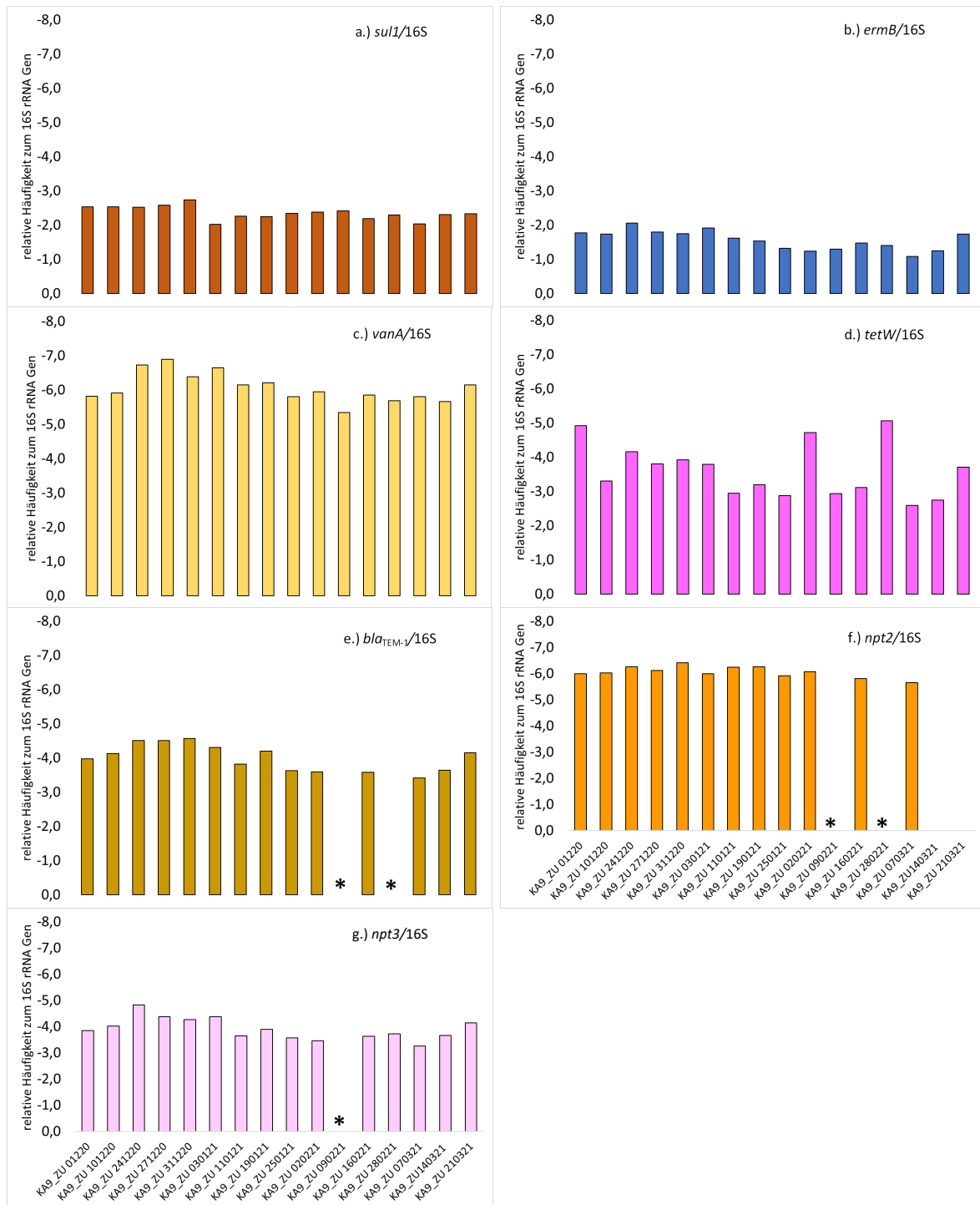


Abbildung 39: Relative ARG-Häufigkeiten des zeitlich hochaufgelösten Monitorings von Kläranlage 9 (Dez. 2020 bis März 2021)  
 Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Mittelwerte der sieben ausgewählten ARGs (*sul1*, *ermB*, *vanA*, *tetW*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *npt2* und *npt3*) zum Mittelwert des



bakteriellen 16S rRNA Gens in den untersuchten WMPs. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet. KA9\_ZU011220 = Kläranlage 9 Zulauf 01. Dezember 2020, etc.; \*, Messergebnis aus Datenanalyse exkludiert.

Das 16S rRNA-Gen konnte im Jahresmonitoring (Okt 2020 bis Sept 2021) der Kläranlage 9 in allen Zulauf-Proben quantitativ nachgewiesen werden. Es wurden absoluten Häufigkeiten zwischen  $2,4 \times 10^8$  (KA9\_ZU 08/21) und  $2,1 \times 10^9$  (KA9\_ZU 05/21) Genkopien/ml nachgewiesen. Das ARG *sul1* konnte ebenfalls bei allen Proben nachgewiesen werden, mit absoluten Häufigkeiten zwischen  $1,6 \times 10^6$  (KA9\_ZU 12/20) und  $1,3 \times 10^7$  (KA9\_ZU 09/21) Genkopien/ml. Das ARG *ermB* konnte auch für alle in diesem Zeitraum untersuchten Proben der Kläranlage quantitativ nachgewiesen werden. Es wurden absolute Häufigkeiten von wenigstens  $8,1 \times 10^6$  (KA9\_ZU 08/21) und höchstens  $4,0 \times 10^7$  (KA9\_ZU 07/21) Genkopien/ml detektiert. Das ARG *vanA* wurde in allen Proben nachgewiesen. Es wurden absolute Häufigkeiten zwischen 275 (KA9\_ZU 09/21) und 1598 (KA9\_ZU 11/21) Genkopien/ml detektiert. Das ARG *tetW* wurde in allen Proben der Kläranlage quantitativ nachgewiesen. Es wurden absolute Häufigkeiten von wenigstens  $2,1 \times 10^5$  (KA9\_ZU 08/21) und höchstens  $1,3 \times 10^6$  (KA9\_ZU 07/21) Genkopien/ml nachgewiesen. Das ARG *bla*<sub>TEM-1</sub> konnte in allen Proben der Kläranlage, außer in den Proben KA9\_ZU 11/20, KA9\_ZU 05/21 und KA9\_ZU 07/21, quantitativ nachgewiesen werden. Es wurden absolute Häufigkeiten von wenigstens 56 (KA9\_ZU 06/21) und höchstens  $2,7 \times 10^5$  (KA9\_ZU 09/21) Genkopien/ml nachgewiesen. Das ARG *npt2* konnte in allen Proben der Kläranlage, außer KA9\_ZU 03/21, KA9\_ZU 06/21, KA9\_ZU 07/21 und KA9\_ZU 08/21, quantitativ nachgewiesen werden. Es wurden absolute Häufigkeiten von wenigstens 339 (KA9\_ZU 01/21) und höchstens  $1,9 \times 10^3$  (KA9\_ZU 09/21) Genkopien/ml quantitativ nachgewiesen. Das ARG *npt3* wurde in allen Proben der Kläranlage, außer in den Proben KA9\_ZU 04/21, KA9\_ZU 06/21, KA9\_ZU 07/21, und KA9\_ZU 08/21, quantitativ nachgewiesen. Dabei wurden absolute Häufigkeiten von wenigstens  $5,2 \times 10^4$  (KA9\_ZU 12/20) und höchstens  $1,6 \times 10^5$  (KA9\_ZU 05/21) Genkopien/ml nachgewiesen. Die Ergebnisse des 16S RNA Gens, *sul1*, *ermB*, *vanA* und *tetW* zeigen im zeitlichen Verlauf Schwankungen von max. 1 LOG-Stufe, während die Ergebnisse bei *bla*<sub>TEM-1</sub>, *npt2* und *npt3* deutlichere Unterschiede zeigen. Diese ARGs wurden vor allem in den Monaten Juni bis Aug in geringeren Konzentrationen (für *bla*<sub>TEM-1</sub> bis zu 4 LOG Stufen weniger) oder gar nicht (*npt2* und *npt3*) detektiert. Bei den ARGs *bla*<sub>TEM-1</sub> und *npt3* mussten Messergebnisse aufgrund zu hoher Streuung zwischen den in der qPCR erhaltenen Ct-Werten der 3 Replikate der einzelnen Proben aus der Datenanalyse exkludiert werden. Aufgrund Ressourcenknappheit konnten diese Messungen auch nicht mehr wiederholt werden. Die betreffenden Proben wurden in der graphischen Darstellung mit „\*“ markiert (Abbildung 40). Die ARGs der untersuchten Kläranlage sind nachfolgend in Abbildung 41 auch als relative Häufigkeit zum 16S rRNA Gen logarithmisch dargestellt.

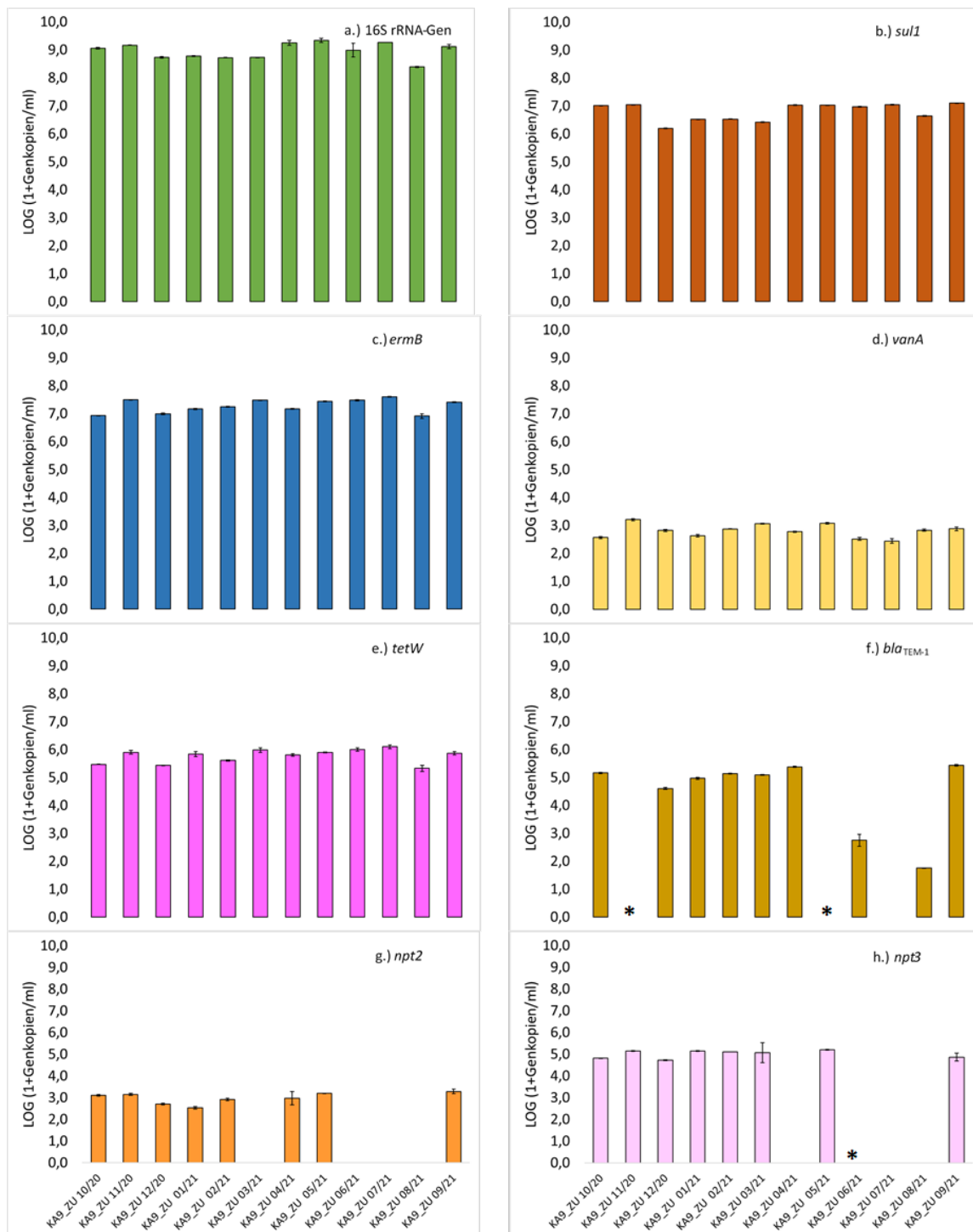


Abbildung 40: Absolute Genabundanz des zeitlich hochaufgelösten Monitorings von Kläranlage 9 (Okt. 2020 bis Sept. 2021).

Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Werte des bakteriellen 16S rRNA Gens und der sieben ausgewählten ARGs (*sul1*, *ermB*, *vanA*, *tetW*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *npt2* und *npt3*) in den untersuchten WMPs. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet, als LOG (1 + Genkopien/ml Probe); die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen zwischen den qPCR

Replikaten (n = 2 für 16S rRNA Gen, n = 3 für ARGs) KA9\_ZU 10/20 = Kläranlage 9 Zulauf Oktober 2020, etc.; \*, Messergebnis aus Datenanalyse exkludiert.

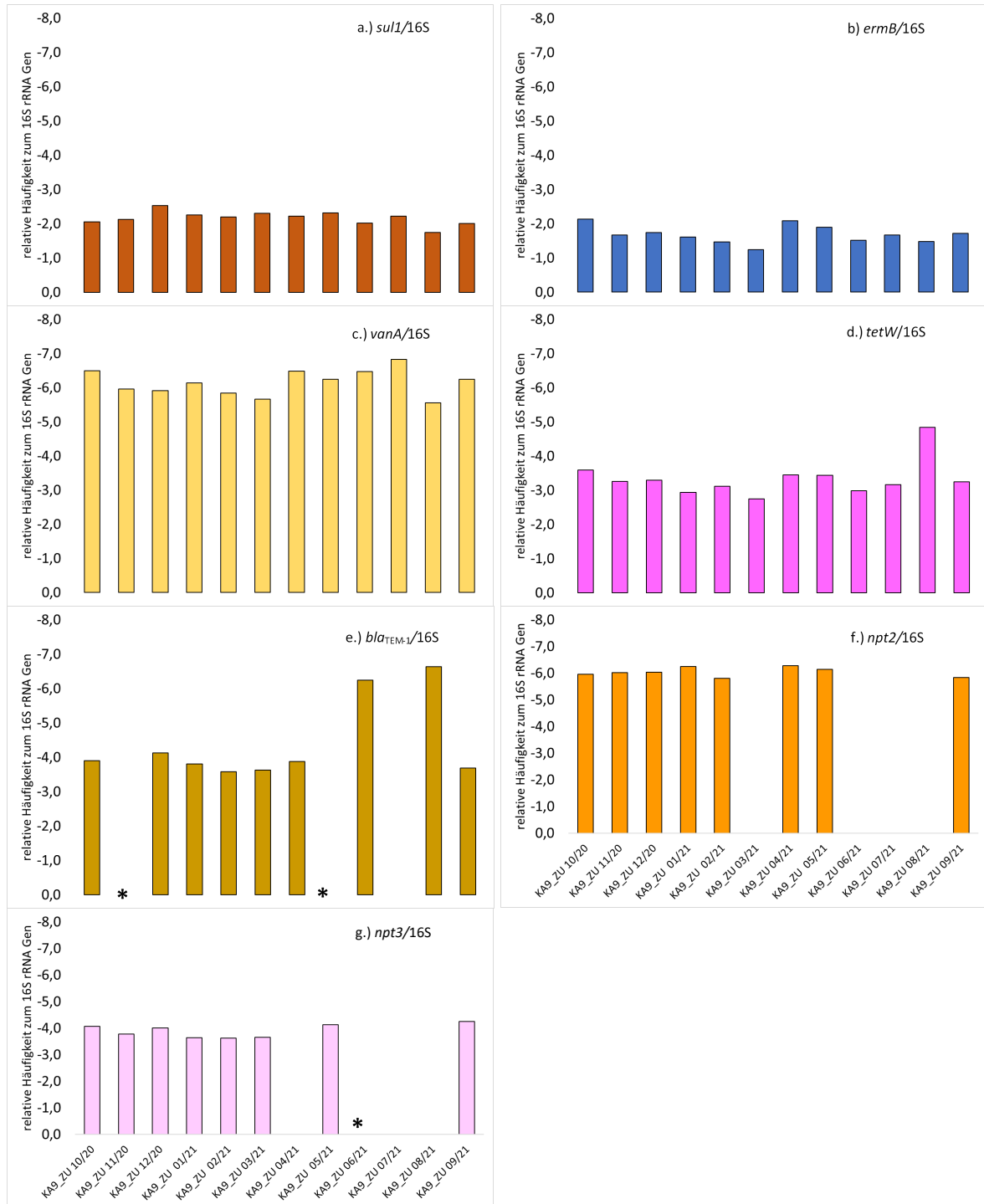


Abbildung 41: Relative Genhäufigkeit des zeitlich hochaufgelösten Monitorings von Kläranlage 9 (Okt. 2020 bis Sept. 2021).

Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Mittelwerte der sieben ausgewählten ARGs (*sul1*, *ermB*, *vanA*, *tetW*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *npt2* und *npt3*) zum Mittelwert des bakteriellen 16S rRNA Gens in den untersuchten WMPs. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet. KA9\_ZU 10/20, Kläranlage 9 Zulauf Oktober 2020, etc; \*, Messergebnisse aus Datenanalyse exkludiert.

### 3.2.3 Räumliche Untersuchung österreichischer Oberflächengewässer

Die Ergebnisse der räumlichen Untersuchung verschiedener österreichischer Oberflächengewässer sind nachfolgend in Abbildung 42, Abbildung 43, Abbildung 44, Abbildung 45, Abbildung 46, Abbildung 47, Abbildung 48 und Anhang 2 - Abbildung 74 graphisch dargestellt.

Die Übersicht über die Hintergrundbelastung der untersuchten Oberflächengewässer (n = 26) in Österreich zeigt, dass 16S RNA Gene im Bereich von  $2,1 \times 10^2$  bis  $1,4 \times 10^7$  Genkopien/ml vorkommen. Für das ARG *sul1* liegen die Werte zwischen 6 und bis zu  $2,5 \times 10^5$  Genkopien/ml und kommt somit in den OFGs am häufigsten vor, dicht gefolgt von *ermB*. Für *ermB* liegen die Genkopien zwischen 4 und  $4,1 \times 10^4$  Genkopien. Das ARG *vanA* wurde nur in einer Probe dieser 26 OFG mit 3 Genkopien/ml quantitativ nachgewiesen. Das ARG *tetW* kam mit Genkopien/ml von max.  $5,4 \times 10^3$  Genkopien/ml vor und *bla<sub>TEM-1</sub>* mit Werten von max. 280 Genkopien/ml. *Npt2* konnte in den untersuchten OFG nur in einer Probe mit 6 Genkopien/ml detektiert werden und *npt3* wurde mit max. 210 Genkopien/ml detektiert (Abbildung 42).

Die Ergebnisse der im Sommer 2019 untersuchten Flüsse sind in Tabelle 25, Abbildung 43, Abbildung 44 und Abbildung 45 dargestellt und beschrieben.

Das 16S rRNA-Gen konnte in allen Oberflächengewässern quantitativ nachgewiesen werden. Dabei konnte für die Wulka die höchste absolute Häufigkeit mit  $1,4 \times 10^7$  Genkopien/ml und für die Erlauf die niedrigste mit  $2,1 \times 10^2$  Genkopien/ml nachgewiesen werden. Das ARG *sul1* konnte bei allen Oberflächengewässern, außer im Fluss Erlauf, quantitativ nachgewiesen werden. Die höchsten absoluten Häufigkeiten aller detektierter ARGs wurden in der Wulka nachgewiesen: *sul1*:  $2,5 \times 10^5$  Genkopien/ml, *ermB*:  $4,1 \times 10^4$  Genkopien/ml, *tetW*:  $2,9 \times 10^3$  Genkopien/ml, *bla<sub>TEM-1</sub>*:  $2,7 \times 10^2$  Genkopien/ml und *npt3*:  $2,1 \times 10^2$  Genkopien/ml. Das könnte auch daran liegen, dass an der Stelle an der diese Probe genommen wurde, gereinigtes Wasser einer Kläranlage eingeleitet wird. Das *ermB*-Gen konnte niemals in den Flüssen Erlauf, Donau und Dornbirner Ach quantitativ detektiert werden. Das *tetW*-Gen konnte nicht in den Oberflächengewässern Reichramingbach, Erlauf und Antiesen quantitativ nachgewiesen werden. Das ARG *bla<sub>TEM-1</sub>* konnte nur in den Flüssen Inn, Reichramingbach und Wulka

quantitativ detektiert werden. Das ARG *npt3* konnte nur in den Oberflächengewässern Inn, Raab und Wulka quantitativ nachgewiesen werden. In keinem der untersuchten Oberflächengewässer wurden die ARGs *vanA* und *npt2* quantitativ detektiert. Die Messungen für die Proben der Flüsse Donau und Dornbirner Ach fehlen für die ARGs *tetW* und *vanA* und wurden mit „\*“ markiert (Abbildung 43). Zusätzlich sind die relativen Häufigkeiten der ARGs zum 16S rRNA Gen in der Abbildung 44 dargestellt.

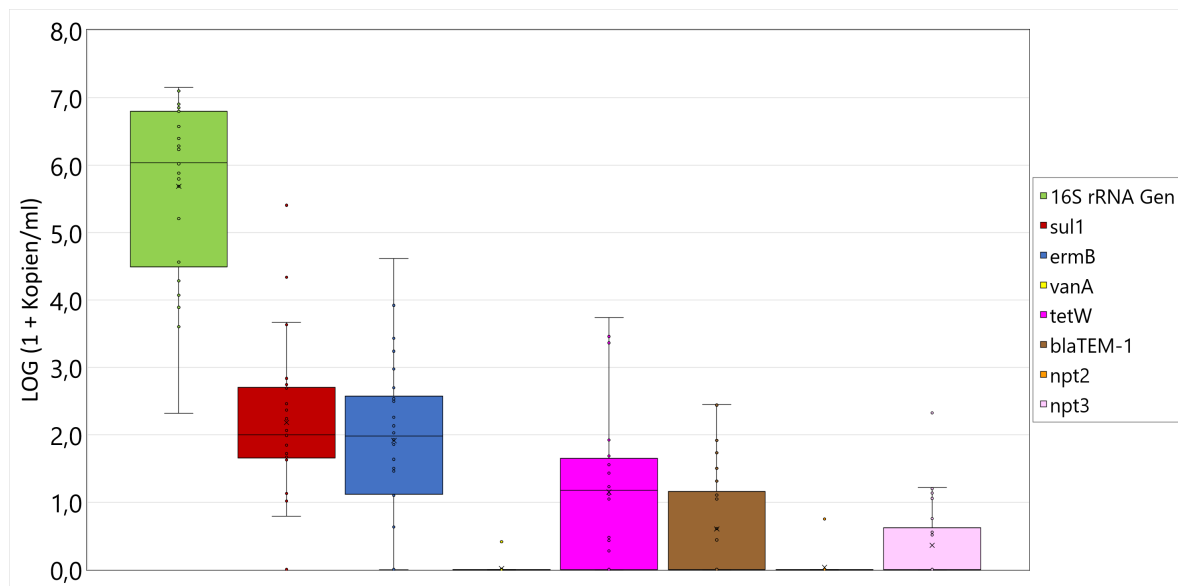


Abbildung 42: Absolute Genabundanzen in österreichischen Oberflächengewässern (Übersicht).

Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Mittelwerte der sieben ausgewählten ARGs (*sul1*, *ermB*, *vanA*, *tetW*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *npt2* und *npt3*) und des bakteriellen 16S rRNA Gens als Boxplots. Sie zeigen die Streuungen der Konzentrationen der genannten Gene in allen untersuchten Oberflächengewässern (bei Mehrfachbeprobung eines OFGs, wurden Ergebnisse jeweils nur von einer Stelle dargestellt) während des Projektzeitraumes. Die Box selbst zeigt dabei den Bereich zwischen oberem (75 %) und unterem (25 %) Quartil an. Außerdem sind noch Median (horizontale Linie), Mittelwert (x), Minimum (untere Antenne) und Maximum (obere Antenne) sowie die Werte der einzelnen ARGs (Punkte) dargestellt. Die Ergebnisse sind logarithmisch als LOG (1 + Genkopien/ml Probe) abgebildet; n = 26.

Tabelle 25: Überblick aller analysierten Gene mittels qPCR in österreichischen Oberflächengewässern – Sommer 2019.

Probenbezeichnung	16S rRNA Gen	<i>sul1</i>	<i>ermB</i>	<i>vanA</i>	<i>tetW</i>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	<i>npt2</i>	<i>npt3</i>
Inn 19	+	+	+	-	+	+	-	+
RRB 19	+	+	+	-	-	+	-	-
Raab 19	+	+	+	-	+	-	-	+
Wulka 19	+	+	+	-	+	+	-	+
Erlauf 19	+	-	-	-	-	-	-	-
Antiesen 19	+	+	+	-	-	-	-	-
Donau 19	+	+	-	n.v.	n.v.	-	-	-
DBA 19	+	+	-	n.v.	n.v.	-	-	-

+, quantitativ detektiert; -, nicht quantitativ detektiert oder nicht nachgewiesen. 19, 2019; RRB, Reichramingbach; DBA, Dornbirner Ach; n.v., Daten nicht vorhanden.

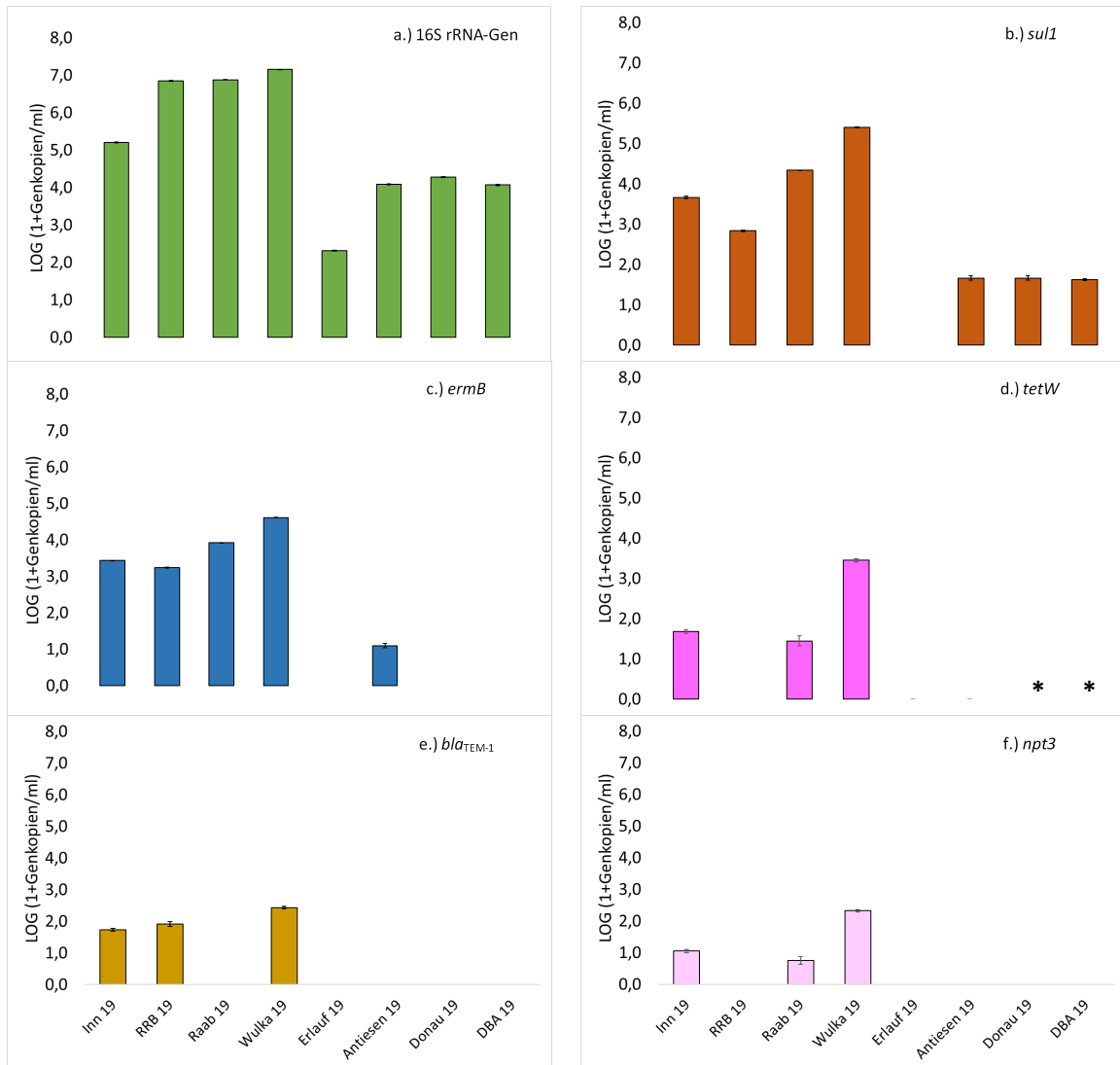


Abbildung 43: Absolute Genabundanz in österreichischen Oberflächengewässern 2019 (räumliche Untersuchung).

Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Werte des bakteriellen 16S rRNA Gens und der fünf ARGs (*sul1*, *ermB*, *tetW*, *bla<sub>TEM-1</sub>* und *npt3*) in den untersuchten WMPs. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet, als LOG (1 + Genkopien/ml Probe); die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen zwischen den qPCR Replikaten (n = 2 für 16S rRNA Gen, n = 3); RRB, Reichramingbach; DBA, Dornbirner Ach; \*, Messergebnisse nicht vorhanden; analysierte, aber nicht detektierte ARGs (*vanA*, *npt2*) sind in Tabelle 25 dokumentiert.

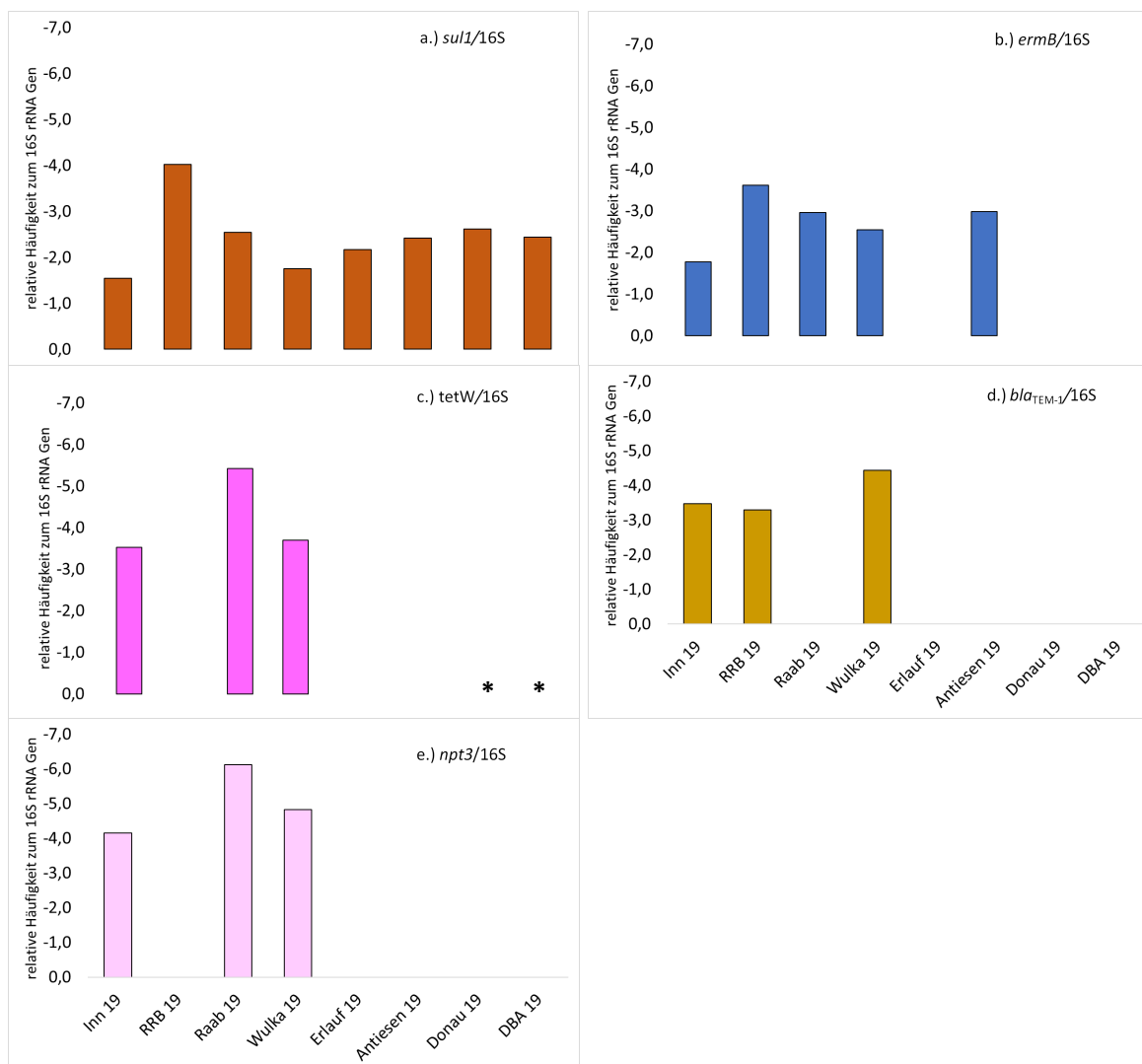


Abbildung 44: Relative ARG-Häufigkeit in österreichischen Oberflächengewässern 2019 (räumliche Untersuchung).

Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Mittelwerte von fünf ARGs (*sul1*, *ermB*, *tetW*, *bla<sub>TEM-1</sub>* und *npt3*) zum Mittelwert des bakteriellen 16S rRNA Gens in den untersuchten WMPs. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet. RRB, Reichramingbach; DBA, Dornbirner Ach; \*, Messergebnisse nicht vorhanden; Analyzierte, aber nicht detektierte ARGs sind in Tabelle 25 dokumentiert.

Die untersuchten ARGs, die im Zuge des Hochdurchsatz Gen-Profilings (SmartChip – Analyse) erfasst wurden sind in Tabelle 21 zusammengefasst. Die Ergebnisse sind in Abbildung 45, Abbildung 46 und Anhang 2 - Abbildung 74 graphisch dargestellt.

In der Analyse mittels Hochdurchsatz Gen-Profilings wurden die Oberflächengewässerproben von 2019 auf insgesamt 71 verschiedene ARGs und das bakterielle 16S rRNA Gen untersucht.



Die meisten verschiedenen ARGs ( $n = 43$ ) konnten in der Wulka gefunden werden. Dabei machten Gene der Antibiotikaklassen MGE, Beta-Lactame und MLSB die größten Anteile aus (Abbildung 45, Anhang 2 - Abbildung 74). In der Probe des Reichramingbachs wurden am wenigsten ( $n = 14$ ) verschiedene ARGs detektiert. Hier war der Anteil der MGE am größten. Verglichen mit Ergebnissen, die mittels qPCR von Reichramingbach, Wulka, Inn und Raab ermittelt wurden, konnten die ARGs *sul1*, *ermB*, *tetW* auch mit dieser Methode nachgewiesen werden (vgl. mit Abbildung 43). Zusätzlich wurde mittels Hochdurchsatz Gen-Profilung auch *vanA* im Probenextrakt der Raab von 2019 nachgewiesen. Dies war bei den qPCR-Analysen nicht der Fall. Im Probenextrakt 2021 wurde es jedoch nicht detektiert. Die ARGs *bla*<sub>TEM-1</sub>, *npt2* und *npt3* wurden mit dieser Methode nicht untersucht. Zusätzlich sind in der Abbildung 46 die relativen Häufigkeiten zum 16S rRNA Gen dargestellt. Demnach kommen die höchsten ARGs-Konzentrationen in der Wulka (Streuung zwischen -3,7 bis -2,5 LOG) und die niedrigsten im Reichramingbach (Streuung zwischen -4,7 bis -4,0 LOG) vor. Dies ist ähnlich mit den Ergebnissen aus den absoluten Häufigkeiten der detektierten ARGs, die mit qPCR gemessen wurden.

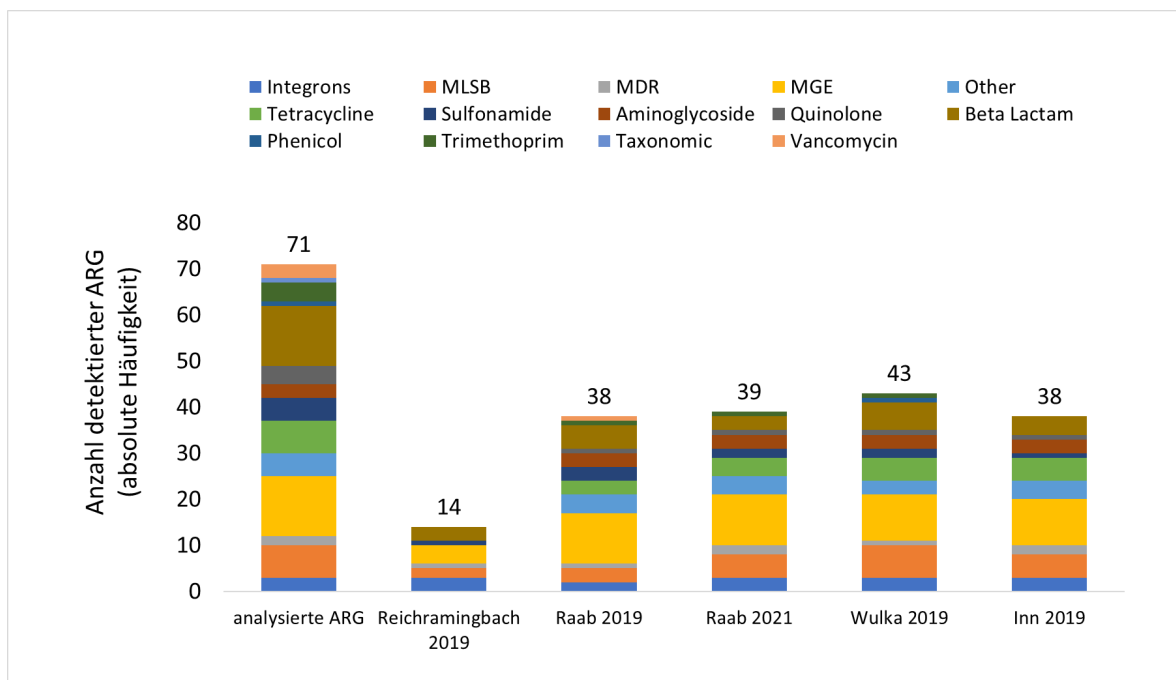


Abbildung 45: Anzahl detektierter ARGs in österreichischen Oberflächengewässern (Sommer 2019) & Raab (Sommer 2021) mittels Hochdurchsatz Gen-Profilung.

Dargestellt sind Ergebnisse aus den SmartChip-Analysen (Resistomap); farbliche Einteilung in Antibiotikaklassen.  $n = 71$  analysierte ARGs ( $n = 95$  ARGs für Proben aus dem Jahr 2021; nur überlappende 71 ARGs dargestellt);  $n = 5$  OFGs.

Im Zuge einer weiteren Analyse mittels Hochdurchsatz Gen-Profilings wurden Proben der Raab und der Wulka im Sommer 2021 erneut untersucht, diesmal auf 96 Gene hin. Zur besseren Vergleichbarkeit sind in Abbildung 45 und Abbildung 46 hierfür nur die 71 überlappenden ARGs dargestellt. Im Jahr 2021 wurden in der Raab eine sehr ähnliche Anzahl an ARGs detektiert ( $n = 39$ ) wie im Jahr 2019 ( $n = 38$ ) (Abbildung 45). In Hinblick auf die relative Häufigkeit wurden in der Raab-Probe aus 2021 jedoch etwas niedrigere ARG-Konzentrationen detektiert (Abbildung 46). Bei der DNA-Extraktion der Wulkaprobe vom Sommer 2021 konnte nur eine sehr geringe DNA-Ausbeute erzielt werden. Die niedrige DNA-Konzentration führte dazu, dass es bei der SmartChip-Analyse zu technischen Problemen kam und die Ergebnisse leider nicht verwertbar waren. Sie sind daher hier nicht dargestellt.

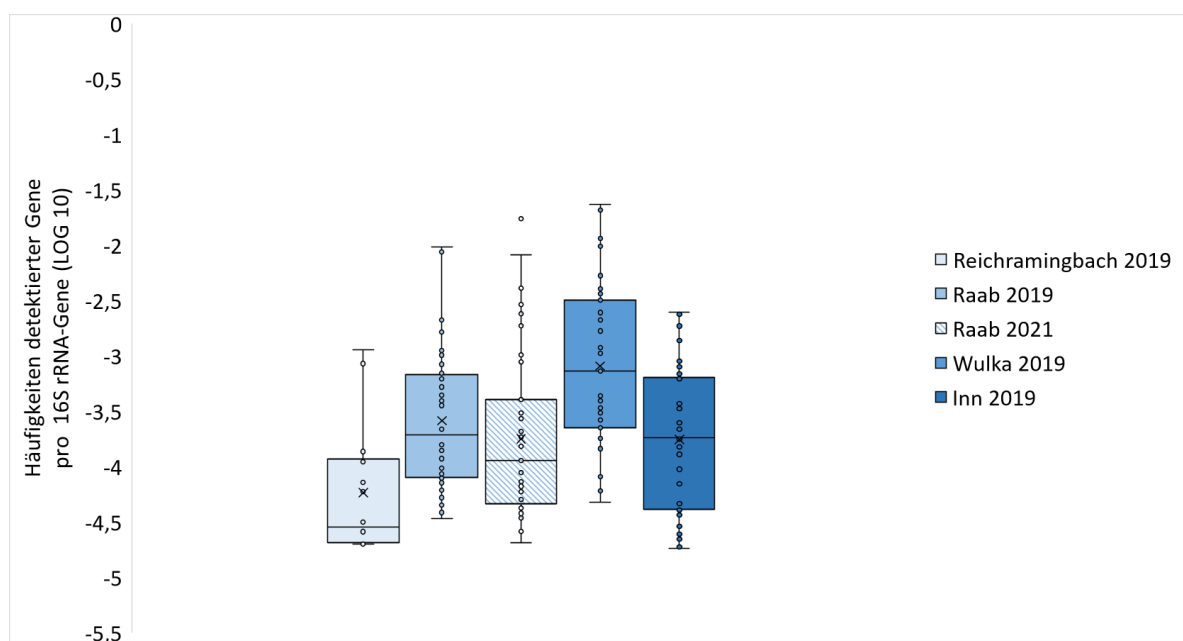


Abbildung 46: Relative ARG-Häufigkeiten in österreichischen Oberflächengewässern (Sommer 2019) & Raab (Sommer 2021) mittels Hochdurchsatz Gen-Profilings.

Dargestellt sind Ergebnisse aus den SmartChip-Analysen (Resistomap) als Boxplots. Sie zeigen die Streuungen der Konzentrationen aller analysierten ARGs bezogen auf die Konzentration des 16S rRNA Gen in den jeweiligen OFGs. Die Box selbst zeigt dabei den Bereich zwischen oberem (75 %) und unterem (25 %) Quartil an. Außerdem sind noch Median (horizontale Linie), Mittelwert (x), Minimum (untere Antenne) und Maximum (obere Antenne) sowie die Werte der einzelnen ARGs (Punkte) dargestellt. Die Ergebnisse sind logarithmisch (LOG<sub>10</sub>) dargestellt.  $n = 71$  analysierte ARGs ( $n = 95$  ARGs für Proben aus dem Jahr 2021; nur überlappende 71 ARGs dargestellt);  $n = 5$  OFGs.

In der nachfolgenden Tabelle 26 und in der Abbildung 47 sowie Abbildung 48 sind die Ergebnisse der untersuchten Stadtgewässer in Wien dargestellt.

Tabelle 26: Übersicht aller analysierten Gene mittels qPCR in österreichischen Oberflächengewässern – Stadtgewässer Wien (2020).

Probenbezeichnung	16S rRNA Gen	<i>sul1</i>	<i>ermB</i>	<i>vanA</i>	<i>tetW</i>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	<i>npt2</i>	<i>npt3</i>
Alte Donau Ost	+	+	+	-	+	-	-	+
Alte Donau West	+	+	+	-	-	-	-	-
Wasserpark	+	+	+	-	-	-	-	-
Heustadlwasser	+	+	+	-	+	-	-	-
Stadtpark	+	+	+	-	+	-	-	-
Neue Donau West	+	+	+	-	-	-	-	-
Neue Donau Ost	+	+	+	-	+	-	-	-

+, quantitativ detektiert; -, nicht quantitativ detektiert/nicht nachgewiesen. ADO, Alte Donau Ost; ADW, Alte Donau West; WP, Wasserpark; HW, Heustadlwasser; SP, Stadtpark; NDW, Neue Donau West; NDO, Neue Donau Ost.

Das bakterielle 16S rRNA-Gen konnte in allen Stadtgewässern quantitativ nachgewiesen werden. Dabei konnte im Wasserpark die höchste absolute Häufigkeit mit  $1,1 \times 10^6$  Genkopien/ml und die niedrigste mit  $4,0 \times 10^3$  Genkopien/ml in der Probe Neue Donau West nachgewiesen werden. Das ARG *sul1* konnte bei allen Oberflächengewässern nachgewiesen werden. Die höchste absolute Häufigkeit dabei wurde mit  $4,8 \times 10^2$  Genkopien/ml in der Alten Donau Ost nachgewiesen, die niedrigste im Wasserpark mit 13 Genkopien/ml. Das *ermB*-Gen konnte in allen Stadtgewässern quantitativ detektiert werden. Die höchste Abundanz konnte im Extrakt der Alten Donau Ost mit 341 Genkopien/ml und die niedrigste mit 29 Genkopien/ml im Extrakt der Stadtpark-Wasserprobe nachgewiesen werden. Das *tetW*-Gen wurde mit einer absoluten Häufigkeit mit höchstens 28 Genkopien/ml in der Alten Donau Ost quantitativ detektiert. Es wurden nicht in den Proben der Alten Donau Ost, des Wasserparks oder der Neuen Donau West detektiert. Die ARG *bla*<sub>TEM-1</sub> und *npt2* konnte in keiner der Proben der Stadtgewässer quantitativ nachgewiesen werden. Das ARG *npt3* konnte nur in der Alten Donau Ost mit 13 Genkopien/ml detektiert werden (Abbildung 47). Zusätzlich werden die ARGs relativ zum 16S rRNA Gen in der Abbildung 48 dargestellt.

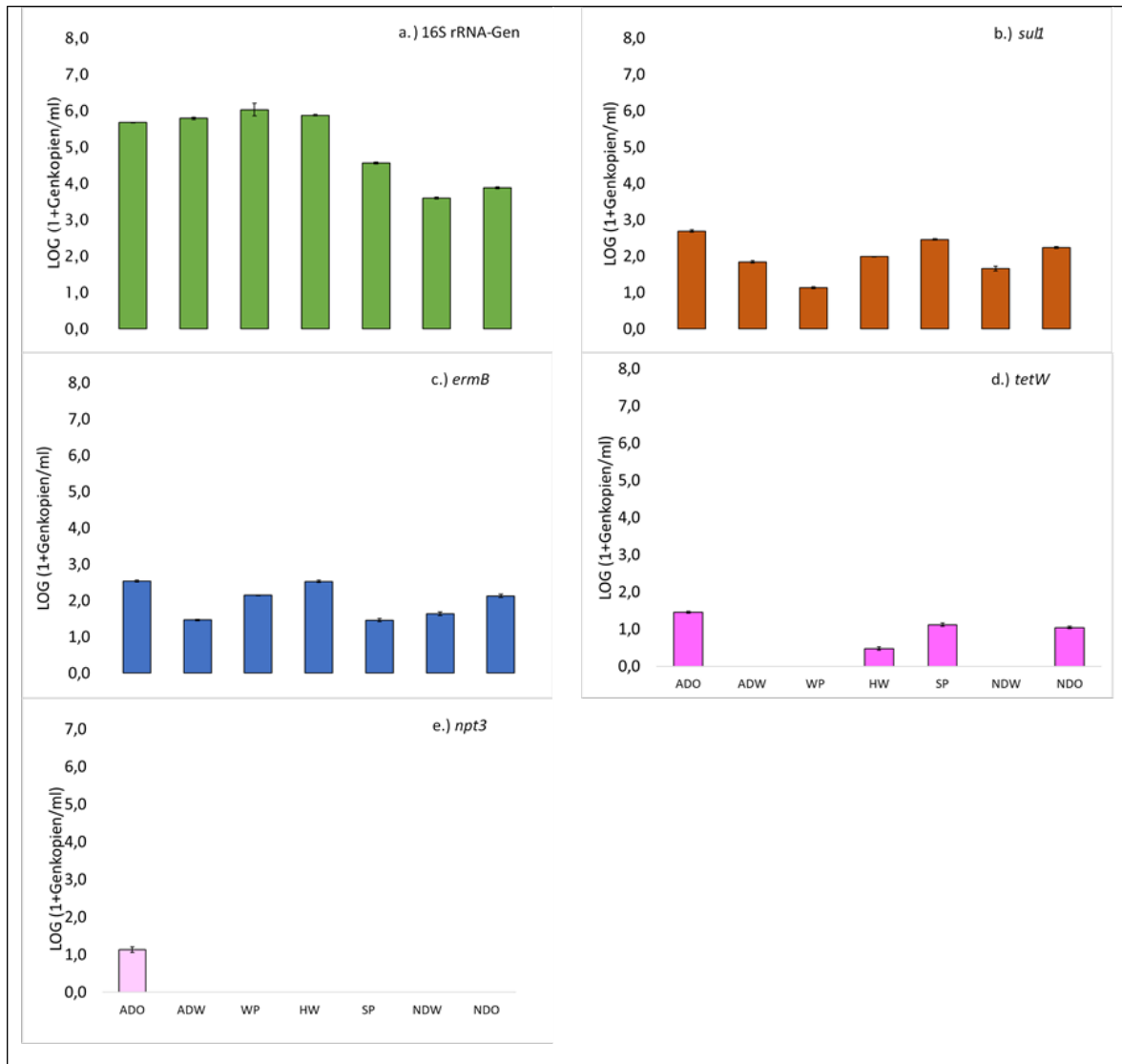


Abbildung 47: Absolute Genabundanz der räumlichen Untersuchung verschiedener Stadtgewässer in Wien.

Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Werte des bakteriellen 16S rRNA Gens und der sieben ausgewählten ARGs (*sul1*, *ermB*, *vanA*, *tetW*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *npt2* und *npt3*) in den untersuchten WMPs. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet, als LOG (1 + Genkopien/ml Probe); die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen zwischen den qPCR Replikaten (n = 2 für 16S rRNA Gen, n = 3 für ARGs); ADO, Alte Donau Ost; ADW, Alte Donau West; WP, Wasserpark; HW, Heustadlwasser; SP, Stadtpark; NDW, Neue Donau West; NDO, Neue Donau Ost; Analytierte, aber nicht detektierte ARGs sind in Tabelle 26 dokumentiert.

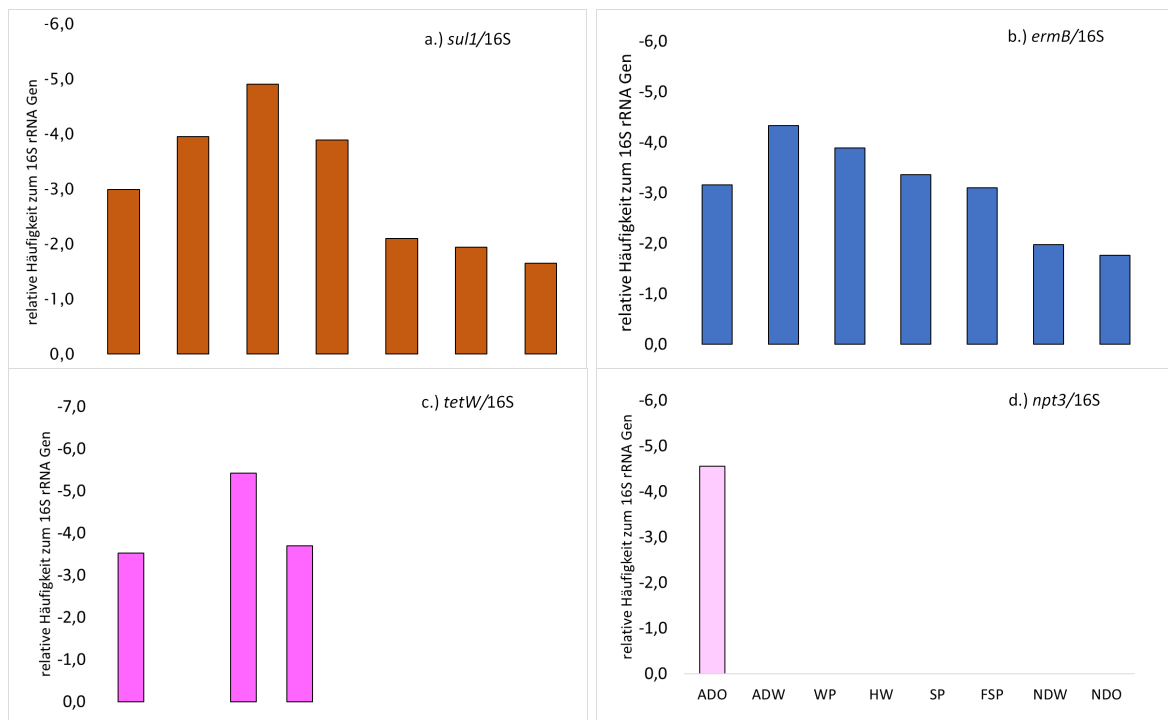


Abbildung 48: Relative ARG-Häufigkeiten untersuchter Stadtgewässer in Wien (2020). Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Werte der sieben ausgewählten ARGs (*sul1*, *ermB*, *vanA*, *tetW*, *bla*<sub>TEM-1</sub>, *npt2* und *npt3*) zum Mittelwert des bakteriellen 16S rRNA Gens in den untersuchten WMPs. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet. ADO, Alte Donau Ost; ADW, Alte Donau West; WP, Wasserpark; HW, Heustadlwasser; SP, Stadtpark; NDW, Neue Donau West; NDO, Neue Donau Ost. Analysierte, aber nicht detektierte ARGs sind in Tabelle 26 dokumentiert.

### 3.2.4 Saisonales und zeitlich hochaufgelöstes Monitoring ausgewählter Oberflächengewässer

Die Ergebnisse der saisonalen und zeitlich hochaufgelösten Monitorings verschiedener österreichischer Oberflächengewässer sind nachfolgen in Tabelle 27, Abbildung 49, Abbildung 50, Tabelle 28, Abbildung 51, Abbildung 52, Tabelle 29, Abbildung 54 und Abbildung 55 dargestellt.

Tabelle 27: Übersicht aller analysierten Gene mittels qPCR in verschiedenen Stellen des Fließgewässers Schwechat – Winter 2021 und Sommer 2021.

Probenbezeichnung	16S rRNA Gen	<i>sul1</i>	<i>ermB</i>	<i>vanA</i>	<i>tetW</i>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	<i>npt2</i>	<i>npt3</i>
<b>Winter</b>								
Schwechat ob KA_W21	+	+	+	-	+	*	-	+
Schwechat un KA_W21	+	+	+	-	+	+	-	+
Schwechat Wald_W21	+	+	+	-	-	+	-	-
Schwechat Wiese_W21	+	+	+	-	+	+	-	-
Schwechat MB_W21	+	+	+	-	+	+	-	-
Schwechat BG_W21	+	+	+	-	-	+	-	-
Schwechat WB_W21	+	+	+	-	+	*	-	-
<b>Sommer</b>								
Schwechat ob KA_S21	+	+	+	-	+	+	-	-
Schwechat un KA_S21	+	+	+	-	+	+	-	+
Schwechat Wald_S21	+	-	-	-	-	-	-	-
Schwechat Wiese_S21	+	+	+	-	+	+	-	-
Schwechat MB_S21	+	+	+	-	+	+	-	-
Schwechat BG_S21	+	+	+	-	+	-	-	-
Schwechat WB_S21	+	+	+	-	+	+	-	+

Die graue Schattierung hebt einen Unterschied in der qualitativen Detektion zwischen Winter und Sommer hervor. +, quantitativ detektiert; -, nicht quantitativ detektiert; \*, Messergebnisse auf Grund zu hoher Standardabweichungen innerhalb der Replikate in der qPCR exkludiert; \_W21, Winter 2021; \_S21, Sommer 2021; ob KA, oberhalb Kläranlage; un KA, unterhalb Kläranlage; MB, Mittelbereich; BG, bewohnte Gegend; WB, Wiener Becken.

Das 16S rRNA-Gen konnte an allen Proben der Schwechat quantitativ nachgewiesen werden. Abbildung 49 zeigt, dass die höchste absolute Häufigkeit dabei in der Probe „Schwechat WB\_S21“ mit  $1,0 \times 10^7$  Genkopien/ml und die niedrigste in „Schwechat Wald\_W21“ mit  $2,1 \times 10^5$  Genkopien/ml nachgewiesen werden konnte. Das ARG *sul1* konnte bei allen Probenextrakten, außer der von „Schwechat Wald\_S21“, nachgewiesen werden. Die höchste absolute Häufigkeit dabei wurde mit  $2,4 \times 10^4$  Genkopien/ml bei „Schwechat WB\_S21“ nachgewiesen. Das *ermB*-Gen konnte bei allen Proben der Schwechat quantitativ detektiert werden, außer bei „Schwechat Wald\_S21“. Die höchsten Genkopien/ml wurden dabei an

„Schwechat un KA\_S21“ mit 1,106 Genkopien/ml nachgewiesen. Das *tetW*-Gen wurde mit einer absoluten Häufigkeit mit höchstens 218 Genkopien/ml bei „Schwechat un KA\_S21“ quantitativ detektiert. Dieses Gen konnte nicht bei „Schwechat Wald\_W21“ quantitativ detektiert werden. Das ARG *bla*<sub>TEM-1</sub> konnte nicht an bei „Schwechat Wald\_S21“ und „Schwechat BG\_S21“ quantitativ nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Proben von „Schwechat ob KA\_W21“ und „Schwechat WB\_W21“ konnten aufgrund der hohen Standardabweichungen zwischen den Ct-Werten der einzelnen Replikate in der qPCR nicht in die Datenanalyse miteinbezogen werden (\*). Die höchste absolute Häufigkeit von *bla*<sub>TEM-1</sub> wurde bei „Schwechat Wiese W21“ mit 280 Genkopien/ml detektiert. Das ARG *npt3* konnte nur bei „Schwechat ob KA\_W21“, „Schwechat un KA\_W21“, „Schwechat un KA\_S21“ und „Schwechat WB\_S21“ mit maximal 12 Genkopien/ml (Schwechat un KA\_S21) detektiert werden. An allen anderen Stellen war dieses Gen quantitativ nicht nachweisbar. Die ARGs *vanA* und *npt2* konnten in keinen der untersuchten Proben aus der Schwechat quantitativ nachgewiesen werden. Vergleicht man die detektierten Gene in Hinblick auf Winter 2021 (W21) und Sommer 2021 (S21) konnten die untersuchten ARGs etwas häufiger in den Probeextrakten aus dem Winter detektiert werden (Abbildung 49). Möglicherweise hängt das damit zusammen, dass im Winter mehr Antibiotika verschrieben und eingenommen werden, weil mehr Leute krank sind (Hinteregger et al., 2017). Außerdem zeigten die Proben von den Stellen „Schwechat ob KA\_“ bei allen gemessenen ARGs niedrigere Konzentrationen als bei den Stellen „Schwechat un KA\_“ – dies gilt sowohl für Winter und Sommer 2021 (W21 und S21). Es ist wahrscheinlich, dass hier die Kläranlage für die höheren Konzentrationen verantwortlich ist. Im Probenextrakt „Schwechat Wald\_S21“ konnte keines der sieben ARGs nachgewiesen werden. In den Probenahmestellen in der Nähe von dicht besiedelten Gebieten hingegen zeigten sich meist höhere ARG-Konzentrationen. Der untersuchte Belastungsgradient spiegelte sich somit in der ARG-Hintergrundbelastung wider. In Abbildung 50 sind zusätzlich sind die relativen Häufigkeiten anteilig am bakteriellen 16S rRNA Gen dargestellt.

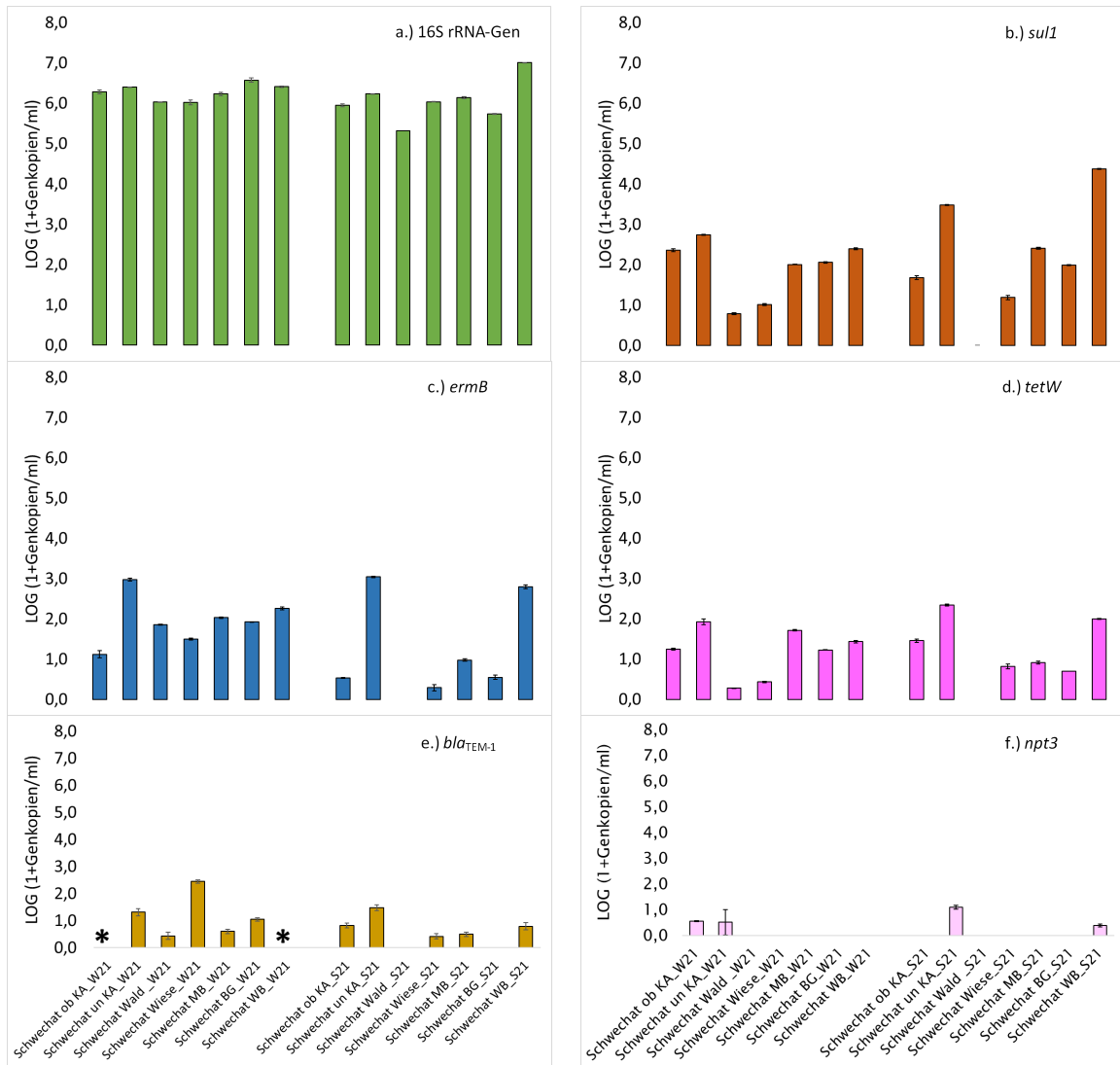


Abbildung 49: Absolute Genabundanz an verschiedenen Stellen im Fluss Schwechat – Vergleich Winter 2021 und Sommer 2021.

Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Werte des bakteriellen 16S rRNA Gens und der sieben ausgewählten ARGs (*sul1*, *ermB*, *vanA*, *tetW*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *npt2* und *npt3*) in den untersuchten WMPs. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet, als LOG (1 + Genkopien/ml Probe); die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen zwischen den qPCR Replikaten (n = 2 für 16S rRNA Gen, n = 3 für ARGs); W\_21, Winter 2021; S\_21, Sommer 2021; ob KA, ober Kläranlage; un KA, unter Kläranlage; MB, Mittelbereich; BG, bewohnte Gegend; WB, Wiener Becken. \*, Messdaten aus Datenanalyse exkludiert; Analysierte, aber nicht detektierte ARGs sind in Tabelle 27 dokumentiert.



