



Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Physiologisches Institut,
Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover

Nieders. Ministerium für Ernährung,
Landwirtschaft und Verbraucherschutz
Referat 105.1
Calenberger Str. 2
30169 Hannover

Physiologisches Institut

Leiter:
Prof. Dr. Gerhard Breves
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover

Tel. +49 511 856-7271
Fax +49 511 856-7687
gerhard.breves@tiho-hannover.de

Ihre Nachricht vom | Ihr Zeichen

Meine Nachricht vom | Mein Zeichen

Datum
Hannover, 09.12.2014

Bericht zum Forschungsvorhaben

„Untersuchungen zu Arzneimittelrückständen und multiresistenten Mikroorganismen in Biogasanlagen unter besonderer Berücksichtigung von Hühnertrockenkot als Gärsubstrat“

Hintergrund

Mit der im Jahre 2011 durchgeführten Studie zum Risikopotenzial von Biogasanlagen an jeweils 5 Anlagen aus Ackerbau-, Milchvieh- und Veredelungsregionen wurde erstmals für Gärsubstrate und Gärreste das mikrobielle Spektrum qualitativ und quantitativ charakterisiert. Dabei konnten in keiner der getesteten Anlagen Neurotoxin-bildende *Clostridium botulinum* Stämme und andere für den Menschen pathogene Mikroorganismen nachgewiesen werden. In dieser ersten Studie war es nicht möglich, auch solche Anlagen zu beproben, in denen neben Energiepflanzen und wirtschaftlichem Dünger auch zu einem signifikanten Teil Hühnertrockenkot als Gärsubstrat eingesetzt wird. Da sich diese Substratkombination in jüngster Zeit als geeignet und daher als praxisrelevant erwiesen hat, zugleich jedoch keine belastbaren Daten zum Eintrag und Austrag von Arzneimitteln/Arzneimittelrückständen und multiresistenten Mikroorganismen über die Gärsubstrate bzw. Gärreste vorliegen, war es das Ziel der Folgestudie, am Beispiel von 5 Anlagen, in denen in erheblichem Umfang Hühnertrockenkot eingesetzt wird, diese beiden Fragestellungen qualitativ und quantitativ zu charakterisieren.

Auswahl der Biogasanlagen und Probengewinnung

In die Studie wurden insgesamt 10 Biogasanlagen einbezogen, von denen fünf Anlagen in Veredelungsregionen neben anderen Substraten mit einem hohen Anteil von Hühnertrockenkot betrieben wurden. Die anderen 5 Anlagen aus Ackerbauregionen wurden mit nachwachsenden Rohstoffen bzw. teilweise mit

wirtschaftseigenem Dünger betrieben. Von jeder Anlage wurden jeweils an vier aufeinanderfolgenden Tagen Proben der Gärsubstrate und an vier aufeinanderfolgenden Tagen Proben der Gärreste (Probenmenge jeweils ca. 1000 g) entnommen und bis zum Versand an die entsprechenden Untersuchungslabore bei 4°C gelagert.

Die Auswahl der Biogasanlagen sowie die Probenentnahme erfolgten über 3N. Die Probenaufbereitung sowie der Versand wurden vom Physiologischen Institut der Tierärztlichen Hochschule veranlasst.

Tab. 1: Übersicht zu den an der Studie beteiligten Biogasanlagen

Probennr.	Nr.	Betriebsart	Input
1	A1	Ackerbau	100% Mais
2	A2	Ackerbau	100% NaWaRo
3	A3	Ackerbau	Maissilage, Rinder-/Schweinegülle, HTK
4	B1	Milchvieh	70% Rindergülle, Futterreste
5	B2	Milchvieh	Mind. 30% Rindergülle, Rest Mais
6	C1	Veredelung	66% Mais, 6% HTK (Elterntiere), 25% Rinder-/Schweinegülle
7	C2	Veredelung	65% Mais, 30% Mastschweingülle, 5% HTK
8	C3	Veredelung	65% Mais, Zuckerrübe, 30% Schweinegülle, 5% HTK
9	C4	Veredelung	Schweine-/Rindergülle, Hühnermist
10	C5	Veredelung	1.000 t HTK/ Jahr

Projektteil 1: Arzneimittelrückstände

Die Bestimmung verschiedener Tierarzneimittel aus den Substanzklassen der Sulfonamide und Tetracycline in den Proben der Biogasanlagen erfolgte am Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Hamscher. Für die Analytik wurden die Gärsubstrate und Gärreste zu jeweils 2 Proben „gepoolt“. Die Analyse erfolgte nach Flüssig-Flüssigextraktion mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie in Kombination mit Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS-MS) (Spielmeyer et al. 2014).

Für die Quantifizierung wurde den Proben ein Gemisch aus drei internen Standards (jeweils ¹³C₆-isotopenmarkiertes Sulfadiazin, Sulfamethazin und Sulfamethoxazol) zugesetzt. Die Proben wurden mit Citratpuffer aufgeschlämmt und die Analyten anschließend mit einem Lösungsmittelgemisch (Methanol, Ethanol, Dichlormethan; 1:3:1, v/v/v) aus der Matrix extrahiert. Der Extrakt wurde bei reduziertem Druck eingengt und der Rückstand in Methanol/Wasser (1:1 v/v) aufgenommen. Die chromatographische Trennung erfolgte mittels UHPLC (Dionex Ultimate 3000 RS) an einer Accucore aq Säule (2,6 µm, 2,1 mm x 100 mm, Thermo Scientific). Durch Gradientenelution (Fließmittel A: 98 % Wasser, 2 % Acetonitril plus 0,1 % Ameisensäure; Fließmittel B: Methanol/Acetonitril 1:1; v/v) konnten die Tierarzneimittel innerhalb von 16 min separiert werden. Nachweis und Quantifizierung der Wirkstoffe erfolgten in einem API 3000 Triple-Quadrupol Massenspektrometer

(ABSciex) im positiven ESI-Modus. Für jeden Analyten wurden zwei Produktionen mit einer dwell Zeit von 0,15 s pro Ion aufgezeichnet. Folgende MS Parameter wurden für alle Analysen eingestellt: Kapillarspannung: 5.000 V, Heizgastemperatur: 150 °C, Kollisionsgas: Stickstoff.

Die Quantifizierung erfolgte über interne Standards anhand einer externen Matrixkalibrierung. Für die Kalibrierung wurde antibiotikafreier Rinderfaeces mit definierten Konzentrationen der internen Standards und Analyten dotiert und analog zu den Proben aufgearbeitet.

Die Methodennachweisgrenzen liegen im Bereich von 0,01 bis 0,08 mg Analyt pro kg Feuchtmasse, die Bestimmungsgrenzen zwischen 0,02 und 0,50 mg pro kg (s. Tabelle).

Wirkstoff	Nachweisgrenze [mg/kg]	Bestimmungsgrenze [mg/kg]
Sulfonamide		
Sulfachloropyridazin	0,01	0,06
Sulfadiazin	0,01	0,04
Sulfadimethoxin	0,01	0,02
Sulfaguanidin	0,04	0,18
Sulfamerazin	0,04	0,08
Sulfamethazin (= Sulfadimidin)	0,04	0,08
Sulfamethoxazol	0,01	0,08
Sulfamethoxypyridazin	0,01	0,04
Sulfapyridin	0,01	0,04
Sulfathiazol	0,02	0,10
Tetracycline		
Chlortetracyclin	0,06	0,35
Doxycyclin	0,08	0,50
Oxytetracyclin	0,06	0,26
Tetracyclin	0,06	0,28

Ergebnisse

Von den insgesamt 10 getesteten Sulfonamiden konnten nur in den Gärresten von zwei Anlagen Rückstände von Sulfadiazin sicher bestimmt werden. Die Konzentrationen lagen in einem Bereich zwischen 50 und 100 µg/kg Frischsubstanz (Tab. 2).

