

UMWELT & GESUNDHEIT

03/2022

Erarbeitung anspruchsvoller Standards für die mittelfristige Fortführung der bodenbezogenen Verwertung von Klärschlämmen aus Abwasserbehandlungs- anlagen mit kleiner Ausbaugröße

Abschlussbericht

UMWELT & GESUNDHEIT 03/2022

Ressortforschungsplan des Bundesministerium für Umwelt,
Naturschutz, nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz

Forschungskennzahl 3717 34 342 0

FB000493

Erarbeitung anspruchsvoller Standards für die mittelfristige Fortführung der bodenbezogenen Verwertung von Klärschlämmen aus Abwasserbehandlungsanlagen mit kleiner Ausbaugröße

Abschlussbericht

von

Dr. Birgit Wolters, Kristin Hauschild, Prof. Dr. Kornelia
Smalla,
Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Julius
Kühn-Institut (JKI) Bundesforschungsinstitut für
Kulturpflanzen, Messeweg 11-12, 38104 Braunschweig

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

Impressum

Herausgeber

Umweltbundesamt
Wörlitzer Platz 1
06844 Dessau-Roßlau
Tel: +49 340-2103-0
Fax: +49 340-2103-2285
buergerservice@uba.de
Internet: www.umweltbundesamt.de

 [/umweltbundesamt.de](https://www.facebook.com/umweltbundesamt.de)

 [/umweltbundesamt](https://twitter.com/umweltbundesamt)

Durchführung der Studie:

Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Julius Kühn-Institut (JKI)
Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
Messeweg 11-12
38104 Braunschweig

Abschlussdatum:

November 2019

Redaktion:

Fachgebiet III 2.5 Überwachungsverfahren, Abwasserentsorgung
Andrea Roskosch

Publikationen als pdf:

<http://www.umweltbundesamt.de/publikationen>

ISSN 1868-4340

Dessau-Roßlau, Mai 2022

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autorinnen und Autoren.

Kurzbeschreibung: Erarbeitung anspruchsvoller Standards für die mittelfristige Fortführung der bodenbezogenen Verwertung von Klärschlämmen aus Abwasserbehandlungsanlagen mit kleiner Ausbaugröße

Mit der bodenbezogenen Verwertung von Klärschlämmen als Dünger sind Risiken verbunden. Zum einen enthalten diese eine hohe Vielfalt an Bakterien (einschließlich Pathogenen), zum anderen sind sie mit einer Vielzahl an Schadstoffen verunreinigt, von denen einige Gruppen (z.B. Schwermetalle, Antibiotika und Desinfektionsmittel) selektiv auf Antibiotika-resistente Bakterien wirken. Da in Kläranlagen Bakterien aus unterschiedlichen Einspeisungsquellen unter hoher Nährstoffverfügbarkeit und in Gegenwart dieser selektiven Substanzen inkubiert werden, stellen Kläranlagen sogenannte „hotspots“ für horizontalen Gentransfer dar. Dieser Gentransfer erfolgt über mobile genetische Elemente, welche den Austausch von genetischem Material (einschließlich von Resistenzgenen) zwischen unterschiedlichen Bakterienarten ermöglichen. Entsprechend gelten Klärschlämme als eine der Haupteintragsrouten von Schadstoffen, Antibiotika-resistenten Bakterien, Antibiotika-Resistenzgenen und mobilen genetischen Elementen in den Boden.

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss der Konzentration von selektiven Substanzen in Klärschlämmen aus Abwasserbehandlungsanlagen kleiner bis mittlerer Ausbaugröße auf das Auftreten von Antibiotika-Resistenzgenen, mobilen genetischen Elementen und deren Übertragbarkeit auf andere Bakterien, sowie auf das Auftreten von Indikatorbakterien zu untersuchen. Desweiteren wurde das Schicksal von Resistenzgenen und mobilen genetischen Elementen nach Klärschlammasbringung in Bodenmikrokosmen untersucht. Basierend auf den Ergebnissen und der bestehenden Fachliteratur sollen möglichst Grenzwerte für die Konzentration an selektiven Schadstoffen in Klärschlämmen vorgeschlagen werden. Die Ergebnisse der Studie lassen erkennen, dass Klärschlämme aus kleinen Abwasserbehandlungsanlagen ähnlich stark mit Resistenzgenen, mobilen genetischen Elementen und selektiven Substanzen kontaminiert sind wie Klärschlämme aus großen Anlagen. Es ist nicht möglich, aus den gewonnenen Ergebnissen konkrete Grenzwerte für selektive Substanzen in Klärschlamm abzuleiten. Dennoch lassen sich insbesondere für Fluorochinolone, Doxycylin, Trimethoprim, Triclosan, Kupfer und Zink zahlreiche signifikante und positive Korrelationen zur Abundanz mit Resistenzgenen und mobilen genetischen Elementen feststellen. Diese Substanzen könnten sich als geeignete Kandidaten für die tiefere Erarbeitung von Grenzwerten in Klärschlamm dienen.

Abstract: Elaboration of demanding standards for the medium-term continuation of the soil-related utilisation of biosolids from small-scale sewage treatment plants

The soil-related utilization of biosolids as fertilizer inherits risks. On the one hand, these contain a high diversity of bacteria (including pathogens), on the other hand they are contaminated with a high diversity of pollutants, of which some groups (e.g. heavy metals, antibiotics and disinfectants) pose selective effects on antibiotic-resistant bacteria. As in sewage treatment plants bacteria of different sources are mixed and incubated under high nutrient availability in the presence of selective substances, sewage treatment plants are considered “hotspots” of horizontal gene transfer. This gene transfer takes place via mobile genetic elements, which allow for the exchange of genetic material (including antibiotic resistance genes) between different bacteria. Accordingly, biosolids are considered one of the main entrance routes for pollutants, antibiotic resistant bacteria, antibiotic resistance genes and mobile genetic elements into soil.

This study aimed to analyze the effects of the concentration of selective substances in biosolids on the abundance of antibiotic resistance genes, mobile genetic elements and their transferability to other bacteria, and on the detection of indicator bacteria. Further, the fate of

resistance genes and mobile genetic elements following biosolid application was analyzed in soil microcosms. Based on the results and the given literature, threshold values for selective substances should be proposed. The results of this study indicate that biosolids obtained from small-scale sewage treatment plants are contaminated to a similar content with resistance genes, mobile genetic elements and selective substances than biosolids from large-scale facilities. It is **not** possible to propose limit values for selective substances based on the gained results. Nevertheless, for fluoroquinolones, doxycycline, trimethoprim, triclosan, copper, and zinc many significant and positive correlations were revealed with the abundance of resistance genes and mobile genetic elements. These substances may thus prove as suitable candidates for the in-depth elaboration of limit values in biosolids.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	10
Tabellenverzeichnis	12
Abkürzungsverzeichnis.....	14
Zusammenfassung.....	16
Summary	22
1 Einleitung.....	27
1.1 Kurzbeschreibung des Forschungsvorhabens.....	27
1.2 Erkenntnisstand	27
2 Material & Methoden	31
2.1 Probenahme.....	31
2.2 Trockenmassebestimmung.....	31
2.3 Extraktion der Total Community (TC)-DNA.....	32
2.4 Quantifizierung von RGs und MGEs in TC-DNA via qPCR.....	32
2.5 Detektion Plasmid-spezifischer Sequenzen mittels PCR und Southern Blot-Hybridisierung	34
2.6 Mikrokosmos-Experimente.....	34
2.7 Exogene Plasmidisolierung aus Klärschlämmen	35
2.7.1 Charakterisierung der gefischten Plasmide	36
2.7.2 Transformation ausgewählter Plasmide in <i>E. coli</i> DH5 α	36
2.7.3 Erstellung von Antibiogrammen transformierter Plasmide	36
2.7.4 Charakterisierung der Plasmid-DNA aus dem Transkonjuganten I4.18 und dem Transformanten I4.18	37
2.7.5 PacBio-Sequenzierung der Plasmid-DNA aus dem Transkonjuganten I4.18 und dem Transformanten I4.18	37
2.8 Nachweis von coliformen Bakterien und Salmonellen	37
2.8.1 Direkter Nachweis coliformer Bakterien	37
2.8.2 Nachweis resistenter coliformer Bakterien nach Anreicherung.....	37
2.8.3 Nachweis von Salmonellen nach Anreicherung.....	38
2.9 Chemische Analyse der Klärschlämme auf Schwermetalle, Antibiotika und Desinfektionsmittel.....	38
2.10 Korrelation der Gen-Abundanz mit Konzentrationen an Schwermetallen, Antibiotika und Desinfektionsmitteln, sowie der Größe der Kläranlage und dem Vorhandensein einer Klinik oder Industrie im Einzugsgebiet.....	38
2.11 Analyse der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften in den Klärschlämmen via Illumina Sequenzierung von 16S Amplicons.....	38

3	Ergebnisse	40
3.1	Bestimmung der Trockenmasse.....	40
3.2	Extraktion TC-DNA	40
3.3	Quantifizierung von RGs und MGEs in TC-DNA aus Klärschlämmen	40
3.4	Detektion Plasmid-spezifischer Sequenzen in TC-DNA aus Klärschlämmen mittels PCR/Southern Blot Hybridisierung.....	43
3.5	Quantifizierung von RGs und MGEs in TC-DNA aus Bodenmikrokosmen.....	44
3.6	Exogene Plasmidisolierung	47
3.6.1	Charakterisierung der gefischten Plasmide	47
3.6.2	Erstellung von Antibiogrammen transformierter Plasmide	48
3.6.3	Charakterisierung der Plasmid-DNA aus dem Transkonjuganten I4.18 und dem Transformanten I4.18	50
3.6.4	PacBio-Sequenzierung der Plasmid-DNA aus dem Transkonjuganten I4.18 und dem Transformanten I4.18	52
3.7	Nachweis von coliformen Bakterien und Salmonellen	54
3.7.1	Direkter Nachweis coliformer Bakterien	54
3.7.2	Nachweis resistenter coliformer Bakterien nach Anreicherung.....	54
3.7.3	Nachweis von Salmonellen nach Anreicherung.....	54
3.8	Chemische Analysen	55
3.9	Korrelations- Analysen	59
3.10	Analyse der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften in den Klärschlämmen via Illumina Sequenzierung von 16S Amplicons.....	62
4	Diskussion.....	65
5	Quellenverzeichnis	72
A	Anhang	81
A.1	Bodenparameter Standardböden	81
A.2	Zahlenwerte Zielgenabundanz in Klärschlämmen bezogen auf Trockenmasse	82
A.3	Zahlenwerte Zielgenabundanz in Klärschlamm-Originalsubstanz	83
A.4	Eintragsmengen an selektiven Substanzen in die Bodenmikrokosmen	85
A.5	Konzentrationen der Schwermetalle, TCS und TCC in den Klärschlämmen bezogen auf die Trockenmasse	86
A.6	Konzentrationen der Schwermetalle, TCS und TCC in der Klärschlamm-Originalsubstanz [pro kg].....	87
A.7	Konzentrationen der Antibiotika in den Klärschlämmen bezogen auf die Trockenmasse ...	88
A.8	Errechnete Konzentrationen der Antibiotika und von Carbamazepin in der Klärschlamm-Originalsubstanz.....	89