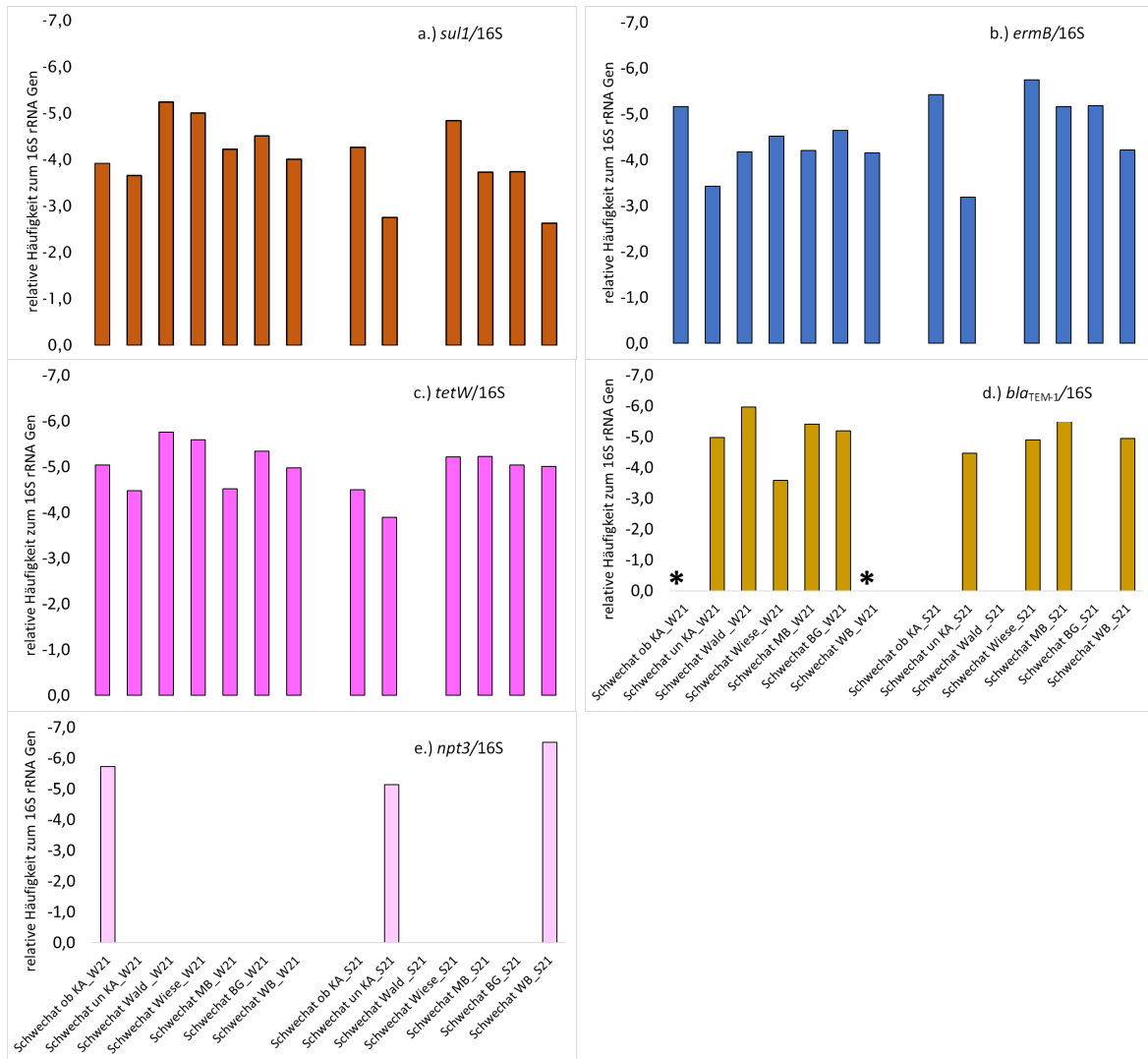


Abbildung 50: Relative ARG-Häufigkeiten an verschiedenen Stellen im Fluss Schwechat – Vergleich Winter 2021 und Sommer 2021.

Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Mittelwerte der sieben ausgewählten ARGs (*sul1*, *ermB*, *vanA*, *tetW*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *npt2* und *npt3*) zum Mittelwert des bakteriellen 16S rRNA Gens in den untersuchten WMPs. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet. W\_21, Winter 2021; S\_21, Sommer 2021; ob KA, ober Kläranlage; un KA, unter Kläranlage; MB, Mittelbereich; BG, bewohnte Gegend; WB, Wiener Becken. \*, Messdaten nicht inkludiert; Analytierte, aber nicht detektierte ARGs sind in Tabelle 27 dokumentiert.

Tabelle 28: Übersicht aller analysierten Gene mittels qPCR in verschiedenen Stellen des Fließgewässers Liesing – Winter 2021 und Sommer 2021.

Probenbezeichnung	16S rRNA Gen	<i>sul1</i>	<i>ermB</i>	<i>vanA</i>	<i>tetW</i>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	<i>npt2</i>	<i>npt3</i>
<b>Winter</b>								
Liesing UB_W21	+	+	+	-	+	+	-	+
Liesing LW_W21	+	+	+	-	+	+	-	+
Liesing_VS_W21	+	+	+	+	+	+	-	+
<b>Sommer</b>								
Liesing UB_S21	+	+	+	-	+	+	-	-
Liesing LW_S21	+	+	+	-	+	-	-	+
Liesing_VS_S21	+	+	+	-	+	+	-	+

Die graue Schattierung hebt einen Unterschied in der qualitativen Detektion zwischen Winter und Sommer hervor. +, quantitativ detektiert; -, nicht quantitativ detektiert; \_W21, Winter 2021; \_S21, Sommer 2021; UB, unberührte Natur; LW, Landwirtschaft; VS, Vorstadt.

Das 16S rRNA-Gen konnte an allen Probenahmestellen der Liesing quantitativ nachgewiesen werden. Dabei konnte bei „Liesing LW\_S21“ die höchste absolute Häufigkeit mit  $1,2 \times 10^7$  Genkopien/ml und bei „Liesing UB\_S21“ die niedrigste mit  $5,3 \times 10^6$  Genkopien/ml nachgewiesen werden. Das ARG *sul1* konnte in allen Proben der Liesing quantitativ nachgewiesen werden. Die höchste absolute Häufigkeit wurde dabei mit  $6,7 \times 10^3$  Genkopien/ml bei „Liesing VS\_S21“ detektiert. Das *ermB*-Gen konnte bei allen Stellen der Liesing quantitativ detektiert werden. Die höchste absolute Häufigkeit konnte dabei bei „Liesing VS\_S21“ mit 1033 Genkopien/ml nachgewiesen werden. Das *vanA*-Gen konnte nur bei „Liesing VS\_W21“ mit 2,6 Genkopien/ml quantitativ nachgewiesen werden. Das *tetW*-Gen wurde bei allen Proben quantitativ detektiert, mit der höchsten absoluten Häufigkeit von  $5,5 \times 10^3$  Genkopien/ml bei „Liesing LW\_S21“. Das ARG *bla*<sub>TEM-1</sub> konnte in allen Proben der Liesing, außer bei „Liesing LW\_S21“, quantitativ nachgewiesen werden. Die höchste absolute Häufigkeit wurde bei „Liesing LW\_W21“ mit 32 Genkopien/ml detektiert. Das ARG *npt2* konnte in keiner der untersuchten Proben der Liesing quantitativ nachgewiesen werden. Das ARG *npt3* konnte an allen Stellen, außer „Liesing UB\_S21“, quantitativ detektiert werden. Die höchsten absoluten Häufigkeiten zeigten sich bei „Liesing UB\_W21“ und „Liesing VS\_W21“ mit jeweils 16 Genkopien/ml. Vergleicht man die detektierten Gene in Hinblick auf Winter 2021 (W21) und Sommer 2021 (S21) konnten die untersuchten ARGs auch hier etwas häufiger im Winter detektiert werden (Abbildung 51). Zusätzlich sind die relativen Häufigkeiten am 16S rRNA Gen in Abbildung 52 dargestellt.

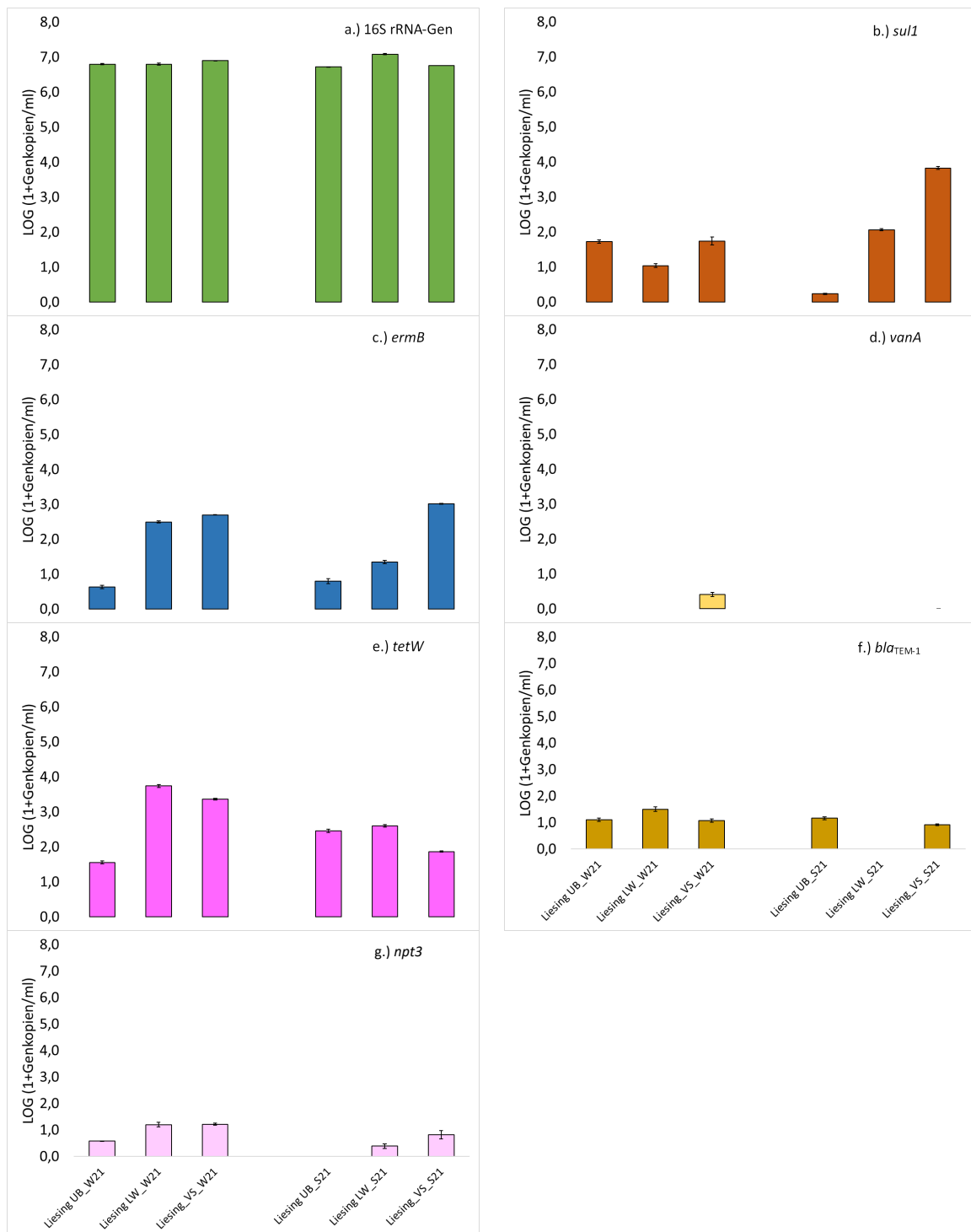


Abbildung 51: Absolute Genabundanz an verschiedenen Stellen im Fluss Liesing – Vergleich Winter 2021 und Sommer 2021.

Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Werte des bakteriellen 16S rRNA Gens und der sieben ausgewählten ARGs (*sul1*, *ermB*, *vanA*, *tetW*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *npt2* und *npt3*) in den untersuchten WMPs. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet, als LOG (1 + Genkopien/ml Probe); die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen zwischen den qPCR

Replikaten (n = 2 für 16S rRNA Gen, n = 3 für ARGs); W\_21, Winter 2021; S\_21, Sommer 2021; UB, unberührte Natur, LW, Landwirtschaft, VS, Vorstadt; analysierte, aber nicht detektierte ARGs sind in Tabell2 28 dokumentiert.

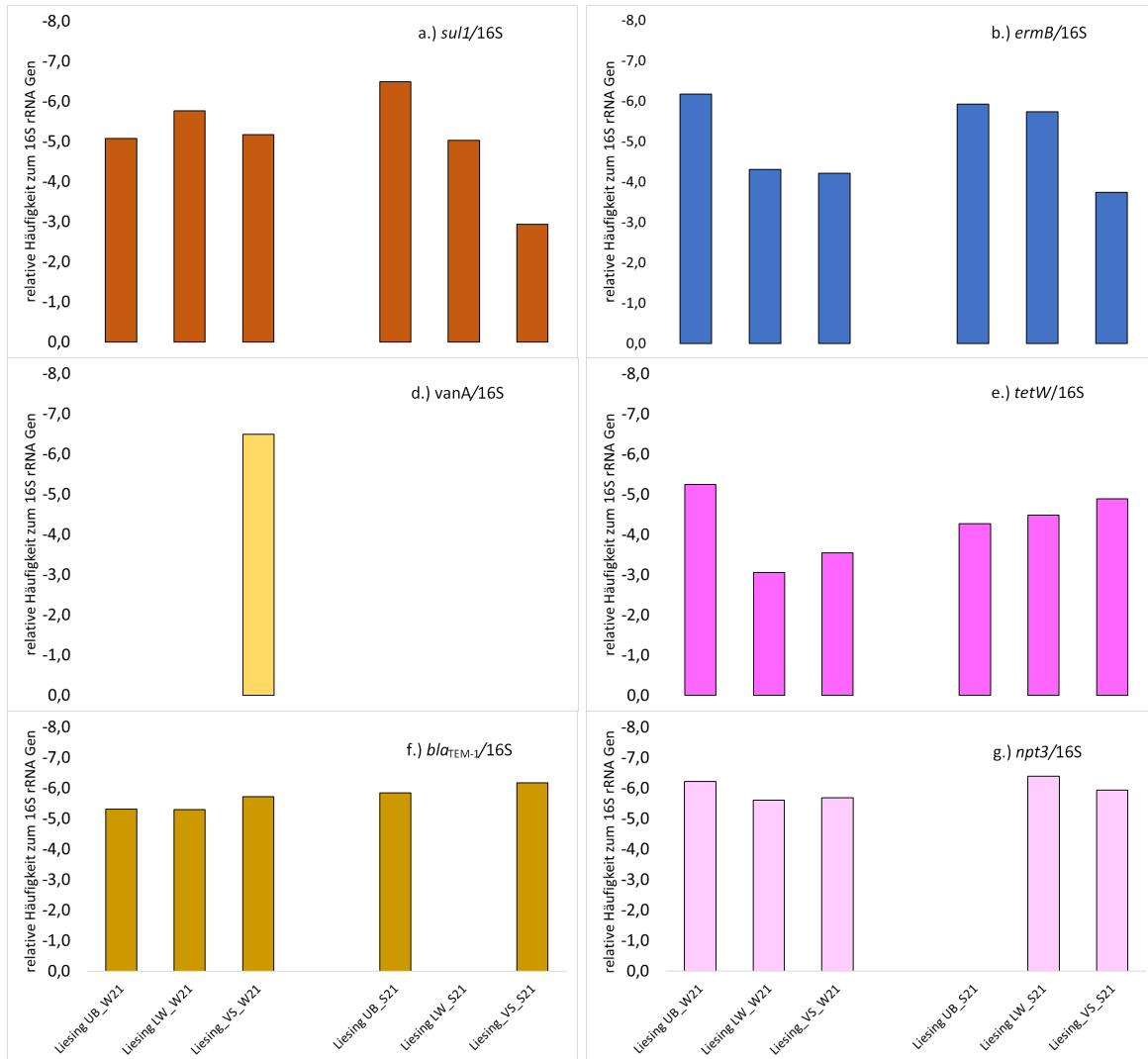


Abbildung 52: Relative ARG-Häufigkeiten an verschiedenen Stellen im Fluss Liesing – Vergleich Winter 2021 und Sommer 2021.

Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Mittelwerte der sieben ausgewählten ARGs (*sul1*, *ermB*, *vanA*, *tetW*, *bla*<sub>TEM-1</sub>, *npt2* und *npt3*) zum Mittelwert des bakteriellen 16S rRNA Gens in den untersuchten WMPs. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet. W\_21, Winter 2021; S\_21, Sommer 2021; UB, unberührte Natur; LW,

Landwirtschaft; VS, Vorstadt. Analyisierte, aber nicht detektierte ARGs sind in Tabelle 28 dokumentiert.

Die Ergebnisse des Hochdurchsatz Gen-Profilings von Biofilm-Proben, die an den gleichen Stellen in der Schwechat und Liesing genommen wurden wie die oben dargestellten Oberflächengewässerproben, sind in Abbildung 53 dargestellt.

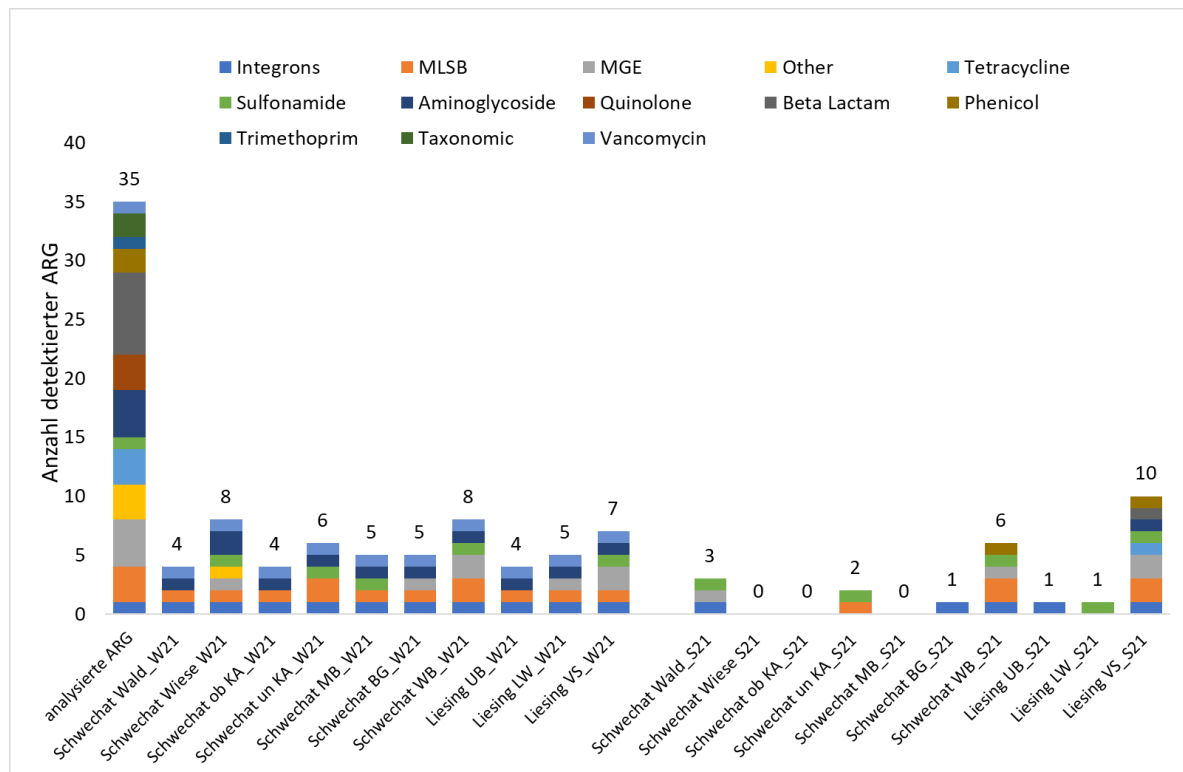


Abbildung 53: Anzahl detektierter ARGs in Biofilm-Proben der Fließgewässer Schwechat und Liesing (Winter und Sommer 2021) mittels Hochdurchsatz-Gen-Profilings.

Dargestellt sind Ergebnisse aus den SmartChip-Analysen (Resistomap). Die Ergebnisse stammen aus 2 unterschiedlichen Analysen. Die Proben aus dem Winter wurden auf 35 verschiedene ARGs, die aus dem Sommer auf 95 verschiedene ARGs untersucht; überlappende Gene aus beiden Analysen (n = 35) sind abgebildet; Probenanzahl: n = 10 Winter, n = 10 Sommer.

Die höchste Anzahl an verschiedenen ARGs/Genen wurde demnach bei „Liesing VS\_S21“ (n = 10 ARGs) gefunden. Im Probenextrakt der Stelle „Schwechat un KA“ wurden für beide Jahreszeiten jeweils 2 Gene mehr als bei „Schwechat ob KA“ detektiert, was vermutlich auf den menschlichen Einfluss durch die Kläranlageneinleitung zurückzuführen ist. Es handelt sich auch jeweils um die gleichen 2 Gene (*ermF* und *sul1*), die bei der Stelle nach der Kläranlage

zusätzlich auftreten. Die Ergebnisse aus dem Sommer 2021 zeigen insgesamt bei allen Stellen, außer bei „Liesing VS\_S21“, weniger detektierte Gene und sind somit vergleichbar mit den qPCR Ergebnissen aus den dazugehörigen Wasserproben, wo im Sommer auch bei einigen Stellen weniger ARGs (1 bis 3 von 7) detektiert werden konnten (Tabelle 27 und Tabelle 28). Nur bei der Stelle „Schwechat WB“ konnte im Winter mittels qPCR-Analysen ein ARG mehr detektiert werden als im Sommer. Es ist außerdem zu erwähnen, dass die Daten des Hochdurchsatz Gen-Profilings aus zwei verschiedenen Analysen stammen. Bei der Analyse der Proben aus dem Winter 2021 wurden das 16S rRNA Gen und 35 ARGs analysiert, während die Proben aus dem Sommer 2021 auf das 16S rRNA Gen und 95 ARGs analysiert wurden. In diesem Bericht sind zur besseren Vergleichbarkeit nur die 35 überlappenden ARG für beide Analysen dargestellt.

Die Ergebnisse des Jahresmonitorings der Alten Donau, die im Zeitraum 2018 bis 2020 monatlich beprobt wurde, sind nachfolgend in Tabelle 29, Abbildung 54 und Abbildung 55 dargestellt.

Tabelle 29: Übersicht aller analysierten Gene mittels qPCR von den monatlichen Proben aus dem Jahresmonitoring der Alten Donau (2018 – 2020).

Die genauen Probenahmezeitpunkte (n = 23) sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Probenbezeichnung	16S rRNA Gen	<i>sul1</i>	<i>ermB</i>	<i>vanA</i>	<i>tetW</i>	<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	<i>npt2</i>	<i>npt3</i>
AD -521-1/18	+	+	-	-	-	-	-	-
AD-2133-1/18	+	+	-	-	-	-	-	-
AD-2431-1/18	+	+	-	-	-	-	-	-
AD-2880-1/18	+	-	-	-	-	-	-	-
AD-3419-1/18	+	+	-	-	-	-	-	-
AD-3983-1/18	+	+	-	-	-	-	-	-
AD-4468-1/18	+	+	-	-	-	-	-	-
AD-376-1/19	+	+	-	-	-	-	-	-
AD-628-1/19	+	+	-	-	-	-	-	-
AD-1071-1/19	+	+	-	-	-	-	-	-
AD-1614-1/19	+	+	-	-	-	-	-	-
AD-2027-1/19	+	+	-	-	-	-	-	-

AD-2599-1/19	+	+	-	-	-	-	-	-
AD-3045-1/19	+	+	-	-	-	-	-	-
AD-3435-1/19	+	+	-	-	-	-	-	-
AD-3810-1/19	+	+	-	-	-	-	-	-
AD-4379-1/19	+	+	-	-	-	-	-	-
AD-4835-1/19	+	+	-	-	-	-	-	-
AD-38-1/20	+	+	-	-	-	-	-	-
AD-253-1/20	+	+	-	-	-	-	-	-
AD-927-1/20	+	+	-	-	-	-	-	-
AD-1381-1/20	+	+	-	-	-	-	-	-
AD-1661-1/20	+	+	-	-	-	-	-	-

+, quantitativ detektiert; -, nicht quantitativ detektiert

In allen untersuchten Proben der Alten Donau, die im Zeitraum 2018 bis 2020 genommen wurden, konnten das 16S rRNA Gen und *sul1* quantitativ nachgewiesen werden. Die höchste absolute Häufigkeit für das 16S rRNA konnte demnach bei „AD-2133-1/18“ mit  $1,8 \times 10^7$  und die niedrigste bei „AD-38-1/20“ mit  $1,5 \times 10^5$  Genkopien/ml quantitativ nachgewiesen werden. Hierbei ist zu erwähnen, dass diese Proben aufgrund zeitlicher und materieller Begrenzungen nicht auf etwaige Inhibitionen untersucht wurden. Deshalb können Ungenauigkeiten bezüglich der Quantitäten der 16S rRNA Genkonzentration nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Das ARG *sul1* wurden mit der höchsten absoluten Häufigkeit bei „AD-2431-1/18“ mit  $4,3 \times 10^3$  Genkopien/ml und der niedrigsten bei „AD-1071-1/19“ mit 18 Genkopien/ml quantitativ nachgewiesen (Abbildung 54). Die ARGs *vanA*, *tetW*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *npt2* und *npt3* konnten in diesen Proben der Alten Donau nicht quantitativ nachgewiesen werden (Tabelle 29). Ebenso können hier Ungenauigkeiten bezüglich der ARGs-Konzentrationen nicht ausgeschlossen werden, da die Proben aufgrund begrenztem Probenvolumen nur verdünnt (1:10) gemessen werden konnten. Es besteht die Möglichkeit, dass geringe Genkonzentrationen somit nicht mehr quantitativ nachgewiesen werden konnten. Relative Häufigkeit des *sul1* Gens zum 16S rRNA Gen ist zusätzlich in Abbildung 55 dargestellt.

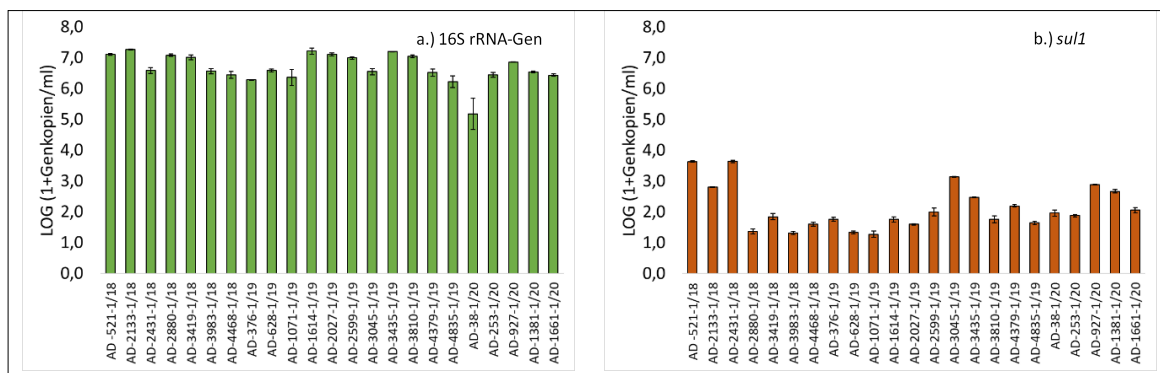


Abbildung 54: Absolute Genabundanz während des Jahresmonitorings in der Alten Donau (2018 bis 2020).

Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Werte des bakteriellen 16S rRNA Gens und der sieben ausgewählten ARGs (*sul1*, *ermB*, *vanA*, *tetW*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *npt2* und *npt3*) in den untersuchten WMPs. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet, als LOG (1 + Genkopien/ml Probe); die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen zwischen den qPCR Replikaten (n = 2 für 16S rRNA Gen, n = 3 ARGs); Analyzierte, aber nicht detektierte ARGs sind in Tabelle 29 dokumentiert.

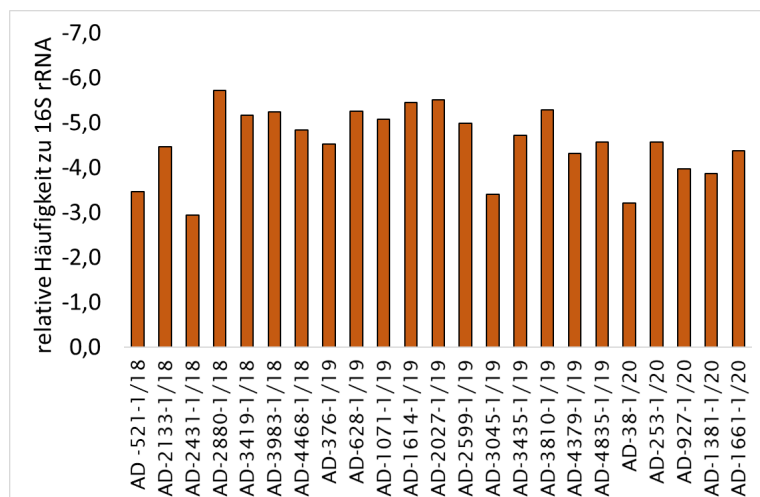


Abbildung 55: Relative Häufigkeiten des ARG *sul1* während des Jahresmonitorings in der Alten Donau (2018 bis 2020).

Dargestellt sind die mit qPCR TaqMan assays (Ingenetix) gemessenen Mittelwerte der sieben ausgewählten ARGs (*sul1*, *ermB*, *vanA*, *tetW*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *npt2* und *npt3*) zum Mittelwert des bakteriellen 16S rRNA Gens in den untersuchten WMPs. Die Ergebnisse sind logarithmisch abgebildet. Analyzierte, aber nicht detektierte ARGs sind in Tabelle 29 dokumentiert.



### 3.2.5 Amplikonsequenzierung (16S rRNA Gen)

In Abbildung 56 und Abbildung 57 sind beispielhaft die taxonomischen Zusammensetzungen der mikrobiellen Gemeinschaften des Zulaufs und Ablaufs von KA2 in Form von KRONA-Plots dargestellt.

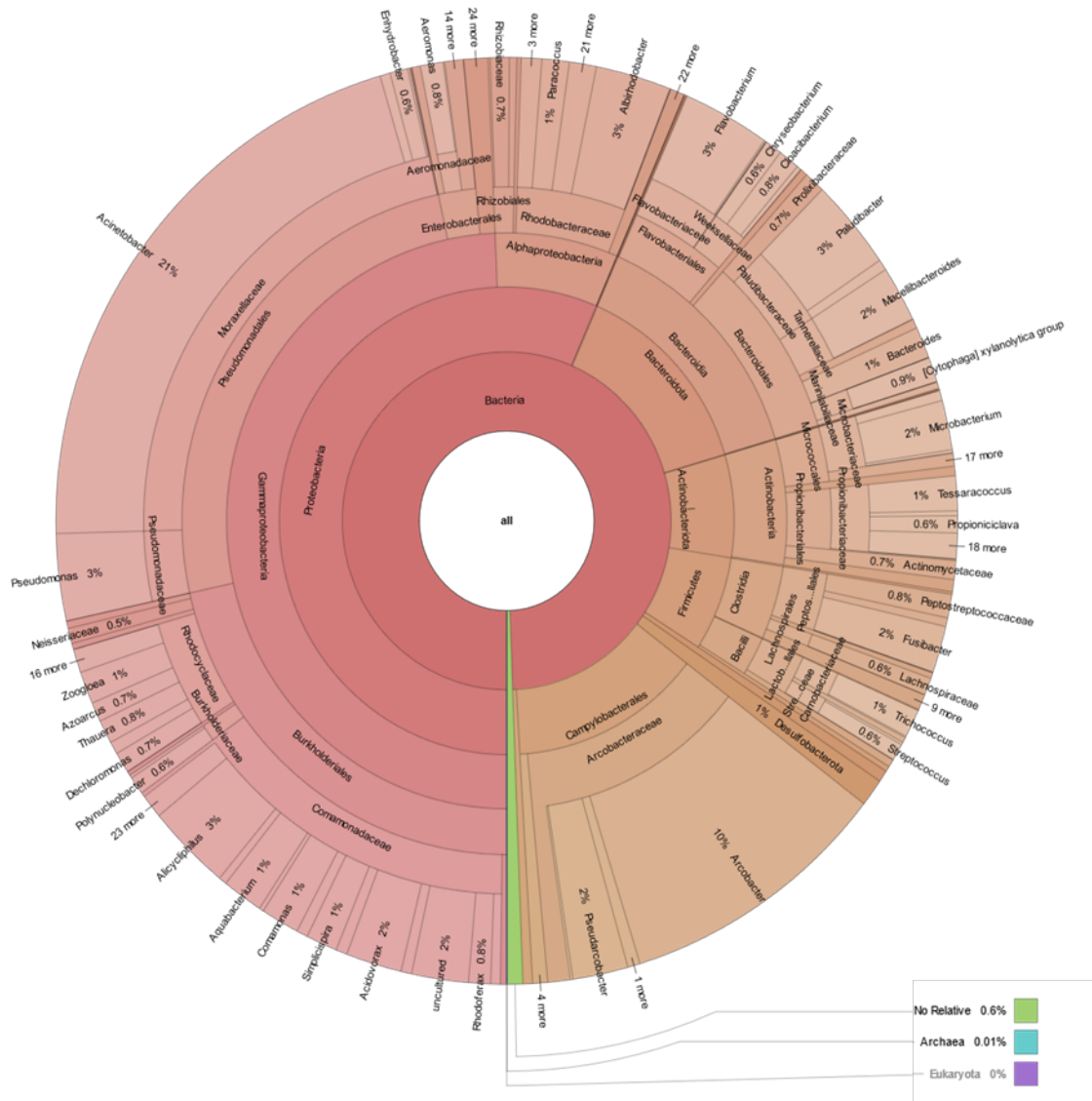


Abbildung 56: Taxonomische Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften des Zulaufs von Kläranlage 2 in Form eines KRONA-Plots.