Von den 4 untersuchten Tetracyclinen konnten nur Doxycyclin und Tetracyclin in einigen Anlagen nachgewiesen werden, in denen Hühnertrockenkot eingesetzt wurde. Dabei konnten in der Anlage 6 Doxycyclin und Tetracyclin sowohl in Gärsubstraten als auch in Gärresten gemessen werden, in der Anlage 7 wurde ein positiver Nachweis von Tetracyclin in den Gärsubstraten und Gärresten geführt, wogegen beide Antibiotika in den Proben der Anlage 9 nur in den Gärresten sicherbestimmt, jedoch Tetracyclin auch in den Gärresten der Anlage 10 nachgewiesen werden konnten. Die Konzentrationen lagen in allen Fällen in einem Bereich zwischen einfacher und doppelter Bestimmungsgrenze. (Tab. 3).

Tab. 2: Ergebnisse der Sulfonamid-Analyse in Gärsubstraten und Gärresten (in µg/kg Feuchtgewicht; NWG = Nachweisgrenze; BG = Bestimmungsgrenze).

Betriebsnr. Probennr.	Betrieb	Sulfadiazin		Sulfamethazin	
		Substrat	Rest	Substrat	Rest
1.1	Ackerbau	-	-	-	-
1.2		-	-	-	-
2.1	Ackerbau	-	47	-	Bereich NWG
2.2		-	62	-	Bereich NWG
3.1	Ackerbau	-	-	-	-
3.2		-	-	-	-
4.1	Milchvieh	-	-	-	-
4.2		-	-	-	-
5.1	Milchvieh	Bereich NWG	-	-	-
5.2		Bereich NWG	-	-	-
6.1	HTK	Bereich NWG	-	-	-
6.2		-	-	-	-
7.1	HTK	Bereich NWG	-	-	-
7.2		Bereich NWG	Bereich NWG	-	-
8.1	HTK	-	-	-	-
8.2		-	-	-	-
9.1	HTK	Bereich NWG	93	-	-
9.2		-	97	-	-
10.1	HTK	-	-	-	-
10.2		-	-	-	-

In keiner Probe wurden Sulfachloropyridazin, Sulfadimethoxin, Sulfaguanidin, Sulfamerazin, Sulfamethoxazol, Sulfamethoxyridazin, Sulfapyridin, Sulfathiazol nachgewiesen.

Tab. 3: Ergebnisse der Tetracyclin-Analyse in Gärsubstraten und Gärresten (in µg/kg Feuchtgewicht; NWG = Nachweisgrenze; BG = Bestimmungsgrenze).

Betriebsnr. Probennr.	Betrieb	Chlortetracyclin		Doxycyclin		Oxytetracyclin		Tetracyclin	
		Substrat	Rest	Substrat	Rest	Substrat	Rest	Substrat	Rest
1.1	Ackerbau	Bereich NWG	–	–	–	–	–	–	–
1.2		Bereich NWG	–	–	–	–	–	–	–
2.1	Ackerbau	–	Bereich NWG	–	–	–	–	–	–
2.2		–	Bereich NWG	–	–	–	–	–	–
3.1	Ackerbau	–	–	–	–	–	–	–	–
3.2		–	–	–	–	–	–	–	–
4.1	Milchvieh	–	–	–	–	–	–	–	–
4.2		–	–	–	–	–	–	–	–
5.1	Milchvieh	–	–	–	–	–	–	–	–
5.2		–	–	–	–	–	–	–	–
6.1	HTK	–	–	536	710	–	–	330	417
6.2		–	–	556	746	–	–	342	466
7.1	HTK	Bereich NWG	Bereich NWG	< BG	< BG	–	–	281	405
7.2		Bereich NWG	Bereich NWG	< BG	< BG	–	–	340	402
8.1	HTK	–	–	–	–	–	–	–	–
8.2		–	–	–	–	–	–	–	–
9.1	HTK	–	–	–	764	–	–	Bereich NWG	355
9.2		–	–	–	817	–	–	Bereich NWG	405
10.1	HTK	–	–	–	< BG	–	Bereich NWG	–	338
10.2		–	–	–	< BG	–	Bereich NWG	–	391

Projektteil 2: Nachweis multiresistenter Mikroorganismen

Probenbeschreibung

Für diese Untersuchungen wurden die einzelnen Proben der Gärsubstrate und der Gärreste zu jeweils einer Probe gepoolt. Damit wurden die Bestimmungen an jeweils 10 Proben der Gärsubstrate und der Gärreste durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgte zwischen September 2013 und Februar 2014 am Institut für Angewandte Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen (Prof. Dr. P. Kämpfer). In den hier dargestellten Ergebnissen sind die untersuchten Proben fortlaufend von 1 bis 10 nummeriert. Folgende Probenbezeichnung wurden verwendet: BGA 1E bis 10E und BGA 1A bis 10A (BGA: Biogasanlage; 1-10: durchgehende Nummerierung; **E**: Gärsubstrat/Eingangsproben der BGAs und **A**: Gärrest/ Ausgangsproben der BGAs. Die Proben wurden gekühlt geliefert (4°C): Am Tag des Probeneingangs wurde direkt mit den mikrobiologischen Untersuchungen begonnen.

Untersuchungsumfang und Methodenbeschreibung

Kultivierungsabhängiger Nachweis ESBL-tragender Enterobacteriaceae, VRE und MRSA

Gärsubstrate und Gärreste wurden kultivierungsabhängig auf das Vorhandensein von ESBL-tragenden *Enterobacteriaceae*, v.a. ESBL *E. coli*, MRSA und VRE untersucht. Die hier angewandte Nachweismethodik, wurden im Rahmen des BMBF geförderten Projektes RiskAGuA (2011-2014) für die Untersuchung von Eingangs- und Ausgangsproben von Biogasanlagen am Institut für Angewandte Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität, etabliert. Der Nachweis von ESBL *E. coli*, MRSA und VRE

erfolgte hier aus 10 g (einfach), 1 g (in Duplikaten) und 0,1 g (in Triplikaten) frisch gelieferter Proben. Die Einwaagen der Proben wurden in 90, 9 bzw. 0,9 mL Flüssigmedium mit entsprechenden Antibiotika für 24h bei 37°C inkubiert. Die Voranreicherung von ESBL *Enterobacteriaceae* (primär *E. coli*) erfolgte in Luria-Bertani Medium unter Zusatz von je 1 mg l⁻¹ Cefotaxim und Ceftazidim. Für den Nachweis von MRSA wurden zwei aufeinanderfolgende Voranreicherungsschritte eingesetzt, der erste Voranreicherungsschritt erfolgte in Mueller Hinton Bouillon (Carl-Roth, Deutschland) unter Zusatz von 6 Gew.% Natriumchlorid. Der zweite Schritt in CASO Flüssigmedium mit 3,5 mg l⁻¹ Cefoxitin und 50 mg l⁻¹ Aztreonam. Die Voranreicherung zur Kultivierung von VRE erfolgte in M92 Flüssigmedium (DSMZ Medium Nr. M92; <http://www.dsmz.de/>) unter Zusatz von 6 mg l⁻¹ Vancomycin und 600 mg l⁻¹ Natriumazid. Die Voranreicherungen für ESBL *Enterobacteriaceae* und MRSA wurden unter Schütteln der Kulturen (180 rpm) inkubiert, die Voranreicherungen für VRE wurden nicht geschüttelt inkubiert um den Sauerstoffeintrag zu minimieren. Nach den Voranreicherungen wurden je 10 µL der Voranreicherkulturen auf entsprechenden CHROMagar Medien (CHROMagar ESBL, MRSA UND VRE; MastDiagnostika, Reinfeld, Deutschland) mittels 13-Strich Vereinzelung ausgestrichen und für 24 h bei 37°C inkubiert.

