

# Factsheet: MARGINS-I

## MARGINS-I: Identifizierung und Quantifizierung der Antibiotikaresistenzgen-Hintergrundbelastung von Böden in Österreich

Verfasser\*innen: Sonia Galazka MSc. (AGES), Dr. Melanie Kuffner (AGES) – Projektmitarbeiterinnen MARGINS-I.  
Ass. Prof. Dr. Julia Vierheilig, Ass. Prof. Dr. Norbert Kreuzinger (TU Wien) und Dr. Markus Wögerbauer (AGES) - Projektleiter\*innen der Projekte MARGINS-I & II. Stand: 18.4.2023

### Worum handelt es sich bei MARGINS-I?

Im MARGINS-I Projekt wurde erstmals in Österreich die Antibiotikaresistenzgen(ARG)-Belastung von Böden systematisch erfasst. Ausgewählte Agrarböden, sowie naturbelassene und urbane Wiesen-, Laub- und Nadelwaldböden wurden untersucht, um quantitative Daten zur ARG-Verbreitung zu erhalten. Zudem wurden in einem definierten Agroökosystem mögliche Antibiotikaresistenz-Übertragungswege von ihrem Ursprung (wie Schweinegülle, -Kot und Kompost) über das exponierte Feld bis ins Drainage-Wasser beobachtet.

### Was bedeutet "MARGINS"?

#### = Monitoring of Antibiotic Resistance Genes in Soils

Die Forschungsarbeiten wurden in Kooperation mit der Technischen Universität Wien (Institut für Wassergüte und Ressourcenmanagement) durchgeführt, die die gleichen Fragestellungen im Abwasser und in Oberflächengewässern untersucht hat. Bodenspezifische ARG-Daten wurden von der AGES (Abteilung für Risikobewertung) ermittelt und im MARGINS-I Bericht veröffentlicht. Abwasserspezifische Ergebnisse sind dem MARGINS-II Bericht zu entnehmen.

### Warum ist dieses Projekt relevant?

Antimikrobielle Resistenz wurde von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als eines der Top 10 globalen Gesundheitsprobleme deklariert.

Antibiotikaresistenzgene (ARGs), die aus Umweltquellen wie Böden, Gewässern aber auch aus Lebens- und Futtermittelketten stammen, können problematisch für die Behandlung von bakteriellen Infektionskrankheiten sein. Anthropogene Einflüsse wie landwirtschaftliche Güllendüngung können zu einer Erhöhung der bereits natürlich im Boden vorkommenden ARG-Konzentrationen oder zur Einbringung von neuen ARGs führen. Deshalb spielen Agroökosysteme nicht nur eine Rolle bei der Ausbreitung – sondern auch bei der Eindämmung – von Antibiotikaresistenzen.

## Was waren die Ziele des Projektes?

Da bisher weder quantitative noch qualitative Daten zur ARG-Belastung von österreichischen Böden erhoben wurden, hat das MARGINS-I Projekt versucht, diese Datenlücke zu füllen.

Ziele dieses Projektes umfassten:

- die quantitative Datenerfassung von ARGs in österreichischen Böden unter unterschiedlich starken anthropogenen Einflüssen (starker Selektionsdruck: Gülle-gedüngte Agrarfelder; schwacher Selektionsdruck: naturbelassene alpine Nadelwaldböden)
- die Auswirkung von Gülledüngung auf die ARG-Konzentration in Ackerböden des österreichischen Freiluft-Versuchsgeländes (HOAL; Petzenkirchen, Niederösterreich) im Jahresverlauf zu beobachten
- die möglichen Ausbreitungswege von ARGs innerhalb des HOALs (aus Kompost, Schweinekot, Schweine-Gülle über Böden bis hin zum Drainage-Wasser) zu erfassen

## Wie wurde das Projekt umgesetzt?

Insgesamt wurden 110 Proben untersucht, welche sich aus 85 Bodenproben, 20 Wasserproben und 3 organischen Düngerproben (Kompost, Schweinekot, Schweinegülle) zusammensetzten.