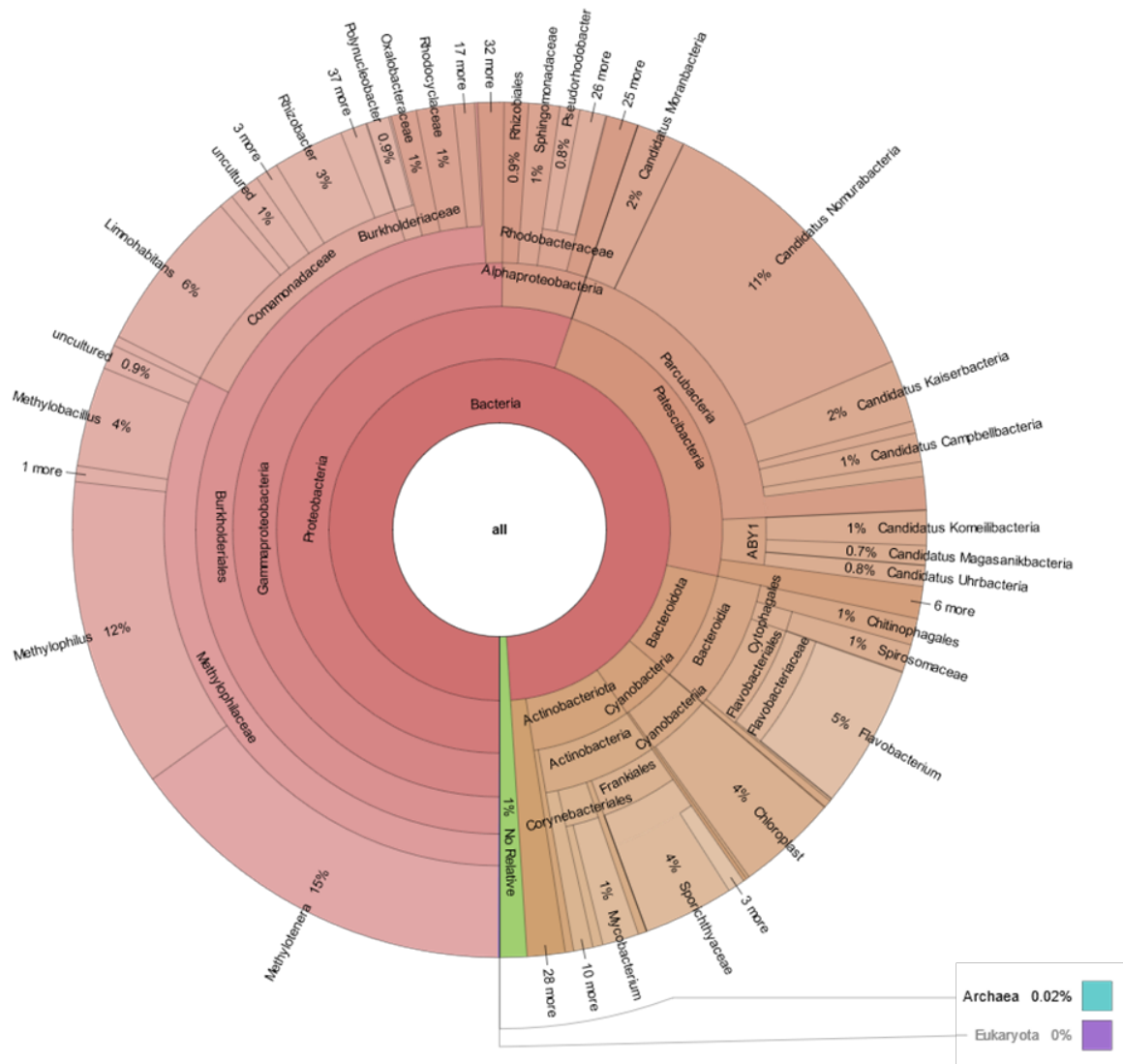


Abbildung 57 Taxonomische Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft des Ablaufs von Kläranlage 2 in Form eines KRONA-Plots.

### 3.2.6 Chemische Analysen ausgewählter Kläranlagen und Oberflächengewässer

Die in Tabelle 7 und Tabelle 12 zusammengefassten Proben wurden auf 20 Antibiotika (Tabelle 22) und zahlreichen weiteren chemischen Spurenstoffen (Tabelle 23) mittels der oben beschriebenen chemischen Analyse untersucht. Die Ergebnisse sind als Konzentrationsverläufe für die entsprechenden Antibiotika in der Abbildung 58 dargestellt und fassen alle Kläranlagenzuläufe, alle Abläufe und alle Oberflächenwässer aus dem Monitoring Sommer 2019 zusammen, um einen Überblick über die ermittelten Konzentrationsbereiche zu geben. Alle Abbildungen stammen aus dem Projekt „Untersuchung

von Abwässern und Gewässern auf unterschiedliche toxikologische Endpunkte“ (gefördert vom BMLTR) (Braun et al., 2020). Meistens sind die Konzentrationen in den Zuläufen der Kläranlagen am höchsten, gefolgt von den Abläufen und schließlich OFG. Es deutet auf ähnliche LOG-Einheiten-Unterschiede hin, wie sie in den oben beschriebenen ARGs beobachtet wurden, mit ähnlichen Variationen von mehr als einer LOG-Einheit über eine einzelne Matrix (Kläranlagen-Zu-/Ablauf; Oberflächengewässer). Manche Antibiotikakonzentrationen waren jedoch im Ablauf höher als im Zulauf (Clindamycin, Metrodinazol, Sulfadimethoxin und Sulfathiazol). Die Antibiotika Amoxicillin, Doxycyclin, Josamycin, Penicillin G, Penicillin V und Sulfadoxin wurden weder in den Kläranlagen noch im Gewässer nachgewiesen, obwohl diese (außer Sulfadoxin) häufig zum Einsatz kommen. Die Antibiotika Azithromycin, Clarithromycin und Erythromycin kommen in den Kläranlagenzu- und -abläufen in Konzentrationen von 0,1-1 µg/l vor und liegen somit über den Bewertungskriterien. Zusätzlich wurden noch weitere zahlreiche Arzneimittelrückstände, Umweltgifte (Dioxine, Furane, DL-PCB, PAHs) und Röntgenkontrastmitteln analysiert, deren Ergebnisse im Anhang zu finden sind (Anhang 1 - Abbildung 65, Anhang 1 - Abbildung 66, Anhang 1 - Abbildung 67, Anhang 1 - Abbildung 68, Anhang 1 - Abbildung 69, Anhang 1 - Abbildung 70, Anhang 1 - Abbildung 71, Anhang 1 - Abbildung 72 und Anhang 1 - Abbildung 73). Hier sind beispielsweise vor allem hohe Konzentrationen (> 1µg/l und > Bewertungskriterium) in den Zuläufen bei den Antirheumatika Diclofenac, Ibuprofen, Mefenaminsäure und Naproxen zu sehen (Anhang 1 - Abbildung 65). Ebenfalls in höheren Konzentrationen vorhanden sind vor allem im Zulauf Metformin (Antidaibetika) und die Antiepileptika Gabapentin und Levetiracetam (Anhang 1 - Abbildung 66). Auch die Gruppe der Röntgenkontrastmittel sind im Zu- und Ablauf relativ hoch vertreten und liegen sehr oft über den Bewertungskriterien (Anhang 1 - Abbildung 71).

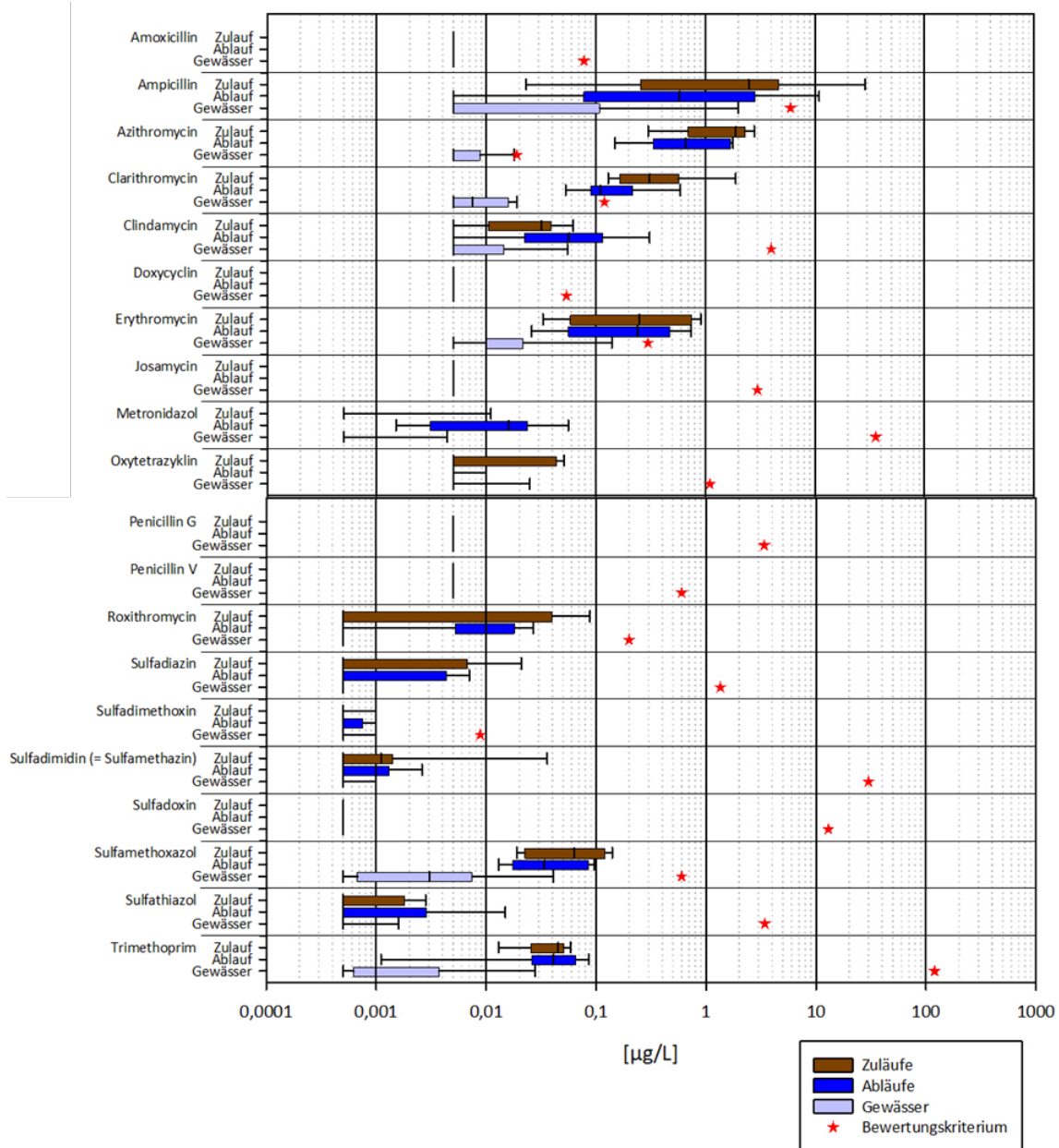


Abbildung 58: Konzentrationen der gemessenen Antibiotika während des Monitorings im Sommer 2019.

Dargestellt sind die Verteilungen der Konzentrationen  $[\mu\text{g/L}]$  der Zuläufe (n = 9), Abläufe (n = 9) und Oberflächengewässer (n = 8) als Boxplots. Quelle: Braun et al. (2020).

### 3.2.7 Statistische Auswertung der Daten

In einem ersten Interpretations- und statistischen Auswertungsschritt wurden die aus dem ARG-DNA-Array (70 verschiedene ARGs) und der chemischen Analyse (20 Antibiotika) gewonnenen Daten gepoolt und auf Ähnlichkeiten zwischen den Proben basierend auf Proximity-Tests analysiert. Die Visualisierung der Clusterung der Probenstellen ist als Dendrogramm in Abbildung 59 dargestellt. (Eine vereinfachte Erklärung, wie Dendrogramme zu lesen sind, ist, bei einer Probenahmestelle zu beginnen und der Linie zur zweiten Stelle zu folgen. Je länger der Weg / die Linie zwischen den Standorten ist, desto unterschiedlicher sind die Proben). Mit einzelnen Ausnahmen liefert die Analyse ein plausibles Bild, das hohe Ähnlichkeiten zwischen allen Zufluss- („Zu“) und Abflussproben („Ab“), aber große Unterschiede zwischen Zufluss- und Abflussproben zeigt. Die Oberflächengewässerproben („OGW“) sind eher mit den Abflussproben verwandt als mit den Zuflussproben. Dennoch ist OGW8 (Wulka) mit dem Zufluss-Zweig der Proben geclustert, was durch den hohen Anteil an geklärtem Abwasser an dieser Probenahmestelle erklärt werden könnte. Andererseits sind die Abwässer der Kläranlagen 2, 6 und 7 eher mit den Oberflächengewässerproben OGW 6, 2 und 7 verwandt. (Inn, Reichramingbach und Raab) als mit dem Abwassercluster der Anlagen 3, 9, 4, 5, 1 und 8.

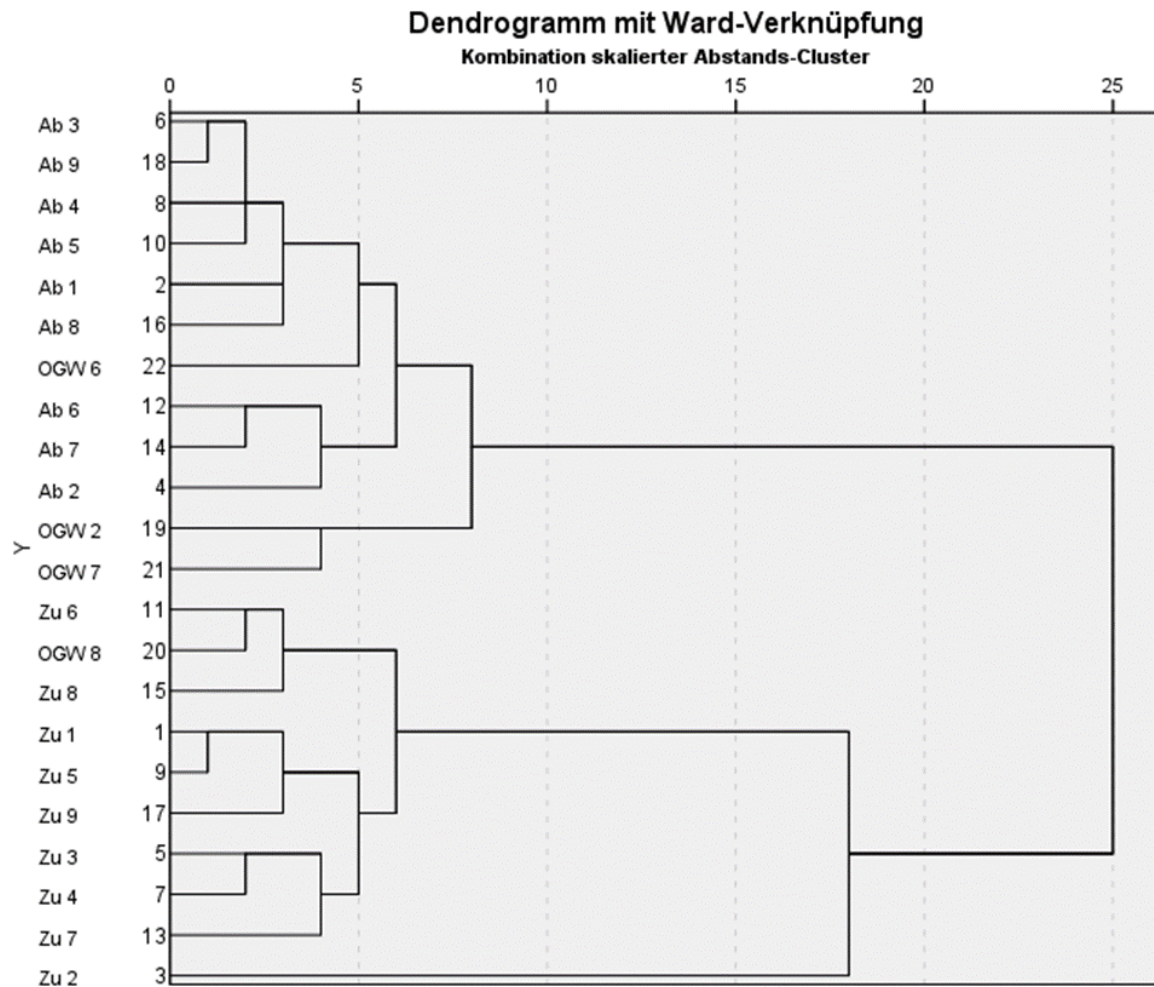


Abbildung 59: Dendrogramm mit Ward-Verknüpfung – Ähnlichkeiten der Kläranlagen und Oberflächengewässerproben aus Sommer 2019 zueinander.  
n = 9 Zuläufe (Zu), n = 9 Abflüsse (Ab), n = 8 Oberflächengewässer (OGW).

Eine erste Runde einer Komponentenanalyse für denselben Datensatz zeigt, dass etwa 80 % der Varianz durch 10 Variablen erklärt werden können, was es ermöglicht, die Komplexität von etwa 86 Variablen auf 10 zu reduzieren. Interessanterweise befinden sich ARGs der gleichen Familie wie *tet*, *qnr*, *bla*-Gene, in der gleichen Komponente (1), während die Chemikalien selbst meist in Komponente 3 vertreten sind. Weitere vertiefte Analysen sind hier erforderlich, um die Immissionssituation zu verstehen.

### 3.3 Entfernung von ARGs durch weitergehende Abwasserbehandlung

Obwohl die Thematik der ARG-Entfernung durch weitergehende Abwasserbehandlung keine explizite Fragestellung des gegenständlichen Projekts war, werden an dieser Stelle auszugswise relevante Ergebnisse zu den Auswirkungen verschiedener Abwasserbehandlungsverfahren auf das Vorkommen und die Abundanzen von Antibiotikaresistenzgenen dargestellt, die im Zuge des EU-Projekts ANSWER (ANTibioticS and mobile resistance elements in WastEwater Reuse applications: risks and innovative solutions - Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 675530) erarbeitet wurden. Die Ergebnisse zur Reduktionsleistung des untersuchten Multibarrierensystems bestehend aus Ozonung und nachgeschalteter granulierter Aktivkohlestufe (GAK) auf Antibiotikaresistenzgene sind in Abbildung 60, Abbildung 61 und Abbildung 62 dargestellt. Die Abbildungen stammen aus Krampe et al. (2020) und Slipko et al. (2021) und sind auch in Zessner et al. (2022) zu finden.

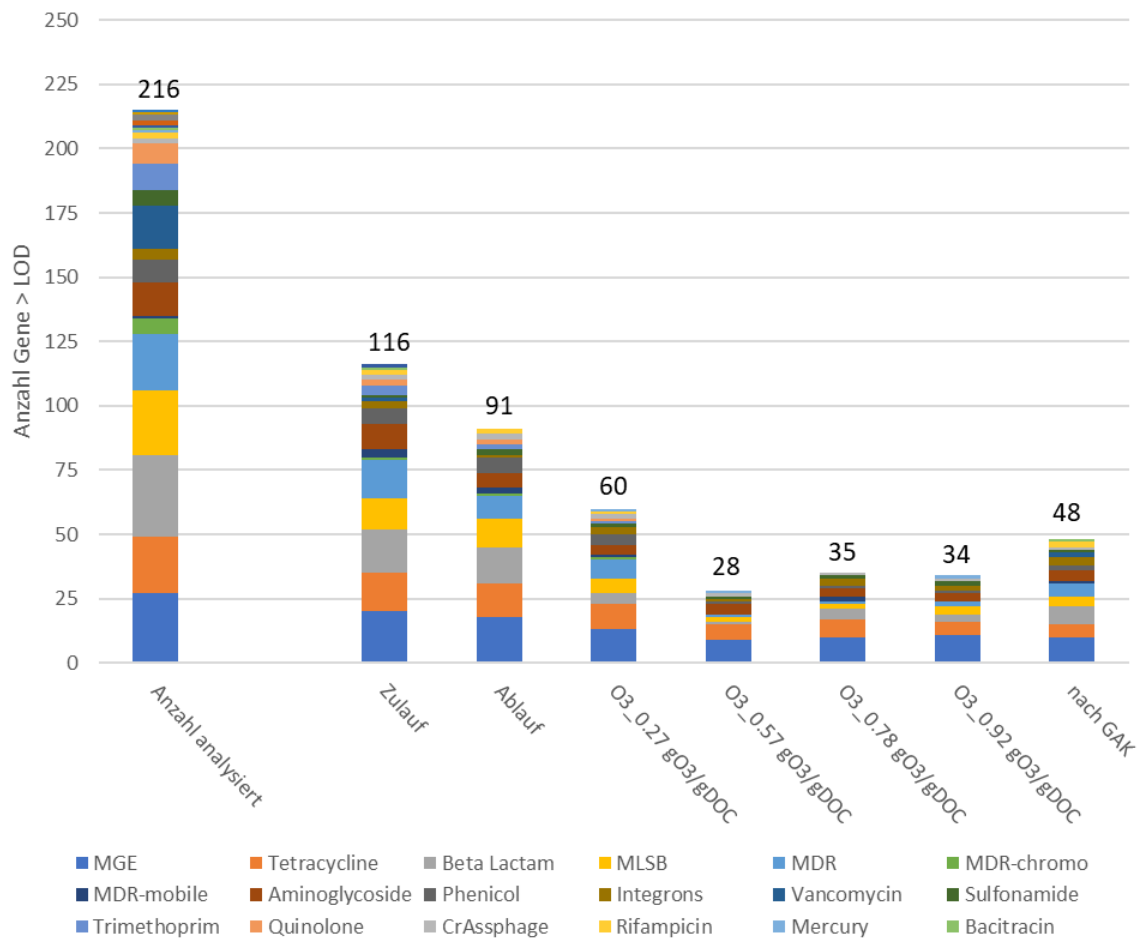


Abbildung 60: Anzahl detektiertes ARGs im untersuchten Multibarriersystem zur weitergehenden Abwasserreinigung mittels Hochdurchsatz-Gen-Profiling. Übersicht über die detektierten ARGs in den einzelnen Stufen des Multibarriersystems bestehend aus Ozonung und nachgeschalteter granulierter Aktivkohlestufe (GAK). Zulauf/ Ablauf entsprechen dem Zulauf und dem Ablauf der konventionellen Kläranlage. Quelle: Krampe et al., 2020.

In Abbildung 60 sind aus Gründen der Übersichtlichkeit die Positivbefunde für die untersuchten Resistenzgene nach Antibiotikagruppen bzw. anderen mit der Thematik im Zusammenhang stehenden Kriterien gruppiert dargestellt. Von den in Summe 216 untersuchten Genen wurden im Zulauf der konventionellen Anlage 116 positiv befundet bzw. nachgewiesen. Im Ablauf reduziert sich die Anzahl der nachweisbaren unterschiedlichen Resistenzgene auf 91. Durch die Ozonung wird diese Zahl in Abhängigkeit der eingesetzten spezifischen Ozondosis weiter reduziert. Während bei 0,27 g O<sub>3</sub>/g DOC nur eine Reduktion auf 60 positive Nachweise erfolgt, kommt es ab etwa 0,5 g O<sub>3</sub>/g DOC zu einer weiteren deutlichen Reduktion auf im Mittel 32 unterschiedliche Resistenzgene. Im Ablauf des GAK-Filters wird wieder ein leichter Anstieg der Anzahl auf 48 nachweisbare Resistenzgene beobachtet.



In Abbildung 61 sind die Ergebnisse als LOG-Reduktion von ARGs in den einzelnen Verfahrensstufen der konventionellen (Biologie) und weitergehenden Abwasserreinigung dargestellt. Die Ergebnisse einer Tagesmesskampagne mit unterschiedlichen Ozondosen (0,27 - 0,92 g O<sub>3</sub>/g DOC) zeigten, dass ab 0,57 g O<sub>3</sub>/g DOC im Median über alle nachgewiesenen ARGs eine Reduktion um knapp 4 LOG-Stufen erreicht wurde und eine weitere Erhöhung der Dosis auf 0,78 bzw. 0,92 g O<sub>3</sub>/g DOC zu keiner weiteren Steigerung der LOG-Reduktion mehr führte. Im Gegensatz zur Ozonung ergab die PCR-Chip-Analyse im nachgeschalteten GAK-Filter keine zusätzliche ARGs-Entfernung mehr.

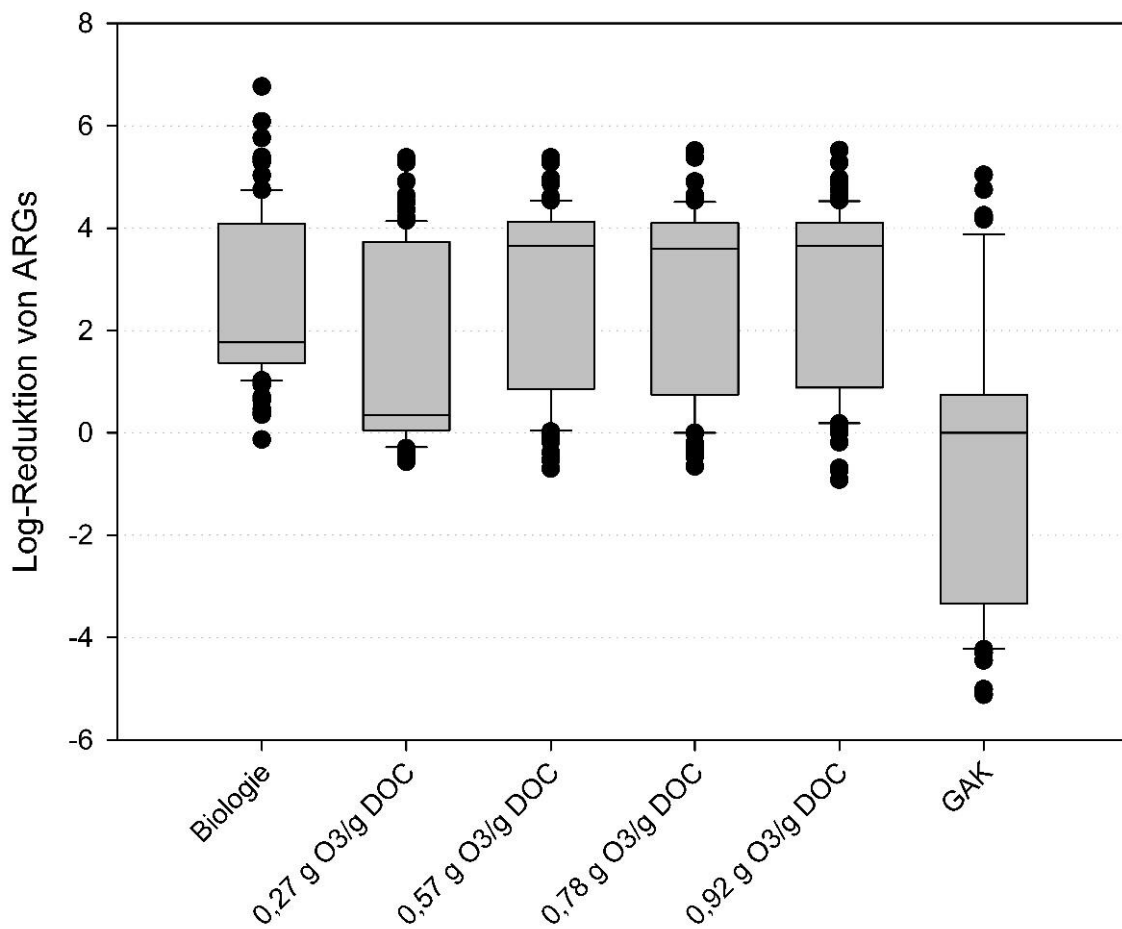


Abbildung 61: LOG-Reduktion von ARGs im Multibarriersystem zur weitergehenden Abwasserreinigung (Hochdurchsatz-Gen-Profilings). Dargestellt sind die LOG-Reduktionen der mittels Hochdurchsatz-Gen-Profilings gemessenen ARG-Konzentrationen in den einzelnen Verfahrensstufen der konventionellen (Biologie) und

weitergehenden Abwasserreinigung (Ozonung und GAK; Referenz für GAK: 0,57 g O<sub>3</sub>/g DOC).  
Quelle: Slipko et al., 2021.

Um Änderungen der relativen Häufigkeit von ARGs zu erfassen, wurde die absolute Häufigkeit der untersuchten ARGs auf die Häufigkeit des 16S rRNA Gens bezogen. Eine Selektion von ARGs, wie sie für eine spezifische Ozondosis von 0,9 g O<sub>3</sub>/g DOC berichtet wurde (Alexander et al., 2016), konnte bei der höchsten untersuchten Ozondosis von 0,92 g O<sub>3</sub>/g DOC auch in der vorliegenden Studie beobachtet werden (Abbildung 62). Bei geringeren Ozondosen von ≤ 0,78 g O<sub>3</sub>/g DOC war dieser Effekt jedoch nicht feststellbar und die Werte bewegten sich in der Größenordnung von konventionell gereinigtem Kläranlagenablauf.

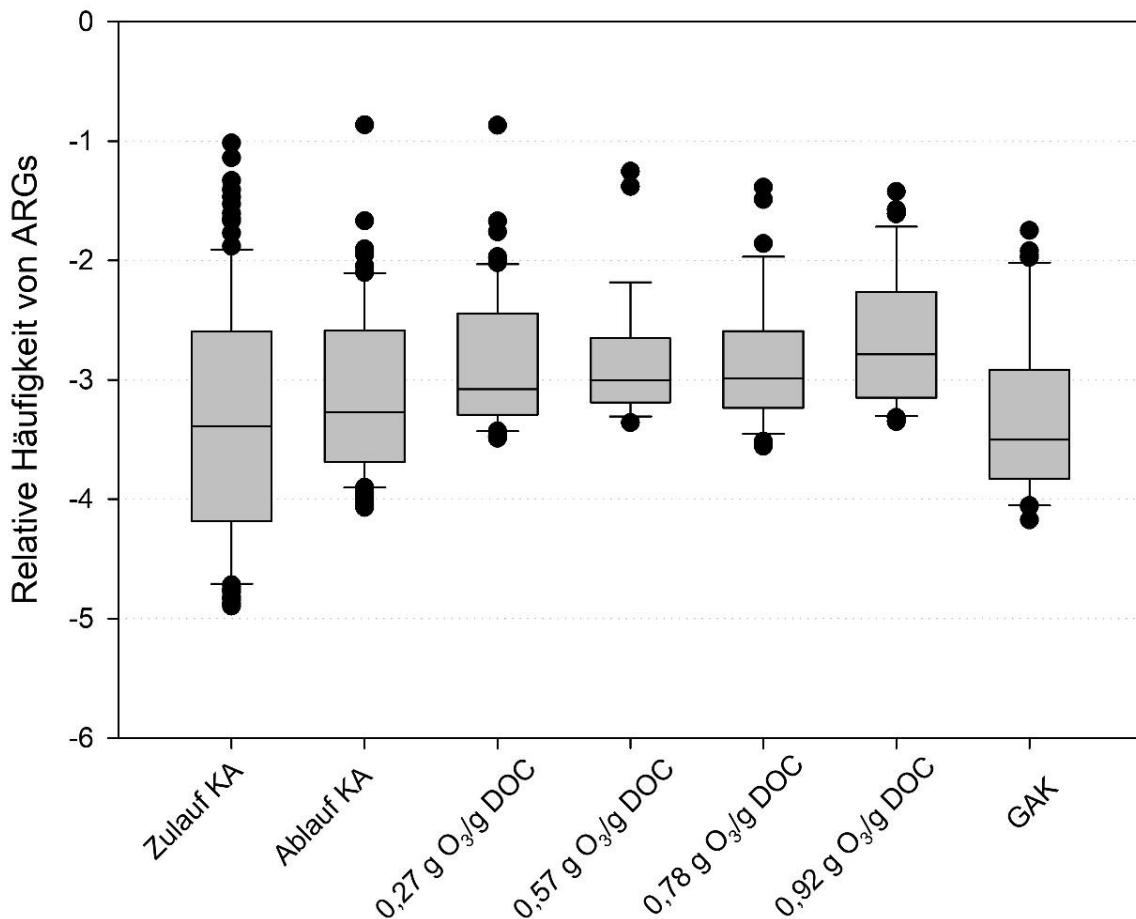


Abbildung 62: Relative ARG-Häufigkeit im Multibarriersystem zur weitergehenden Abwasserreinigung (Hochdurchsatz-Gen-Profilung).  
Dargestellt sind die mittels Hochdurchsatz-Gen-Profilung gemessenen relativen ARG-Häufigkeiten in den einzelnen Verfahrensstufen der konventionellen (Zulauf, Ablauf KA) und

weitergehenden Abwasserreinigung (Ozonung und GAK; Referenz für GAK: 0,57 g O<sub>3</sub>/g DOC).  
Quelle: Slipko et al., 2021.