Bei positivem Wachstum wurden Kolonien verschiedener Morphologien mit CHROMagar spezifischen Pigmentierungen der Zielorganismen weiter untersucht. Die Kolonien wurden gepickt und die Biomasse auf einer weiteren CHROMagar Platte vermehrt (24 Inkubation bei 37°C). Von den gewachsenen Kolonien wurde eine Impföse Biomasse in 100 µL DNA und RNA freiem Wasser in einem sterilem Reaktionsgefäß resuspendiert. Durch das wiederholte Einfrieren und Auftauen (3 Zyklen) wurde DNA aus den Zellen freigesetzt. Diese Zelllysate wurden als DNA Template für einen PCR-basierten Nachweis entsprechender Resistenzgene eingesetzt. Folgende Multiplex-PCRs (Paralldetektion mehrerer Gene) wurden durchgeführt: Amplifikation von *bla*CTX-M, *bla*TEM und *bla*SHV Gene für ESBL-tragende *Enterobacteriaceae* (Monstein et al., 2007); von *vanA*, *vanB* und *vanC*, (teilweise modifiziertes Primersystem nach Kariyama et al., 2000); und von *mecA* in Kombination mit einem *S. aureus*-spezifischem Gen (*nuc*) (Poulsen et al., 2003). Die Zelllysate wurden parallel oder integriert in die Multiplex-PCR System auf Amplifizierbarkeit getestet. Dies erfolgte durch Amplifikation des 16S rRNA Gens mittels universellen 16S rRNA Gen-bindenden Primern. Für jedes Multiplex-PCR Primersystem wurden jeweils Positivkontrollen (Zelllysate Resistenzgen-tragender Referenzstämmen) mitamplifiziert. Bei positivem Resistenzgennachweis wurden Reinkulturen gewonnen. Diese wurden nochmals auf die Anwesenheit des entsprechenden Resistenzgens geprüft und über partielle 16S rRNA Gensequenzierung phylogenetisch identifiziert. Für die ESBL-tragenden *Enterobacteriaceae* wurde zusätzlich für eine weitere genotypische Differenzierung eine genomische Fingerprintanalyse durchgeführt. Die phylogenetische Identifizierung erfolgte durch eine BLASTN Analyse der 16S rRNA Gensequenzen in der Typstammdatenbank EzTaxon-e (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) über die Erfassung der Ähnlichkeiten zu dem nächst-ähnlichsten Typstämmen. Zusätzlich wurde für ESBL-tragende *Enterobacteriaceae*, *mecA*-tragende Staphylokokken und VRE jeweils eine phylogenetischer Stammbaum in dem Phylogenieprogramm ARB (Ludwig et al., 2004) und der Typstammdatenbank des "The All-Species Living Tree" Projektes (LTP; Release LTPs111, Februar 2013) erstellt.

Ergebnisse

Wachstum auf CHROMagar ESBL, MRSA und VRE nach spezifischen Voranreicherungen

Abbildung 1 gibt eine Übersicht über das Wachstum auf den CHROMagar Platten nach den jeweiligen spezifischen Voranreicherungen bei der Untersuchung von 10 g, 1g und 0,1g Originalproben. Bei dem Nachweis von ESBL-tragenden *Enterobacteriaceae* erfolgte nur bei zwei Gärresten (BGAs 1 und 9) kein Wachstum, alle anderen Proben zeigten zumindest bei einzelnen Einwaagen positives Wachstum. Für den MRSA Nachweis konnte auf allen CHROMagar Platten Wachstum beobachtet werden. Für den VRE Nachweis erfolgte kein Wachstum bei einem Gärsubstrat (BGA 10) und einem Gärrest (BGA 1), bei allen anderen Proben wurde, wenn auch nicht bei allen Einwaagen, Wachstum beobachtet.

ESBL	10 g	1 g		0,1 g		
		a	b	a	b	c
1E	+	+	+	+	+	+
1A	-	-	-	-	-	-
2E	+	+	+	+	+	+
2A	+	+	+	+	+	+
3E	+	+	+	+	+	+
3A	-	-	-	-	+	+
4E	+	+	+	+	+	+
4A	+	+	+	-	+	+
5E	+	+	+	+	+	+
5A	+	+	+	+	+	+
6E	+	+	+	+	+	+
6A	+	+	+	+	+	+
7E	+	+	+	+	+	+
7A	+	+	+	+	+	+
8E	+	+	+	+	+	+
8A	-	+	+	+	+	+
9E	-	+	+	+	+	+
9A	-	-	-	-	-	-
10E	-	-	+	+	+	+
10A	+	+	+	+	+	+

MRSA	10 g	1 g		0,1 g		
		a	b	a	b	c
1E	+	+	+	+	+	+
1A	+	+	+	+	+	+
2E	+	+	+	+	+	+
2A	+	+	+	+	+	+
3E	+	+	+	+	+	+
3A	+	+	+	+	+	+
4E	+	+	+	+	+	+
4A	+	+	+	+	+	+
5E	+	+	+	+	+	+
5A	+	+	+	+	+	+
6E	+	+	+	+	+	+
6A	+	+	+	+	+	+
7E	+	+	+	+	+	+
7A	+	+	+	+	+	+
8E	+	+	+	+	+	+
8A	+	+	+	+	+	+
9E	+	+	+	+	+	+
9A	+	+	+	+	+	+
10E	+	+	+	+	+	+
10A	+	+	+	+	+	+

VRE	10 g	1 g		0,1 g		
		a	b	a	b	c
1E	+	+	+	+	+	+
1A	-	-	-	-	-	-
2E	+	+	+	+	+	+
2A	+	+	+	+	+	+
3E	+	+	+	+	+	+
3A	-	-	+	+	+	+
4E	+	+	+	+	+	+
4A	+	+	-	+	-	+
5E	+	+	+	+	+	+
5A	+	+	+	+	+	+
6E	+	+	+	-	+	+
6A	+	+	+	+	+	+
7E	+	+	+	+	+	+
7A	+	+	+	+	+	+
8E	+	+	+	+	+	+
8A	+	+	+	+	+	+
9E	+	+	+	+	+	+
9A	+	+	+	-	+	-
10E	-	-	-	-	-	-
10A	+	+	+	+	+	+

-	Kein Wachstum
+	Wachstum

Abbildung 1 Überblick über das Wachstum auf CHROMagar ESBL, MRSA und VRE nach spezifischer Voranreicherungen für ESBL-tragende *Enterobacteriaceae*, MRSA und VRE

Nachweis ESBL-tragende *Enterobacteriaceae* in Gärsubstraten und Gärresten

ESBL Gene wurden bei 37 von 150 auf CHROMagar ESBL gewachsenen und mit Multiplex-PCR „gescreenten“ Kolonien nachgewiesen. Ein positiver Resistenzgenachweis erfolgte bei Gärsubstraten von fünf Biogasanlagen (BGA 2, 3, 4, 6 und 9) und Gärresten von vier Biogasanlagen (BGA 2, 4, 5 und 6) (*Abbildung 2*). Am häufigsten wurden bei den Kolonien nur ein *bla*CTX-M oder ein *bla*CTX-M+*bla*TEM Gene nachgewiesen, zweimal nur ein *bla*TEM und nur einmal ein *bla*SHV Gen. Insgesamt wurden 34 Resistenzgen-tragende Isolate gewonnen und phylogenetisch identifiziert.