Das zentrale Element von MARGINS-I war die Erfassung der Kopienzahl von 24 ARGs und 2 mobilen genetischen Elementen in Böden, Drainage- und Bachwasser sowie in Schweinekot, Schweinegülle und Kompost mittels quantitativer PCR (TaqMan qPCR).

Die ARG-qPCR Ergebnisse (absolute Quantifizierung) wurden überdies in Relation zur Anzahl der ermittelten *16S rRNA Gene* der Bodenmikroflora am Probenentnahmestandort gesetzt (relative Quantifizierung: deltaCt Methode).

Zusätzlich durchgeführte, ergänzende Untersuchungen:

- **16S Metagenomsequenzierung:** Bestimmung der mikrobiellen Diversität und Abundanz sowie deren Korrelationen mit ARG-Konzentrationen anhand von Netzwerkanalysen (81 Proben) zur Ermittlung von Bakterienarten, die als potentielle Resistenzträger fungieren könnten
- **Resistomap/SmartChip high-throughput qPCR:** Analyse eines erweiterten Spektrums von 95 ARGs (30 Proben)
- **Bestimmung der Resistenzraten kultivierbarer Bakterien:** 6x Antibiotika, 5x Bodenproben (Agar-Voll- und Minimalmediumplatten). Taxonomische Identifikation von 213 antibiotikaresistenten Bakterieneinzelisolaten (16S Amplikon Sequenzierung)
- **Antibiotika-Quantifizierung:** 16x Boden-, Gülle- und Kotproben (29 Antibiotika); 5x Wasserproben (20 Antibiotika) mittels LC-MS/MS
- **Geochemische Bodenparameter-Analyse an den Probenentnahmestellen:** Korrelationen mit qPCR-Ergebnissen
- **Sammlung von Wetter-/Klimadaten im Bereich der Probenentnahmestellen:** HOAL- und ZAMG-Wetterstationen. Korrelation mit den beobachteten ARG-Mengen.

## Welche Proben wurden getestet?

### Agroökosystem HOAL/Probenentnahmestellen:

- 2x langjährig Gülle-gedüngte Felder mit Gülledüngung im Beobachtungszeitraum (F31, F39)
- 1x langjährig Gülle-gedüngtes Feld ohne Gülledüngung im Beobachtungszeitraum (F32)
- 1x langfristig Gülle-freies Feld (F04)
- 1x Laub- und Nadelwaldboden
- Organische Dünger (1x Kompost, 1x Schweinekot, 3x Schweinegülle)
- 1x Bachwasser und 1x Drainagewasser

### Nicht landwirtschaftlich genutzte Vergleichsböden:

- 4x urbane - und 2x naturbelassene Wiesen (Donau Auen)
- Naturbelassene Laubwaldböden (8x Donau Auen, 1x Prater Park, 1x Lainzer Tiergarten)
- Naturbelassene Nadelwaldböden (Alpin: Ötscher – 3 Höhenstufen; 5x Wiener Becken)

Im HOAL-Gelände wurden innerhalb des Beobachtungszeitraumes (= Longitudinalstudie über eine Vegetationsperiode: Herbst 2019-Herbst 2020) je Probenentnahmestelle an 7-10 Zeitpunkten Bodenproben entnommen. Im gleichen Zeitraum wurden 10 Bach- und Drainagewasserproben im Entwässerungsbereich der getesteten HOAL-Felder gezogen. Im Fall der urbanen- und naturbelassenen Wiesen sowie Laubwaldböden wurden Proben jeweils zur warmen und kalten Jahreszeit gezogen.