Die Ergebnisse der Versuche, die sich mit der Reduktion von ARGs durch Membranfiltration, einer anderen Technologie der weitergehenden Abwasserreinigung, beschäftigte, sind in Abbildung 63, Tabelle 30 und Abbildung 64 dargestellt. Alle Daten und Abbildungen stammen aus Reif et al. (2019) und sind teilweise auch in Slipko et al. (2019) zu finden.

Die logarithmische Reduktion zeigt, dass der größte Rückhalt freier DNA mit der Umkehrosmosemembran UO2 erreicht wurde. Die Permeatkonzentration lag dabei unter dem LOQ der qPCR Quantifizierungsmethode, was einer Reduktion um 4 LOG Stufen, daher einem Rückhalt von mehr als 99,99% entspricht. Mit der Nanofiltrationsmembran NF2 konnte eine Reduktion der freien extrazellulären DNA von 3,63 LOG erreicht werden. Die Ultrafiltrationsmembranen UF2 und UF3 resultieren in 3,38 und 3,46 LOG Reduktion. Die Membranen MF1 und UF2 zeigten den niedrigsten Rückhalt mit 0,06 LOG Reduktion und 0,12 LOG Reduktion (Abbildung 63).

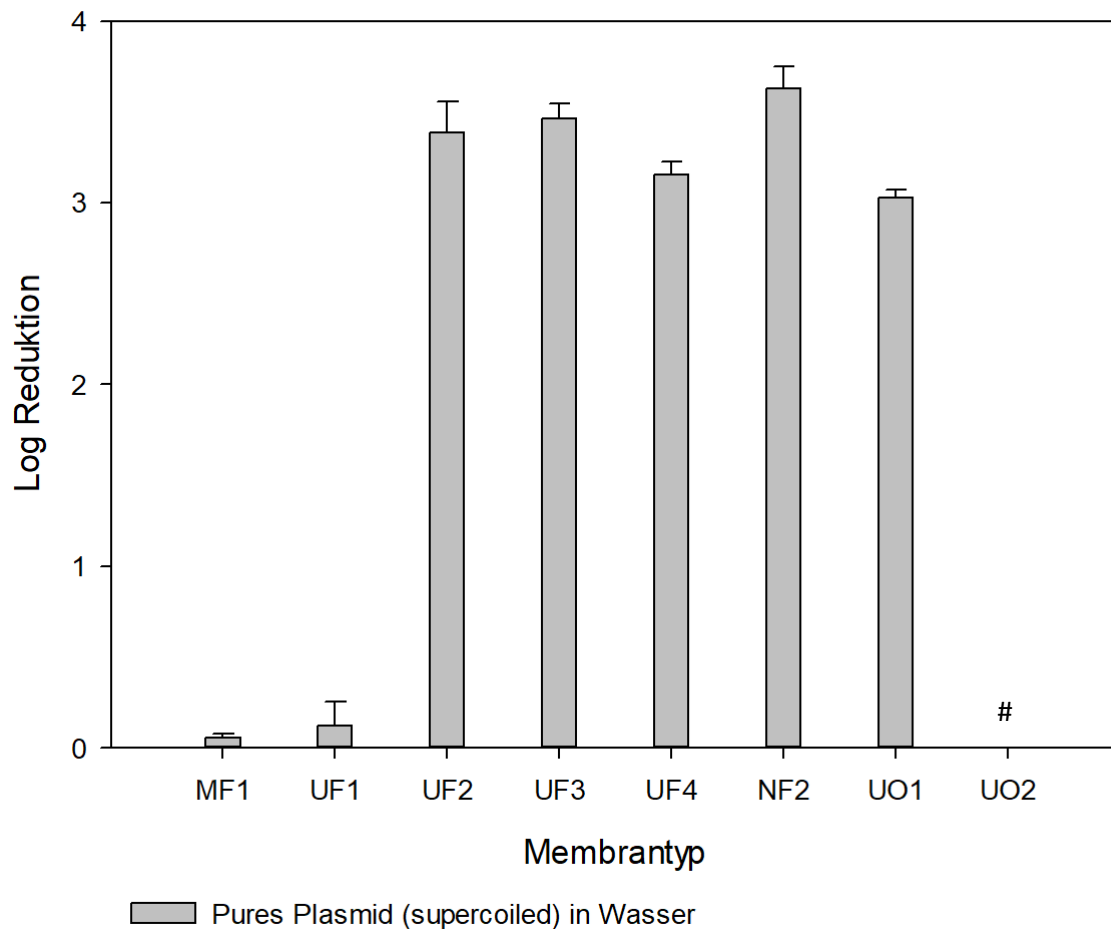


Abbildung 63: Logarithmische Reduktion der freien extrazellulären DNA aus destilliertem, autoklaviertem Wasser für verschiedenen Membrantypen.

MF, Mikrofiltration; UF, Ultrafiltration; NF, Nanofiltration; UO, Umkehrosiose.

#, Da die Permeatkonzentration der UO2 Filtration unter dem LOQ lag, kann kein Wert dargestellt werden (Entfernung > 4 LOG-Stufen).

Quelle: Reif et al., 2019

Die Retentionsraten der DNA Mischung aus Plasmiden und linearen Fragmenten sind in Tabelle 30 dargestellt. Die Filtrationen mit vorfiltriertem Kläranlagenablauf zeigten leicht erhöhte Rückhalteraten. Da die eingesetzten DNA Moleküle viel größer als der „molecular weight cut-off“ (MWCO) der Membranen waren, ist davon auszugehen, dass der Siebeffekt den Hauptentfernungsmechanismus darstellt.

Tabelle 30: Rückhalt der Mischung aus Plasmiden und linearen DNA Fragmenten aus destilliertem, autoklaviertem Wasser und Kläranlagenablauf für verschiedenen Membrantypen. MF, Mikrofiltration; UF, Ultrafiltration; NF, Nanofiltration; UO, Umkehrosmose

Quelle: Reif et al., 2019 (auch in Slipko et al., 2019).

Membrantyp	Rückhalt der DNA Mischung in [%]	
	dH2O	filtrierter Kläranlagenablauf
MF1	4.70 ± 6.43	2.13 ± 6.24
UF1	4.72 ± 6.31	10.46 ± 11.99
UF2	94.73 ± 0.36	96.78 ± 0.41
UF3	95.12 ± 0.32	96.27 ± 0.70
UF4	98.88 ± 0.00	99.73 ± 0.00
UF5	99.36 ± 0.06	99.16 ± 0.30
NF1	> 99.90 (below LOQ)	> 99.90 (below LOQ)
NF2	> 99.90 (below LOQ)	> 99.90 (below LOQ)
UO1	99.48 ± 0.09	99.66 ± 0.52
UO2	> 99.90 (below LOQ)	> 99.90 (below LOQ)

Die Ergebnisse der Filtration der drei verschiedenen DNA Konfigurationen zeigen, dass der geringste Rückhalt für linearisiertes Plasmid (UF2: 89,39% UO1: 84,82%) und der höchste für Pures Plasmid (supercoiled) (UF2: 99,95% UO1: 99,91%) erreicht wurden (Abbildung 64).

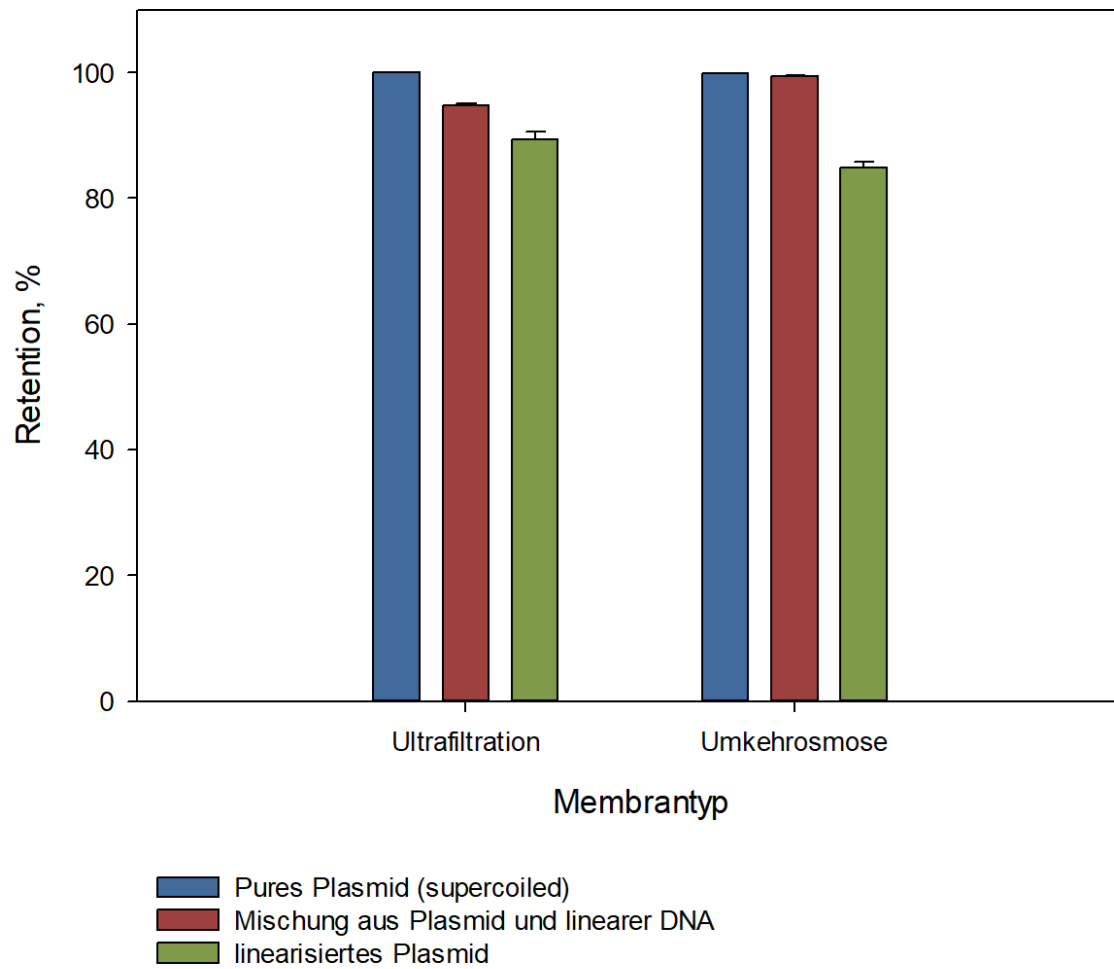


Abbildung 64: Einfluss der DNA-Konformation auf den Rückhalt bei Filtration mit der Ultrafiltrationsmembran UF1 und der Umkehrosmosemembran UO1.

Quelle: Reif et al., 2019 (auch in Slipko et al., 2019)

# 4 Schlussfolgerungen

## 4.1 Auswirkungen der verwendeten Methodik auf die Quantifizierung von ARG und andere molekularbiologische Analysen

Die methodischen Experimente sollten zeigen, welche Faktoren (von der Probenahme bis zur DNA-Extraktion) Einflüsse auf die im Rahmen des Projekts Margins-II verwendeten molekularbiologischen Analysen haben. Die daraus resultierenden Ergebnisse waren hilfreich, um auf einer soliden Beurteilungsbasis **einheitliche Aufarbeitungsmethoden für die Untersuchung der Abwasser- und Oberflächengewässerproben für die weitere Projektbearbeitung festzulegen.**

Die im Rahmen dieses Projektes durchgeführten **methodischen Experimente zur Abwasserprobenahme zeigten keine nennenswerten Auswirkungen der untersuchten Probenahmeverfahren** (Stichproben, TMP, WMP) auf die mittels qPCR ermittelte Quantität der exemplarisch gemessenen ARGs (*sul1* und *ermB*) sowie des bakteriellen 16S rRNA Gens, das als Parameter zur Bestimmung der Gesamtheit aller Bakterien herangezogen wurde. Lediglich die photometrisch bestimmten DNA-Konzentrationen zeigten Unterschiede zwischen den verschiedenen Probenahmeverfahren. Die verwendete photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration durch Messung der Absorption bei 260 nm ist allerdings nicht sehr empfindlich. Bei geringen Konzentrationen lässt sich die Menge an DNA in der Regel nicht mehr von Artefakten unterscheiden. Außerdem ist sowohl bei hohen wie auch bei niedrigen Konzentrationen eine spezifische Konzentrationsbestimmung problematisch, wenn die Proben durch andere Nukleinsäuren oder auch andere Stoffe (wie beispielsweise Reagenzien aus dem DNA-Extraktionsprozess) verunreinigt sind, die bei der gleichen Wellenlänge absorbieren. Grundsätzlich wird bei der Beprobung von Kläranlagen meistens auf Mischproben (TMP oder WMP) gesetzt, weil man so den Überblick eines ganzen Tages- bzw. Wochengeschehens beobachten kann. Auch im Rahmen dieses Projekts wurden daher für die Analyse von verschiedenen ARGs in **Kläranlagen immer Mischproben** untersucht - meist TMP, teils WMP. Aus einer anderen Studie aus dem Jahr 2015 über fäkale Indikatoren und genetische Marker von *Bacteroidetes* in kommunalen Kläranlagen, geht auch hervor, dass 24-Stunden automatisierte Probeverfahren mit Lagerungsbedingungen von 5 °C als ideale Art der Probenahme empfohlen werden. Demnach sollen solche automatischen Probenahmeverfahren zu einem besseren Verständnis und zur Überwachung von kommunalen Kläranlagen als Quellen fäkaler Verschmutzung von Wasserressourcen beitragen (Mayer et al., 2015). Die Analysen von Stichproben bei den methodischen Versuchen mit

Kläranlagenablaufproben führten auch zu vergleichbaren Ergebnissen, was als Grundlage dafür herangezogen wurde bei der Beprobung der **Oberflächengewässer aus Praktikabilitätsgründen** auf **Stichproben** zu setzen. Im Gegensatz zu Kläranlagen, wo hierzulande für die Überwachung der Reinigungsleistung routinemäßig TMP in gekühlten automatischen Probenehmern gesammelt werden, wäre eine solche Probenahme-Infrastruktur für Oberflächengewässer mit einem hohen Etablierungs- und Wartungsaufwand verbunden, der auf Basis der Ergebnisse aus den methodischen Versuchen für die Fragestellung dieses Projekts nicht notwendig zu sein schien.

Da in der Praxis die sofortige Aufarbeitung der Proben nach Probenahme nicht immer möglich ist, sollte der **Einfluss der Probenlagerung** in einem weiteren Experiment untersucht werden. Ein Vorversuch, bei dem Zu-, Ablauf- und Belebtschlamm-Proben für 48 h bei 4 °C gelagert wurden, zeigte keinen nennenswerten Einfluss auf die Konzentrationen von 16S rRNA Gen und ARGs *sul1* und *ermB*. In einem weiteren Versuch wurde daher untersucht, ob eine längere Lagerdauer der Proben bei 4 °C die nachfolgenden Analysen ggf. beeinflussen kann. Im Zulauf konnte kein nennenswerter Einfluss auf die exemplarisch mit qPCR gemessenen Gene sowie die DNA-Konzentration festgestellt werden. Im Ablauf wurden keine nennenswerten Auswirkungen bei einer Lagerung bei 4 °C von bis zu 7 Tagen beobachtet. **Nach 14 Tagen** kam es jedoch zu einer **Reduktion der untersuchten ARGs um 1,2 (*sul1*) bzw. 1,7 (*ermB*) LOG-Stufen** verglichen mit den Konzentrationen in der nicht gelagerten Probe. Ebenso konnte bei der photometrisch bestimmten DNA-Konzentration im Ablauf eine deutliche Abnahme zwischen der Lagerdauer von 7 und 14 Tagen detektiert werden. Daraus lässt sich ableiten, dass eine Lagerung von Kläranlagen Proben vor Prozessierung von über zwei Wochen einen deutlichen Einfluss auf die nachfolgenden molekularbiologischen Analysen zur Folge haben kann. Auf Basis der hier erhaltenen Ergebnisse wäre **eine Lagerung von bis zu 7 Tagen vertretbar**, wobei eine Änderung auf die mikrobielle Gemeinschaft und Auswirkungen auf hier nicht untersuchte Parameter nicht ausgeschlossen werden kann. Grundsätzlich ist es daher **ratsam, die Proben so schnell wie möglich nach der Probenahme zu verarbeiten**.

Verschiedene Probenprozessierungen im Zuge der Weiterverarbeitung der Proben zeigten, dass eine Probenvorbehandlung durch Homogenisierung, Proteinase K-Zugabe oder Ultraschallbehandlung keinen Vorteil für die DNA-Konzentration oder die Quantifizierung der ARG brachte, sondern eher zu niedrigeren Werten führte. Auf Grund dieser Ergebnisse entschied man sich **keine Vorbehandlungen an den Kläranlagen- und Oberflächengewässerproben** durchzuführen (= Standard-Arbeitsablauf im Labor des Instituts für Wassergütewirtschaft, TU Wien).

Eine Erhöhung des Probenvolumens bei der Extraktion von Klärschlamm zeigte erwartungsgemäß auch einen Anstieg in der DNA-Konzentration. Je mehr Probenvolumen an



Klärschlamm, desto höher fällt die DNA-Menge aus. Die Konzentrationen der untersuchten Gene (bakterielles 16S rRNA Gen und ARGs *sul1* und *ermB*) zeigten jedoch keine Unterschiede für die unterschiedlichen Probenmengen).

Als **beste Aufkonzentrierungsmethode** eignete sich den Ergebnissen nach zu urteilen **für wässrige Proben die Filtration**. Hier wurden höhere DNA-Konzentrationen und für manche ARGs teilweise auch etwas höhere Konzentrationen beobachtet als bei der Zentrifugation gleicher Volumina.

**Kläranlagenzulauf** kann auf Grund der hohen Biomasse am besten auf einem **0,45 µm-Filter** mit einem Volumen von **40 ml aufkonzentriert** werden. Bei **Ablaufproben**, die auch weniger Biomasse enthalten, ist auch die Verwendung eines **0,22 µm-Filters praktikabel**. Volumina von **400 ml** zeigten sich als gut aufkonzentrierbar. Je höher das Volumen, desto länger können Filtrationsvorgänge dauern. Eine **sofortige Extraktion** der aufkonzentrierten Proben bringt aus Sicht dieser Ergebnisse **keine Vorteile gegenüber einer Lagerung auf - 80 °C** bei 48 Stunden. In der Praxis hat es sich bewährt, dass eine Lagerung der Proben auf - 80 °C oder auf - 20 °C auch über längere Zeiträume eine geeignete Methode darstellt, wenn die sofortige Extraktion nach der Aufkonzentrierung nicht möglich ist.

Als **Zell-Lyse-Methode bei der DNA-Extraktion** erwies sich der Einsatz von **einem Bead-Beater („FastPrep“)** anstatt eines Schüttlers (Vortex), vor allem in den Zulauf-Proben, als vorteilhafter. Deshalb wurde auch diese Methode im Standard-Workflow integriert.

Auffällig bei all diesen methodischen Experimenten war, dass es zwar immer wieder Unterschiede zwischen den DNA-Konzentrationen von den extrahierten Proben gab, es sich jedoch in den Ergebnissen der qPCR über die Quantität der untersuchten Gene meist nicht widerspiegelte. Ein hoher limitierender Faktor bei all diesen Ergebnissen ist die niedrige Anzahl der einzelnen Proben. Teilweise wurden die Proben auch nicht in Replikaten untersucht, womit man keine gesicherten Aussagen treffen kann. Die DNA-Extraktion erfolgte üblicherweise mit einem Kit. Bei solchen Kits ist die mögliche Ausbeute an DNA manchmal begrenzt, da nur eine bestimmte Menge an das Silica-Säulchen binden kann. Es kann auch im gesamten Prozess der DNA-Extraktion immer wieder zu Verlusten an Zellmaterial kommen. Das richtige Handling spielt hier natürlich auch hinein. Ein weiterer wichtiger Punkt stellt die Messung der DNA-Konzentrationen dar. Diese wurde mittels photometrischer Messung der Absorption bei 260 nm durchgeführt. Hier kann es vor allem bei niedrigeren Konzentrationen zu unzuverlässigen Ergebnissen kommen. Auch mehrmaliges Einfrieren und wieder Auftauen kann zu Einbußen in der DNA-Konzentration führen.

Die methodischen Experimente wurden hier nur für Kläranlagen-Proben durchgeführt. Für Oberflächengewässer-Proben, die im weiterführenden Projekt ebenfalls untersucht wurden, gab es keine methodischen Versuche. Jedoch wurde davon ausgegangen, dass der für Kläranlagenablaufproben etablierte Arbeitsablauf aufgrund der Ähnlichkeit der Matrix auch für die Proben von Oberflächengewässer geeignet ist. Weitere methodische Experimente könnten für OFG noch genauere Einblicke geben. In der Publikation von Liguori et al. (2022) wird ebenfalls darauf hingewiesen, dass es standardisierte Methoden zur Überwachung von Antibiotikaresistenz im Wasser bedarf, um vergleichbare Datensätze erhalten zu können, was den methodischen Versuchen in diesem Projekt nochmal mehr an Bedeutung verleiht.

## 4.2 Situation der ARG-Hintergrundbelastung von österreichischen Kläranlagen und Oberflächengewässern

Die systematische Untersuchung verschiedener österreichischer Kläranlagen und Oberflächengewässer im Projektzeitraum liefert **erstmalig einen umfassenden Überblick über die ARG-Hintergrundbelastung der aquatischen Umwelt in Österreich**. Zusammen mit den Daten zur ARG-Hintergrundbelastung in landwirtschaftlich genutzten **Böden**, die im Partnerprojekt **Margins-I** erhoben wurden, liegt somit eine **wertvolle Ersterhebung der Situation von Antibiotikaresistenzgenen in der Umwelt Österreichs** vor. Diese möchte im **Sinne des „One-Health“ Ansatzes** eine **komplementäre Ergänzung zu den jährlichen AURES-Berichten** des BMSGPK zur Situation der Antibiotikaresistenz im Human-, Veterinär- und Lebensmittelbereich bieten (BMSGPK, 2021).

Die **ARGs *sul1*, *ermB* und *tetW*** wurden dabei in den untersuchten **Kläranlagen am häufigsten** quantitativ detektiert. Sie konnten in allen untersuchten Zu- und Abläufen detektiert werden. Das resultiert daraus, dass Antibiotika aus den Klassen Sulfonamide, Makrolide und Tetracycline sehr oft im klinischen, aber auch im veterinärmedizinischen Bereich eingesetzt werden. Auch die Beta-Lactam Antibiotika werden in großen Mengen im humanen Bereich eingesetzt (ECDC, 2022). Beispielsweise ist *sul1* stark mit anthropogenen Quellen assoziiert und vor allem im Abwasser reichlich vorhanden. Das liegt auch daran, dass Sulfonamide schon relative lange verwendet werden und deswegen sind auch die Resistenzen schon sehr verbreitet. Die Resistenz auf ein spezifisches Sulfonamid ist assoziiert mit einer Kreuzresistenz auf alle anderen Sulfonamide (Adams, 2001; Duijkeren et al., 1994). In der Humanmedizin werden Sulfonamide heute nicht mehr so oft eingesetzt, jedoch in der Veterinärmedizin. Resistente Stämme sind daher auch häufig bei Tieren nachweisbar und gelangen somit auch in die Umwelt. Außerdem ist *sul1* mit Integrons der Klasse 1 assoziiert, das heißt mit mobilen genetischen Elementen. Diese sind wiederum Indikatoren für horizontalen Gentransfer und

sorgen für eine schnelle Ausbreitung dieses Gens (Frank et al., 2007; Vila-Costa et al., 2017). Die ARGs *bla*<sub>TEM-1</sub>, *npt2* und *npt3* wurden in den DNA-Extrakten der **Zuläufe fast immer** quantitativ nachgewiesen. **Am seltensten** wurde *vanA* **in all den untersuchten Kläranlagen** quantitativ detektiert. Das liegt vermutlich daran, dass Vancomycin-Resistenzen häufiger im Abwasser von Krankenhäusern zu finden sind. Sie kommen aber auch in kommunalen Abwässern vor (Hassoun-Kheir et al., 2020). Wenn *vanA*-Gene im Zuge dieser Untersuchungen detektiert wurden, wurden sie fast ausschließlich in den Zuläufen der Kläranlagen nachgewiesen. Da Vancomycin als Antibiotikum der dritten Linie gilt, wird es in der Therapie nicht standardmäßig eingesetzt, sondern nur bei der Behandlung von bakteriellen Infektionen, wo andere Antibiotika aufgrund von vorhandenen Resistenzen nicht wirksam sind. Trotzdem wurde kürzlich im klinischen Bereich in Österreich ein leichter Anstieg an Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) beobachtet (BMSGPK, 2021).

Durch den **Abwasserreinigungsprozess** in den Kläranlagen können die ARGs teilweise um **bis zu 4,3 LOG-Stufen reduziert** werden. ARGs wie *bla*<sub>TEM-1</sub>, *vanA*, *npt2* und *npt3* konnten in manchen Extrakten der Ablaufproben nicht mehr quantitativ nachgewiesen werden. In einer türkischen Studie aus dem Jahr 2020 wurde die beste Reduktion von ARGs mittels Membranbioreaktoren erreicht. Hierbei wird auch darauf hingewiesen, dass die Reduktion von ARGs nicht genspezifisch erfolgt (Kucukunsal and Içgen, 2020). Aus einer anderen Studie geht jedoch hervor, dass beispielsweise *vanA*-Gene nicht durch den Abwasserreinigungsprozess reduziert werden. Außerdem wird erwähnt, dass *vanA*-Gene tendenziell in höheren Konzentrationen im Klärschlamm vorkommen als im Abwasser selbst (Furukawa et al., 2022). Die am häufigsten detektierten ARGs aus dem Hochdurchsatz-Gen-Profiling ergeben sich hier aus den Antibiotikaklassen der Beta-Laktame, MGE und Tetracycline, was wiederum den hohen Einsatz dieser Gruppen im humanen und veterinären Bereich widerspiegelt.

In einem Jahresmonitoring von zwei verschiedenen **Kläranlagen** konnten **keine deutlichen saisonalen Trends** in den ARG-Quantitäten ermittelt werden. Tendenziell wurden in den kühleren Monaten (Dezember bis Februar) manche ARGs etwas weniger oft detektiert. Dies deckt sich mit den Ergebnissen einer chinesischen Studie aus dem Jahr 2018, wo im Kläranlagenablauf ebenfalls abnehmende ARG-Häufigkeiten im Winter beobachtet wurden. In Zufluss- und Überschussschlammproben konnte diese Studie hingegen keine offensichtlichen saisonalen Schwankungen detektieren (Jiao et al., 2018). Eine andere Studie aus Polen (2020) fand dagegen höhere ARG-Konzentrationen im Winter aber auch im Frühling. Eine mögliche Erklärung könnte die höhere Einnahme von Antibiotika in diesen Zeiträumen sein, aber auch die Schwankungen in der zugeführten Rohabwassermenge könnte eine Rolle spielen (Harnisz et al., 2020).

Obwohl gewöhnliche Abwasserreinigungsverfahren nach derzeitigem Standard per se nicht für die Reduktion von ARGs ausgelegt sind, leisten sie dennoch einen enorm wichtigen Beitrag, um den Eintrag der ARGs in die Umwelt stark zu reduzieren. Allerdings können ARGs durch die meisten derzeit gängigen Abwasserreinigungsverfahren nicht komplett zurückgehalten werden. Das gereinigte Abwasser stellt somit nach wie vor einen wichtigen Eintragspfad von ARGs in die Umwelt dar. Die Ergebnisse dieses Projektes zeigen, dass sich in den **Oberflächengewässern** zwar **deutlich weniger ARGs** befinden als in Kläranlagen, aber durchaus eine **gewisse Hintergrundbelastung** besteht. **Am häufigsten** wurden in den DNA-Extrakten aus den Oberflächengewässern die **ARGs *sul1* und *ermB*** gefunden. **Etwas weniger häufig** waren auch ***tetW*, *bla*<sub>TEM-1</sub> und *npt3*** zu finden. ***VanA* und *npt2* konnten so gut wie nie** quantitativ nachgewiesen werden. In den Flüssen Inn, Reichramingbach, Raab und Wulka wurden, bis auf die ARG *vanA* und *npt2*, alle anderen ARGs in absoluten Häufigkeiten von **bis zu 10<sup>5</sup> Genkopien/ml** nachgewiesen. Vergleichsweise waren die Konzentrationen in den im gleichen Zeitraum untersuchten Flüssen Erlauf, Antiesen, Donau und Dornbirner Ach deutlich niedriger oder konnten nicht quantitativ detektiert werden. Die ARGs *tetW* und *vanA* konnten von den Flüssen Donau und Dornbirner Ach auf Grund nicht mehr vorhandenem DNA-Extrakte nicht mittels qPCR untersucht werden. Auffällig war, dass im DNA-Extrakt der Wulka die **ARG-Konzentrationen mancher Targets am höchsten** war. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Probenahmestelle einen **starken anthropogenen Einfluss** aufweist und auch relativ nahe unterhalb einer Kläranlageneinleitung liegt. In den **Stadtgewässern Wiens** waren die **ARG-Häufigkeiten meist geringer** (bis zu 3 LOG-Stufen) als in den untersuchten Flüssen von 2019. In den Proben der Alten Donau, die über 3 Jahre (2018 bis 2020) beprobt wurde, konnte beispielsweise nur das ARG *sul1* quantitativ nachgewiesen werden.

Die Einflüsse von mit Gülle gedüngten Felder oder Kläranlagen auf die ARG-Konzentrationen nahegelegener Probenahmestellen sind aus der Literatur hingehend bekannt. Einer Studie aus Deutschland nach zu urteilen, hängt das Vorkommen und die Häufigkeit von ARG-Konzentrationen von der Wasserqualität und saisonalen Parametern ab. Das zeigte sich hier vor allem bei Proben, die flussaufwärts einer Kläranlage gesammelt wurden. Sie waren empfindlicher gegenüber Umweltveränderungen, sowie Parametern, die saisonale Schwankungen aufwiesen, z. B. Trübung, Schwebstoffe und UVA-Strahlung. Flussabwärts der Kläranlage schien die Konzentration von Ammoniumstickstoff und damit das Vorhandensein von Abwasser im Fluss eine wichtige Rolle für das Auftreten von ARGs zu spielen (Reichert et al., 2021). Im Zuge von Margins-II wurden auch **Belastungsgradienten** untersucht. In der Schwechat beispielsweise wurde eine Probenahmestelle vor und nach einer Kläranlage gewählt. Hierbei sieht man auch, dass die 16S rRNA Gen- sowie ARG-Konzentrationen an der Stelle, die sich **nach der Kläranlage** befindet, **tendenziell höher** sind, im Vergleich zu der Stelle, die sich vor der Kläranlage befindet. Auch die Probenahmestellen **in der Nähe von dicht besiedelten Gebieten zeigten meist höhere ARG-Konzentrationen** im Vergleich zu Stellen im

Wald oder unberührter Natur. Betreffend der saisonalen Trends konnten zwar im Winter tendenziell etwas höhere ARG-Konzentrationen zwischen den untersuchten (ARG)-Genen für die Flüsse Schwechat und Liesing im Gegensatz zu den Sommerproben beobachtet werden, jedoch kann man anhand der Ergebnisse keine gesicherte Aussage treffen. Wie bereits in den Ergebnissen diskutiert wurde, kann dies möglicherweise mit der im Winter höher konsumierten Antibiotikamenge aufgrund von häufigeren Infekten zusammen hängen (Hinteregger et al., 2017).