A.9	Konzentrationen der Antibiotika in den separat analysierten wässrigen Überständen der Klärschlamm [ng/L]	90
A.10	Konzentrationen der QACs in den Klärschlämmen [$\mu\text{g}/\text{kg}$ Trockenmasse]	91
A.11	Ergebnisse der Korrelationsanalyse für die absolute Zielgenabundanz und potentiell selektiven Substanzen bezogen auf die Klärschlamm-Trockenmasse unter Berücksichtigung aller Klärschlämme	92
A.12	Ergebnisse der Korrelationsanalyse zwischen der absoluten Zielgenabundanz, potentiell selektiven Substanzen und der Anlagengröße bezogen auf die Klärschlamm-Originalsubstanz unter Berücksichtigung der flüssigen Klärschlämme	95
A.13	Ergebnisse der Korrelationsanalyse zwischen der absoluten Zielgenabundanz und den QAC-Konzentrationen unter Berücksichtigung der flüssigen Klärschlämme.....	97
A.14	Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften in den Klärschlämmen (Illumina Sequenzierung von 16S Ampicons).....	98

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Logarithmierte Werte und Standardabweichungen der absoluten Genabundanz von <i>rrn</i> und MGE (bezogen auf kg Trockenmasse) in Klärschlammproben	41
Abbildung 2:	Logarithmierte Werte und Standardabweichungen der absoluten Genabundanz von RGs (bezogen auf kg Trockenmasse) in Klärschlammproben	42
Abbildung 3:	Logarithmierte Werte und Standardabweichungen der absoluten Genabundanz von Tetrazyklin-RGs (bezogen auf kg Trockenmasse) in Klärschlammproben	43
Abbildung 4:	Absolute Abundanz 16S und MGEs (logarithmierte Mittelwerte und Standardabweichungen) pro g in den Bodenmikrokosmen zu unterschiedlichen Probenahmezeitpunkten (n=4).	45
Abbildung 5:	Absolute Abundanz RGs (logarithmierte Mittelwerte und Standardabweichungen) pro g in den Bodenmikrokosmen zu unterschiedlichen Probenahmezeitpunkten (n=4).	46
Abbildung 6:	Gelelektrophoretische Auftrennung der isolierten Plasmid-DNA aus dem Transkonjuganten I4.18, dem Transformanten I4.18 und dem Standard-Plasmid RN3 (IncN).....	50
Abbildung 7:	Ergebnis der IncN-spezifischen PCR für Plasmid-DNA isoliert aus dem Transkonjuganten I4.18 und dem Transformanten I4.18.....	51
Abbildung 8:	Restriktionsverdau der Plasmid-DNA, isoliert aus dem Transkonjuganten I4.18 und dem Transformanten I4.18	51
Abbildung 9:	Assemblierung des IncN Plasmids pI4.18 aus dem Transkonjuganten I4.18.....	52
Abbildung 10:	Sequenz-Vergleich der Plasmide pI4.18 und R46.....	53
Abbildung 11:	Vergleich der Insertionssequenz aus pI4.18 mit In37 aus pSHS2 und In1 aus R46 (A) sowie der Promotorsequenzen der Integrongenkastten auf den Plasmiden pB8, pSHS2, pI4.18, R46 und R751 (B).	53
Abbildung 12:	Schwermetall-Konzentrationen [mg] in den Klärschlämmen pro kg Trockenmasse	56
Abbildung 13:	Konzentrationen an TCS und TCC [mg/kg Trockenmasse] in den Klärschlämmen	57
Abbildung 14:	Konzentrationen Fluorochinolon-Antibiotika [µg] in den Klärschlämmen pro kg Trockenmasse	58
Abbildung 15:	Konzentrationen von Nicht-Fluorochinolon-Antibiotika [µg] in den Klärschlämmen pro kg Trockenmasse.....	58
Abbildung 16:	Summierte Konzentrationen von QAC-Gruppen in den Klärschlämmen pro kg Trockenmasse	59

Abbildung 17:	Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften in den Klärschlämmen auf dem Klasse-Level.	64
Abbildung 18:	Eintragsmengen an potentiell selektiven Substanzen in die Bodenmikrokosmen [pro kg Boden].....	85

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Informationen zu den beprobten Kläranlagen (KA)	31
Tabelle 2:	Primer, TaqMan-Sonden und Referenzen der genutzten qPCR assays.....	32
Tabelle 3:	Primersysteme, Amplicon-Größe, Bedingungen und Referenzen der genutzten PCR assays.....	34
Tabelle 4:	Bestimmte Trockenmassen der analysierten Klärschlämme ...	40
Tabelle 5:	Nachweis von Plasmid-spezifischen Sequenzen in TC-DNA aus Klärschlämmen mittels PCR/Southern Blot-Hybridisierung	44
Tabelle 6:	Anzahl Transkonjuganten aus den unterschiedlichen Klärschlämmen	47
Tabelle 7:	Charakterisierung Transkonjuganten	48
Tabelle 8:	Auswertungsschema Antibiogramme (Durchmesser der Hemmhöfe in mm)	49
Tabelle 9:	Ergebnisse Antibiogramme transformierter Plasmide	49
Tabelle 10:	Logarithmierte CFU counts coliformer Bakterien und Detektion Colistin-resistenter Bakterien aus den Klärschlämmen	54
Tabelle 11:	Korrelationskoeffizienten nach Pearson zwischen absoluter Genabundanz und Antibiotika-Konzentrationen in den Klärschlämmen pro Trockenmasse-Einheit	60
Tabelle 12:	Korrelationskoeffizienten nach Pearson zwischen absoluter Genabundanz und Schwermetall- sowie TCS-Konzentrationen in den Klärschlämmen pro Trockenmasse-Einheit und der Ausbaugröße der Anlagen	61
Tabelle 13:	Bodenparameter der in den Mikrokosmen verwendeten Standardböden (Quelle: LUFA Speyer).....	81
Tabelle 14:	Absolute Abundanz der Zielgene in den Klärschlämmen [pro kg Trockenmasse]. Gelistet sind die logarithmierten Mittelwerte und Standardabweichungen.	82
Tabelle 15:	Absolute Abundanz der Zielgene in der Klärschlamm-Originalsubstanz [pro kg]. Gelistet sind die logarithmierten Mittelwerte und Standardabweichungen (n.q.: nicht quantifizierbar).	83
Tabelle 16:	Konzentrationen an Schwermetallen, TCS und TCC in den Klärschlämmen [mg/kg Trockenmasse].	86
Tabelle 17:	Konzentrationen an Schwermetallen, TCS und TCC in der Klärschlamm-Originalsubstanz [mg/kg].	87
Tabelle 18:	Konzentrationen an Antibiotika und Carbamazepin in den Klärschlämmen [µg/kg Trockenmasse].	88
Tabelle 19:	Errechnete Konzentrationen an Antibiotika und Carbamazepin in der Klärschlamm-Originalsubstanz [µg/kg].	89

Tabelle 20:	Konzentrationen der Antibiotika in den separat analysierten wässrigen Klärschlamm-Überständen [ng/L].	90
Tabelle 21:	Konzentrationen der QACs in den Klärschlämmen [µg/kg].....	91
Tabelle 22:	Korrelationskoeffizienten für die absolute Zielgenabundanz und potentiell selektive Substanzen (bezogen auf Trockenmasse) und Anlagengröße [EW] unter Berücksichtigung aller Klärschlämme.	93
Tabelle 23:	Korrelationskoeffizienten zwischen absoluter Zielgenabundanz, potentiell selektiven Substanzen (in der Klärschlamm-Originalsubstanz) und Anlagengröße [EW] unter Berücksichtigung der flüssigen Klärschlämme.	95
Tabelle 24:	Korrelationskoeffizienten zwischen absoluter Zielgenabundanz und QAC-Konzentrationen unter Berücksichtigung der flüssigen Klärschlämme.	97
Tabelle 25:	Relative Abundanz [MW und STABW in %] der dominanten mikrobiellen Phyla und Klassen in den Klärschlämmen.	99
Tabelle 26 (Fortsetzung Tabelle 25):	Relative Abundanz [MW und STABW in %] der dominanten mikrobiellen Phyla und Klassen in den Klärschlämmen	101

Abkürzungsverzeichnis

AMP	Ampicillin
AZI	Azithromycin
CARB	Carbamazepin
CEF	Cefuroxim
CFU	Colony Forming Unit
CHL	Chloramphenicol
CIP	Ciprofloxacin
CLAR	Clarithromycin
CLIN/CLINSO	Clindamycin/Clindamycinsulfoxid
COL	Colistin
CTX	Cefotaxim
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxynukleinsäure)
DOXY	Doxyzyklin
EW	Einwohner-Gleichwert
g	Normale Erdbeschleunigung
KA	Kläranlage
LB	Luria Bertani Medium
LEVO	Levofloxacin
LOG	Logarithmus
MGE	Mobiles Genetisches Element
OFL	Ofloxacin
PCA	Plate Count Agar
QAC	Quaternäre Ammoniumverbindung
RG	Resistenz-Gen
ROX	Roxithromycin
SDZ	Sulfadiazin
SMX	Sulfamethoxazol
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
STR	Streptomycin
rpm	Rotations Per Minute
TC	Total Community (-DNA)
TCC	Triclocarban
TCS	Triclosan
TET	Tetrazyklin
TMP	Trimethoprim
TSB	Tryptic Soy Broth
VAN	Vancomycin

Zusammenfassung

Im Oktober 2017 trat die Novellierung der Klärschlammverordnung aus dem Jahre 1992 in Kraft (AbfKlärV, 2017). Dieser Novellierung zufolge ist „Anstelle einer Phosphorrückgewinnung... die derzeit praktizierte bodenbezogene Verwertung ab dem Jahr 2029 nur noch von Klärschlämmen aus Abwasserbehandlungsanlagen mit einer Ausbaugröße von bis zu 100.000 Einwohnerwerten und ab dem Jahr 2032 nur noch von Klärschlämmen aus Anlagen mit einer Ausbaugröße von bis zu 50.000 Einwohnerwerten zulässig. Dies trägt den Besonderheiten ländlich geprägter Regionen Rechnung (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit, 2017)“. Der vorhergesehene Zeitrahmen für diese Umstellung ist somit abhängig von der Ausbaugröße der Kläranlagen. Entsprechend müssen Anlagen, deren Kapazität über 100.000 Einwohnergleichwerte (EW) beträgt, diese Umstellung innerhalb der nächsten 12 Jahre vollziehen, und Anlagen, die eine Ausbaugröße über 50.000 EW aufweisen, innerhalb der nächsten 15 Jahre. Bislang ausgenommen von dieser Regelung sind Klärschlämme, die aus Anlagen stammen, deren Ausbaugröße kleiner als 50.000 EW ist. Diese Klärschlämme dürfen, unter Einhaltung der bisherigen Regelungen für Grenzwerte, auch über diesen zeitlichen Rahmen hinaus bodenbezogen als Dünger verwendet werden.