ESBL	10 g		1 g		0,1 g			Resistenzgen
		a	b	a	b	c		
1E	+	+	+	+	+	+	n.d.	
1A	-	-	-	-	-	-	-	
2E	2	1	2	1	+	1	CTX-M; CTX-M+TEM	
2A	1	1	2	1	+	1	CTX-M; CTX-M+TEM; SHV	
3E	1	+	+	1	+	+	CTX-M; CTX-M+TEM	
3A	-	-	-	-	+	+	n.d.	
4E	1	1	1	+	+	3(2)	CTX-M	
4A	2	2	+	-	+	+	CTX-M	
5E	+	+	+	+	+	+	n.d.	
5A	2	+	1(0)	+	1	1	CTX-M; CTX-M+TEM	
6E	2	+	+	+	+	+	CTX-M+TEM	
6A	2(1)	+	+	+	1	+	TEM; CTX-M+TEM	
7E	+	+	+	+	+	+	n.d.	
7A	+	+	+	+	+	+	n.d.	
8E	+	+	+	+	+	+	n.d.	
8A	-	+	+	+	+	+	n.d.	
9E	-	1	+	1	+	+	CTX-M; CTX-M+TEM	
9A	-	-	-	-	-	-	-	
10E	-	-	+	+	+	+	n.d.	
10A	+	+	+	+	+	+	n.d.	

-	Kein Wachstum
+	Wachstum
	Resistenzgennachweis: Anzahl positive Kolonien nach Vorscreening (Isolate mit Resistenzgenen nach Vereinzelung)

Abbildung 2 Überblick über Kolonien und Isolate (in Klammern dargestellt) mit positivem Resistenzgennachweis nach spezifischer Voranreicherung für ESBL-tragende *Enterobacteriaceae* und Wachstum auf CHROMagar ESBL.

Eine zusätzliche Analyse der ESBL-Gen-tragenden Isolate zur genotypischen Differenzierung mittels einer molekularen Fingerprintanalyse (BOX-PCR) zeigte, dass die Isolate 22 verschiedenen Genotypen zugeordnet werden können (**Abbildung 3**). Bei genotypisch identischen Isolaten wurde jeweils ein Isolat über 16S rRNA Gen-Sequenzierung phylogenetisch identifiziert. Ursprung der Isolate, Ähnlichkeiten zu nächstähnlichen Typstämmen sowie Resistenzgennachweis sind in **Tabelle 1** zusammengefasst. Bei 30 Isolaten handelte es sich entweder um *bla*CTX-M und/oder *bla*TEM tragende Isolate, sowie einen *bla*SHV-Träger, die alle >99.8% 16S rRNA Gensequenzidentität mit dem Typstamm von *E. coli* aufwiesen; drei CTX-M tragende Isolate wurden als *Citrobacter* spp. identifiziert, mit 99.8% 16S rRNA Gensequenzähnlichkeit zu den Typstämmen von *C. freundii* und *C. murlinae* (**Tabelle 1**). Die phylogenetischen Beziehungen zu nächstverwandten Typstämmen der *Enterobacteriaceae* ist in einem „Maximum-Likelihood“ Baum dargestellt (**Abbildung 4**).

Pearson correlation (Opt:1.00%) [0.0%-100.0%]

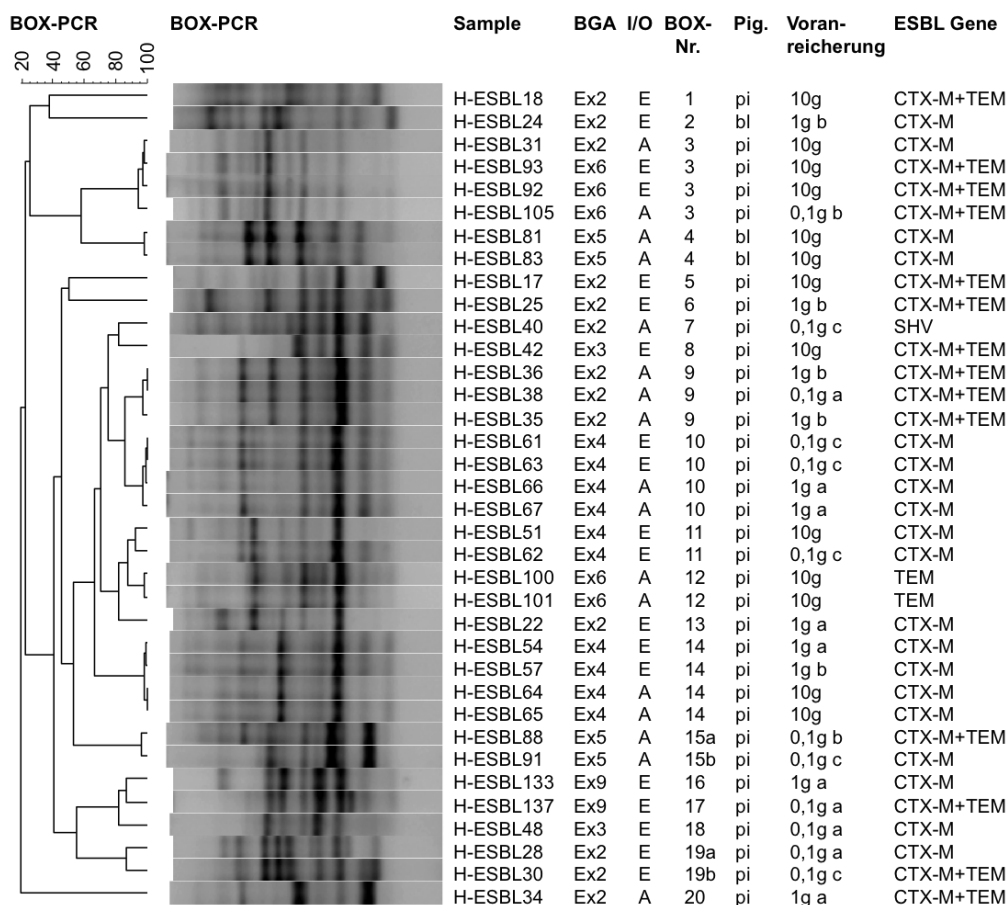


Abbildung 3 Clusteranalyse ESBL Gen-tragender *Enterobacteriaceae* zur genotypischen Differenzierung basierend auf BOX-PCR Fingerprintmustern (Amplifikation repetitiver Sequenzen verteilt über das Gesamtgenom). Die Analyse erfolgte nach Agarosegelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung über BOX-PCR generierte PCR-Fragmente in Gelcompar II (Applied Math).