### 4.3 Situation der ARG-Hintergrundbelastung in Kläranlagen weltweit

Das Forschungsnetzwerk COST Action NEREUS ES1403 (New and Emerging Challenges and Opportunities in Wastewater Reuse) kam zu dem Schluss, dass die am häufigsten vorkommenden ARGs in europäischen Kläranlagen *intl 1*, *qnrS*, *sul1*, *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *vanA*, *qacEΔ1* und *bla<sub>OXA</sub>* sind. Als besonders persistente ARGs gelten vor allem *sul1*, *intl1*, *vanA*, *qnrS*, *bla<sub>OXA</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>*, *sul2* und *tetM* (Nereus COST Action ES1403, 2017). Eine Studie aus dem Jahr 2019 zeigte wie die ARG Situation in kommunalen Kläranlagen weltweit aussieht. Dabei wurden metagenomische Analysen durchgeführt. Es zeigte sich, dass in den europäischen Ländern die häufigsten Resistenzen gegen die Antibiotikaklassen Makrolide, Tetracycline, Beta-Laktame und Aminoglykoside gefunden wurden. Ähnliche Muster zeigen der mittlere Osten, Nordamerika und Ozeanien. In Afrika, Asien und Südamerika kommen Sulfonamid- und Trimethoprim Resistenzen häufiger vor, als auf den vorher erwähnten Kontinenten, ansonsten sind auch hier die bereits erwähnten Antibiotikaklassen präsent, gegen die Resistenzen am häufigsten gefunden wurden. Bei den spezifischen ARGs dominieren in Europa, mittleren Osten und Nordamerika die Gene *mph(E)*, *erm(B)\_cluster* und *msr(E)*. In Afrika und Asien kommen auch etwas häufiger die Resistenzgene *sul1* und *sul3* sowie *aadA\_clust1* vor (Hendriksen et al., 2019). In Munk et al (2022) deuten die Daten außerdem darauf hin, dass bestimmte geografische Gebiete anfälliger für Übertragungsereignisse sind und dadurch zusätzliche Aufmerksamkeit erhalten sollten. Es wird davon ausgegangen, dass die gleichen ARGs weltweit sehr unterschiedlich auf dieselbe Intervention reagieren, da die Geografie die Unterschiede im genomischen Hintergrund, im Plasmidvorkommen, in der Co-Resistenz und im Mobilisierungspotenzial in viel stärkerem Maße beeinflusst, als erwartet wird. Daher sollten Lösungen an die lokalen Bedingungen angepasst werden (Munk et al., 2022). Eine umfassende Zusammenfassung der Literatur der letzten 30 Jahre zum Thema Umweltresistenz, wo die Verteilung, Vielfalt und Verbreitung von ARGs in verschiedenen Lebensräumen in verschiedenen Ländern/Regionen aufgezeigt wird, findet sich in Zhuang et al. (2021).

## 4.4 Potentielle Gefahren der detektierten ARGs für die menschliche Gesundheit

Doch gibt es Zusammenhänge zwischen den nachgewiesenen ARGs und bedeutenden Krankheiten und **welche potentiellen Gefahren** stellen die hier nachgewiesenen ARGs nun **für die Humangesundheit** dar? In der Umwelt kommen viele ARGs ganz natürlich vor. Diese endemisch vorkommenden ARGs stellen das sogenannte Umweltresistom dar. Sie können durch horizontalen Gentransfer jedoch auch auf pathogene Bakterien übertragen werden und somit eine Bedrohung für die Gesundheit von Mensch und Tier darstellen. Durch diese erworbenen Resistenzen ist die Wirkung spezifischer Antibiotika oftmals nicht (mehr) gegeben, was dann zu klinischem Therapieversagen in der Human- und Veterinärmedizin führen kann. Bei multiresistenten Erregern ist die Wahrscheinlichkeit eines Therapieversagen besonders hoch. Dabei handelt es sich um Pathogene mit Resistenzen gegen mindestens drei verschiedenen Antibiotikaklassen. Zu den gesundheitsgefährdenden ARGs zählt man derzeit vor allem *bla<sub>KPC</sub>*, *vanA*, *bla<sub>NDM-1</sub>*, *bla<sub>OXA</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>*, und *mcr1*. Als besonders gefährliche ARB zählen *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae*, welche oft die ARGs *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM-1</sub>*, *bla<sub>OXA</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>* und *mcr1* tragen. Weiters wird oft in den Erregern *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* das ARG *vanA* gefunden. Als ebenfalls sehr gefährlich gelten *Staphylococcus aureus* (*mecA*), *Pseudomonas aeruginosa* (*bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>GES</sub>*, *bla<sub>OXA</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*), *Aeromonas spp.* (*bla<sub>CTX</sub>*) und *Acinetobacter baumannii* (*bla<sub>TEM</sub>*) (Nereus COST Action ES1403, 2017). Solche Problempathogene verursachen oft Haut-, Bauchfell-, Harnwegs-, Darm- und Lungeninfektionen (z.B. multiresistente Krankheitserreger wie Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA), Vancomycin-resistenter *S. aureus* (VRSA), Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE), 3.-Generations-Cephalosporin-resistente Enterobakterien (CRE), Extended-Spektrum-Beta-Laktamase (ESBL)-produzierende, resistente *Klebsiella pneumoniae*). Beispielsweise können *erm*-Gene in *S. aureus* (Haut- und Lungeninfektionen) dafür sorgen, dass dieser Erreger gegen die meisten Makroliden, Lincosamiden und Streptogramin Typ B Präparate resistent wird (BMSGPK, 2022; Krey, 2004). Da auch viele dieser ARGs im Zuge der Analysen in diesem Projekt nachgewiesen werden konnten, können Zusammenhänge mit bedeutenden Krankheiten nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Jedoch sind die nachgewiesenen ARGs nur kleine Genabschnitte. Es kann hier nicht nachvollzogen werden, ob die Gene aus lebendigen oder toten Bakterien stammen bzw. ob es sich um freie DNA handelt. Man weiß auch nicht, ob sie aus pathogenen Bakterien stammen. Hierzu wären komplementär Untersuchungen durch Kultivierungsverfahren und Resistenztestungen der gewonnenen Bakterienkolonien nötig (z.B. mittels Antibiogrammen). Weiterführend könnte man die Isolate mittels PCR auf spezifische Resistenzgene untersuchen bzw. die Isolate mit entsprechenden Analysemethoden identifizieren, um einschätzen zu können um welchen Bakterienstamm es sich handelt und ob dieser gefährlich für den Menschen ist.

## 4.5 Potential weitergehender Abwasserreinigungsverfahren in Hinblick auf ARG-Reduzierung

Im dem Multibarrierensystem bestehend aus Ozonung und granulierter Aktivkohle wurden die ARGs bei 0,6 g O<sub>3</sub>/g DOC um etwa 1 LOG-Stufe reduziert. Die in der Literatur berichtete Erhöhung der relativen Häufigkeit von ARGs konnte in der PCR-Chipanalyse nur bei der höchsten untersuchten Dosis von 0,92 g O<sub>3</sub>/g DOC beobachtet werden, nicht aber bei den niedrigeren Ozondosen, die im Bereich der üblicherweise zur Spurenstoffentfernung angewendeten Dosis liegen. Wie erwartet, zeigte die PCR-Chip-Analyse für die GAK-Behandlung keinen positiven Effekt auf eine weitere Inaktivierung von ARGs.

Die Ergebnisse der nachgeschalteten Membranfiltration zeigen, dass die Methode gut zur Reduktion von freier extrazellulärer DNA geeignet ist. Membranen mit einem MWCO kleiner als 20 kDa konnten freie extrazelluläre DNA zu mehr als 90% zurückhalten. Nanofiltrationsmembranen und die Umkehrosmosemembran RO2 zeigten Entfernungsraten von mehr als 99,90% sowohl aus destilliertem, autoklaviertem Wasser als auch aus Kläranlagenablauf. Linearisierte DNA besitzt im Vergleich zu „*supercoiled plasmid*“ DNA eine größere Dehnbarkeit und Flexibilität. Somit kann sie bei Porenfiltration leichter vom Strömungsfeld erfasst werden. Für Lösungsdiffusionsmembranen wird vermutet, dass die kleineren linearisierten DNA Fragmente ein besseres Lösungsverhalten im Membranmaterial aufweisen und somit besser permeieren können. Die Größe, Konformation und die Konzentration der freien extrazellulären DNA spielt eine wichtige Rolle für den Rückhalt. Es zeigte sich ein leicht erhöhtes Retentionsverhalten durch die Filtrationen freier extrazellulärer DNA aus Kläranlagenabläufen im Vergleich zu Filtrationen von autoklaviertem, destilliertem Wasser.

## 4.6 Handlungsoptionen und -empfehlungen

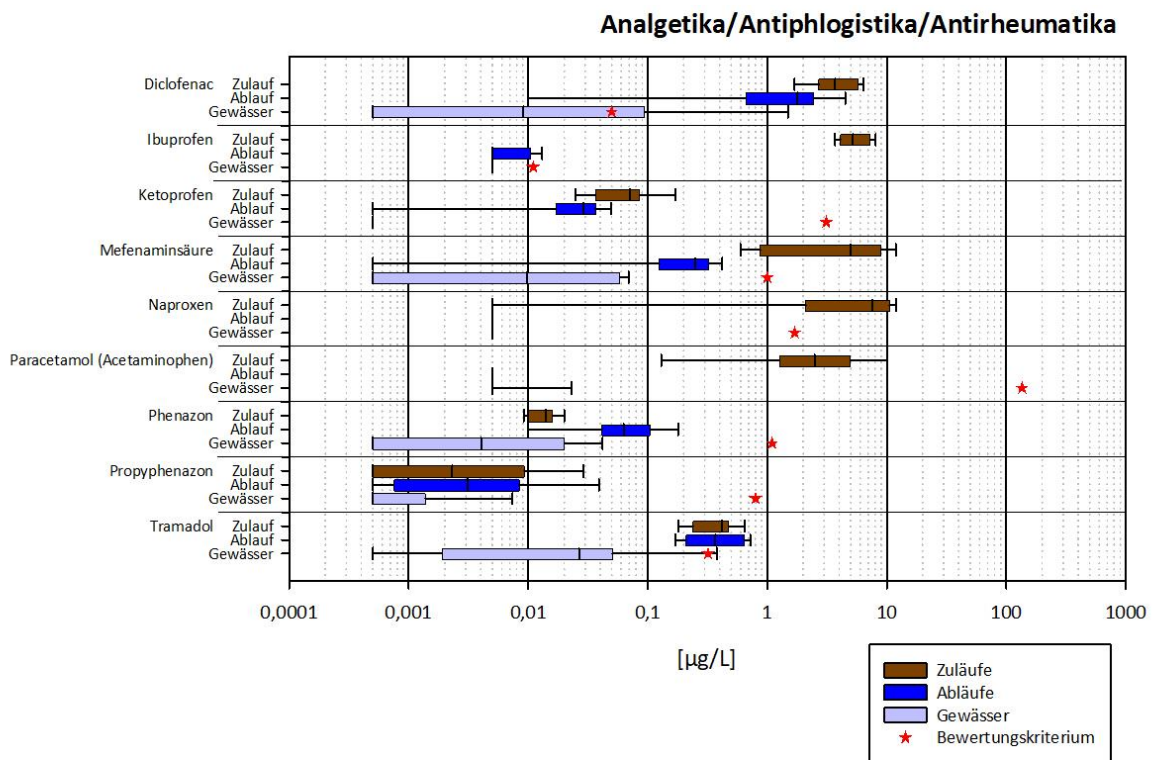
Allem voran sollte der Eintrag von Antibiotikaresistenzen in die aquatische Umwelt so weit wie möglich reduziert werden. Darüber hinaus ist die regelmäßige Überwachung von ARBs und ARGs in Kläranlagen und Oberflächengewässern von zentraler Bedeutung, um die aktuelle Lage im Überblick zu behalten und Veränderungen frühzeitig erkennen zu können. Dies steht im Einklang mit den Vorgaben der EU zum One-Health-Konzept zur Eindämmung von Antibiotikaresistenzen und zur Schwerpunktsetzung im Nationalen Aktionsplan zur Antibiotikaresistenz (BMSGPK, 2022; EC, 2017). Auch der derzeitige Entwurf zur Überarbeitung der kommunalen Abwasserrichtlinie schlägt eine regelmäßige Überwachung von Antibiotikaresistenzen in Kläranlagen  $\geq 100,000$  EW vor (EK., 2022). Dazu werden unter

anderem zukünftige Implementierungen zusätzlicher Reinigungsstufen bei Kläranlagen eine Rolle spielen, um die Entfernung von Antibiotikaresistenzen weiter zu verbessern. Hierfür sollte eine Kombination einzelner Verfahren aus oxidativen, adsorptiven und membranbasierten Technologien in Betracht gezogen werden (Savin et al., 2021; Zessner et al., 2022). Letztendlich wird dies jedoch ganzheitlich unter Mitberücksichtigung einer effizienten Entfernung anderer prioritärer Stoffe zu betrachten sein. Natürlich ist auch weiterhin Forschung notwendig, die sich damit befasst, wie man Antibiotikaresistenzen in Kläranlagen effizient entfernen bzw. wie man ihre Ausbreitung auf ein Minimum reduzieren kann. Dazu müssen auch die unterschiedlichen Mechanismen in Mikroorganismen, die für die Verbreitung der Resistenzgene verantwortlich sind, noch besser untersucht und verstanden werden. Dieses Verständnis ist grundlegende Voraussetzung für effiziente Managementmaßnahmen. Eine Reduktion von Antibiotikaresistenzen in der Umwelt kann dazu beitragen die Nutzungsdauer für aktuelle und künftige Antibiotika zu verlängern. Auch wenn sich die Risikominderung oft nur schwer quantifizieren lässt, zeigt das Ausmaß der weltweit steigenden Krankheits- und Sterblichkeitsraten im Zusammenhang mit Antibiotikaresistenzen deutlich, dass dringender Handlungsbedarf besteht. Antibiotikaresistenzen stellen eine globale Herausforderung dar, erfordern aber dennoch auch Maßnahmen auf lokaler Ebene, um ihre Verbreitung über die Umwelt zu verringern. Zusätzlich zu den sogenannten End-of-Pipe-Optionen ist die Kontrolle der Quellen im Sinne eines präventiven Ansatzes erstrebenswert. Maßnahmen wie eine Limitierung des Einsatzes bestimmter Antibiotika, sinnvolles Nährstoffmanagement in der Landwirtschaft sowie die Kontrolle von Oberflächenabflüssen und eine gute Hygienepraxis können hier wichtige Beiträge leisten und in vielen Fällen mit geringen oder gar keinen Kosten umgesetzt werden. Daneben gilt es auch den Anteil an nicht gereinigtem Abwasser, das ohne Behandlung direkt in die Umwelt entlassen wird, auf globaler Ebene weiter zu reduzieren und wo möglich vorhandene Infrastruktur auszubauen, um dadurch den Eintrag von ARBs und ARGs zusätzlich zu vermindern. Dies ist allerdings oftmals mit größeren Investitionen verbunden. Im Idealfall können Synergien mit bestehenden Strategien und Zielen genutzt werden (Pruden et al., 2013).



# 5 Anhang 1 – Zusätzliche Ergebnisse chemischer Messungen

In diesem Teil sind Abbildungen von zusätzlichen chemischen Messungen, die im Zuge des Projektes „Untersuchung von Abwässern und Gewässern auf unterschiedliche toxikologische Endpunkte“ (gefördert vom BMLTR) von den auch in diesem Projekt untersuchten Kläranlagen und Gewässern (Sommer 2019) dargestellt. Die Abbildungen stammen alle aus Braun et al. (2020). Dabei werden die Ergebnisse von zahlreiche Arzneimittelrück-stände, Umweltgifte (Dioxine, Furane, DL-PCB, PAHs) und Röntgenkontrastmitteln dargestellt: Anhang 1 - Abbildung 65, Anhang 1 - Abbildung 66, Anhang 1 - Abbildung 67, Anhang 1 - Abbildung 68, Anhang 1 - Abbildung 69, Anhang 1 - Abbildung 70, Anhang 1 - Abbildung 71, Anhang 1 - Abbildung 72 und Anhang 1 - Abbildung 73.

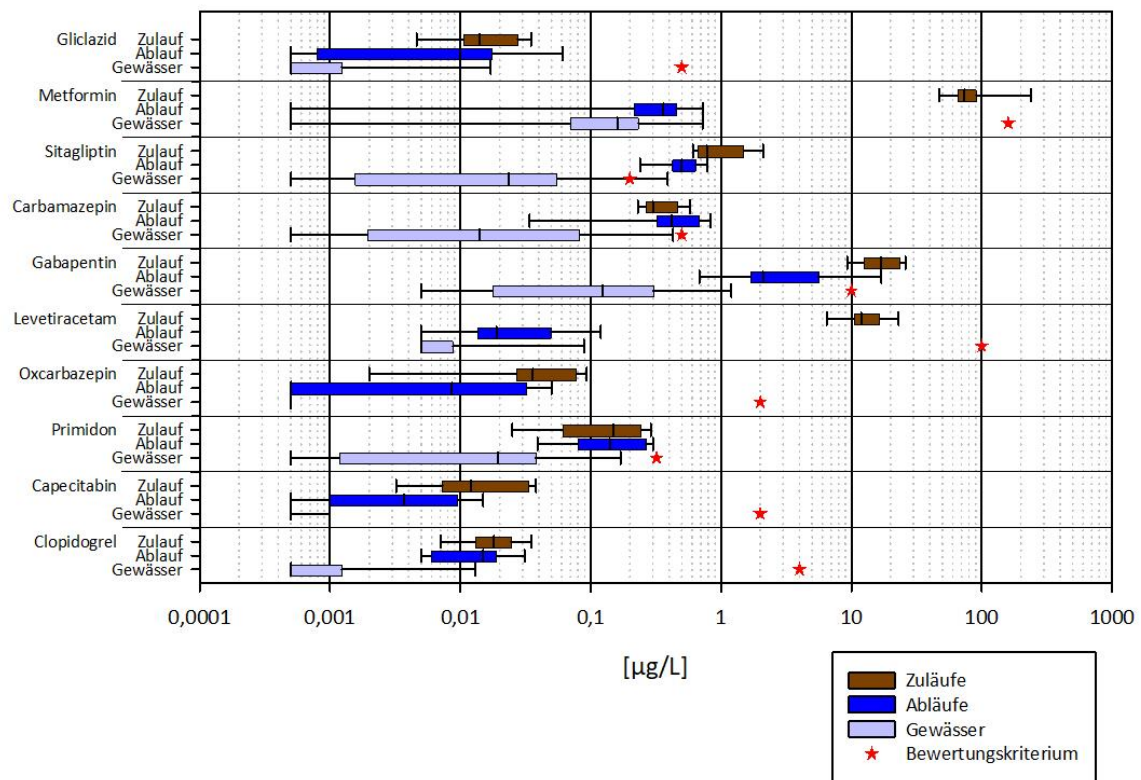


Anhang 1 - Abbildung 65: Konzentrationen der gemessenen Analgetika, Antiphlogistika und Antirheumatika.

Dargestellt sind die Verteilungen der Konzentrationen [µg/l] von allen Zuläufen (n = 9), allen Abläufen (n = 9) und Oberflächengewässern (n = 8) aus dem Sommer 2019 als Boxplots.

Quelle: Braun et al. (2020).

## Antidiabetika / Antiepileptika / Antineoplasten

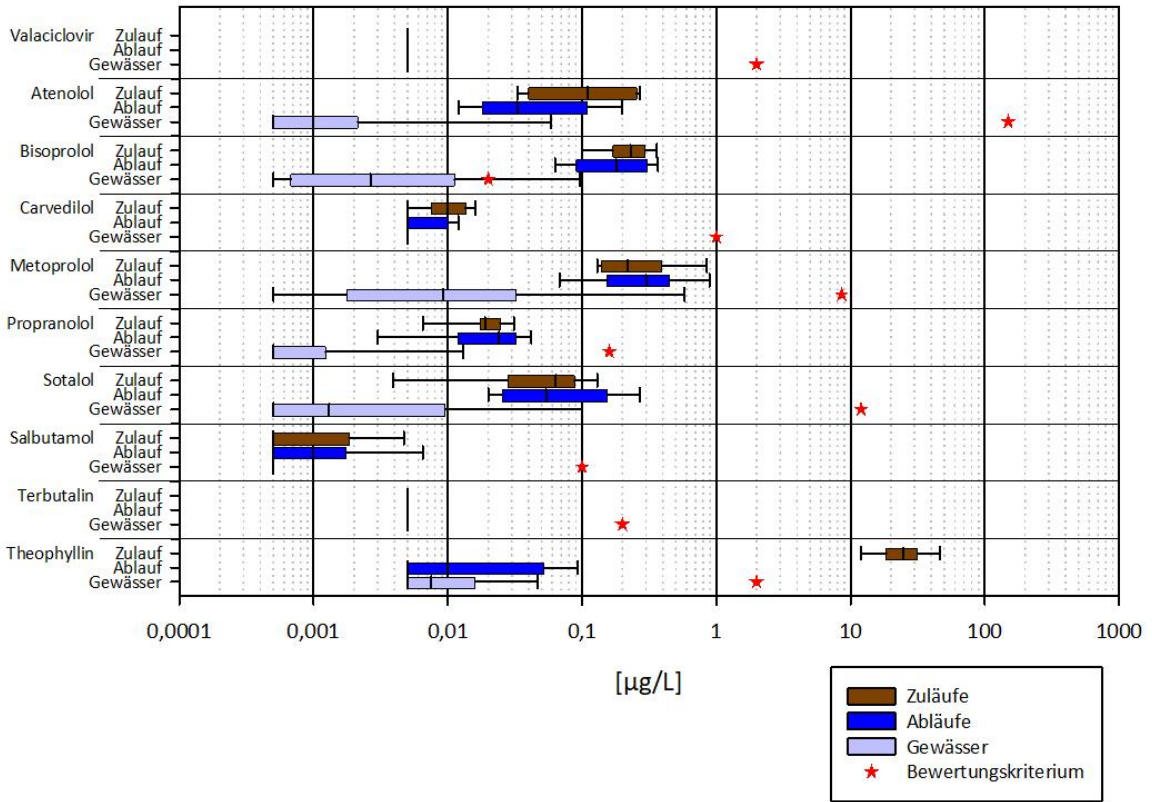


Anhang 1 - Abbildung 66: Konzentrationen der gemessenen Antidiabetika, Antiepileptika und Antineoplasten.

Dargestellt sind die Verteilungen der Konzentrationen [ $\mu\text{g/l}$ ] von allen Zuläufen ( $n = 9$ ), allen Abläufen ( $n = 9$ ) und Oberflächengewässern ( $n = 8$ ) aus dem Sommer 2019 als Boxplots.

Quelle: Braun et al. (2020).

## Antiviral / Betablocker / Bronchio

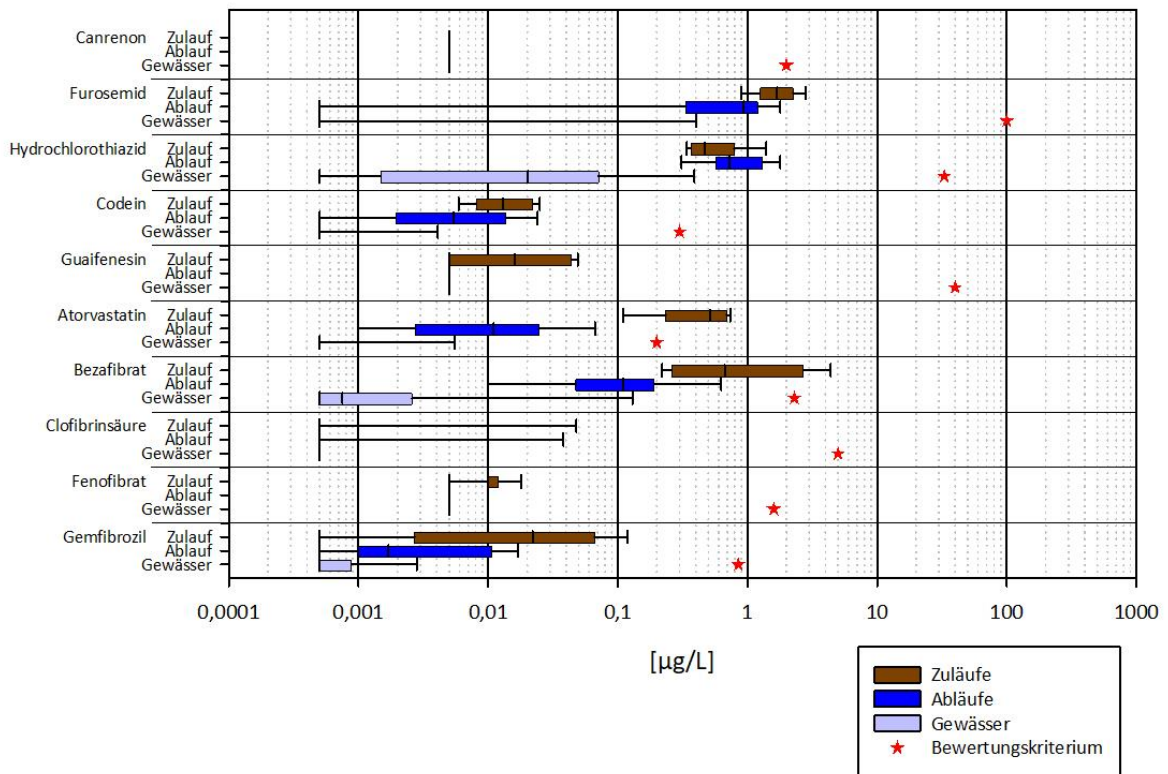


Anhang 1 - Abbildung 67: Konzentrationen der gemessenen Antivirustatika, Betablockern und Bronchiodilatoren.

Dargestellt sind die Verteilungen der Konzentrationen [ $\mu\text{g/l}$ ] von allen Zuläufen ( $n = 9$ ), allen Abläufen ( $n = 9$ ) und Oberflächengewässern ( $n = 8$ ) aus dem Sommer 2019 als Boxplots.

Quelle: Braun et al. (2020).

## Diuretika / Expektorantien / Lipidsenker

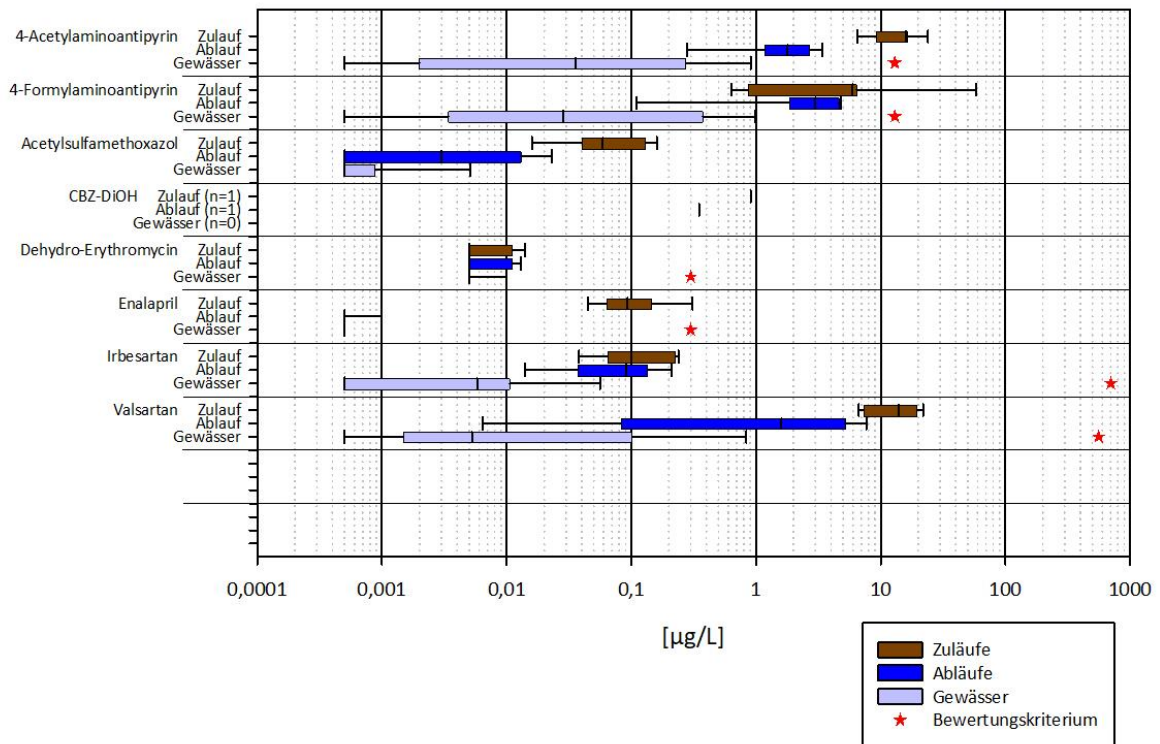


Anhang 1 - Abbildung 68: Konzentrationen der gemessenen Diuretika, Expektorantien und Lipidsenker.

Dargestellt sind die Verteilungen der Konzentrationen [µg/l] von allen Zuläufen (n = 9), allen Abläufen (n = 9) und Oberflächengewässern (n = 8) aus dem Sommer 2019 als Boxplots.

Quelle: Braun et al. (2020).

## Metaboliten / Renin-Angiotensin

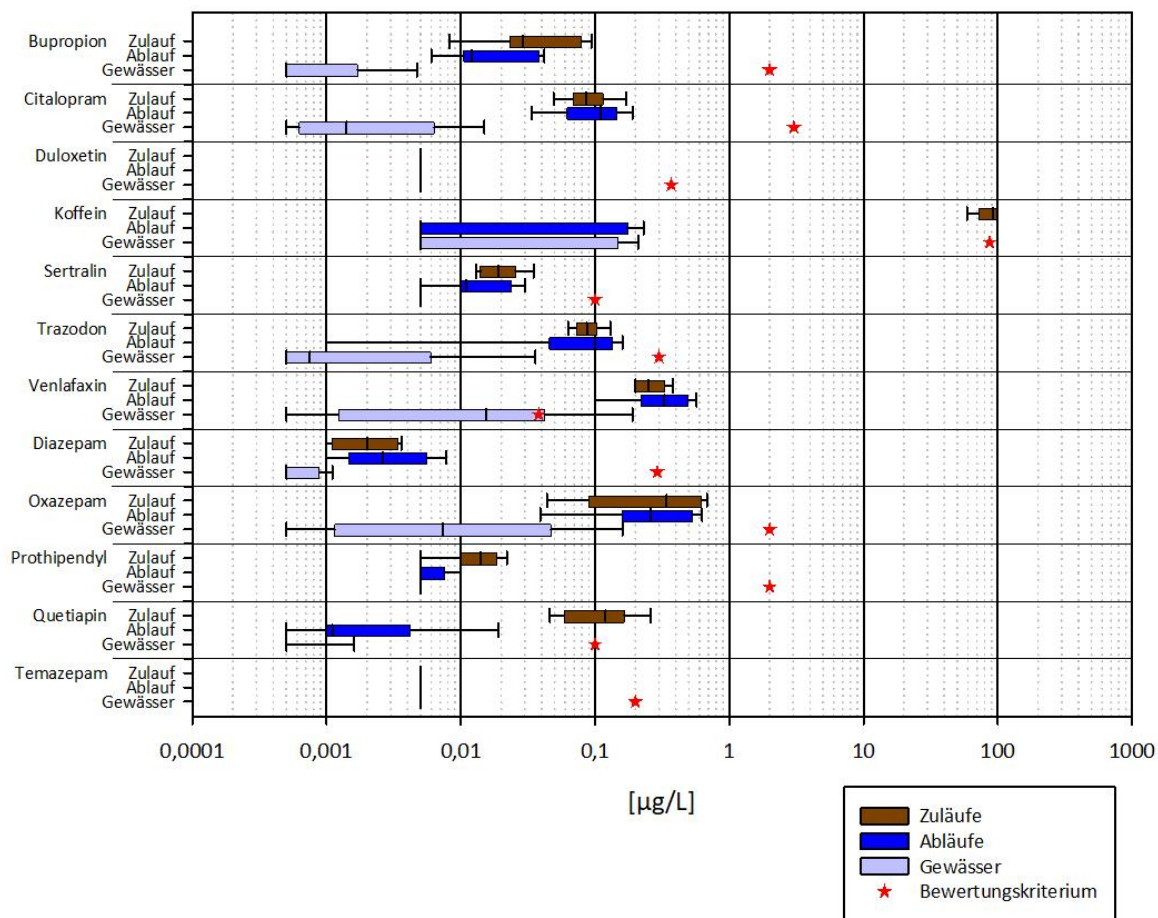


Anhang 1 - Abbildung 69: Konzentrationen der gemessenen Metaboliten und Renin-Angiotensinen.

Dargestellt sind die Verteilungen der Konzentrationen [ $\mu\text{g/l}$ ] von allen Zuläufen ( $n = 9$ ), allen Abläufen ( $n = 9$ ) und Oberflächengewässern ( $n = 8$ ) aus dem Sommer 2019 als Boxplots.

Quelle: Braun et al. (2020).