Vor dem Hintergrund der zunehmenden Problematik des Auftretens von Antibiotika-Resistenzen im klinischen Kontext, rückt die Umwelt als wichtiges Reservoir für Antibiotika-Resistenzgene (RGs) mehr und mehr ins Blickfeld der Forschung. Hierbei wurde Klärschlamm als eine der Haupteintragsrouten von menschlicher Seite für eine Vielzahl chemischer Substanzen und RGs in die Umwelt identifiziert (Rizzo et al., 2013; Verlicchi & Zambello, 2015). Ebenso wurden Kläranlagen als „hotspots“ für horizontalen Gentransfer zwischen Bakterien erkannt (Zhang et al., 2011; Su et al., 2015; Jacquiod et al., 2017). Ziel des vorliegenden Forschungsberichtes war es, einen ersten Überblick über die Belastung von Klärschlämmen aus Abwasserbehandlungsanlagen mit kleiner Ausbaugröße mit potentiell selektiven Substanzen (Schwermetalle, Antibiotika und Desinfektionsmittel), RGs und mobilen genetischen Elementen (MGEs) zu gewinnen. Durch Korrelationsanalysen sollten eventuelle Zusammenhänge zwischen der Häufigkeit von RGs, MGEs und den vorliegenden Konzentrationen an potentiell selektiven Substanzen aufgedeckt werden. Entsprechende Korrelationen könnten ggf. als Grundlage für Empfehlungen von Grenzwerten für die jeweiligen Substanzen herangezogen werden. Als direkter Vergleich wurden auch zwei Kläranlagen in das Projekt aufgenommen, die größer als 50.000 EW sind. Zusätzlich sollte das Schicksal von RGs und MGEs, die mit Klärschlamm in Böden eingetragen werden, untersucht werden.

Da insbesondere solche RGs für die Verbreitung von Resistenzen in der Umwelt (und weiter in den klinischen Kontext) relevant sind, die zwischen unterschiedlichen Bakterien ausgetauscht werden können, wurde neben der Häufigkeit von RGs, außerdem das Auftreten und die Häufigkeit von MGEs als wichtiger Indikator für potentiellen horizontalen Gentransfer untersucht. Hierzu zählen unter anderem Plasmide, welche ringförmige oder lineare, autonom vom Chromosom replizierende DNA-Moleküle sind, die, unter Umständen, RGs tragen können. Einige Plasmidgruppen können zwischen Bakterien ausgetauscht werden. Hier gilt es die „selbst-transferablen (konjugativen)“ Plasmide von den sogenannten „mobilisierbaren“ zu unterscheiden. Während die konjugativen Plasmide die notwendige Maschinerie für ihre Übertragung von einer Zelle in die nächste selbst bereitstellen, sind mobilisierbare Plasmide darauf angewiesen, dass eine passende Maschinerie durch ein anderes, konjugatives Helfer-Plasmid zur Verfügung gestellt wird. Ein weiteres wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen Plasmiden bzw. Plasmidgruppen ist deren Wirtsbereich. Einige Plasmidgruppen besitzen einen sehr breiten Wirtsbereich (sogenannte broad host range Plasmide) und können unter Bakterien aus unterschiedlichen taxonomischen Klassen ausgetauscht werden. Andere Plasmidgruppen

weisen einen sehr engen Wirtsbereich auf (sogenannte narrow host range Plasmide) und können lediglich unter eng verwandten Bakterien (z. B. unterschiedlichen Arten derselben Gattung) ausgetauscht werden. Weitere genetische Elemente, die wichtig im Zusammenhang mit der Ausbreitung von Resistenzen sind, sind die Integrons, die, lokalisiert auf übertragbaren Plasmiden oder konjugativen genetischen Elementen, auch zwischen Bakterienzellen übertragen werden können. Integrons stellen funktionell gesehen Austauschplattformen auf der DNA dar für Genkassetten, die häufig für Antibiotika-Resistenzen kodieren. In Integrons können zahlreiche RG angesammelt, exprimiert und ebenso wieder ausgebaut werden (Stokes & Hall, 1989; Boucher et al., 2007).

Im Rahmen dieses Projektes wurde sowohl die Häufigkeit von RGs als auch die von MGEs in den Klärschlämmen quantitativ erfasst. Hierzu wurde zunächst die Gesamt-DNA aus den Proben mit einer harschen Lyse (unter Nutzung mechanischer Scherkräfte und chemischer Lyse) extrahiert. Anschließend wurde die Abundanz von RGs und MGEs in den DNAs mittels quantitativer real-time PCR (qPCR) ermittelt. Mit wenigen Ausnahmen wurden die meisten der Zielgene in allen Klärschlämmen detektiert. Hierbei zeigte sich, dass bezogen auf den Trockenmassegehalt, die Klärschlämme aus kleinen Abwasserbehandlungsanlagen nicht weniger mit RGs und MGEs belastet waren als die Klärschlämme aus größeren Anlagen. Eine Ausnahme waren die zwei RGs, *sul2* und *strA*, die in höherer Abundanz im Klärschlamm aus der größten Anlage dieses Projektes nachgewiesen wurden. Auffällig war, dass die Abundanz von IncP-1 Plasmiden (sehr breiter Wirtsbereich (Shintani et al., 2014)) deutlich niedriger in entwässerten, als in flüssigen Klärschlämmen war. Hingegen konnte das Integrasegen für Klasse 2 Integrons ausschließlich in den entwässerten Klärschlämmen nachgewiesen werden. Ebenso auffällig war die Beobachtung, dass die niedrigste Abundanz für zahlreiche RGs in Klärschlämmen auftrat, die der Verbrennung zugeführt werden mussten (entweder aus Seuchenschutzgründen oder aufgrund der Überschreitung von gesetzlichen Grenzwerten). Es wurden außerdem einige weitere Plasmidgruppen, die für ihr Auftreten in organischen Düngemitteln bekannt sind, für die aber keine geeigneten qPCR-Methoden zur Verfügung stehen, in die Untersuchungen mit einbezogen. Diese Plasmidgruppen wurden semiquantitativ mit Hilfe von PCR/Southern Blot-Hybridisierung in der TC-DNA erfasst. Hierdurch konnte eine hohe Abundanz an PromA Plasmiden in allen Klärschlämmen detektiert werden. Typischerweise tragen PromA Plasmide selbst keine RGs (Zhang et al., 2014a; Yanagiya et al., 2018). Da sie aber in der Lage sind, andere Plasmide zu mobilisieren und einen breiten Wirtsbereich haben, können sie zu der Verbreitung von RGs die auf anderen Plasmiden liegen, beitragen (Zhang et al., 2014a). Desweiteren konnten in den meisten Klärschlämmen zusätzlich IncN Plasmide nachgewiesen werden. Diese Plasmide spielen eine wichtige Rolle im klinischen Kontext (Zhang et al., 2014b), wurden bereits in anderen organischen Düngemitteln nachgewiesen (Binh et al., 2008; Wolters et al., 2016a) und sind mit einer Vielzahl an RGs assoziiert (Gonzales-Zorn et al., 2005; Eikmeyer et al., 2012). Zusätzlich wurden in einzelnen Klärschlämmen IncW Plasmide gefunden, die ebenfalls aus der Klinik (Zhang et al., 2014b) und anderen organischen Düngemitteln bekannt sind (Binh et al., 2008; Wolters et al., 2016a) und mit Antibiotika-Resistenzen in Verbindung stehen (Revilla et al., 2008).

Da rein DNA-basierte Methoden den Nachteil haben, dass sie keine Angaben über die Funktionalität der nachgewiesenen Zielgene und deren genetischen Kontext liefern (z.B. Erfassung von DNA aus toten Bakterien, oder nicht exprimierten Genen), wurde zusätzlich eine exogene Plasmidisolierung mit den Klärschlämmen durchgeführt. Diese Methode erlaubt es, transferable Plasmide welche (im Fall dieser Studie) für Antibiotika-Resistenzen kodieren, aus den Klärschlämmen in einen *Escherichia coli* (*E. coli*)-Laborstamm (CV601*gfp*) als Rezipienten zu übertragen. Dieser Rezipient verfügt selbst über zwei Antibiotika-Resistenzen (Kanamycin und Rifampicin) und ist zusätzlich mit dem Gen für das grün fluoreszierenden Protein markiert,

was eine Identifizierung der Kolonien des Rezipienten unter UV-Licht gestattet. Bei der exogenen Plasmidisolierung wird dieser Rezipientenstamm zusammen mit Klärschlamm-Bakterien auf einem Mating-Filter inkubiert, wodurch eine Übertragung vom konjugativen Plasmiden aus den Klärschlamm-Bakterien auf den Rezipienten ermöglicht wird. Anschließend wird der Mating-Ansatz auf Agarplatten, die mit Kanamycin, Rifampicin und einem weiteren Antibiotikum (hier Sulfadiazin oder Tetrazyklin) versetzt sind, ausplattiert. Auf diesen Platten können anschließend nur Bakterien wachsen, die sowohl resistent gegen Kanamycin, Rifampicin als auch Sulfadiazin bzw. Tetrazyklin sind. Theoretisch sollten auf diesen Platten also nur Rezipientenzellen wachsen, die durch die Aufnahme eines entsprechenden Plasmids ein RG gegen das zusätzliche Antibiotikum erworben haben (sogenannte Transkonjuganten). Diese Methode verläuft nur erfolgreich, wenn die entsprechenden RGs funktionsfähig und im Rezipienten exprimierbar sind. Auf diese Weise konnten bis auf eine Ausnahme aus allen Klärschlämmen transferable Plasmide in *E. coli* „gefischt“ werden. Erschwerend für die Auswertung der exogenen Plasmidisolierung war, dass ein starkes Hintergrund-Wachstum von multiresistenten Klärschlamm-Bakterien zu beobachten war. Hierdurch konnten keine zuverlässigen Transferraten ermittelt werden. Die gefischten Plasmide wurden via qPCR und PCR/Southern Blot-Hybridisierung charakterisiert. Eine Auswahl dieser Plasmide wurde in einen *E. coli* DH5 α -Stamm transformiert, der selbst keinerlei RGs beherbergt. Anschließend wurden mit den gewonnenen *E. coli*-Transformanten Antibiogramme erstellt um die von den unterschiedlichen Plasmiden vermittelten Resistenz-Muster zu vergleichen. Von den 23 erfolgreich transformierten Plasmiden wurden 19 unterschiedliche Resistenz-Muster vermittelt. Ein Plasmid, welches für besonders viele (neun von 11) getestete Antibiotika-Resistenzen kodierte, wurde zur Sequenzierung mit PacBio eingeschickt.