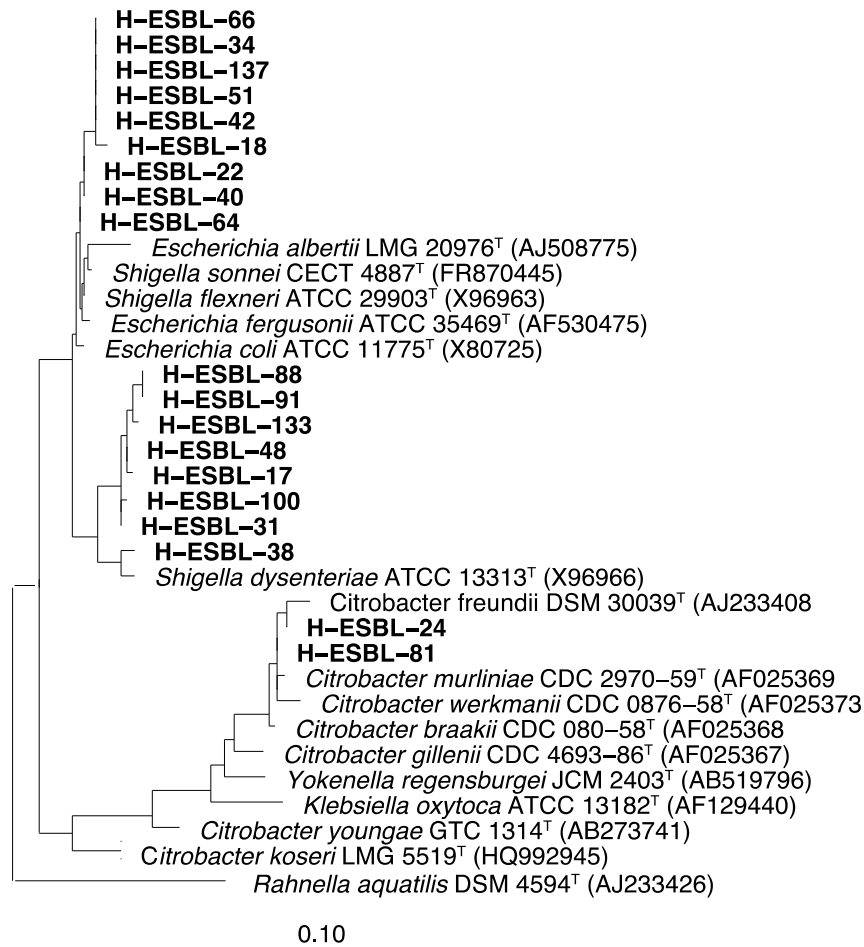


Abbildung 4 Phylogenetische Verwandtschaft ESBL-tragender Isolate der *Enterobacteriaceae* zu nahverwandten Typstämmen von Arten der Familie *Enterobacteriaceae*, dargestellt in einem „Maximum-Likelihood“ Baum basierend auf partiellen 16S rRNA Gensequenzen im Vergleich zu 16S rRNA Gensequenzen der nächstähnlichsten Typstämme. Der phylogenetische Baum wurde in ARB (Ludwig et al., 2004) berechnet. Hierzu wurden die 16S rRNA Gensequenzen der Isolate in dem SINA online Alignment Tool Version 1.2.1.1 (Pruesse et al., 2012) align und in ARB importiert. Die Berechnung erfolgte mit PhyML. Die 16S rRNA Gensequenz von *Rahnella aquatilis* wurde als „Outgroup“ verwendet. Isolate dieser Untersuchung sind fettgedruckt dargestellt. Bar: 0,10 Substitutionen pro Nukleotidposition.

Nachweis von *mecA*-tragenden Staphylokokken in Gärsubstraten

Nach MRSA spezifischer Voranreicherung wurde Wachstum auf CHROMagar MRSA für alle untersuchten Eingangs- und Ausgangsproben (0,1, 1 und 10 g) nachgewiesen (**Abbildung 5**). Insgesamt wurden 209 Kolonien von den CHROMagar MRSA Ausstrichen „gescreent“. Ein positiver Nachweis bzgl. *mecA* erfolgte nur bei den Eingangsproben von BGA 8 und 9. Es wurden 7 Isolate in Reinkultur gebracht, alle waren *mecA*-Träger (Nachscreening Befund). Die phylogenetische Identifizierung der gewonnenen Isolate zeigte, dass es sich nicht um MRSA sondern andere *mecA*-tragende Staphylokokken handelte, die 99.7 – 100% 16S rRNA Gensequenzidentität zu den Typstämmen von *S. haemolyticus*, *S. cohnii* subsp. *urealyticus* und *S. lentus* aufwiesen (siehe **Tabelle 2** und **Abbildung 6**). Somit wurden weder in den Gärsubstraten noch in den Gärresten MRSA kultivierungsabhängig detektiert.

MRSA	10 g	1 g		0,1 g			Resistenzgen
		a	b	a	b	c	
1E	+	+	+	+	+	+	n.d.
1A	+	+	+	+	+	+	n.d.
2E	+	+	+	+	+	+	n.d.
2A	+	+	+	+	+	+	n.d.
3E	+	+	+	+	+	+	n.d.
3A	+	+	+	+	+	+	n.d.
4E	+	+	+	+	+	+	n.d.
4A	+	+	+	+	+	+	n.d.
5E	+	+	+	+	+	+	n.d.
5A	+	+	+	+	+	+	n.d.
6E	+	+	+	+	+	+	n.d.
6A	+	+	+	+	+	+	n.d.
7E	+	+	+	+	+	+	n.d.
7A	+	+	+	+	+	+	n.d.
8E	+	+	2(3)	+	+	+	<i>mecA</i>
8A	+	+	+	+	+	+	n.d.
9E	1	2	+	2	+	+	<i>mecA</i>
9A	+	+	+	+	+	+	n.d.
10E	+	+	+	+	+	+	n.d.
10A	+	+	+	+	+	+	n.d.

-	Kein Wachstum
+	Wachstum
	Resistenzgennachweis: Anzahl positive Kolonien nach Vorscreening (Isolate mit Resistenzgenen nach Vereinzelung)

Abbildung 5 Überblick über Kolonien und Isolate (in Klammern dargestellt) mit positivem Resistenzgennachweis nach spezifischer Voranreicherung für *mecA*-tragende Staphylokokken und Wachstum auf CHROMagar MRSA.