## Welche Antibiotika-Resistenzgene wurden getestet?

Die getesteten 24 ARGs inaktivieren 12 Antibiotikaklassen:

- Aminoglykoside (*aadA*, *aph(3')-IIa*, *aph(3')-IIIa*, *strB*)
- $\beta$ -Laktame (*bla<sub>CTX-M-15</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM-1</sub>*, *bla<sub>OXA-10</sub>*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *mecA*)
- Phenicole (*cmxA*)
- Diaminopyrimidine (*dfrA-1*)
- Makrolide (*ermB*, *ermF*)
- Polypeptide (*mcr-1*)
- Biozide (*qacEdelta1*)
- Fluorochinolone (*qnrS*)
- Nukleoside (*sat-4*)
- Sulfonamide (*sul1*)
- Tetracykline (*tet(A)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(W)*)
- Glykopeptide (*vanA*)

## Welche Ergebnisse wurden im Rahmen des Projekts erzielt?

### ARG-Konzentrationen in unterschiedlichen Ökosystemen

- Die Abundanz der detektierbaren Targets variierte in den verschiedenen Matrizen und Proben (Kopien pro Gramm Trockengewicht Boden (K/g TB)):
  - langjährig güllegedüngte Felder:  $10^2 - 10^6$  K/ g TB
  - langjährig Gülle-freies Feld:  $10^2 - 10^5$  K/ g TB
  - Vergleichsböden (Nadel-, Laubwälder, Wiesen):  $10^2 - 10^5$  K/ g TB (mit vielen Targets unter der Nachweisgrenze bei naturnahen Proben)
  - Schweinegülle:  $10^6 - 10^9$  K/g

### Einfluss von Gülledüngung auf ARGs in Ackerböden:

- Die Untersuchung von Schweinegülle und der Agrarfelder zeigte, dass die Konzentrationen von insgesamt 15 ARGs und MGEs in Ackerböden durch die Gülledüngung erhöht wird:  
***ermF, ermB, dfrA-1, sat-4, nptIII, strB, aadA, cmxA, sul1, qacEdelta1, tet(A), tet(M), tet(O), tet(W)*** und ***intl1***
- Ein Gülle-bedingter Maximalwert trat einen Tag- bis eine Woche nach Düngung bei 13 ARGs auf:  
*ermF, ermB, dfrA-1, sat-4, nptIII, strB, cmxA, sul1, qacEdelta1, tet(A), tet(M), tet(W)* und *intl1*
- Diese ARG-Konzentrationen flachten bis Ende der Vegetationsperiode wieder auf den Ursprungswert ab.
- Über den Beobachtungszeitraum hinweg waren 13 Targets in den langjährig Gülle-gedüngten Feldern statistisch signifikant häufiger:  
*ermB, dfrA-1, sat-4, nptIII, strB, aadA, cmxA, sul1, qacEdelta1, tet(A), tet(M), tet(O)* und *tet(W)*
- Antibiotika konnten lediglich in Gülle nachgewiesen werden (Marbofloxacin/Fluorochinolon und Doxycyclin/Tetrazyklin-Derivat), jedoch nicht in den Böden. Die Konzentrationen waren gering, könnten jedoch minimal selektiv wirksam sein.
- Die Genera *Clostridium sensu stricto 1*, *Terrisporobacter*, *Turicibacter* und *Romboutsia* wurden in Schweinegülle und in den Gülle-gedüngten Feldern besonders häufig detektiert, mit einem starken Anstieg nach Gülle-Applikation.

### ARG-Belastung bei Vergleichsstandorten und HOAL-Feldern:

- Die niedrigsten ARG-Belastungen wurden an Nadelwaldstandorten ermittelt, die höchsten in Wiener Grasflächen
- Ubiquitär detektierte Targets: *bla<sub>TEM-1</sub>*, *vanA*, *ISPPs*, *intl1*, *ermB* und *cmxA*
- Eine hohe ARG-Diversität in allen Böden zeigte das Resistomap-Screening auf 95 ARG-Targets:
  - 55-69 detektierte Targets in den Gülle-gedüngten Böden
  - 55-60 detektierte Targets im Gülle-freien Feld
  - 52-58 detektierte Targets in urbanen Wiesenböden

- 37-53 detektierte Targets in naturbelassenen Laub- und Nadelwaldböden
- Die Bakteriengattung *Terrisporobacter* korrelierte mit den ARGs *dfrA-1*, *nptIII*, *sat-4* und *qacEdelta1* positiv nach Spearman in Gülle-gedüngten Feldern.