Zusätzlich zur Analyse von RGs und MGEs wurde auch das Vorkommen von Indikator-Bakterien in den Klärschlämmen untersucht. Neben coliformen Bakterien und Salmonellen wurden hierbei auch Colistin-resistente coliforme Bakterien berücksichtigt. Während mit der angewandten Methodik in keiner Probe Salmonellen nachgewiesen wurden, enthielten alle Proben coliforme Bakterien. Zusätzlich wurden in allen Proben coliforme Bakterien nachgewiesen, die resistent gegen das Reserve-Antibiotikum Colistin waren.

Die chemischen Analysen der Klärschlämme auf Schwermetalle, Antibiotika und die potentiell selektiv auf Antibiotika-RGs wirkenden Desinfektionsmittel (Triclosan, Triclocarban und die Gruppe der quaternären Ammoniumverbindungen (QACs)) wurden als Auftrag an entsprechende externe Labore vergeben. Die Konzentrationen der Schwermetalle lagen mit einer einzigen Ausnahme in allen Klärschlämmen dieser Studie unterhalb der gesetzlichen Grenzwerte. Lediglich der Cadmium-Wert im Klärschlamm, der während einer von zwei Probenahmen aus der größten Abwasserbehandlungsanlage dieser Studie beprobt wurde, lag leicht oberhalb des zulässigen Grenzwertes. Für die meisten Schwermetalle ließ sich feststellen, dass deren Konzentrationen bezogen auf die Trockenmasse am höchsten in den entwässerten Klärschlämmen waren. Ebenso ließ sich zumeist eine erhöhte Konzentration in den Klärschlämmen beobachten, die aus Anlagen stammten, die eine Klinik im Einzugsbereich haben. Auch die Konzentration des Desinfektionsmittels Triclosan war in den entwässerten Klärschlämmen im Vergleich zu den flüssigen erhöht, während Triclocarban ausschließlich in den entwässerten Klärschlämmen detektierbar war. In allen Klärschlämmen wurden Antibiotika nachgewiesen. Hierbei lagen vor allem die Konzentrationen an Fluorochinolonen besonders hoch mit Werten von 212 μg bis 2,49 mg pro kg Trockenmasse für Levofloxacin und 576 μg bis 6,75 mg pro kg Trockenmasse für Ciprofloxacin. Auch weitere Antibiotika konnten in allen Klärschlämmen detektiert werden, wenn auch in deutlich niedrigerer Konzentration, zum Beispiel das Tetrazyklin Doxzyzyklin und die Makrolide Azithromycin, Roxithromycin, Clarithromycin. Zusätzlich konnten Lincosamide (Clindamycin), Sulfonamide (Sulfamethoxazol),

Trimethoprim und Vancomycin in einzelnen Klärschlämmen nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu konnten keine Penicilline, Cephalosporine oder Erythromycin im Rahmen dieser Studie detektiert werden.

Da sich bei der Auswertung der Abundanz der einzelnen Zielgene und der Konzentration von Zielsubstanzen bereits deutlich abzeichnete, dass die Beschaffenheit des Klärschlamm (entwässert oder flüssig) ein wesentlicher Faktor ist, wurden die Korrelationsanalysen auf die 10 flüssigen Klärschlämme beschränkt, um eine möglichen Verzerrung der Ergebnisse zu vermeiden. Da die erlaubte Auftragungsmenge von Klärschlamm pro Hektar unter anderem über die Trockenmasse festgelegt ist, wurden die auf die Trockenmasse bezogenen Werte der jeweiligen Genabundanz und Substanzkonzentrationen in die Korrelationsanalyse eingebracht. Hierbei zeichnete sich ab, dass vor allem die Korrelationskoeffizienten zwischen Zink und Kupfer mit den meisten Zielgenen positiv waren. Insbesondere für Zink waren viele dieser Korrelationen zusätzlich signifikant (p : 0,05-0,001). Ein Zusammenhang zwischen Kupfer- und Zink-Konzentrationen mit der Abundanz von RGs bestätigt bereits zuvor in der Literatur beschriebene Befunde für Boden (Knapp et al., 2011; Song et al., 2017). Hingegen waren die Korrelationskoeffizienten der Schwermetalle Arsen, Cadmium und Chrom mit den meisten Zielgenen negativ. Ähnlich wie Zink und Kupfer war auch die Konzentration von Triclosan positiv mit der Abundanz der allermeisten Zielgene korreliert, und viele dieser Korrelationen waren außerdem signifikant (p : 0,05-0,001). Unter den Antibiotika waren vor allem die Konzentrationen an Ciprofloxacin, Levofloxacin, Doxzyklin und Trimethoprim mit den meisten Zielgenen positiv (und in den allermeisten Fällen signifikant) korreliert. Interessanterweise waren die Korrelationskoeffizienten zwischen der Auslastungsgröße der Abwasserbehandlungsanlagen und der Abundanz der meisten Zielgene negativ (und zumeist signifikant). Hierdurch wurde die Beobachtung bestätigt, dass bei der Auswertung der qPCR-Ergebnisse, die Klärschlämme aus den kleineren Abwasserbehandlungsanlagen bezogen auf den Trockenmassegehalt nicht weniger mit RGs und MGEs kontaminiert waren als die Klärschlämme aus größeren Anlagen. Zusätzlich zu der Korrelationsanalyse, die auf den auf die Trockenmasse bezogenen Werten basierte, wurde eine Analyse durchgeführt, die auf den tatsächlich vorliegenden Konzentrationen bzw. Abundanz in der Originalsubstanz der Klärschlämme beruhte. Bei dieser Analyse wurden noch mehr positive Korrelationen zwischen den Konzentrationen potentiell selektiver Substanzen und Zielgenen als bei der Trockenmasse-basierten Analyse gefunden. Dies unterstreicht das Selektionspotential, das von den entsprechenden Substanzen ausgeht, auf Bakterien, die die entsprechenden Zielgene tragen.

Im Hinblick auf eine mögliche Übertragung aus der landwirtschaftlichen Umwelt auf den Menschen (bzw. die Klinik) ist, neben dem Vorkommen von Bakterien mit RGs und MGEs in Klärschlämmen, vor allem deren Schicksal nach Ausbringung auf den Boden von hoher Wichtigkeit. Aus diesem Grund wurde das Vorkommen von RGs und MGEs in Böden, die mit Klärschlamm gedüngt wurden, über einen zeitlichen Rahmen von 112 Tagen mittels qPCR untersucht. Um eine höchstmögliche Reproduzierbarkeit zu gewährleisten und möglichst viele Parameter über den gesamten Versuchszeitraum konstant halten zu können, wurden für diese Aufgabe Bodenmikrokosmen als Methode gewählt. Hierzu wurden zwei Standardböden von der LUFÄ Speyer bezogen (Boden 2.1: schluffiger Sandboden, Boden 2.4: toniger Lehm), die mit jeweils drei unterschiedlichen Klärschlämmen aus diesem Projekt in praxisüblicher Menge gedüngt wurden. Als Kontrollen dienten Mikrokosmen, die mit mineralischem (NPK-) Dünger oder Wasser behandelt wurden. Alle untersuchten RGs und MGEs waren ausschließlich in den Bodenmikrokosmen detektierbar, die mit Klärschlamm behandelt wurden. Der bloße Eintrag von Nährstoffen, wie mit den NPK-Kontrollen simuliert, führte nicht dazu, dass resistente Bodenbakterien proliferierten, bzw. nicht dazu, dass diese eine Abundanz erreichten, die oberhalb der Quantifizierungsgrenze der hier verwendeten Methoden lag. Das einzige Zielgen,

das ebenfalls in den Kontroll-Mikrokosmen nachgewiesen werden konnte, war *rrn*, welches in allen Bakterien vorliegt und deshalb als Richtwert für die Anzahl an Bakterien in einer Probe herangezogen werden kann. Die Abundanz dieses Gens war zu Beginn des Versuches (Tag 0) in den Bodenmikrokosmen, die Klärschlamm enthielten deutlich höher als in den Kontrollmikrokosmen, was auf einen Eintrag von Bakterien mit den Klärschlämmen bzw. Wachstum von Bodenbakterien zurückzuführen ist. Nach 56 bis 112 Tagen konnte kein Unterschied mehr für die Abundanz von *rrn* zwischen den Böden aus den Mikrokosmen mit oder ohne Klärschlamm beobachtet werden. Die MGEs IncP-1ε (*trfA*) und Klasse 1 Integrons (*intI1*) wiesen eine höhere Abundanz pro g Boden in Mikrokosmen auf, die mit flüssigem Klärschlamm behandelt wurden, als in solchen, die entwässerten Klärschlamm erhielten. Während *intI1* nach 56 Tagen nicht mehr in den Böden nachweisbar war, konnte *trfA* zu diesem Zeitpunkt noch in Mikrokosmen, die mit flüssigem Klärschlamm gedüngt wurden, detektiert werden. Die einzigen beiden Gene, die bis zum Ende des Versuches (112 Tage) in beiden Bodentypen nachweisbar waren, waren das Sulfonamid-RG *sul1* und das QAC-RG *qacE/qacEA1*. Unterschiede zwischen den beiden Bodentypen konnten für *sul2* und *qacE/qacEA1* festgestellt werden. Während *sul2* an Tag 56 nicht mehr im Sandboden nachgewiesen konnte, wurde es in Lehm Boden noch am letzten Probenahmezeitpunkt detektiert. Die Abundanz des Gens *qacE/qacEA1* lag im Sandboden nach 112 Tagen lediglich in den Mikrokosmen, die den Klärschlamm „I“ enthielten oberhalb der Nachweisgrenze, im Lehm Boden konnte das Gen zu diesem Zeitpunkt noch in allen Mikrokosmen, die mit Klärschlämmen behandelt wurden, nachgewiesen werden. Das Tetrazyklin-RG *tet(M)* konnte in allen Mikrokosmen, die mit Klärschlamm behandelt wurden, bis zu Tag 14 nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu wurde das Gen *tet(W)* ausschließlich in Mikrokosmen nachgewiesen, die flüssigen Klärschlamm enthielten, und konnte in beiden Bodentypen bis 56 Tage nach Versuchsbeginn quantifiziert werden. Die beiden Tetrazyklin-RG *tet(A)* und *tet(Q)* wurden nur an Tag 0 und ausschließlich in Mikrokosmen, die mit flüssigem Klärschlamm behandelt wurden, detektiert. Nicht nachgewiesen wurden in den Mikrokosmen Klasse 2 Integrons (*intI2*) und *tetA(P)*. Die generelle Beobachtung, dass die Abundanz aller detektierten RGs und MGEs, die mit den Klärschlamm-Bakterien in die Böden eingetragen wurden, über die Zeit abnahm, und oft zum Ende des Versuchs unterhalb der Quantifizierungsgrenze lag, bestätigt bisherige Erkenntnisse über die Effekte organischer Düngung auf das Resistom im Boden (Wolters et al., 2018). Es wird vermutet, dass Bakterien, die in organischen Düngemitteln vorhanden sind, sich nur schlecht an die Bedingungen in ihrer neuen Umwelt (Boden) adaptieren können, und deshalb absterben, bzw. deutlich in ihrer Abundanz abnehmen (Hammesfahr et al. 2008; Heuer et al., 2008; Sandberg & LaPara, 2016). Bei wiederholtem Eintrag organischer Dünger kommt es aber zu einem erhöhten Hintergrund an RGs, MGEs und Antibiotika in landwirtschaftlich genutzten Böden (Wolters et al., 2019). Es gilt zu bedenken, dass diese Studie mit 12 teilnehmenden Abwasserbehandlungsanlagen in einem relativ kleinen Rahmen durchgeführt wurde. Desweiteren können für bestimmte Parameter saisonale Schwankungen auftreten (Martin et al., 2012), die hier nicht berücksichtigt werden konnten, da alle Kläranlagen im Frühjahr 2018 beprobt wurden. Dennoch legen die Ergebnisse dieser Studie nahe, dass die Belastung von Klärschlämmen, die aus Abwasserbehandlungsanlagen mit kleiner Ausbaugröße stammen, mit selektiven Substanzen, RGs und MGEs (bezogen auf ihren Trockenmassegehalt) vergleichbar ist mit der Belastung von Klärschlämmen aus großen Kläranlagen. Als wichtiger Faktor für diese Belastung scheint neben z.B. der Strukturierung des Einzugsgebietes (Klinik, Industrie) vor allem die Beschaffenheit des Klärschlammes eine wichtige Rolle zu spielen. Den unterschiedlichen Kläranlagen stehen unterschiedliche Behandlungsmöglichkeiten für das bezogene Abwasser und die anfallenden Klärschlämme zur Verfügung, und die Retentionszeiten in den Anlagen unterscheiden sich. Somit ist die bloße Ausbaugröße einer Kläranlage nicht geeignet, um auf die Belastung des