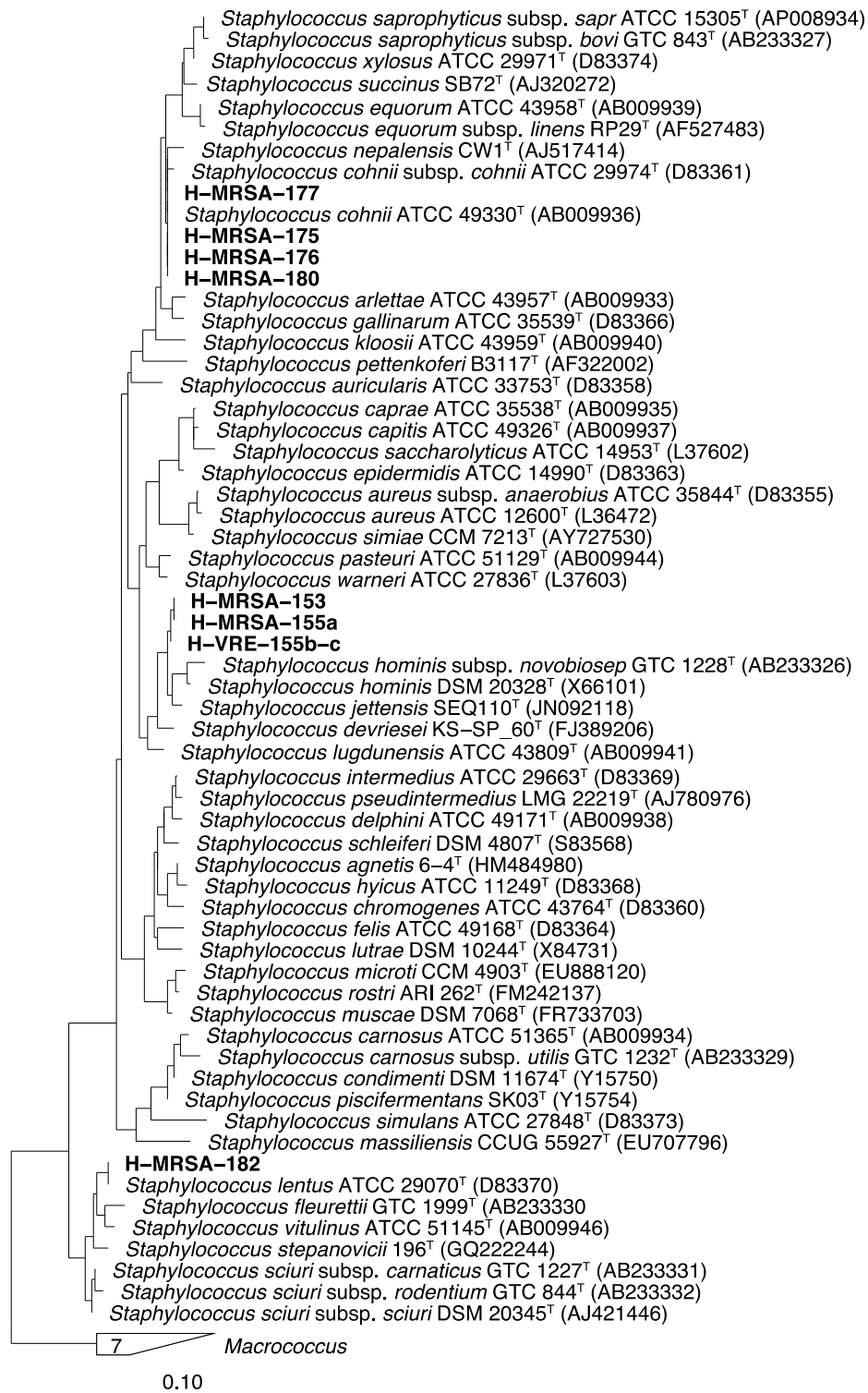


Abbildung 6 Phylogenetische Einordnung von *mecA*-tragenden *Staphylokokken* innerhalb der Gattung *Staphylococcus* dargestellt in einem „Maximum-Likelihood“ Baum basierend auf partiellen 16S rRNA Gensequenzen im Vergleich zu 16S rRNA

Genesequenzen der Typstämme von *Staphylococcus* Arten. Der phylogenetische Baum wurde in ARB (Ludwig et al., 2004) berechnet. Hierzu wurden die 16S rRNA Genesequenzen der Isolate in dem SINA online Alignment Tool Version 1.2.1.1 (Pruesse et al., 2012) aligniert und in ARB importiert. Die Berechnung erfolgte mit PhyML. Die 16S rRNA Genesequenz von Typstämmen der Gattung *Macrococcus* wurde als „Outgroup“ verwendet. Isolate dieser Untersuchung sind fettgedruckt dargestellt. Bar: 010 Substitutionen pro Nukleotidposition.

Nachweis von VRE in Gärsubstraten und Gärresten

Nach spezifischer Voranreicherung für VRE wurde bis auf den Ausgang von BGA 1 und dem Eingang von BGA 10 bei allen Proben Wachstum auf dem CHROMagar VRE beobachtet. Von insgesamt 141 auf CHROMagar VRE gewachsenen Kolonien waren 14 Kolonien positiv bezüglich *vanA* und/ oder *vanC*₁. *VanB* wurde nicht detektiert. Ein positiver Nachweis von *vanA* erfolgte in einem Gärsubstrat (BGA 5) und in zwei Gärresten (BGA 2 und 4). *VanC*₁ wurde am häufigsten detektiert, *vanC*₁ wurde in zwei Gärsubstraten (BGA 6 und 8) und in vier Gärresten (BGA 4, 5, 6, und 9) nachgewiesen (**Abbildung 7**).

VRE	10 g		1 g		0,1 g			Resistenzgen
			a	b	a	b	c	
1E	+	+	+	+	+	+	+	n.d.
1A	-	-	-	-	-	-	-	n.d.
2E	+	+	+	+	+	+	+	n.d.
2A	+	+	+	+	2	+	+	<i>vanA</i>
3E	+	+	+	+	+	+	+	n.d.
3A	-	-	+	+	+	+	+	n.d.
4E	+	+	+	+	+	+	+	n.d.
4A	+	+	-	+	-	1	+	<i>vanA+vanC</i> ₁
5E	1	+	+	1(0)	+	+	+	<i>vanA</i>
5A	+	1	+	1	+	1	+	<i>vanC</i> ₁
6E	+	+	+	-	+	1(2)	+	<i>vanC</i> ₁
6A	+	+	1(0)	+	1(0)	+	+	<i>vanC</i> ₁
7E	+	+	+	+	+	+	+	n.d.
7A	+	+	+	+	+	+	+	n.d.
8E	+	+	+	+	1(0)	+	+	<i>vanC</i> ₁
8A	+	+	+	+	+	+	+	n.d.
9E	+	+	+	+	+	+	+	n.d.
9A	1(0)	1	+	-	+	-	-	<i>vanC</i> ₁
10E	-	-	-	-	-	-	-	n.d.
10A	+	+	+	+	+	+	+	n.d.

-	Kein Wachstum
+	Wachstum
1	Resistenzgennachweis: Anzahl positive Kolonien nach Vorscreening (Isolate mit Resistenzgenen nach Vereinzellung)

Abbildung 7 Überblick über Kolonien und Isolate (in Klammern dargestellt) mit positivem Resistenzgennachweis nach spezifischer Voranreicherung für *van*-Gen-tragende Enterokokken und Wachstum auf CHROMagar VRE.

Nicht alle *van*-Gen-Träger konnten isoliert und phylogenetisch identifiziert werden, nur aus zwei Gärsubstraten (BGA 5 und 6) und vier Gärresten (BGAs 2, 4, 5 und 9) war die Isolierung erfolgreich. Insgesamt wurden 11 *van*-Gen-tragende Isolate nach phylogenetischer Analyse als *Enterococcus* spp. identifiziert. Zwei Isolate (beide aus dem Gärrest von BGA 2) zeigten 99.7% 16S rRNA Gen-Sequenzidentität zu dem Typstamm von *E. faecium*. Bei beiden Isolaten wurde ein *vanA* nachgewiesen. Die

anderen Enterokokken Isolate hatten höchste 16S rRNA Gensequenzidentitäten (zwischen 99.5 und 100%) zu Typstämmen von *E. viikkiensis*/*E. pseudoavium*/*E. devriesei* (4 Isolate, zwei *vanA* und zwei *vanB* Träger), *E. casseliflavus* (4 Isolate, *vanC1* Träger), und *E. mundii* (*vanC1* Träger) (**Tabelle 3; Abbildung 8**). Isolate die statt *Enterococcus* spp. von den Kolonien mit positivem *van*-Gennachweis isoliert wurden, wurden als *Ochrobactrum* spp., *Pseudochrobactrum* spp., *Paenibacillus* spp. und *Staphylococcus* spp. identifiziert (**Tabelle 3**). Bis auf eine Ausnahme (*Paenibacillus* sp. H-VRE-66, positiver *vanA* und *vanB* Nachweis) wurden bei diesen Isolaten keine *van*-Gene nachgewiesen.