## Psychoanaleptika / Psycholeptika

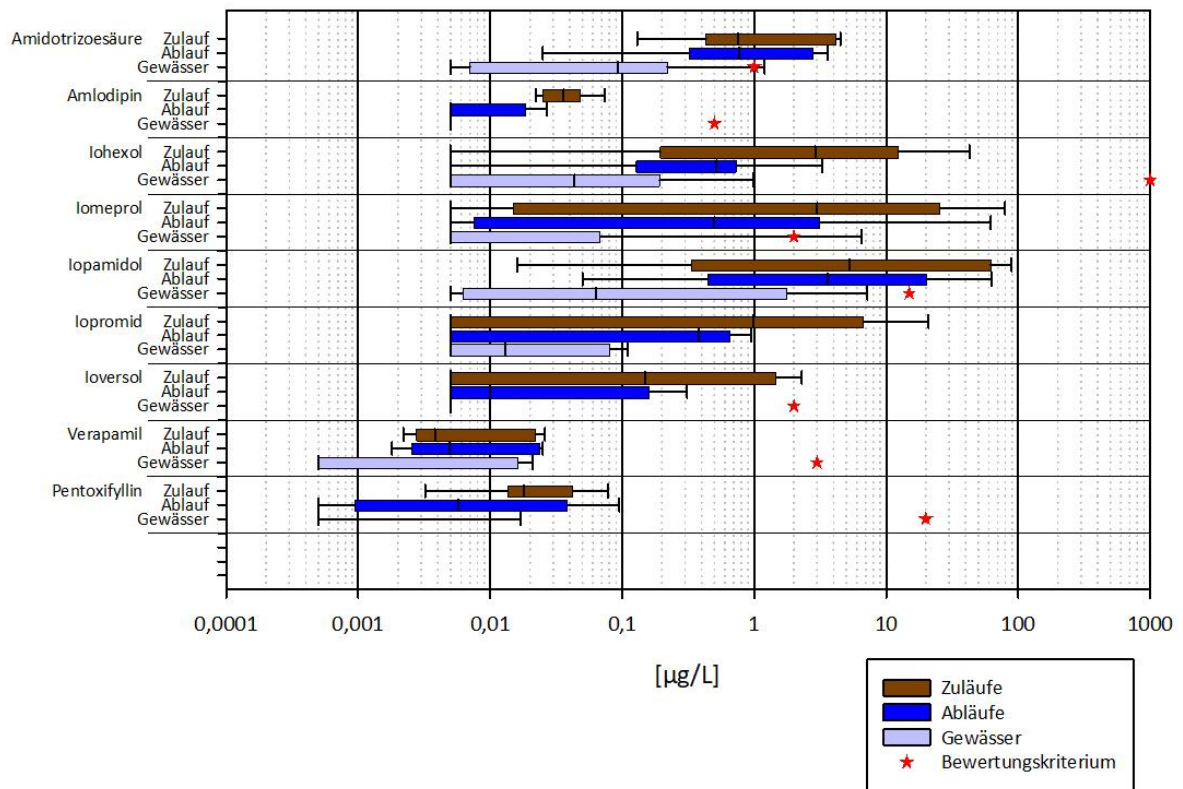


Anhang 1 - Abbildung 70: Konzentrationen der gemessenen Psychoanaleptika und Psycholeptika.

Dargestellt sind die Verteilungen der Konzentrationen [ $\mu\text{g/l}$ ] von allen Zuläufen ( $n = 9$ ), allen Abläufen ( $n = 9$ ) und Oberflächengewässern ( $n = 8$ ) aus dem Sommer 2019 als Boxplots.

Quelle: Braun et al. (2020).

## Röntgenkontrastmittel / Vasodilatoren

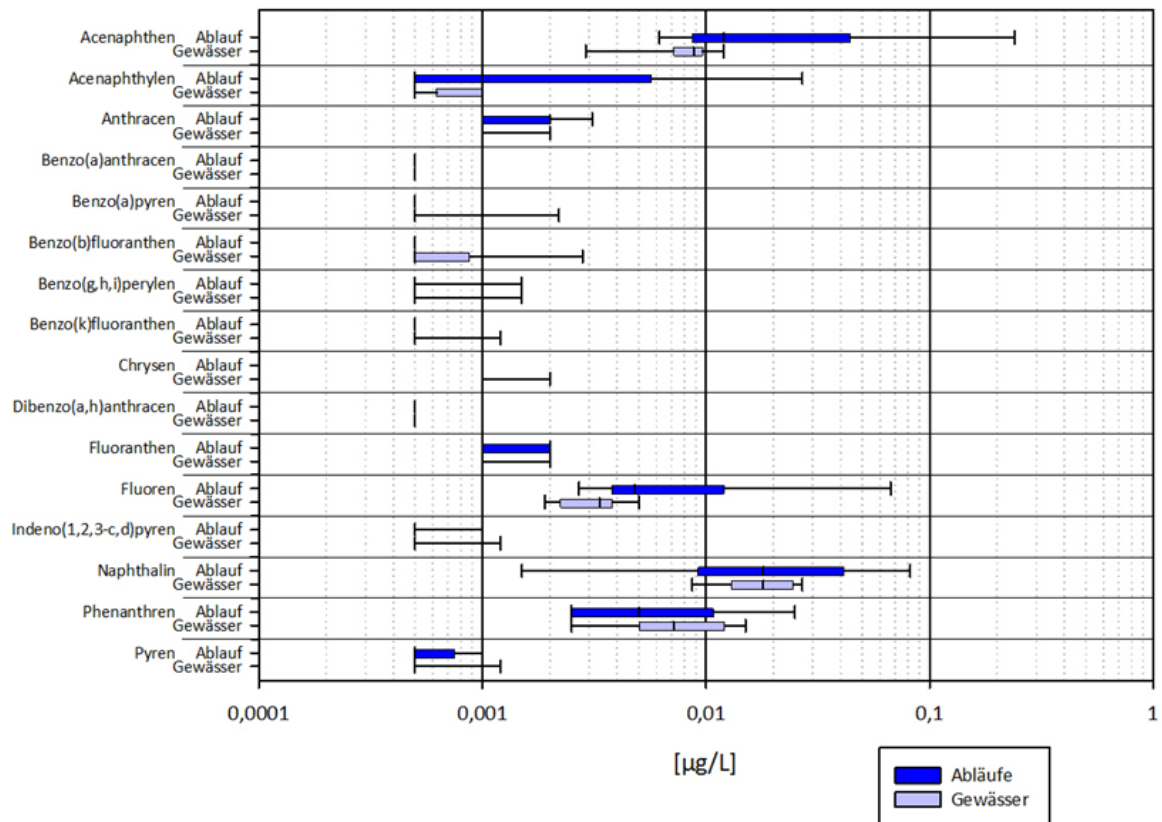


Anhang 1 - Abbildung 71: Konzentrationen der gemessenen Röntgenkontrastmittel und Vasodilatoren.

Dargestellt sind die Verteilungen der Konzentrationen [µg/l] von allen Zuläufen (n = 9), allen Abläufen (n = 9) und Oberflächengewässern (n = 8) aus dem Sommer 2019 als Boxplots.

Quelle: Braun et al. (2020).

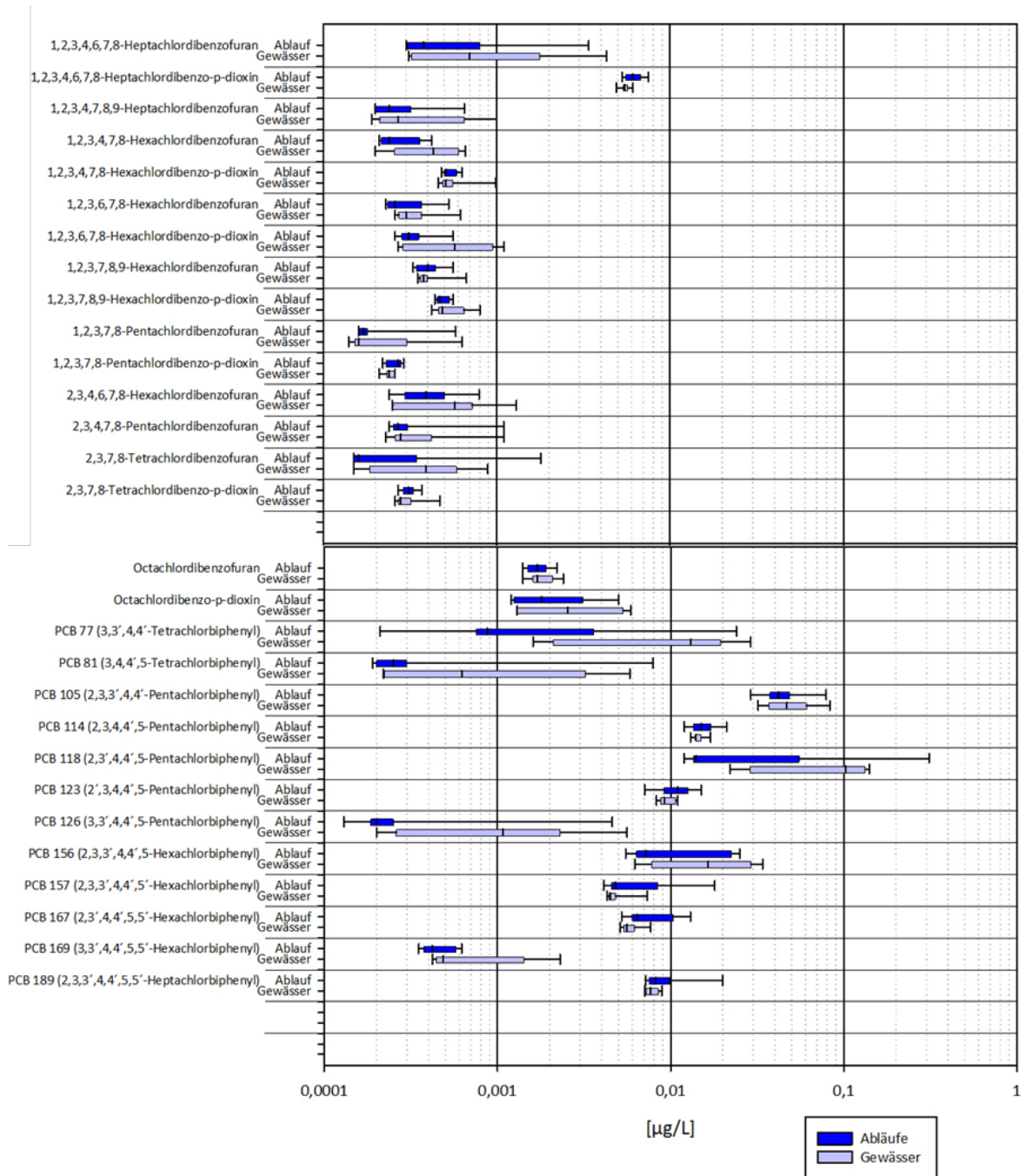
## PAH



Anhang 1 - Abbildung 72: Konzentrationen der gemessenen PAH (polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe).

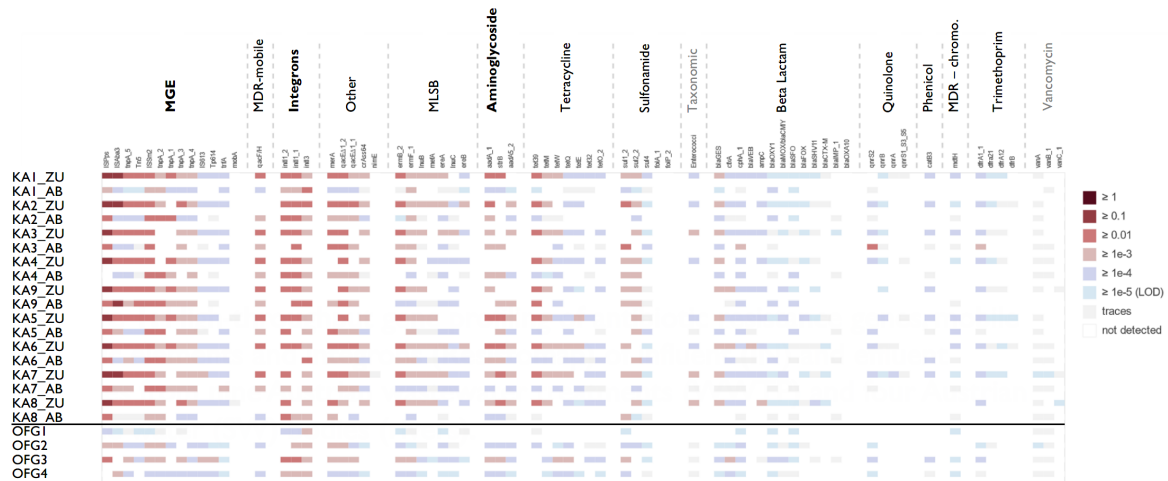
Dargestellt sind die Verteilungen der Konzentrationen [ $\mu\text{g/l}$ ] von allen Abläufen ( $n = 9$ ) und Oberflächengewässern ( $n = 8$ ) aus dem Sommer 2019 als Boxplots. Quelle: Braun et al. (2020).





Anhang 1 - Abbildung 73: Konzentrationen der gemessenen Dioxine, Furane und DL-PCB. Dargestellt sind die Verteilungen der Konzentrationen [ $\mu\text{g/l}$ ] von allen Abläufen ( $n = 9$ ) und Oberflächengewässern ( $n = 8$ ) aus dem Sommer 2019 als Boxplots. Quelle: Braun et al. (2020).

# 6 Anhang 2 – Zusätzliche Ergebnisse aus dem Hochdurchsatz-Gen-Profilung



Anhang 2 - Abbildung 74: Vorkommen und Häufigkeit von (assoziierten) ARGs in ausgewählten Proben des Untersuchungsprogrammes 2019 mittels Hochdurchsatz-Gen-Profilung. Dargestellt sind Ergebnisse aus den SmartChip-Analysen (Resistomap) als Heatmap. n = 71 untersuchte ARGs; KA1\_ZU, Kläranlage 1 Zulauf; KA1\_AB, Kläranlage 1 Ablauf 2019; usw.

# 7 Anhang 3 – Factsheets

## 7.1 Factsheet 1 – Methodische Ansätze zum quantitativen Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen in Abwasser und Oberflächengewässern

Welche methodischen Ansätze sind geeignet, um Antibiotikaresistenzgenen in Abwasser und Oberflächengewässern quantitativ zu überwachen?

Verfasser\*innen: Irina Dielacher (TU Wien) – Projektmitarbeiterin Margins-II und Ass. Prof. Dr. Julia Vierheilig, Ass. Prof. Dr. Norbert Kreuzinger (TU Wien) und Dr. Markus Wögerbauer (AGES) - Projektleiter\*innen der Projekte Margins (I & II)

Die Festlegung einer **harmonisierten Methode zur Überwachung von antimikrobiellen Resistenzen** in Abwasser und Oberflächengewässern ist von zentraler Bedeutung, was auch im Vorschlag für die Neufassung der **EU-Richtlinie über die Behandlung von kommunalem Abwasser** erkannt wurde. Dabei können zahlreiche Faktoren in der Methodik die Untersuchungsergebnisse beeinflussen, angefangen von der Probenahme über Lagerung und Probenprozessierung hin zur Art der Analyse. Im Zuge dieses Projektes wurden die relevantesten Einflussfaktoren für die quantitative Überwachung von Antibiotikaresistenzgenen mittels qPCR in Abwasser und Oberflächengewässern evaluiert und darauf aufbauend ein standardisierter Arbeitsablauf für diese Art der Analyse etabliert.

- **Art der Probenahme:**
  - **Mischproben** (Tages - oder Wochenmischproben) sind zu empfehlen, da sie ein repräsentatives Bild über die Situation geben. Da KAs in Österreich mit 24-Stundenprobenehmern ausgestattet sind, stellt diese Art der Probenahme **für Abwasser eine praktikable Vorgangsweise** dar.
  - **Stichproben** können nur eine Momentaufnahme der Situation liefern, sind aber **für die Beprobung von Oberflächengewässern** aufgrund der hier meist nicht vorhandenen automatisierten Probenehmer **eine valide Alternative**.
  - In unseren Untersuchungen wurden **keine nennenswerten Auswirkungen der Probenahmeart** auf die DNA-, 16S rRNA Gen- und exemplarisch gemessenen ARG-Konzentrationen von *sul1* und *ermB* **detektiert**.
- **Lagerung der Proben:**
  - Es ist darauf zu achten, die Probe zwischen Probenahme und -aufarbeitung stets **gekühlt zu lagern** (auch während des Transportes), möglichst bei 4 °C.

- Nach der Probenahme ist grundsätzlich ist eine **möglichst rasche Aufarbeitung** zu empfehlen, um Änderungen der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft in der Probe zu minimal zu halten.
- Eine Lagerung von Abwasserproben bei **4 °C bis zu 7 Tagen** hatte in unseren Untersuchungen **keinen nennenswerten Einfluss** auf DNA-, 16S rRNA Gen- und ARG-Konzentrationen; nach 14 Tagen zeigten sich jedoch Reduktionen in den ARG-Konzentrationen.
- **Probenprozessierung:**
  - Zur Aufkonzentrierung der Biomasse aus wässrigen Proben wird die **Filtration empfohlen** (gegenüber der Zentrifugation). Für das Projekt Margins-II wurde bzgl. Filtration folgende Standard-Vorgehensweise festgelegt: KA-Zulauf (40 ml) auf Zellulosemischesterfilter (0,45 µm); KA-Ablauf (bis zu 400 ml) auf Zellulosemischesterfilter (0,2 µm); OFGs (bis zu 1000 ml) auf Zellulosemischesterfilter (0,2 µm) bzw. in der späteren Projektphase auf Polycarbonatfilter (0,22 µm).
  - Eine vorangehende Probenvorbehandlung (Homogenisierung/Probenaufschluss, Proteinase K-, Ultraschallbehandlung) ist nach den Ergebnissen unserer methodischen Versuche nicht von Vorteil.
  - Die auf Filtern **aufkonzentrierte Probe kann** vor der Extraktion auch **längere Zeit** (über mehrere Wochen/Monate) bei – 80 °C oder – 20 °C **gelagert werden** ohne zu erwartende negative Folgen auf die nachgeschalteten molekularbiologischen Analysen; eine sofortige Extraktion brachte bei unseren Versuchen keine Vorteile bezüglich DNA-, 16S rRNA Gen- und ARGs-Konzentrationen verglichen zu einer Lagerung der aufkonzentrierten Probe auf - 80 °C für mind. 48 Std.
  - Bei der DNA-Extraktion wird der **Einsatz eines Bead-Beaters zur Zellyse empfohlen**. Diese Methode erwies sich als vorteilhaft bezüglich der DNA-, 16S rRNA Gen- und ARGs-Konzentrationen gegenüber der Benutzung eines Schüttlers (Vortex), vor allem in den KA-Zulaufproben.

## 7.2 Factsheet 2 – Antibiotikaresistenzgen- Hintergrundbelastung von Abwasser und Oberflächengewässern in Österreich

Welche Antibiotikaresistenzgene (ARGs) sind derzeit im Abwasser und in den Oberflächengewässern Österreichs zu finden? Und in welchen Konzentrationen liegen sie vor?

Verfasser\*innen: Ass. Prof. Dr. Julia Vierheilig, Ass. Prof. Dr. Norbert Kreuzinger (TU Wien) und Dr. Markus Wögerbauer (AGES) - Projektleiter\*innen der Projekte Margins (I & II) und Irina Dielacher (TU Wien) – Projektmitarbeiterin Margins-II

Ziel der vorliegenden Studie Margins war es, neben der Hintergrundbelastung in landwirtschaftlich genutzten Böden (Margins-I), die Hintergrundbelastung von Abwässern und Oberflächengewässern (Margins-II) mit ARGs in Österreich erstmalig systematisch zu ermitteln. Dies steht in Einklang mit den Vorgaben der EU zum One-Health-Konzept zur Eindämmung von Antibiotikaresistenzen und mit der Schwerpunktsetzung im Nationalen Aktionsplan zur Antibiotikaresistenz sowie mit der zukünftig vorgesehenen regelmäßigen Überwachung von Antibiotikaresistenzen in Kläranlagen  $\geq 100,000$  EW im kürzlich erschienenen Entwurf zur Überarbeitung der kommunalen Abwasserrichtlinie.

Im Zulauf der **österreichischen Kläranlagen** konnten zwischen 59 % und 80 % der untersuchten (assoziierten) ARGs detektiert werden. Im Ablauf war die Detektionsrate (assoziiertes) ARGs mit 13 % bis 51 % meist um einiges geringer (mit zwei Ausnahmen: 56% und 76%). Am häufigsten wurden dabei (assoziierte) ARGs aus den Gruppen der mobilen genetischen Elemente (MGE), der Beta Lactame und der Macrolid-Lincosamid-Streptogramin B (MLSB) gefunden. Von den sieben mittels qPCR untersuchten ARGs konnten drei (*sul1*, *ermB*, *tetW*) in allen Kläranlagen, sowohl im Zu- als auch im Ablauf quantitativ detektiert werden. Drei weitere (*bla<sub>TEM-1</sub>*, *npt2*, *npt3*) wurden häufig nachgewiesen, besonders in den Zuläufen der untersuchten Kläranlagen. Das Resistenzgen *vanA*, welches eine Resistenz gegen Vancomycin vermittelt, einem Antibiotikum der dritten Linie, konnte in den untersuchten Kläranlagen in Österreich glücklicherweise nur vereinzelt und fast ausschließlich in den Zuläufen nachgewiesen werden. Weiters konnten keine deutlichen saisonalen Trends der ARG-Konzentrationen in Kläranlagen beobachtet werden. Tendenziell wurden in den kühleren Monaten (Dezember bis Februar) manche ARGs etwas weniger oft detektiert. Die mittels Hochdurchsatz-Gen-Profilings durchgeführten Analysen zeigten im Jahr 2021 eine deutliche Zunahme der Anzahl an (assoziierten) ARGs in untersuchten Kläranlagen im Vergleich zu 2019. Die qPCR-Ergebnisse konnten diese Zunahme jedoch nicht bestätigen. Die Resultate des Hochdurchsatz-Gen-Profilings zeigten in 75% der zwischen den beiden Jahren verglichenen Kläranlagen (im Zu- und Ablauf) außerdem etwas höhere relative ARG-Häufigkeiten, was bei den qPCR Ergebnissen größtenteils nicht der Fall war. Obwohl gewöhnliche Abwasserreinigungsverfahren nach derzeitigem Standard per se nicht für die

Reduktion von ARGs ausgelegt sind, leisten sie dennoch einen enorm wichtigen Beitrag, um den Eintrag der ARGs in die Umwelt stark zu reduzieren. Die ARG-Konzentrationen in den Kläranlagen konnten dadurch um bis zu 4,3 LOG-Stufen reduziert werden. Allerdings können ARGs durch die meisten derzeit gängigen Abwasserreinigungsverfahren nicht komplett zurückgehalten werden. Das gereinigte Abwasser stellt somit nach wie vor einen wichtigen Eintragspfad von ARGs in die Umwelt dar.

Die Ergebnisse dieses Projektes zeigen, dass sich in den **Oberflächengewässern** zwar deutlich weniger ARGs befinden als in Kläranlagen, aber durchaus eine gewisse Hintergrundbelastung besteht. In den exemplarisch mittels Hochdurchsatz-Gen-Profiling untersuchten Proben war die Detektionsrate (assoziierter) ARGs zwischen 20 % und 61%, wobei in den Gewässern mit höherer anthropogener Belastung auch eine größere Anzahl an ARGs detektiert werden konnte. Wie bereits in den Kläranlagen, machten Gene der Antibiotikaklassen MGE, Beta-Lactame und MLSB die größten Anteile aus. Von den sieben mittels qPCR untersuchten ARGs wurden in den Oberflächengewässern *sul1* und *ermB* am häufigsten gefunden, *tetW*, *bla<sub>TEM-1</sub>* und *npt3*) etwas weniger häufig und *vanA* und *npt2* nur in sehr wenigen Einzelfällen. Es wurden Konzentrationen von bis zu 10<sup>5</sup> Genkopien/ml gemessen.

Die detektierten ARGs können durch horizontalen Gentransfer von einer Bakterienart auf eine andere übergehen und somit Resistenzen untereinander weitergegeben werden. So können Resistenzen unter bestimmten Umständen auch von ungefährlichen Umweltbakterien auf menschliche Krankheitserreger übertragen werden. Neben der Verminderung des Eintrags von ARGs in die aquatische Umwelt, ist auch ihre regelmäßige Überwachung in Kläranlagen und Oberflächengewässern im Sinne eines „One-Health“ Ansatzes daher von zentraler Bedeutung, um potentielle Gefährdungen für den Menschen durch Therapieversagen zu minimieren. Auch im derzeitigen Entwurf zur Überarbeitung der kommunalen Abwasserrichtlinie ist eine regelmäßige Überwachung von Antibiotikaresistenzen in Kläranlagen  $\geq 100,000$  EW vorgesehen.

## 7.3 Factsheet 3 – Zukünftige Überwachungsstrategie

Welche Punkte sollten bei der Überwachung von Antibiotikaresistenzen in der Umwelt zukünftig berücksichtigt werden?

Verfasser\*innen: Ass. Prof. Dr. Julia Vierheilig, Ass. Prof. Dr. Norbert Kreuzinger (TU Wien) und Dr. Markus Wögerbauer (AGES) - Projektleiter\*innen der Projekte Margins (I & II) und Irina Dielacher (TU Wien) – Projektmitarbeiterin Margins-II

Für eine zukünftige Überwachungsstrategie von Antibiotikaresistenzen in der Umwelt sollten folgende Punkte berücksichtigt werden:

- Globale Herangehensweise zur Eindämmung der Resistenzproblematik weltweit
- Harmonisierte Methoden zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse
- Integration mit Überwachungsprogrammen aus dem Human- und Veterinärbereich hin zu einer gesamtheitlichen Betrachtungsweise (One-Health Ansatz)
- Kombination von quantitativen molekularbiologischen Verfahren mit Kultivierungsverfahren zur besseren Gefährdungseinschätzung
- Verknüpfung mit der Analyse fäkaler Verunreinigungen für ein besseres Systemverständnis als Basis für gezielte Managementmaßnahmen
- Wasserkreislauf-basierter Ansatz: Verbindung von Analysen zur Verbreitung von Antibiotikaresistenzen mit einer nutzungsbasierten Gefährdungs- und Risikoanalyse

## Referenzen

- Adams, H.R., 2001. *Veterinary pharmacology and therapeutics*, 8th ed. ed. Iowa State University Press, Ames.
- Alexander, J., Knopp, G., Dötsch, A., Wieland, A., Schwartz, T., 2016. Ozone treatment of conditioned wastewater selects antibiotic resistance genes, opportunistic bacteria, and induce strong population shifts. *Sci. Total Environ.* 559, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.154>
- Angel, R., Claus, P., Conrad, R., 2012. Methanogenic archaea are globally ubiquitous in aerated soils and become active under wet anoxic conditions. *ISME J.* 6, 847–862. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.141>
- Angel, R., Petrova, E., Lara-Rodriguez, A., 2020. Total Nucleic Acids Extraction from Soil v6. <https://doi.org/10.17504/protocols.io.bwxcpfiw>
- BMSGPK, 2022. NAP-AMR: Der Nationale Aktionsplan zur Antibiotikaresistenz [WWW Document]. Bundesminist. Soz. Gesundh. Pflege Konsum. Wien. URL <https://www.sozialministerium.at/Themen/Gesundheit/Antimikrobielle-Resistenzen-und-Gesundheitssystem-assoziierte-Infektionen/Antimikrobielle-Resistenzen/NAP-AMR--Der-Nationale-Aktionsplan-zur-Antibiotikaresistenz.html>
- BMSGPK, 2021. Resistenzbericht Österreich AURES 2020 - Antibiotikaresistenz und Verbrauch antimikrobieller Substanzen in Österreich. Wien. [file:///d:/Downloads/AURES\\_2020\\_\(Stand\\_24.3.2022\)\\_-1.pdf](file:///d:/Downloads/AURES_2020_(Stand_24.3.2022)_-1.pdf).
- Braun, R., Hartmann, C., Kreuzinger, N., Lenz, K., Schaar, H., Scheffknecht, C., 2020. Untersuchung von Abwässern und Gewässern auf unterschiedliche toxikologische Endpunkte - Biologische Wirkttests mittels in-vitro-Verfahren. BMLRT (Hrsg.), Wien.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Czekalski, N., Sigdel, R., Birtel, J., Matthews, B., Bürgmann, H., 2015. Does human activity impact the natural antibiotic resistance background? Abundance of antibiotic resistance genes in 21 Swiss lakes. *Environ. Int.* 81, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.04.005>
- Duijkeren, E. van., Vulto, A.G., Miert, A.S.J.P.A.M. van, 1994. Trimethoprim/sulfonamide combinations in the horse: a review. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 17, 64–73. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1994.tb00524.x>
- EC, 2017. A European One Health Action Plan, Against Antimicrobial Resistance (AMR) [WWW Document]. Eur. Comm. URL [https://health.ec.europa.eu/system/files/2020-01/amr\\_2017\\_action-plan\\_0.pdf](https://health.ec.europa.eu/system/files/2020-01/amr_2017_action-plan_0.pdf)
- ECDC, 2022. Antimicrobial consumption in the EU/EEA (ESAC-Net) - Annual Epidemiological Report 2021. European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm.
- EK., 2022. Europäische Kommission 26.10.2022: Vorschlag für eine RICHTLINIE DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES über die Behandlung von kommunalem Abwasser (Neufassung). [https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:fc078ec8-55f7-11ed-92ed-01aa75ed71a1.0002.02/DOC\\_1&format=PDF](https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:fc078ec8-55f7-11ed-92ed-01aa75ed71a1.0002.02/DOC_1&format=PDF).
- Frank, T., Gautier, V., Talarmin, A., Bercion, R., Arlet, G., 2007. Characterization of sulphonamide resistance genes and class 1 integron gene cassettes in Enterobacteriaceae, Central African Republic (CAR). *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 742–745. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl538>



- Fuchs, R., Fuchs, K., 2021. Bericht über den Vertrieb von Antibiotika in der Veterinärmedizin in Österreich 2016-2020. Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH Fachbereich Integrierte Risikobewertung, Daten und Statistik, Graz, Austria.
- Furukawa, T., Mekata, T., Amarasiri, M., Sei, K., 2022. Concentration and reduction efficiency of vancomycin-resistant heterotrophic bacteria and vanA and vanB genes in wastewater treatment unit processes. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 30, 340–347. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2022.07.008>
- Guo, X., Pang, W., Dou, C., Yin, D., 2017. Sulfamethoxazole and COD increase abundance of sulfonamide resistance genes and change bacterial community structures within sequencing batch reactors. *Chemosphere* 175, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.134>
- Harnisz, M., Kiedrzyńska, E., Kiedrzyński, M., Korzeniewska, E., Czatkwowska, M., Koniuszewska, I., Jóźwik, A., Szklarek, S., Niestępski, S., Zalewski, M., 2020. The impact of WWTP size and sampling season on the prevalence of antibiotic resistance genes in wastewater and the river system. *Sci. Total Environ.* 741, 140466. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140466>
- 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>
- Hendriksen, R.S., Munk, P., Njage, P., van Bunnik, B., McNally, L., Lukjancenka, O., Röder, T., Nieuwenhuijse, D., Pedersen, S.K., Kjeldgaard, J., Kaas, R.S., Clausen, P.T.L.C., Vogt, J.K., Leekitcharoenphon, P., van de Schans, M.G.M., Zuidema, T., de Roda Husman, A.M., Rasmussen, S., Petersen, B., The Global Sewage Surveillance project consortium, Bego, A., Rees, C., Cassar, S., Coventry, K., Collignon, P., Allerberger, F., Rahube, T.O., Oliveira, G., Ivanov, I., Vuthy, Y., Sopheak, T., Yost, C.K., Ke, C., Zheng, H., Baisheng, L., Jiao, X., Donado-Godoy, P., Coulibaly, K.J., Jergović, M., Hrenovic, J., Karpíšková, R., Villacis, J.E., Legesse, M., Eguale, T., Heikinheimo, A., Malania, L., Nitsche, A., Brinkmann, A., Saba, C.K.S., Kocsis, B., Solymosi, N., Thorsteinsdottir, T.R., Hatha, A.M., Alebouyeh, M., Morris, D., Cormican, M., O'Connor, L., Moran-Gilad, J., Alba, P., Battisti, A., Shakenova, Z., Kiiyukia, C., Ng'eno, E., Raka, L., Avsejenko, J., Bērziņš, A., Bartkevics, V., Penny, C., Rajandas, H., Parimannan, S., Haber, M.V., Pal, P., Jeunen, G.-J., Gemmell, N., Fashae, K., Holmstad, R., Hasan, R., Shakoor, S., Rojas, M.L.Z., Wasyl, D., Bosevska, G., Kochubovski, M., Radu, C., Gassama, A., Radosavljevic, V., Wuertz, S., Zuniga-Montanez, R., Tay, M.Y.F., Gavačová, D., Pastuchova, K., Truska, P., Trkov, M., Esterhuyse, K., Keddy, K., Cerdà-Cuéllar, M., Pathirage, S., Norrgren, L., Örn, S., Larsson, D.G.J., Heijden, T.V. der, Kumburu, H.H., Sanneh, B., Bidjada, P., Njanpop-Lafourcade, B.-M., Nikiema-Pessinaba, S.C., Levent, B., Meschke, J.S., Beck, N.K., Van, C.D., Phuc, N.D., Tran, D.M.N., Kwenda, G., Tabo, D., Wester, A.L., Cuadros-Orellana, S., Amid, C., Cochrane, G., Sicheritz-Ponten, T., Schmitt, H., Alvarez, J.R.M., Aidara-Kane, A., Pamp, S.J., Lund, O., Hald, T., Woolhouse, M., Koopmans, M.P., Vigre, H., Petersen, T.N., Aarestrup, F.M., 2019. Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nat. Commun.* 10, 1124. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08853-3>
- Hinteregger, M., Janzek-Hawlat, S., Reichhardt, B., 2017. Saisonale Schwankungen von Antibiotika-Verordnungen in Österreich. *Ökonomie & Praxis, Informationen für Vertragsärzte der Kärntner Gebietskrankenkasse.*