jeweiligen Klärschlamms mit RGs oder MGEs zu schließen. Neben der Quantifizierung von Antibiotika-RGs und MGEs unterstreicht ebenso die Tatsache, dass in allen Klärschlämmen multiresistente Bakterien und Colistin-resistente coliforme Bakterien enthalten waren, die Rolle von Klärschlamm als wichtiger Quelle und Eintragsroute von Resistenzen in die Umwelt und potentiell Humanpathogenen. Zudem verdeutlicht die erfolgreiche Isolierung von transferablen Multiresistenz-Plasmiden aus nahezu allen Klärschlämmen in diesem Projekt das Übertragungspotential von Antibiotika-RGs aus Klärschlamm Bakterien auf andere Bakterien. Auch wenn die Überdauerungszeit von RGs und MGEs, die mit Klärschlamm in die Bodenmikrokosmen eingebracht werden, begrenzt scheint, lässt sich nicht ausschließen, dass ein Austausch zwischen Klärschlamm- und Bodenbakterien stattfindet. Ebenfalls ist denkbar, dass einige Klärschlamm Bakterien (z.B. Sporenbildner) in sehr niedriger Abundanz auch nach längerer Zeit noch vorhanden sind, aber unterhalb der Detektionsgrenze liegen. Unter geeigneten Umständen könnten solche Bakterien erneut proliferieren. Die chemischen Analysen zeigten, dass Klärschlämme aus kleinen Abwasserbehandlungsanlagen vergleichbar mit potentiell selektiven Substanzen belastet sind wie Klärschlämme großer Anlagen und teilweise wurden positive signifikante Korrelationen erfasst. Dennoch sind die entsprechenden Korrelationswerte nicht stark genug um basierend hierauf Vorschläge für entsprechende Grenzwerte zu unterbreiten. Außerdem gilt es zu bedenken, dass auch weitere Substanzen für die Abundanz der Zielgene, wie z.B. andere Antibiotika, Metalle oder Desinfektionsmittel anderer Klassen relevant sein könnten. Ebenso sind die Aussagen auf die untersuchten Zielgene beschränkt.

Um weitergehende Erkenntnisse bezüglich des Einflusses der Klärschlamm beschaffenheit auf die Belastung mit RGs, MGEs und selektiven Substanzen zu gewinnen, wären umfangreichere Untersuchungen nötig, in denen der Klärschlamm aus mehreren Abwasserbehandlungsanlagen vor und nach der Entwässerung verglichen wird. Hierbei wäre es sinnvoll, auch Proben der Kläranlagen-Abläufe und des Schlammwassers zu untersuchen, um evtl. Hinweise darauf zu gewinnen, wo die RGs, MGEs und selektiven Substanzen verbleiben, bzw. ob und wo sie evtl. in ihrer Abundanz reduziert oder degradiert werden.

Summary

With the amendment of the German sewage sludge regulation coming into force by 2017, the soil-related use of biosolids as organic fertilizer will be prohibited within the following years. Instead, biosolids will be subjected to the recovering of phosphorus. The timeframe anticipated for this changeover will depend on the size of the waste water treatment plant. Accordingly, waste water treatment plants with a size larger than 100,000 population equivalents (PEs) have to carry out this changeover within the next 12 years, and those with a size larger than 50,000 PEs within the next 15 years. Up to now, biosolids obtained from waste water treatment plants smaller than 50,000 PEs are excepted from this regulation. These biosolids may, subjected to already pre-existing regulations for limit values, also furtheron be applied as soil fertilizer.

Against the background of the increasing problem of the occurrence of antibiotic resistances in clinical context, the role of the environment as an important reservoir of antibiotic resistance genes (RGs) comes more and more into the focus of research. Thereby, biosolids were identified as one of the main anthropogenic input routes of a variety of chemical substances and RGs into the environment (Rizzo et al., 2013; Verlicchi & Zambello, 2015). Also waste water treatment plants were recognized as “hotspots” for horizontal gene transfer (Zhang et al., 2011; Su et al., 2015; Jacquiod et al., 2017). The aim of the present research report was to gain a first overview over the contamination of biosolids obtained from small-scale waste water treatment plants with potentially selective compounds (heavy metals, antibiotics and disinfectants), RGs and mobile genetic elements (MGEs). By performing correlation analysis, possible relations between the abundance of RGs and MGEs with the concentrations of potentially selective compounds should be revealed. Respective correlations might possibly serve as a basis for the recommendation of limit values for the respective compounds in biosolids. For direct comparison, also two waste water treatment plants with a size larger than 50,000 PEs were included in this project. Additionally, the fate of bacteria hosting RGs and MGEs introduced into soil via biosolids should be investigated.

As especially those RGs are relevant for the dissemination of resistances within the environment (and further into clinical settings), that can be exchanged between different bacteria, next to the abundance of RGs, also the occurrence and abundance of MGEs was investigated as an important indicator of potential horizontal gene transfer. This includes (amongst others) plasmids, that are autonomously replicating linear or circular DNA-molecules that can often carry antibiotic RGs. Some plasmid groups may be exchanged between bacteria. Here it is valid to distinguish the “self-transmissible (conjugative)” plasmids from so-called “mobilizable” plasmids. While conjugative plasmids are equipped with the whole machinery necessary for their transfer from one cell into another, mobilizable plasmids rely on the presence of a suitable machinery provided by another, conjugative helper plasmid for their transfer. Another important distinctive feature of plasmids or plasmid groups is their host range. Some plasmid groups (broad host range plasmids) have a very wide host range and can be exchanged among bacteria belonging to different phyla. Other plasmid groups show a very narrow host range (narrow host range plasmids, restricting their transfer and replication to very closely related bacteria (e.g. different species of the same genus). Further genetic elements that play an important role in the dissemination of resistances are integrons carried on plasmids or conjugative transposons or integrated conjugative elements. These are from a functional point of view DNA -localised exchange platforms for gene cassettes, which often code for antibiotic resistances. In integrons, numerous RGs may be accumulated, expressed and also excised (Stokes & Hall, 1989; Boucher et al., 2007).

Within the frame of this project the abundance of RGs as well as of MGEs within the biosolids was cultivation-independently quantified. For this purpose, at first the total community (TC) DNA was extracted from the samples after a harsh cell lysis (applying mechanical shearing forces and chemical lysis). Subsequently, the abundance of RGs and MGEs within the DNAs were determined via quantitative real-time PCR (qPCR). With few exceptions, most target genes were detected in all biosolids. Thereby it was shown, that related to dry mass content, biosolids from small-scale waste water treatment plants were not less contaminated with RGs or MGEs than biosolids from large-scale waste water treatment plants. Two exceptions were the RGs *sul2* and *strA* that were observed in the highest abundance in biosolids obtained from the largest waste water treatment plant of this project. Strikingly, the abundance of IncP-1 ϵ plasmids (broad host range; (Shintani et al., 2014)) per unit dry matter was significantly lower in dewatered biosolids than in liquid biosolids. In contrast, the integrase gene typical of class 2 integrons (*intI2*) was detected exclusively in dewatered biosolids. Another striking observation was that the highest abundance of numerous RGs occurred in biosolids destined for incineration (for the sake of pest control or due to exceeding limit values). Moreover, few additional plasmid groups, that were previously reported in organic fertilizers but for which suitable qPCR assays were lacking, were included in the present investigations. Those plasmid groups were semi-quantitatively detected by PCR and subsequent Southern blot-hybridization. Thus, a high abundance of PromA plasmids was detected in all biosolids. Typically, PromA plasmids themselves do not carry any accessory genes such as RGs (Zhang et al., 2014a; Yanagiya et al., 2018). But, due to their broad host range and their ability to mobilize other plasmids, they may contribute to the spread of RGs localized on other plasmids (Zhang et al., 2014a). In addition, IncN plasmids were detected in most biosolids. This plasmid group plays an important role within clinical settings (Zhang et al., 2014b) and was detected in organic fertilizers (Binh et al., 2008; Wolters et al., 2016a), and is associated with a variety of RGs (Gonzales-Zorn et al., 2005; Eikmeyer et al., 2012). Further, IncW plasmids were detected in individual biosolid samples, which are as well known from the clinic (Zhang et al., 2014b) and organic fertilizers (Binh et al., 2008; Wolters et al., 2016a), and are also related with RGs (Revilla et al., 2008).