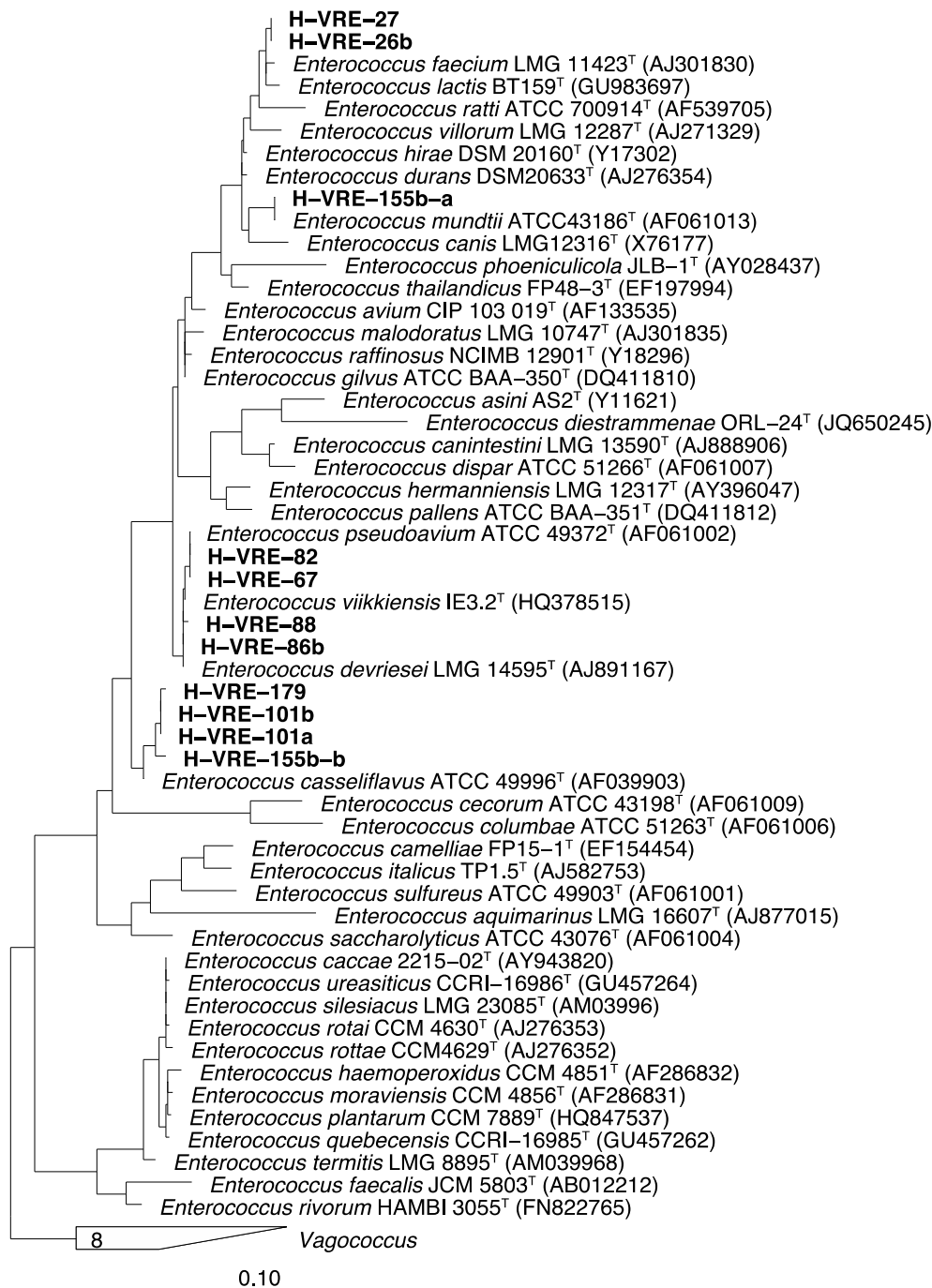


Abbildung 8 Phylogenetische Einordnung von VRE Isolaten innerhalb der Gattung *Enterococcus* dargestellt in einem „Maximum-Likelihood“ Baum basierend auf partiellen 16S rRNA Gensequenzen im Vergleich zu 16S rRNA Gensequenzen der Typstämme von *Enterococcus* Arten. Der phylogenetische Baum wurde in ARB (Ludwig et al., 2004) berechnet. Hierzu wurden die 16S rRNA Gensequenzen der Isolate in dem SINA online Alignment Tool Version 1.2.1.1 (Pruesse et al., 2012) „aligned“ und in ARB importiert. Die Berechnung erfolgte mit PhyML. Die 16S rRNA

Gensequenz von Typstämmen *mehrere Vagococcus* Arten wurden als „Outgroup“ verwendet. Isolate dieser Untersuchung sind fettgedruckt dargestellt. Bar: 0.01 Substitutionen pro Nukleotidposition.

Zusammenfassung: Multiresistente Mikroorganismen

Von 10 deutschen Biogasanlagen (BGAs) wurde je ein Gärsubstrat und ein Gärrest kultivierungsabhängig auf das Vorhandensein von multiresistenten Bakterien untersucht. Dabei lag der Schwerpunkt auf dem Nachweis von ESBL („Extended-spectrum-beta-lactamase) -tragenden *Enterobacteriaceae*, Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) und Vancomycin resistenten Enterokokken (VRE). Der Nachweis erfolgte aus 10 g, 1 g und 0,1 g der Originalproben unter Verwendung spezifischer Voranreicherungsverfahren mit anschließender Kultivierung auf den spezifischen Nährböden: CHROMagar ESBL, MRSA und VRE, die für den Nachweis dieser spezifischen Bakteriengruppen entwickelt wurden. Die gewachsenen Bakterienkolonien wurden dann mit molekularbiologischen Methoden auf das Vorhandensein der spezifischen Resistenzgene (Multiplex-PCR Systemefür ESBL nach *bla*CTX-M, *bla*TEM und *bla*SHV (Monstein et al., 2007), für MRSA nach *mecA* (Poulsen et al., 2003), und für VRE nach *vanA*, *vanB* und *vanC*₁ (Kariyama et al., 2000). Die Bezeichnungen *bla*CTX-M, *bla*TEM, *bla*SHV, *mecA*, *vanA*, *vanB* und *vanC*₁ stehen dabei für ganz spezifische Gene. Bei positivem Nachweis wurden dann aus den Bakterienkolonien Reinkulturen gewonnen und die Isolate dann identifiziert. Auch für die Identifizierung wurde eine molekularbiologische Methode verwendet, die darauf beruht, die Sequenz eines Gens (hier des 16S rRNA Gens) zu ermitteln und diese dann anhand von Vergleichen mit hinterlegten Sequenzen in Datenbanken zu identifizieren. Zusätzlich wurde noch eine Methode verwendet, die mit einem speziellen „genetischen Fingerabdruck“ (BOX-PCR „Fingerprintmethode“) eine noch genauere Typisierung der Bakterien ermöglicht.

Eine spezielle Gruppe antibiotikaresistenter Bakterien sind spezielle „Darmbakterien“ (*Enterobacteriaceae*), die Resistenzen (und zwar durch besondere Enzyme, die β -Lactamasen, ESBL) besonders gegenüber solchen Antibiotika aufweisen, die normalerweise die Zellwandbildung dieser Organismen hemmen und somit diese Organismen im Wachstum unterdrücken.

Nach spezifischer Voranreicherung für ESBL-tragende *Enterobacteriaceae* wurde bis auf zwei Gärrestproben (BGAs 1 und 9) Wachstum auf dem CHROMagar ESBL beobachtet. Insgesamt wurden 150 der gewachsenen Bakterienkolonien von den CHROMagar ESBL Ausstrichen auf das Vorkommen von Resistenzgenen untersucht. Der Resistenzgennachweis war bei 37 Kolonien positiv; diese stammten aus 5 Gärsubstraten (BGAs 2, 3, 4, 6 und 9) und vier Gärresten (BGAs 2, 4, 5 und 6). Es wurden 33 Isolate phylogenetisch identifiziert (nach Genotypisierung mittels einer BOX-PCR „Fingerprintmethode“). Dabei handelte es sich primär um *bla*CTX-M und/oder *bla*TEM-tragende Isolate, sowie einen *bla*SHV-Träger, die >99.8% 16S rRNA Gensequenzidentität zu *Escherichia coli* aufwiesen und um drei *bla*CTX-M-tragende Isolate, die als *Citrobacter* spp. identifiziert wurden.