- Jiang, H., Zhou, R., Yang, Y., Chen, B., Cheng, Z., Zhang, M., Li, J., Zhang, G., Zou, S., 2018. Characterizing the antibiotic resistance genes in a river catchment: Influence of anthropogenic activities. *J. Environ. Sci.* 69, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.08.009>
- Jiao, Y.-N., Zhou, Z.-C., Chen, T., Wei, Y.-Y., Zheng, J., Gao, R.-X., Chen, H., 2018. Biomarkers of antibiotic resistance genes during seasonal changes in wastewater treatment systems. *Environ. Pollut.* 234, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.048>
- Krampe, J., Kreuzinger, N., Reif, D., Saracevic, E., Schaar, H., Weilguni, S., Winkelbauer, A., Wagner, A., Swoboda, M., Lahnsteiner, J., Kneisl, F., 2020. KomOzAk II Endbericht: Weitergehende Reinigung kommunaler Abwässer mit Ozon sowie Aktivkohle für die Entfernung organischer Spurenstoffe – Toxikologie und allgemeine Anwendbarkeit. BMLRT (Hrsg), Wien.
- Kreuzinger, N., Haslinger, J., Kornfeind, L., Schaar, H., Saracevic, E., Winkelbauer, A., Hell, F., Walder, C., Müller, M., Wagner, A., Wieland, A., 2015. KomOzAk Endbericht: Weitergehende Reinigung kommunaler Abwässer mit Ozon sowie Aktivkohle für die Entfernung organischer Spurenstoffe. BMLFUW (Hrsg.), Wien.
- Krey, A., 2004. Molekularbiologische Resistenzmechanismen und Therapieoptionen bei europäischen *Staphylococcus aureus* Isolaten (Dissertation Medizin). Institut für Medizinische Mikrobiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf.
- Kucukunsal, S., Icgen, B., 2020. Removal of antibiotic resistance genes in various water resources recovery facilities. *Water Environ. Res.* 92, 911–921. <https://doi.org/10.1002/wer.1286>
- Liguori, K., Keenum, I., Davis, B.C., Calarco, J., Milligan, E., Harwood, V.J., Pruden, A., 2022. Antimicrobial Resistance Monitoring of Water Environments: A Framework for Standardized Methods and Quality Control. *Environ. Sci. Technol.* 56, 9149–9160. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c08918>
- Manaia, C.M., Donner, E., Vaz-Moreira, I., Hong, P. (Eds.), 2020. Antibiotic resistance in the environment: a worldwide overview, *The handbook of environmental chemistry*. Springer, Cham, Switzerland. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-55065-3>
- Mayer, R.E., Vierheilig, J., Egle, L., Reischer, G.H., Saracevic, E., Mach, R.L., Kirschner, A.K.T., Zessner, M., Sommer, R., Farnleitner, A.H., 2015. Automated Sampling Procedures Supported by High Persistence of Bacterial Fecal Indicators and Bacteroidetes Genetic Microbial Source Tracking Markers in Municipal Wastewater during Short-Term Storage at 5°C. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 5134–5143. <https://doi.org/10.1128/AEM.00998-15>
- Munk, P., Brinch, C., Møller, F.D., Petersen, T.N., Hendriksen, R.S., Seyfarth, A.M., Kjeldgaard, J.S., Svendsen, C.A., van Bunnik, B., Berglund, F., Global Sewage Surveillance Consortium, Bego, A., Power, P., Rees, C., Lambrinidis, D., Neilson, E.H.J., Gibb, K., Coventry, K., Collignon, P., Cassar, S., Allerberger, F., Begum, A., Hossain, Z.Z., Worrell, C., Vandenberg, O., Pieters, I., Victorien, D.T., Gutierrez, A.D.S., Soria, F., Grujić, V.R., Mazalica, N., Rahube, T.O., Tagliati, C.A., Rodrigues, D., Oliveira, G., de Souza, L.C.R., Ivanov, I., Juste, B.I., Oumar, T., Sopheak, T., Vuthy, Y., Ngandjio, A., Nzouankeu, A., Olivier, Z.A.A.J., Yost, C.K., Kumar, P., Brar, S.K., Tabo, D.-A., Adell, A.D., Paredes-Osses, E., Martinez, M.C., Cuadros-Orellana, S., Ke, C., Zheng, H., Baisheng, L., Lau, L.T., Chung, T., Jiao, X., Yu, Y., JiaYong, Z., Morales, J.F.B., Valencia, M.F., Donado-Godoy, P., Coulibaly, K.J., Hrenovic, J., Jergović, M., Karpíšková, R., Deogratias, Z.N., Elsborg, B., Hansen, L.T., Jensen, P.E., Abouelnaga, M., Salem, M.F., Koolmeister, M., Legesse, M., Eguale, T., Heikinheimo, A., Le Guyader, S., Schaeffer, J., Villacis, J.E., Sanneh, B., Malaria, L., Nitsche, A., Brinkmann, A., Schubert, S., Hesse, S., Berendonk, T.U., Saba,

C.K.S., Mohammed, J., Feglo, P.K., Banu, R.A., Kotzamanidis, C., Lytras, E., Lickes, S.A., Kocsis, B., Solymosi, N., Thorsteinsdottir, T.R., Hatha, A.M., Ballal, M., Banger, S.R., Fani, F., Alebouyeh, M., Morris, D., O'Connor, L., Cormican, M., Moran-Gilad, J., Battisti, A., Diaconu, E.L., Corno, G., Di Cesare, A., Alba, P., Hisatsune, J., Yu, L., Kuroda, M., Sugai, M., Kayama, S., Shakenova, Z., Kiiyukia, C., Ng'eno, E., Raka, L., Jamil, K., Fakhraldeh, S.A., Alaati, T., Bērziņš, A., Avsejenko, J., Kokina, K., Streikisa, M., Bartkevics, V., Matar, G.M., Daoud, Z., Pereckienė, A., Butrimaite-Ambrozeviciene, C., Penny, C., Bastaraud, A., Rasolofoaarison, T., Collard, J.-M., Samison, L.H., Andrianarivelo, M.R., Banda, D.L., Amin, A., Rajandas, H., Parimannan, S., Spiteri, D., Haber, M.V., Santchurn, S.J., Vujacic, A., Djurovic, D., Bouchrif, B., Karraouan, B., Vubil, D.C., Pal, P., Schmitt, H., van Passel, M., Jeunen, G.-J., Gemmell, N., Chambers, S.T., Mendoza, F.P., Huete-Perez, J., Vilchez, S., Ahmed, A.O., Adisa, I.R., Odetokun, I.A., Fashae, K., Sørgaard, A.-M., Wester, A.L., Ryrfors, P., Holmstad, R., Mohsin, M., Hasan, R., Shakoor, S., Gustafson, N.W., Schill, C.H., Rojas, M.L.Z., Velasquez, J.E., Magtibay, B.B., Catangcatang, K., Sibulo, R., Yauce, F.C., Wasyl, D., Manaia, C., Rocha, J., Martins, J., Álvaro, P., Di Yoong Wen, D., Shin, H., Hur, H.-G., Yoon, S., Bosevska, G., Kochubovski, M., Cojocar, R., Burduniuc, O., Hong, P.-Y., Perry, M.R., Gassama, A., Radosavljevic, V., Tay, M.Y.F., Zuniga-Montanez, R., Wuertz, S., Gavačová, D., Pastuchová, K., Truska, P., Trkov, M., Keddy, K., Esterhuysen, K., Song, M.J., Quintela-Baluja, M., Lopez, M.G., Cerdà-Cuellar, M., Perera, R.R.D.P., Bandara, N.K.B.K.R.G.W., Premasiri, H.I., Pathirage, S., Charlemagne, K., Rutgersson, C., Norrgren, L., Örn, S., Boss, R., Van der Heijden, T., Hong, Y.-P., Kumburu, H.H., Mdegela, R.H., Hounmanou, Y.M.G., Chonsin, K., Suthienkul, O., Thamlikitkul, V., de Roda Husman, A.M., Bidjada, B., Njanpop-Lafourcade, B.-M., Nikiema-Pessinaba, S.C., Levent, B., Kurekci, C., Ejobi, F., Kalule, J.B., Thomsen, J., Obaidi, O., Jassim, L.M., Moore, A., Leonard, A., Graham, D.W., Bunce, J.T., Zhang, L., Gaze, W.H., Lefor, B., Capone, D., Sozzi, E., Brown, J., Meschke, J.S., Sobsey, M.D., Davis, M., Beck, N.K., Sukapanpatharam, P., Truong, P., Lilienthal, R., Kang, S., Wittum, T.E., Rigamonti, N., Baklayan, P., Van, C.D., Tran, D.M.N., Do Phuc, N., Kwenda, G., Larsson, D.G.J., Koopmans, M., Woolhouse, M., Aarestrup, F.M., 2022. Genomic analysis of sewage from 101 countries reveals global landscape of antimicrobial resistance. *Nat. Commun.* 13, 7251.

<https://doi.org/10.1038/s41467-022-34312-7>

Muziasari, W.I., Pärnänen, K., Johnson, T.A., Lyra, C., Karkman, A., Stedtfeld, R.D., Tamminen, M., Tiedje, J.M., Virta, M., 2016. Aquaculture changes the profile of antibiotic resistance and mobile genetic element associated genes in Baltic Sea sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92, fiw052. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw052>

Muziasari, W.I., Pitkänen, L.K., Sørum, H., Stedtfeld, R.D., Tiedje, J.M., Virta, M., 2017. The Resistome of Farmed Fish Feces Contributes to the Enrichment of Antibiotic Resistance Genes in Sediments below Baltic Sea Fish Farms. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02137>

Nereus COST Action ES1403, 2017. Deliverable 2: List of the top 10 most prevalent and persistent, and the top 5 most hazardous ARB&ARGs in treated wastewater and surrounding environment, specifically focusing on antibiotic resistance genes associated with mobile genetic elements. COST (European Cooperation in Science and Technology).

Pärnänen, K.M.M., Narciso-da-Rocha, C., Kneis, D., Berendonk, T.U., Cacace, D., Do, T.T., Elpers, C., Fatta-Kassinos, D., Henriques, I., Jaeger, T., Karkman, A., Martinez, J.L., Michael, S.G., Michael-Kordatou, I., O'Sullivan, K., Rodriguez-Mozaz, S., Schwartz, T., Sheng, H., Sørum, H., Stedtfeld, R.D., Tiedje, J.M., Giustina, S.V.D., Walsh, F., Vaz-

- Moreira, I., Virta, M., Manaia, C.M., 2019. Antibiotic resistance in European wastewater treatment plants mirrors the pattern of clinical antibiotic resistance prevalence. *Sci. Adv.* 5, eaau9124. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau9124>
- Pazda, M., Kumirska, J., Stepnowski, P., Mulkiewicz, E., 2019. Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems – A review. *Sci. Total Environ.* 697, 134023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134023>
- 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>
- Reichert, G., Hilgert, S., Alexander, J., Rodrigues de Azevedo, J.C., Morck, T., Fuchs, S., Schwartz, T., 2021. Determination of antibiotic resistance genes in a WWTP-impacted river in surface water, sediment, and biofilm: Influence of seasonality and water quality. *Sci. Total Environ.* 768, 144526. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144526>
- Reif, D., Slipko, K., Krampe, J., Kreuzinger, N., 2019. Nachgeschaltete Membranfiltration zur Entfernung antibiotikaresistenter Bakterien und Gene aus Kläranlagenabläufen, in: “Wiener Mitteilungen”, J. Krampe, N. Kreuzinger, M. Zessner (Hrsg.); Band 249 (2019), ISBN: 978-3-85234-144-6. TU-Wien (Institut für Wassergüte und Ressourcenmanagement), Wien, pp. 245–258.
- Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M.C., Michael, I., Fatta-Kassinos, D., 2013. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Sci. Total Environ.* 447, 345–360. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.01.032>
- Savin, M., Alexander, J., Bierbaum, G., Hammerl, J.A., Hembach, N., Schwartz, T., Schmithausen, R.M., Sib, E., Voigt, A., Kreyenschmidt, J., 2021. Antibiotic-resistant bacteria, antibiotic resistance genes, and antibiotic residues in wastewater from a poultry slaughterhouse after conventional and advanced treatments. *Sci. Rep.* 11, 16622. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96169-y>
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Scott, H.M., Acuff, G., Bergeron, G., Bourassa, M.W., Gill, J., Graham, D.W., Kahn, L.H., Morley, P.S., Salois, M.J., Simjee, S., Singer, R.S., Smith, T.C., Storrs, C., Wittum, T.E., 2019. Critically important antibiotics: criteria and approaches for measuring and reducing their use in food animal agriculture. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1441, 8–16. <https://doi.org/10.1111/nyas.14058>
- Slipko, K., Reif, D., Wögerbauer, M., Hufnagl, P., Krampe, J., Kreuzinger, N., 2019. Removal of extracellular free DNA and antibiotic resistance genes from water and wastewater by membranes ranging from microfiltration to reverse osmosis. *Water Res.* 164, 114916. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.114916>
- Slipko, K., Schaar, H., Reif, D., Saracevic, E., Krampe, J., Kreuzinger, N., 2021. Entfernung von antibiotikaresistenten Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen beim Routinebetrieb eines Multibarrierensystems zur weitergehenden Abwasserbehandlung mit Ozonung und granulierter Aktivkohle., in: “Begleitbuch”: 14. Aachener Tagung Wassertechnologie - Verfahren Der Wasseraufbereitung Und Abwasserbehandlung, Aachen; 02.11.2021 - 03.11.2021; Aachen, Germany.
- Stedtfeld, R.D., Guo, X., Stedtfeld, T.M., Sheng, H., Williams, M.R., Hauschild, K., Gunturu, S., Tift, L., Wang, F., Howe, A., Chai, B., Yin, D., Cole, J.R., Tiedje, J.M., Hashsham, S.A.,

2018. Primer set 2.0 for highly parallel qPCR array targeting antibiotic resistance genes and mobile genetic elements. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94, fiy130. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy130>
- Vila-Costa, M., Gioia, R., Aceña, J., Pérez, S., Casamayor, E.O., Dachs, J., 2017. Degradation of sulfonamides as a microbial resistance mechanism. *Water Res.* 115, 309–317. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.007>
- Wang, F.-H., Qiao, M., Su, J.-Q., Chen, Z., Zhou, X., Zhu, Y.-G., 2014. High Throughput Profiling of Antibiotic Resistance Genes in Urban Park Soils with Reclaimed Water Irrigation. *Environ. Sci. Technol.* 48, 9079–9085. <https://doi.org/10.1021/es502615e>
- Wang, J., Qi, W., Lei, N., Chen, X., 2019. Lamellar hydrogel fabricated by host-guest interaction between  $\alpha$ -cyclodextrin and amphiphilic phytosterol ethoxylates. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 570, 462–470. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.03.069>
- Wang, R., Ji, M., Zhai, H., Guo, Y., Liu, Y., 2021. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in WWTP effluent-receiving water bodies and reclaimed wastewater treatment plants. *Sci. Total Environ.* 796, 148919. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148919>
- WHO, 2019a. Ten Threats to Global Health in 2019 [WWW Document]. World Health Organ. WHO. URL <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019> (accessed 11.15.21).
- WHO, 2019b. Critically important antimicrobials for human medicine, 6th rev. ed. World Health Organization; <https://apps.who.int/iris/handle/10665/312266>, Geneva.
- Zanotto, C., Bissa, M., Illiano, E., Mezzanotte, V., Marazzi, F., Turolla, A., Antonelli, M., De Giuli Morghen, C., Radaelli, A., 2016. Identification of antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from a municipal wastewater treatment plant. *Chemosphere* 164, 627–633. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.040>
- Zessner, M., Schaar, H., Zoboli, O., Kreuzinger, N., Kittlaus, S., Muschalla, D., Neunteufel, B., Gruber, G., Reinstaller, S., Camhy, D., Sommer, R., Reiter, M., Cervero-Aragó, S., Holzhammer, E., Farnleitner, A., Steinbacher, S., Mayer, R., Ertl, T., de Vito-Francesco, E., Allabashi, R., Pressl, A., Kretschmer, F., Steidl, C., Lenz, K., Soriano Jimenez, E., Hohenblum, P., 2022. SIWAWI Endbericht: Zukünftige stoffliche und mikrobiologische Herausforderungen für die kommunale Siedlungswasserwirtschaft. BMLFRW (Hrsg.), Wien.
- Zhu, Y.-G., Johnson, T.A., Su, J.-Q., Qiao, M., Guo, G.-X., Stedtfeld, R.D., Hashsham, S.A., Tiedje, J.M., 2013. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 3435–3440. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222743110>
- Zhuang, M., Achmon, Y., Cao, Y., Liang, X., Chen, L., Wang, H., Siame, B.A., Leung, K.Y., 2021. Distribution of antibiotic resistance genes in the environment. *Environ. Pollut.* 285, 117402. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117402>

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beprobte Kläranlagen.	13
Tabelle 2: Beprobte Oberflächengewässerstellen.	15
Tabelle 3: Untersuchte Proben im methodischen Versuch zur Art der Abwasserprobenahme.	21
Tabelle 4: Untersuchte Proben im Vorversuch zur Lagerdauer bei 4 °C für 48 Stunden (KA6).	22
Tabelle 5: Lagerdauer von Zu- und Ablaufproben über 14 Tage bei 4 °C (KA6).	23
Tabelle 6: Unterschiedliche Probenprozessierungen von Zu-, Ablauf- und Belebtschlammproben (KA6).	24
Tabelle 7: Beprobung verschiedener österreichischer Kläranlagen.	27
Tabelle 8: Beprobung verschiedener österreichischer Kläranlagen Zuläufe.	28
Tabelle 9: Monitoring von Kläranlage 6 über 1 Jahr.	29
Tabelle 10: Monatliches Monitoring des Zulaufs von Kläranlage 9 über 1 Jahr.	29
Tabelle 11: Wöchentliches Monitoring des Zulaufs von Kläranlage 9.	30
Tabelle 12: Untersuchung ausgewählter Gewässer in Österreich.	31
Tabelle 13: Untersuchung ausgewählter Stadtgewässer in Wien.	32
Tabelle 14: Zeitlich höher aufgelöste Beprobung der Alten Donau in Wien.	33
Tabelle 15: Saisonales Monitoring von Schwechat und Liesing.	33
Tabelle 16: Markierung der Sonden für die verschiedenen Gene.	36
Tabelle 17: Temperaturprotokoll der qPCR am LightCycler® 480 System (Roche). Projektzeitraum: 2019 – 2020.	36
Tabelle 18: Temperaturprotokoll der qPCR am LightCycler® 480 System (Roche). Projektzeitraum: 2021 – 2022.	36
Tabelle 19: Temperaturprotokoll der qPCR am Applied Biosystems QuantStudio™ 6 Pro Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific). Projektzeitraum: 2021 – 2022.	37
Tabelle 20: Validierungsdaten für die mittels TaqMan qPCR getesteten ARGs und das 16S rRNA Gen unter Verwendung von ssDNA-Standards und dsDNA Standards.	39
Tabelle 21: Alle untersuchten ARGs und 16SrRNA Gen durch SmartChip-Analysen (Resistomap) (n = 96), Zeitraum 2019 – 2021*.	42
Tabelle 22: Analytierte Antibiotika mit zugehöriger Antibiotikaklasse.	44

Tabelle 23: Weitere analysierte Spurenstoffe mit zugehöriger Gruppe.	45
Tabelle 24 Auswirkungen der Pufferzugabe auf den gefrorenen Filter	67
Tabelle 25: Überblick aller analysierten Gene mittels qPCR in österreichischen Oberflächengewässern – Sommer 2019.	100
Tabelle 26: Übersicht aller analysierten Gene mittels qPCR in österreichischen Oberflächengewässern – Stadtgewässer Wien (2020).	105
Tabelle 27: Übersicht aller analysierten Gene mittels qPCR in verschiedenen Stellen des Fließgewässers Schwechat – Winter 2021 und Sommer 2021.	108
Tabelle 28: Übersicht aller analysierten Gene mittels qPCR in verschiedenen Stellen des Fließgewässers Liesing – Winter 2021 und Sommer 2021.	112
Tabelle 29: Übersicht aller analysierten Gene mittels qPCR von den monatlichen Proben aus dem Jahresmonitoring der Alten Donau (2018 – 2020).	116
Tabelle 30: Rückhalt der Mischung aus Plasmiden und linearen DNA Fragmenten aus destilliertem, autoklaviertem Wasser und Kläranlagenablauf für verschiedenen Membrantypen. MF, Mikrofiltration; UF, Ultrafiltration; NF, Nanofiltration; UO, Umkehrosmose	131

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Überblick über die einzelnen Aspekte der methodischen Untersuchungen.	20
Abbildung 2: DNA-Konzentration bei unterschiedlichen Arten der Abwasserprobenahme im Kläranlagenzulauf.	48
Abbildung 3: Absolute Genabundanzen bei unterschiedlichen Arten der Abwasserprobenahme im Kläranlagenzulauf.	49
Abbildung 4: DNA-Konzentration bei unterschiedlichen Arten der Abwasserprobenahme im Kläranlagenablauf.	50
Abbildung 5: Absolute Genabundanzen bei unterschiedlichen Arten der Abwasserprobenahme im Kläranlagenablauf.	51
Abbildung 6: DNA-Konzentration ohne und mit Lagerung der Proben (48 Std., 4 °C).	52
Abbildung 7: Absolute Genabundanzen ohne und mit Lagerung der Proben (48 Std., 4 °C).	54
Abbildung 8: DNA-Konzentration bei Lagerung von Kläranlagenzulauf (14 Tage, 4 °C).	55
Abbildung 9: Absolute Genabundanzen bei Lagerung von Kläranlagenzulauf (14 Tage, 4 °C).	56
Abbildung 10: DNA-Konzentration bei Lagerung von Kläranlagenablauf (14 Tage, 4 °C).	57
Abbildung 11: Absolute Genabundanzen bei Lagerung von Kläranlagenablauf (14 Tage, 4 °C).	58
Abbildung 12 DNA Konzentration mit und ohne Probenvorbehandlung.	59
Abbildung 13: Absolute Genabundanzen bei unterschiedlicher Probenvorbehandlung.	60
Abbildung 14: DNA-Konzentration bei Erhöhung des Probenvolumens von Belebtschlamm.	61
Abbildung 15: Absolute Genabundanzen bei Erhöhung des Probenvolumens von Belebtschlamm.	62
Abbildung 16: DNA-Konzentration nach unterschiedlicher Aufkonzentrierung der Proben.	63
Abbildung 17: Absolute Genabundanzen bei unterschiedlicher Aufkonzentrierung der Proben.	64
Abbildung 18: DNA-Konzentration mit und ohne Lagerung der aufkonzentrierten Proben (48 Std., - 80 °C).	65
Abbildung 19: Absolute Genabundanzen mit und ohne Lagerung der aufkonzentrierten Proben (48 Std., - 80 °C).	66
Abbildung 20: DNA-Konzentration bei unterschiedlichen Zellysemethoden in der DNA-Extraktion.	68



Abbildung 21: Absolute Genabundanz bei unterschiedlichen Zellysemethoden in der DNA-Extraktion.	69
Abbildung 22: Übersicht der ARG-Hintergrundbelastung in den untersuchten österreichischen Kläranlagen.	71
Abbildung 23: Übersicht der ARG-Hintergrundbelastung in österreichischen Kläranlagenzuläufen (Mai 2020).	72
Abbildung 24: Absolute Genabundanz in verschiedenen Kläranlagen Österreichs (2019).	74
Abbildung 25: Relative ARG-Häufigkeiten in verschiedenen Kläranlagen Österreichs (2019).	75
Abbildung 26: Absolute LOG-Reduktion der untersuchten Gene in 9 österreichischen Kläranlagen (2019).	76
Abbildung 27: Anzahl detektierter ARGs mittels Hochdurchsatz-Gen-Profilierung - Kläranlagen 2019.	77
Abbildung 28: Relative Häufigkeiten detektierter ARGs aus dem Hochdurchsatz-Gen-Profilierung - Kläranlagen 2019.	78
Abbildung 29: Absolute Genabundanz in verschiedenen Kläranlagenzuläufen Österreichs (April/Mai 2020).	80
Abbildung 30: Relative ARG-Häufigkeiten verschiedener Zuläufe von Kläranlagen in Österreich (April/Mai 2020).	81
Abbildung 31: Absolute Genabundanz verschiedener Kläranlagen in Österreich (Sommer 2021).	83
Abbildung 32: Relative ARG-Häufigkeit von verschiedenen Kläranlagen in Österreich (Sommer 2021).	84
Abbildung 33: Vergleich absoluter Genabundanz von Kläranlage 1 aus den Jahren 2019 und 2021.	85
Abbildung 34: Vergleich der Anzahl detektierter ARGs von Kläranlagen aus den Jahren 2019 und 2021 mittels Hochdurchsatz-Gen-Profilierung.	87
Abbildung 35: Vergleich der relativen Häufigkeiten detektierter ARGs aus dem Hochdurchsatz-Gen-Profilierung - Kläranlagen 2019 vs. 2021.	88
Abbildung 36: Absolute Genabundanz des zeitlich hochaufgelösten Monitorings von Kläranlage 6 (2019/2020).	90
Abbildung 37: Relative ARG-Häufigkeit des zeitlich hochaufgelösten Monitorings von Kläranlage 6 (2019/2020).	91

Abbildung 38: Absolute Genabundanzen des zeitlich hochaufgelösten Monitorings von Kläranlage 9 (Dez. 2020 bis März 2021)	93
Abbildung 39: Relative ARG-Häufigkeiten des zeitlich hochaufgelösten Monitorings von Kläranlage 9 (Dez. 2020 bis März 2021)	94
Abbildung 40: Absolute Genabundanzen des zeitlich hochaufgelösten Monitorings von Kläranlage 9 (Okt. 2020 bis Sept. 2021).	96
Abbildung 41: Relative Genhäufigkeit des zeitlich hochaufgelösten Monitorings von Kläranlage 9 (Okt. 2020 bis Sept. 2021).	97
Abbildung 42: Absolute Genabundanzen in österreichischen Oberflächengewässern (Übersicht).	99
Abbildung 43: Absolute Genabundanzen in österreichischen Oberflächengewässern 2019 (räumliche Untersuchung).	101
Abbildung 44: Relative ARG-Häufigkeit in österreichischen Oberflächengewässern 2019 (räumliche Untersuchung).	102
Abbildung 45: Anzahl detektierter ARGs in österreichischen Oberflächengewässern (Sommer 2019) & Raab (Sommer 2021) mittels Hochdurchsatz Gen-Profilig.	103
Abbildung 46: Relative ARG-Häufigkeiten in österreichischen Oberflächengewässern (Sommer 2019) & Raab (Sommer 2021) mittels Hochdurchsatz Gen-Profilig.	104
Abbildung 47: Absolute Genabundanzen der räumlichen Untersuchung verschiedener Stadtgewässer in Wien.	106
Abbildung 48: Relative ARG-Häufigkeiten untersuchter Stadtgewässer in Wien (2020).	107
Abbildung 49: Absolute Genabundanzen an verschiedenen Stellen im Fluss Schwechat – Vergleich Winter 2021 und Sommer 2021.	110
Abbildung 50: Relative ARG-Häufigkeiten an verschiedenen Stellen im Fluss Schwechat – Vergleich Winter 2021 und Sommer 2021.	111
Abbildung 51: Absolute Genabundanzen an verschiedenen Stellen im Fluss Liesing – Vergleich Winter 2021 und Sommer 2021.	113
Abbildung 52: Relative ARG-Häufigkeiten an verschiedenen Stellen im Fluss Liesing – Vergleich Winter 2021 und Sommer 2021.	114
Abbildung 53: Anzahl detektierter ARGs in Biofilm-Proben der Fließgewässer Schwechat und Liesing (Winter und Sommer 2021) mittels Hochdurchsatz-Gen-Profilig.	115
Abbildung 54: Absolute Genabundanzen während des Jahresmonitorings in der Alten Donau (2018 bis 2020).	118

Abbildung 55: Relative Häufigkeiten des ARG <i>su1</i> während des Jahresmonitorings in der Alten Donau (2018 bis 2020).	118
Abbildung 56: Taxonomische Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften des Zulaufs von Kläranlage 2 in Form eines KRONA-Plots.	119
Abbildung 57 Taxonomische Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft des Ablaufs von Kläranlage 2 in Form eines KRONA-Plots.	120
Abbildung 58: Konzentrationen der gemessenen Antibiotika während des Monitorings im Sommer 2019.	122
Abbildung 59: Dendrogramm mit Ward-Verknüpfung – Ähnlichkeiten der Kläranlagen und Oberflächengewässerproben aus Sommer 2019 zueinander.	124
Abbildung 60: Anzahl detektierter ARGs im untersuchten Multibarrierensystem zur weitergehenden Abwasserreinigung mittels Hochdurchsatz-Gen-Profilings.	126
Abbildung 61: LOG-Reduktion von ARGs im Multibarrierensystem zur weitergehenden Abwasserreinigung (Hochdurchsatz-Gen-Profilings).	127
Abbildung 62: Relative ARG-Häufigkeit im Multibarrierensystem zur weitergehenden Abwasserreinigung (Hochdurchsatz-Gen-Profilings).	128
Abbildung 63: Logarithmische Reduktion der freien extrazellulären DNA aus destilliertem, autoklaviertem Wasser für verschiedenen Membrantypen.	130
Abbildung 64: Einfluss der DNA-Konformation auf den Rückhalt bei Filtration mit der Ultrafiltrationsmembran UF1 und der Umkehrosmosemembran UO1.	132
Anhang 1 - Abbildung 65: Konzentrationen der gemessenen Analgetika, Antiphlogistika und Antirheumatika.	143
Anhang 1 - Abbildung 66: Konzentrationen der gemessenen Antidiabetika, Antiepileptika und Antineoplasten.	144
Anhang 1 - Abbildung 67: Konzentrationen der gemessenen Antivirustatika, Betablockern und Bronchiodilatoren.	145
Anhang 1 - Abbildung 68: Konzentrationen der gemessenen Diuretika, Expektorantien und Lipidsenker.	146
Anhang 1 - Abbildung 69: Konzentrationen der gemessenen Metaboliten und Renin-Angiotensinen.	147
Anhang 1 - Abbildung 70: Konzentrationen der gemessenen Psychoanaleptika und Psycholeptika.	148

Anhang 1 - Abbildung 71: Konzentrationen der gemessenen Röntgenkontrastmittel und Vasodilatoren.	149
Anhang 1 - Abbildung 72: Konzentrationen der gemessenen PAH (polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe).	150
Anhang 1 - Abbildung 73: Konzentrationen der gemessenen Dioxine, Furane und DL-PCB.	151
Anhang 2 - Abbildung 74: Vorkommen und Häufigkeit von (assoziierten) ARGs in ausgewählten Proben des Untersuchungsprogrammes 2019 mittels Hochdurchsatz-Gen-Profiling.	152

## Abkürzungen

AB	Ablauf Kläranlage
AR	Antibiotikaresistenz
ARA	Abwasserreinigungsanlage
ARB	Antibiotikaresistentes Bakterium
ARG	Antibiotikaresistenzgen
Bgld.	Burgenland
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
KA	Kläranlage
NÖ	Niederösterreich
n.v.	Nicht verfügbar
OFG	Oberflächengewässer
OGW	Oberflächengewässerproben
OÖ	Oberösterreich
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure (engl.: ribosomal ribonucleic acid)
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
Stmk.	Steiermark
T	Tirol
TMP	Tagesmischprobe
Vbg.	Vorarlberg
W	Wien
WMP	Wochenmischprobe
ZU	Zulauf Kläranlage

Abkürzungen einzelner Probenahmestellen sind hier nicht aufgeführt, sondern ausschließlich an entsprechender Position im Text und ggf. zusätzlich in den jeweiligen Tabellen und Abbildungen.

**Projektnehmer**

AGES - Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Department für Integrative Risikobewertung/Daten-Statistik-Risikobewertung - DSR in Kooperation mit der Technischen Universität Wien, Institut für Wassergüte und Ressourcenmanagement

Adresse: Spargelfeldstr. 191, 1220 Wien (AGES) / Lilienthalgasse 21 OD, 1030 Wien (TU Wien)