As solely DNA-based methods suffer from the disadvantage that no information about the functionality of the target genes (e.g. detection of DNA from dead bacteria or non-expressed genes) or the genetic context are gained, in addition exogenous plasmid isolation was performed with bacteria from biosolids as plasmid donor. This method enables the transfer of conjugative plasmids carrying (in this study) antibiotic RGs from biosolid bacteria to an *Escherichia coli* (*E. coli*)-laboratory strain (CV601*gfp*) as recipient. The recipient itself carries two antibiotic resistances (kanamycin and rifampicin) and is additionally marked with the *gfp* gene coding for green fluorescent protein, which allows the identification of recipient colonies under UV-light. During exogenous plasmid isolation, this recipient strain is incubated together with biosolids on a mating filter, which enables the transfer of conjugative plasmids from biosolid bacteria to the recipient. Subsequently the mating mix is plated onto agar plates supplemented with kanamycin, rifampicin and an additional antibiotic (in this case tetracycline or sulfadiazine). On these plates only recipient bacteria should grow, that are resistant toward kanamycin, rifampicin as well as toward tetracycline or sulfadiazine. Thus, in theory only recipient cells should grow, that became resistant toward the additional antibiotic by taking up a plasmid carrying the respective RG (so-called transconjugants). This method is only successful, if the respective RGs are functional and can be expressed within the recipient. By this means, transferable plasmids were captured from all but one biosolid into *E. coli*. Aggravating for the evaluation of the exogenous plasmid isolation was the fact, that a strong background growth of multiresistant bacteria from the biosolids occurred on the agar plates. Although the transconjugants could be identified by their *gfp*-tag, nevertheless background growth made the determination of reliable transfer frequencies

impossible. The captured plasmids were characterized via qPCR and PCR-Southern blot hybridization. A selection of these plasmids was transformed via electroporation into an *E. coli* DH5 α strain devoid of any RGs. Subsequently, antibiograms of the gained transformants were determined via disc diffusion assays, to compare the resistance patterns conferred by the different plasmids. By this means, 19 different resistance patterns were observed among the 23 successfully transformed plasmids. One particular plasmid, that coded for especially many antibiotic resistances (nine of 11 tested) was sent for sequencing via PacBio.

Further to the investigation of RGs and MGEs, also the presence of indicator bacteria within the biosolids was analyzed. Here, next to coliform bacteria and Salmonella, also colistin-resistant coliform bacteria were considered. While the applied methodology did not detect salmonella in any biosolid, all samples contained coliform bacteria. Besides, all biosolids harbored coliform bacteria that were resistant toward the last resort-antibiotic colistin.

The chemical analyses of the biosolids for contents of heavy metals, antibiotics and disinfectants that potentially act selectively on bacteria carrying antibiotic RGs (triclosan, triclocarban and the group of quaternary ammonium compounds (QACs)) were determined in external laboratories. With one exception, all heavy metal concentrations determined for the biosolids of this study were below the given legal limit values. Only in one case, the cadmium-value of a biosolid sample obtained at one of two sampling times from the largest waste water treatment plant of this study, was slightly higher than the allowed threshold value. For the majority of heavy metals it was observed, that the respective concentration related to the dry matter content of the samples, was higher in dewatered biosolids as compared to liquid biosolids. Further, often a higher concentration was found for biosolids obtained from waste water treatment plants harboring a hospital within their catchment area. Alike, the concentration of triclosan (related to dry matter content) was higher in dewatered biosolids, while triclocarban was exclusively detected in dewatered samples. In all biosolids as well antibiotics were detected. Among these, in particular the concentrations determined for the fluoroquinolones were especially high with values ranging from 212 μg to 2.49 mg per kg dry matter for levofloxacin and 576 μg to 6.75 mg per kg dry matter for ciprofloxacin. Also, further antibiotics were detected in all biosolid samples, although at lower concentrations, such as the tetracycline doxycycline and the macrolides roxithromycin, azithromycin and clarithromycin. In addition, lincosamides (clindamycin), sulfonamides (sulfamethoxazole), trimethoprim and vancomycin were detected in individual biosolids. In contrast, no penicillins, cephalosporins or erythromycin were detected within the frame of this study.

The evaluation of the abundance of the individual target genes and the determination of the concentrations of target compounds already indicated the state of the biosolids (dewatered/liquid) as a relevant factor. Thus, to avoid any bias of the results, the two dewatered biosolids were excluded from the correlation analysis which was performed based on the results of the remaining 10 liquid biosolids. As the allowed maximum application rate of biosolids per hectare is defined (amongst other parameters) via the dry matter input, the target gene abundance and compound concentrations per unit dry matter were subjected to the performed Pearson correlation analysis. Here it was noted, that especially the correlation coefficients between **zinc and copper and most of the target genes were positive**. Particularly for zinc many of these correlations were as well significant (p : 0.05-0.001). A correlation between copper- and zinc- concentrations with the abundance of certain RGs was previously described for soils (Knapp et al., 2011; Song et al., 2017). On the contrary, the correlation coefficients between the heavy metals arsenic, cadmium and chromium with most target genes were negative. Similarly to zinc and copper, also the correlation coefficients between triclosan and the target genes were in most cases positive and often also significant (p : 0.05-0.001). Among the

antibiotics, especially the concentrations of ciprofloxacin, levofloxacin, doxycyclin and trimethoprim were positively correlated to most target genes and often these relations were as well significant. Interestingly, the correlation coefficients of the majority of target genes with the sizes of the waste water treatment plants were negative (and in most instances significant). This confirms the observation, that via evaluation of the qPCR data (related to dry matter content), biosolids from small-scale waste water treatment plants were **not less** contaminated with RGs and MGEs than biosolids from large-scale plants. Besides the described correlation analysis based on dry matter-related values, also an analysis was performed that relied on the actual concentrations and gene abundance in the original biosolid substances. Here, even more positive correlations between concentrations of potentially selective compounds and target genes were revealed. This confirms the potential selective pressure that these substances pose on the target genes.

In view of a potential dissemination from the agricultural environment to humans (or clinical settings), in addition to the mere presence and abundance of RGs and MGEs in total community DNA from biosolids, especially their fate after application to soil is important. For this reason, the abundance of RGs and MGEs in soils fertilized with biosolids was followed over a time frame of 112 days via qPCR. To allow for a high reproducibility and the opportunity to keep as many parameters as possible constant over time, soil microcosms were established for this task. For this purpose, two different well characterized standard soils were obtained from the Lufa Speyer (soil 2.1: silty sand, soil 2.4: clayey loam), which were fertilized with three different biosolids (according to the commonly in agricultural practice applied amount) of this study. As controls served microcosms that were treated with mineral (NPK-) fertilizer or tap water. All analyzed RGs and MGEs were exclusively detected in soil samples from microcosms that were treated with biosolids. The mere input of nutrients, as simulated by the NPK-controls, did not lead to the proliferation of soil indigenous resistant bacteria (hosting the respective target genes), or rather not to a sufficiently strong growth to be quantified by the applied methods. The only target gene that was as well detected in the soil from the control microcosms was *rrn*, which is present in all bacteria and thus serves as a proxy for the number of bacterial cells within a sample. At the beginning of the experiment (day 0), the abundance of this gene was significantly higher in soil from microcosms treated with biosolids as compared to controls, due to the input of biosolid bacteria or bacterial growth in response to the nutrients added. After 56 and 112 days of incubation, no such difference for the abundance of *rrn* between microcosms applied with biosolids or the controls was observed. The MGEs IncP-1 ϵ (*trfA*) and class 1 integrons (*intI1*) showed a higher abundance (per g soil) in soils from microcosms that received liquid biosolids than those treated with dewatered biosolids. While *intI1* could not be detected in the soils after 56 days of incubation, *trfA* was still detectable at this sampling time in microcosms treated with liquid biosolids. The only two target genes, that were still detectable within both soil types by the end of the experiment (112 days), were the sulfonamide RG *sul1* and the QAC RG *qacE/qacE Δ 1*. Differences according to soil type could be detected for *sul2* and *qacE/qacE Δ 1*. While *sul2* was not detected in the silty sand after 56 days, it was quantifiable in clayey loam until the last sampling date (112 days). The abundance of *qacE/qacE Δ 1* in silty sand at day 112 was only above the detection limit within microcosms treated with biosolids "J", while in clayey loam it was still detected in all soil samples from biosolid-applied microcosms at this time point. The tetracycline RG *tet(M)* was detected in soils treated with biosolids until day 14. In contrast, the target gene *tet(W)* was exclusively detected in microcosms that received liquid biosolids and was quantifiable in both soil types up to 56 days of incubation. The tetracycline RGs *tet(A)* and *tet(Q)* were both only detected at day 0 and only in microcosms treated with liquid biosolids. Not detected within any microcosm were the target genes *intI2* and *tetA(P)*. The general observation, that the abundance of all detected RGs and MGEs, introduced into soil via

biosolids, decreased over time and often dropped below the detection limit by the end of the experiment, confirms previously described effects of organic fertilization on the soil resistome (Wolters et al., 2019). It is assumed, that bacteria resident in organic fertilizers, can only poorly adapt to the conditions prevailing in their new environment (soil), and thus, die or decrease significantly in abundance (Hammesfahr et al. 2008; Heuer et al., 2008; Sandberg & LaPara, 2016).

It should be noted, that the present study, with 12 participating waste water treatment plants, was performed within a rather small frame. Furthermore, for some parameters seasonal fluctuations may occur (Martin et al., 2012), that could not be taken into account here, as all waste water treatment plants were sampled in spring 2018. Nevertheless, the results of this study indicate, that the contamination of biosolids obtained from small-scale waste water treatment plants with selective compounds, RGs and MGEs (related to dry matter content) is comparable to that of biosolids from larger facilities. An important factor playing a role for the level of contamination next to the structure of the catchment area (e.g. hospital, industry,...) appears to be the state of the biosolids (liquid, dewatered). The different waste water treatment plants are equipped with different treatment methods for the incoming waste water and the remaining biosolids, and also the retention times within the facilities differ. Given that, the mere size of a waste water treatment plant is not suitable to conclude on the contamination of respective biosolids with RGs and MGEs. Next to the quantification of antibiotic RGs and MGEs, also the fact that multiresistant bacteria and colistin-resistant coliform bacteria were present in all biosolids, underlines the role of biosolids as an important reservoir for and input route of resistances into the environment. Furthermore, the successful isolation of transferable multiresistance plasmids from almost all biosolids of the current project illustrates the transfer potential of antibiotic RGs from biosolid bacteria to other bacteria (in worst case pathogens). Even if the persistence of RGs and MGEs introduced into soil-microcosms via biosolids appears to be limited, it can't be excluded, that an exchange of genetic material occurs between soil bacteria and biosolid bacteria. Also it is conceivable that some biosolid bacteria (e.g. sporeforming bacteria) persist at a very low abundance within soil, but are below the detection level. Under certain, suitable circumstances, such bacteria might proliferate again. The chemical analyses showed, that biosolids obtained from small-scale waste water treatment plants were not less contaminated with potentially selective compounds than biosolids obtained from large facilities and partially, positive significant correlations were revealed. However, the respective correlation coefficients are not strong enough to serve as a basis for the proposal of any legal limit values. Moreover, it has to be taken into account that also the concentrations of further compounds may prove relevant for the abundance of target genes, such as other antibiotics, metals or other disinfectant classes. As well, gained information is limited to the target genes considered in this study.