Nach spezifischer Voranreicherung für MRSA wurde Wachstum bei allen Proben auf CHROMagar MRSA nachgewiesen. Insgesamt wurden 209 Kolonien von den CHROMagar MRSA Ausstrichen nach Resistenzgenen „gescreent“. Resistenzgene wurden nur bei 7 Kolonien detektiert, die alle aus zwei Gärsubstraten stammten (BGAs 8 und 9). Die Identifizierung ergab, dass es sich um *mecA*-tragende Staphylokokken handelte, die 99.7 – 100% 16S rRNA Gensequenzidentität zu den

Typstämmen von *Staphylococcus haemolyticus*, *S. cohnii* subsp. *urealyticus* und *S. lentus* aufwiesen. MRSA, d.h. Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* wurden nicht detektiert.

Nach spezifischer Voranreicherung für VRE (Vancomycin resistenten Enterokokken) wurde bis auf ein Gärsubstrat (BGA 10) und einen Gärrest (BGA 1) bei allen Proben Wachstum auf dem CHROMagar VRE beobachtet. Insgesamt wurden 141 Kolonien von CHROMagar VRE Ausstrichen nach Resistenzgenen gescreent. Der Resistenzgenachweis war bei 14 Kolonien positiv (*vanA* und *vanC₁*); diese stammten aus drei Gärsubstraten (BGA 5, 6 und 8) und fünf Gärresten (BGA 2, 4, 5, 6 und 9). Nicht alle *van*-Gen-Träger konnten isoliert und identifiziert werden, nur aus zwei Gärsubstraten (BGAs 5 und 6) und vier Gärresten (BGAs 2, 4, 5 und 9). Insgesamt wurden 11 *van*-Gen-tragende Enterokokken Isolate identifiziert wobei zwei Isolate (beide aus dem Gärrest von BGA 2) 99.7% 16S rRNA Gensequenzidentisch mit dem Typstamm von *E. faecium* Waren. Die anderen *Enterococcus* Isolate hatten höchste 16S rRNA Gensequenzidentität (zw. 99.5 und 100% zu Typstämmen von *E. viikkiensis*/*E. pseudoavium*/*E. devriesei*, *E. casseliflavus* und *E. mundii*).

Die Untersuchung zeigte, dass die multiresistenten Bakterien der ESBL („Extended-spectrum-beta-lactamase)-tragenden *Enterobacteriaceae*, und zwar hier spezifisch ESBL-*E. coli* sowohl in Gärsubstraten als auch in Gärresten auftreten. Gleiches, wenn auch nur bei einem geringeren Anteil der untersuchten Biogasanlagen gilt für Vancomycin resistente Enterokokken (VRE). In einem Gärrest wurden u.a. *vanA*-tragende *E. faecalis* Stämme detektiert (Die Artzuordnung erfolgte aufgrund der 16S rRNA Sequenzähnlichkeit). MRSA, d.h. Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* wurden weder in den Gärresten noch in den Gärsubstraten detektiert. In den Gärresten wurden in einigen Proben andere Staphylokokken detektiert, die zwar das *mecA*-Gen aufwiesen, aber nicht als *Staphylococcus aureus* identifiziert wurden. Eine hier nicht dargestellte kultivierungsunabhängige Untersuchung der Gärsubstrate und Gärresten zeigte, dass vereinzelt sowohl in den Gärsubstraten als auch Gärresten *mecA* Gene nachgewiesen werden konnten. Alle drei Gruppen resistenter Bakterien wurden somit nachgewiesen.

Die Ergebnisse zeigen keine Eliminierung aber auch keine Zunahmen dieser Bakteriengruppen durch den anaeroben Biogasprozess.

Schlussfolgerungen und Bewertung

Mit den Ergebnissen aus der vorliegenden Studie konnten erstmals an praxisüblichen Biogasanlagen belastbare Daten erhoben werden, aus denen Ein- und Austrag von Sulfonamiden bzw. Tetracyclinen und von multiresistenten Mikroorganismen beurteilt werden kann. Auffällig war dabei, dass von den insgesamt 10 getesteten Sulfonamiden nur Sulfadiazin in den Gärresten von zwei Anlagen nachgewiesen werden konnte. Dabei wurden Konzentrationen gemessen, die maximal das 2,5fache der Bestimmungsgrenze betragen. Bei den Tetracyclinen konnten positive quantitative Nachweise nur für Doxycyclin und Tetracyclin geführt werden und dies nur in solchen Anlagen, in denen Hühnertrockenkot eingesetzt wurde. In diesen Proben wurde das Doppelte der Bestimmungsgrenze in keinem Fall erreicht. Der ausschließliche Rückstandsnachweis in Gärresten ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass bei einer Verweilzeit der Gärsubstrate von durchschnittlich mehr als 60 Tagen die zeitgleich entnommenen Gärsubstrate kontaminationsfrei waren, in den Gärresten aber aus vorangegangenen Arzneimittel eintrag noch Rückstände nachweisbar waren..

Aus den erhobenen Befunden ist zu schließen, dass durch Gärreste zwar ein Austrag von antimikrobiellen Wirkstoffen in die Umwelt stattfinden kann, die Konzentrationen der messbaren Wirkstoffe aber in einem niedrigen Bereich liegen und dass in Anlagen, in denen kein Hühnertrockenkot eingesetzt wird, keine Tetracycline gefunden werden. Aus den im Rahmen dieser Studie durchgeführten Analyse ist kein Rückschluss möglich, ob es durch den Fermentationsprozess möglicherweise zur Degradation von Arzneimitteln kommen kann.

Im Zusammenhang mit dem Auftreten multiresistenter Mikroorganismen konnte gezeigt werden, dass unabhängig vom Anlagentyp multiresistente Mikroorganismen nachgewiesen werden konnten, dabei aber das Auftreten von MRSA als eher marginal zu beurteilen ist. Auszuschließen sind sowohl die Anreicherung als auch die Abreicherung multiresistenter Keime während des Fermentationsprozesses.

Literatur

Kariyama, R., Mitsuhashi R., Chow J. W., Clewell D. B. and Kumon H. (2000) Simple and Reliable Multiplex PCR Assay for Surveillance Isolates of Vancomycin-Resistant Enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3092-3095.

Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, et al. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acid Res* 32: 1363–1371.

Monstein, H.J., Östholm-Balkhed, A., Nilsson, N.V., Nilsson, M., Dornbusch. K. and Nilsson, L.E. (2007) Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in *Enterobacteriaceae*. *APMIS* 115: 1400-1408.

Poulsen, A.B., Skov, R., Pallesen, L.V. (2003): Detection of methicillin resistance in coagulase negative staphylococci and in staphylococci directly from simulated blood cultures using the EVIGENE MRSA Detection Kit. *J Antimicrob Chemother* 51: 419-421.

Pruesse, E., Peplies, J. and Glöckner, F.O. (2012) SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics*, 28: 1823-1829.

Spielmeier, A., Ahlborn J, Hamscher G (2014) Simultaneous determination of 14 sulfonamides and tetracyclines in biogas plants by liquid liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 406: 2513-2524.