#### Einfluss von abiotischen Faktoren auf ARG-Konzentrationen:

- **Regen:** Negative Korrelation zwischen Regenmenge am Tag der Probenahme und dem ARG *ermF*
- **Boden-und Lufttemperatur:** Negative Korrelation mit *tet(W)*
- **Kupfer:** Positive Korrelation mit *aph(3')-IIIa*, *tet(M)* und *tet(O)*
- **Molybdän:** Positive Korrelation mit *bla<sub>TEM-1</sub>*, *cmxA*, *ermF*, *tet(M)*
- **Zink:** Positive Korrelation mit *aadA*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *aph(3')-IIa*, *tet(M)*
- **Mangan:** Negative Korrelation mit *tet(M)*, *sul1*, *ermF*

#### Was bedeuten die gesammelten Ergebnisse?

- Deutlicher Hinweis auf die Übertragung von ARGs und assoziierten Bakterien aus Gülle in österreichische Ackerböden
- **Resilienz** von Ackerböden gegenüber frisch über Gülle eingebrachte ARGs: verursachte ARG-Konzentrationserhöhungen nicht permanent
- Gülle-bedingter Konzentrationsanstieg im Boden nicht bei allen getesteten ARGs nachweisbar
- ARG-Hintergrundkonzentrationen jedoch in **langfristig** Gülle-gedüngten Ackerböden höher als im Gülle-freien Feld
- Naturnahe Böden und landwirtschaftliche Nutzflächen zeigen ein ähnliches Spektrum an ARGs. Die Anzahl der detektierten ARGs und die ermittelten Konzentrationen sind jedoch in naturnahen Böden in der Regel geringer.
- Die ermittelten Antibiotika-Konzentrationen in Gülle vermitteln eventuell in dieser Matrix einen Selektionsdruck, jedoch nicht im Boden (keine Antibiotika detektierbar).
- Abiotische Faktoren können positiv (Kupfer, Molybdän, Zink) oder negativ (Regen, Boden- und Lufttemperatur) mit bestimmten ARGs korrelieren.

#### Was kann unternommen werden, um die Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen über Ökosystemgrenzen zu verringern?

- Etablierung von ARG Monitoring-Systemen in diversen Umweltkompartimenten, um ARG-Belastungen zu ermitteln und deren Dynamik zu überwachen
- Ermittlung von lokalen ARG-Hotspots in der Umwelt, Lebens- und Futtermittelkette, um effiziente Interventionspunkte zu identifizieren
- Aufbau von nationalen ARG-Datenbanken, die neben quantitativen Informationen auch Prävalenz-, Sequenz- und Metadaten, sowie Informationen zur bakteriellen Biodiversität im getesteten Habitat enthalten

- Internationale Abstimmung der Vorgangsweisen zur Reduzierung der Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen
- Verknüpfung der molekularbiologischen ARG-Daten mit Bakterienkultivierungsdaten und/oder Resistenzprofilen
- Verknüpfung der molekularbiologischen ARG-Daten aus Umweltkompartimenten mit human- und veterinärmedizinischen epidemiologischen Daten. Strikte Verfolgung des One Health Ansatzes (Einbeziehung von Umwelt, human- und veterinärmedizinischen Aspekten in die ARG-Eindämmungsstrategie) bei der Gefährdungs- und Risikobewertung.
- Integration des molekularbiologischen Ansatzes zum Screening auf ARGs in bestehende phänotypische Pathogen-Monitoring-Programme (EARS)
- Harmonisierung der eingesetzten molekularbiologischen Methodik (qPCR, high throughput qPCR, Metagenomik) um internationale Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erleichtern.

- Eindämmung der Ausbreitung von ARGs und assoziierter Bakterien aus und über Umweltquellen notwendig
- Reduzierung der ARG-Belastung von Schweinegülle vor deren Ausbringung in die Umwelt empfehlenswert
- Verbesserte Reinigung von mit ARG und ARB kontaminierten Abwässern aus industriellen, städtischen, landwirtschaftlichen und klinischen Quellen
- **One Health-Konzept:** Zusammenarbeit von Veterinärmedizinerinnen, Ärzten, Experten für Lebensmittelsicherheit, Kläranlagenbetreibern, Umweltexperten und Risikomanagern