To gain further insights into the impact of the biosolid state on its contamination with RGs, MGEs and selective compounds, more extensive investigations would be necessary, in which biosolids of several waste water treatment plants before and after the dewatering process are compared. Here it would be reasonable to analyse as well samples of the waste water treatment plant outflow and the water- phase of the biosolids, to gain insights on the disposition of the RGs, MGEs and selective substances, and on a potential reduction or degradation, respectively.

1 Einleitung

1.1 Kurzbeschreibung des Forschungsvorhabens

Durch das zunehmende Auftreten von Infektionen mit multiresistenten Keimen wird der erfolgreiche Einsatz von Antibiotika in der Human- und Veterinärmedizin in Frage gestellt. Daher ist es dringend erforderlich zu untersuchen, inwiefern transferable Antibiotika-Resistenzgene (RGs) von Umweltbakterien zu dieser Problematik beitragen und entsprechende mögliche Verbreitungswege zu identifizieren. Im Zuge der Düngung landwirtschaftlicher Böden mit Klärschlamm werden resistente Bakterien und Antibiotika RGs in die Böden eingebracht. Oftmals sind diese RGs auf sogenannten mobilen genetischen Elementen (MGEs) lokalisiert (z. B. Plasmiden, Integrons) und können zwischen unterschiedlichen Bakterien ausgetauscht werden. Zeitgleich werden auch die im Klärschlamm enthaltenen Schadstoffe in den Boden eingetragen. Einige dieser Stoffe, wie z. B. Schwermetalle, Antibiotika und einige Desinfektionsmittel, können selektiv auf resistente Bakterien wirken (durch direkte Selektion oder via Ko-Selektion) und so deren Anteil in der gesamten Bakterienpopulation erhöhen (Baker-Austin et al., 2006; Gullberg et al., 2014; Kim et al., 2014; Pal et al., 2015).

Im Hinblick auf eine mögliche Risikobewertung ist es daher äußerst wichtig, die Konzentration von Antibiotika, Schwermetallen und entsprechenden Desinfektionsmitteln (Triclosan (TCS), Triclocarban (TCC) und quaternäre Ammoniumverbindungen (QACs)), sowie das Vorkommen von RGs und MGEs in Klärschlämmen zu analysieren. Hierbei gilt ein besonderes Interesse den transferablen RGs, welche auf MGEs lokalisiert sind und über Artgrenzen hinweg zwischen Bakterien ausgetauscht werden können.

Während laut der neuen Klärschlammverordnung von 2017 (AbfKlärV, 2017) die landwirtschaftliche Nutzung von Klärschlämmen aus Kläranlagen mit einer Ausbaugröße > 50.000 Einwohner-Gleichwert (EW) ab 2032 bzw. ab > 100.000 EW ab 2019 untersagt ist, besteht für Kläranlagen kleinerer Ausbaugröße auch über diesen Zeitpunkt hinaus die Möglichkeit, den anfallenden Klärschlamm bodenbezogen zu verwerten. Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens soll deshalb anhand einer Literaturrecherche und der mikrobiologischen und chemischen Analyse von Klärschlämmen aus Kläranlagen kleiner Ausbaugröße (<= 50.000 EW) das Ausmaß des Eintrags von RGs, MGEs und selektiven Substanzen in den Boden erfasst werden. Zusätzlich wird mit Hilfe von Mikrokosmos-Experimenten das Schicksal von RGs und MGEs, die mit Klärschlamm in Boden eingebracht werden, untersucht. Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen sollen Qualitätskriterien bezüglich des Gehalts an Schwermetallen, Antibiotika und Desinfektionsmitteln, für Klärschlämme, welche Anwendung als Dünger in der Landwirtschaft finden, vorgeschlagen werden.

1.2 Erkenntnisstand

Das Gesundheitssystem wird unter anderem durch die fortschreitende Ausbreitung von Antibiotika-resistenten Bakterien in der Umwelt gefährdet (WHO, 2018). So könnten in absehbarer Zukunft bereits marginale Verletzungen und derzeit noch unkomplizierte Routine-Operationen im Falle einer Infektion mit drastischen Risiken wie erhöhter Morbidität und Mortalität verbunden sein. Deshalb ist es von höchster Relevanz, anthropogene Beiträge zu dieser Entwicklung so weit wie möglich zu reduzieren. Laut Clarke & Smith (2011) sind Klärschlämme eine der wichtigsten Eintragsrouten von Antibiotika und anderen Arzneimitteln in die Umwelt. Gleichzeitig ist Klärschlamm eines der reichhaltigsten Reservoirs an Antibiotika-resistenten Bakterien und Antibiotika-RGs (Ma et al., 2011; Calero-Cáceres et al., 2014; Bondarczuk et al., 2016; Wolters et al., 2019).

In Abwasserbehandlungsanlagen werden, je nach Einzugsgebiet, Bakterien aus unterschiedlichen Quellen miteinander gemischt. Durch die Tatsache, dass im Abwasser ein diverses Angebot an Nährstoffen für diese Bakterien bereitsteht, werden deren metabolische Aktivität und ihr genetischer Austausch untereinander gefördert. Zusätzlich enthalten Abwässer eine Vielzahl an potentiell selektiv wirkenden Substanzen (Antibiotika, Schwermetalle, Desinfektionsmittel), welche den Anteil resistenter Bakterien an der Gesamtpopulation der Bakterien erhöhen, und teilweise auch den horizontalen Gentransfer (HGT) unter Bakterien fördern können. Dementsprechend werden Kläranlagen als „hotspots“ für HGT betrachtet (Rizzo et al., 2013; Jacquiod et al., 2017) und es besteht die Möglichkeit der Ausbreitung von resistenten Bakterien, RGs und MGEs im Abwasser und in den anfallenden Klärschlämmen (Kim et al., 2014; Pal et al., 2015). Bislang wurde schon eine Vielzahl an Plasmiden aus unterschiedlichen Inkompatibilitätsgruppen (IncA/C, IncF, IncI, IncM, IncN, IncP-1, IncP-6, IncQ, IncU, IncW, IncX3) und eine noch höhere Anzahl an Antibiotika-RGs in Klärschlämmen detektiert (Szczepanowski et al., 2004; Schlüter et al., 2007; Akiyama et al., 2010; Eikmeyer et al., 2012; Dropa et al., 2016; Yao et al., 2017; Wolters et al., 2019). Ein besonderes Augenmerk bezüglich einer möglichen Resistenzübertragung gilt hier den Plasmidgruppen, die ein breites Wirtsspektrum aufweisen, wie z. B. IncP-1 Plasmide (welche über einen außerordentlich effektiven Transfermechanismus verfügen) und IncQ Plasmide, deren Wirtsspektrum sowohl Gram-positive als auch negative Bakterien einschließt (Rawlings & Tietze; 2001; Shintani et al., 2014; Klümper et al., 2015). Im Hinblick auf eine potentielle Übertragung von RGs auf pathogene Bakterien ist es außerdem erwähnenswert, dass einige der in Klärschlamm detektierten Plasmidgruppen bereits im klinischen Kontext in Erscheinung treten und hier Resistenzen gegen diverse Antibiotika-Klassen vermitteln können (Datta et al., 1971; Zhang et al., 2014). Eine weitere Klasse von genetischen Elementen (obwohl nicht mobil per se, dennoch aufgrund ihrer häufigen Lokalisierung auf größeren MGEs, zu den MGEs gezählt) die häufig in Klärschlämmen nachgewiesen wurde (Ma et al., 2011; Liu et al., 2012; Burch et al., 2013; Wolters et al., 2019), und die mit der Verbreitung von RGs insbesondere unter Gram-negativen Pathogenen in Verbindung gebracht wird (Gillings, 2014), sind die Integrons. Integrons sind funktionelle Plattformen auf der DNA, die es ermöglichen, Genkassetten einzubauen, anzusammeln und zu exprimieren (Stokes & Hall, 1989). In den meisten Fällen kodieren die genannten Genkassetten für RGs. Da vor allem das Integrasegen von klinischer Klasse 1 Integrons hochkonserviert ist und weil Klasse 1 Integrons unter anderem mit diversen RGs assoziiert sind, ist dieses Gen ein vielversprechender Kandidat als Indikatorgen für anthropogene Verunreinigungen (Gillings et al., 2015). In der Total Community (TC-) DNA von Klärschlammproben, die wöchentlich aus einer Kläranlage in Buenos Aires genommen wurden, wurden über den gesamten Probezeitraum von drei Jahren mittels quantitativer real time PCR IncP-1 Plasmide (*korB*), Klasse 1 Integrons (*intI1*) und das QAC RG *qacE/qacEΔ1* detektiert (unveröffentlicht). Dies weist auf eine kontinuierliche Kontamination des Klärschlammes mit diesen genetischen Elementen hin.

Böden stellen ein natürliches und besonders reichhaltiges Reservoir an Antibiotika-synthetisierenden Bakterien und an Antibiotika-RGs dar (D'Costa et al. 2006). Mit Klärschlamm als Dünger werden neben Nährstoffen zusätzlich Antibiotika-resistente Bakterien und deren RGs und MGEs in die Böden eingebracht. So konnte eine erhöhte Abundanz an RGs in Böden beobachtet werden, die über längere Zeit mit Klärschlamm gedüngt wurden (Xie et al., 2016; Chen et al., 2016). Unabhängig hiervon legen zahlreiche Studien nahe, dass der Effekt einzelner Klärschlamm-Ausbringungen auf das Vorkommen von RGs und Antibiotika-resistenten Bakterien im Boden von vorübergehender Natur ist (Rahube et al., 2014; Lau et al., 2017; Wolters et al., 2018 & 2019). Ähnliche Effekte sind ebenfalls für die organische Düngung mit Gülle und Biogas-Gärresten bekannt (Heuer et al., 2011a; Nolvak et al., 2016; Wolters et al.,

2018). Hierbei wurde bereits ein Zusammenhang zwischen der Zunahme an RGs und MGEs im Boden mit dem gleichzeitigen Eintrag von Antibiotika und organischem Dünger (Heuer & Smalla, 2007; Heuer et al., 2011b) und einer vorausgegangenen Behandlung der Tiere mit Antibiotika postuliert (Kopmann et al., 2013; Jechalke et al., 2013a, 2014a). Nichtsdestotrotz ist bislang nicht abschließend geklärt, ob die Zunahme an resistenten Bakterien und RGs in den gedüngten Böden auf den Eintrag via Klärschlamm zurückzuführen ist, oder ob die parallele Nährstoffzufuhr zu einer Proliferation der resistenten Bodenbakterien führt (Udikovic-Kolic; 2014; Hu et al., 2016a).

Neben RGs und MGEs werden durch Klärschlamm außerdem Antibiotika in den Boden eingetragen (Golet et al., 2003; Yang et al., 2018). Hier hängt deren weiteres Schicksal nicht nur maßgeblich von der jeweiligen Stoffklasse ab (z. B. sind die Halbwertszeiten für Fluorochinolone im Boden wesentlich länger als von Sulfonamiden), sondern auch von weiteren Parametern wie dem pH-Wert des Bodens, der Bodenfeuchtigkeit, der Temperatur, der Bodentextur oder dem vorhandenen Pflanzenbewuchs (Heuer et al., 2011a; Jechalke et al., 2014b). Bezüglich der selektiv wirkenden Desinfektionsmittel ist das Schicksal von QACs im Boden bislang kaum untersucht worden (Mulder et al., 2018). Hingegen haben sich bereits einige Studien mit dem Verbleib von TCS und TCC im Boden beschäftigt und Klärschlämme einerseits als eine Eintrittspforte beschrieben (Lozano et al., 2010, 2017; Chen et al., 2014) und andererseits festgestellt, dass diese die Bioverfügbarkeit vermutlich durch Sorptionsprozesse von TCS im Boden deutlich herabsetzen (Fu et al., 2016). Auch Schwermetalle werden mit Klärschlamm in den Boden eingebracht, wo sie im Gegensatz zu Antibiotika und Desinfektionsmitteln nicht mit der Zeit abgebaut, sondern akkumuliert werden (Wuana & Okieimen; 2011; Yang et al., 2014). Für die Mehrzahl der Schwermetalle wurde in Abhängigkeit von deren Eigenschaften festgestellt, dass sie meist in der oberflächennahen Bodenschicht verbleiben. Die Effekte von Schwermetallen auf die Abundanz von RGs im Boden hängen vom jeweiligen Schwermetall und dessen Konzentration, sowie vom betreffenden RG ab. Insbesondere Kupfer wirkt selektiv auf diverse Antibiotika RGs (Knapp et al., 2011 & 2017; Hu et al., 2016b & 2017; Zhang et al., 2018a). Desweiteren können Metalle in Konzentrations-abhängiger Weise die Transferfrequenz des IncP-1 Plasmids pJK5 im Boden reduzieren, ohne dass das Wirtsspektrum an sich beeinflusst wird (Klümper et al., 2017). Hierbei ist allerdings zu beachten, dass pJK5 über keine Metall-RGs verfügt. Im Falle von anderen Plasmiden, welche sowohl Antibiotika-RGs als auch Metall-RGs beherbergen, könnte die Abundanz dieser Plasmide (und deren Antibiotika-RGs) durch die Selektion via Schwermetallen zunehmen (Ko-Selektion).

In Bezugnahme auf die Problematik des zunehmenden Auftretens von Resistenzen in klinischen Pathogenen ist es wichtig zu erkennen, dass die Resistome (Gesamtheit aller RGs) unterschiedlicher Habitats und deren Bakterien nicht strikt voneinander getrennt sind. Stattdessen ist ein Austausch von genetischem Material zwischen diesen über diverse potentielle Wege möglich, wobei die Richtung des Transfers nicht endgültig geklärt ist (Wellington et al., 2013). So ist beispielsweise ein Transfer von RGs, welche mit Klärschlamm in den Boden gelangen, auf Bodenbakterien oder Bakterien, die mit Pflanzen assoziiert sind, vorstellbar. Dementsprechend wurde eine erhöhte relative Abundanz einzelner Gene auf Nutzpflanzen beobachtet, die mit Klärschlamm gedüngt wurden, verglichen mit Pflanzen aus Kontrollboden (Rahube et al., 2014). Durch den Verzehr entsprechend gedüngter Pflanzen könnten diese RG-tragenden Bakterien mit dem Mikrobiom im Gastrointestinaltrakt in Kontakt treten und hier ihre RGs auf vorhandene potentielle Pathogene übertragen. Bereits die Ergebnisse von Forsberg et al. (2012) wiesen auf einen Austausch von RG-beherbergenden DNA-Abschnitten zwischen Bodenbakterien und klinischen Pathogenen hin.

Vieles spricht dafür, den Eintrag von RGs, MGEs und selektiv wirkenden Substanzen in den Boden (und die weitere Nahrungskette) möglichst gering zu halten. Da bislang keine systematischen Studien zur Belastung von Klärschlämmen mit RGs, MGEs und selektiv wirkenden Substanzen für kleine und mittelgroße Kläranlagen vorliegen, soll diese Studie dazu beitragen die vorhandenen Wissenslücken zu schließen.

2 Material & Methoden

2.1 Probenahme

Im Rahmen dieses Projektes wurden die Klärschlämme aus insgesamt 12 Kläranlagen beprobt. Die Proben wurden jeweils durch das zuständige Fachpersonal der Anlage entnommen. Es wurden pro Klärschlamm je vier Replikate in folgenden Mengen bereitgestellt: für die geplanten chemischen Analysen je ca. 4,5 L (unmittelbar nach Erreichen des Labors eingelagert bei -20 °C) plus je 200 mL für mikrobiologische Untersuchungen (bis zur zeitnahen Bearbeitung bei 4 °C gelagert). Nähere Informationen zu den beprobten Kläranlagen sind in der Tabelle 1 aufgeführt. Aufgrund der zugesicherten Vertraulichkeit können nur Größenordnungen der EWs angegeben werden.

Tabelle 1: Informationen zu den beprobten Kläranlagen (KA)

KA	EW	Klärschlamm-beschaffenheit	Einzugsgebiet	Beschaffenheit Abwasser	Klärschlamm-entsorgung
A	>100.000	T: entwässert III: entwässert	urban, industriell, Krankenhaus	vorwiegend häuslich, industriell, Krankenhaus	landwirtschaftlich
B	<50.000	flüssig	ländlich, Lebens- mittelindustrie, Krankenhaus	industriell, häuslich, Krankenhaus	landwirtschaftlich
C	>50.000	flüssig	Lebensmittelin- dustrie, ländlich	industriell, häuslich	Verbrennung
D	<10.000	flüssig	ländlich	vorwiegend häuslich, (landwirtschaftlich?)	landwirtschaftlich
E	<50.000	flüssig	ländlich	vorwiegend häuslich, (landwirtschaftlich?)	landwirtschaftlich
F	<50.000	entwässert	urban, Krankenhaus	vorwiegend häuslich	landwirtschaftlich
G	<10.000	flüssig*	ländlich	vorwiegend häuslich	(landwirtschaftlich)*
H	<50.000	flüssig	ländlich	vorwiegend häuslich	Verbrennung
I	<10.000	flüssig	ländlich	vorwiegend häuslich	landwirtschaftlich
J	<50.000	flüssig	ländlich	vorwiegend häuslich	landwirtschaftlich
K	<50.000	flüssig	ländlich	vorwiegend häuslich	landwirtschaftlich, Kompostierung
L	<10.000	flüssig	ländlich, Industrie	vorwiegend häuslich	landwirtschaftlich

*Nicht stabilisierter Klärschlamm, wird zur Weiterbehandlung nach KA F verbracht.

2.2 Trockenmassebestimmung

Zur Bestimmung des Trockenmasse-Gehaltes der Klärschlämme wurden pro Replikat flüssigen Klärschlammes 50 mL in einem 50 mL Falcontube (dessen Leergewicht zuvor bestimmt wurde) bei 4.000 g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand möglichst vollständig durch

Dekantieren entfernt. Anschließend wurden die Feuchtgewichte der Pellets notiert. Daraufhin wurden je fünf g pro Pellet und entwässerten Klärschlamm-Replikaten in zuvor getrockneten und gewogenen Glas-Petrischalen bei 105 °C über Nacht getrocknet und im Anschluss deren Trockenmasse bestimmt. Anhand der ermittelten Gewichte wurden die Trockenmasse-Gehalte der Klärschlämme in % berechnet.

2.3 Extraktion der Total Community (TC)-DNA

Je Replikat wurden 50 mL Klärschlamm bei 4.000 g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und der wässrige Überstand nach Dekantieren verworfen. Die resultierenden Pellets wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingelagert. Nach dem Auftauen wurden die Pellets mit sterilen Spateln und durch Vortexen homogenisiert. Es wurden je 0,3 g Pellet bzw. entwässerter Klärschlamm in die lysis tubes des spin kit for soil (MP Biomedicals, Heidelberg) eingewogen und die TC-DNA wurde entsprechend den Angaben des Herstellers extrahiert. Der Erfolg der Extraktion wurde mittels gelelektrophoretischer Auftrennung der gewonnenen DNA-Lösung auf 0,8%igen Agarosegelen und anschließender Ethidiumbromid-Färbung kontrolliert. Für den Einsatz in den anschließenden quantitativen real time-PCR assays (qPCR) wurde die DNA 1:10 mit 1xTE Puffer (pH 8,0) verdünnt.

2.4 Quantifizierung von RGs und MGEs in TC-DNA via qPCR

Die Abundanz von 16S rRNA Genen (*rrn*), Sequenzen welche spezifisch für die Plasmid-Inkompatibilitätsgruppen IncF (*traI*), IncI1 (*traI*), IncI2 (*traI*), IncP-1 (*korB*), IncP-1ε (*trfA*), IncQ-1 (*repB*) und LowGC (*traN*) sind, Klasse 1 und 2 Integron Integrase Gene (*intI1*, *intI2*), sowie RGs, welche Resistenz gegen Sulfonamide (*sul1*, *sul2*), Tetrazykline (*tet(A)*, *tet(M)*, *tet(Q)*, *tet(W)*), Streptomycin (*strA*) und QACs (*qacE/qacEΔ1*) vermitteln, wurden in der TC-DNA mittels 5'-Nuklease assays in einem CFX96 real-time PCR Nachweissystem (Bio-Rad, Hercules, California) quantifiziert (detaillierte Angaben zu den entsprechenden Primern sind der Tabelle 2 zu entnehmen). Um sicherzustellen, dass keine unspezifischen Amplifikate bei der Quantifizierung mitgerechnet werden, wurde ein cut-off für Signale, die nach dem Amplifikationszyklus 30 auftraten, festgelegt. Signale, die später auftraten, wurden als „negativ“ gewertet. Wenn in mindestens zwei der vier Replikate einer Probe keine Signale bzw. Signale nach Zyklus 30 zu beobachten waren, wurde der Nachweis als „negativ“ bzw. „nicht quantifizierbar“ (unter der Nachweisgrenze) gewertet.

Tabelle 2: Primer, TaqMan-Sonden und Referenzen der genutzten qPCR assays

Gen*	Primer und Sonden**	Sequenz (5'-3')	Referenz
16S rDNA (<i>rrn</i>)	1492R 1369F TM1389F	ggwtaccttgttacgactt cgggtaatacgttcycgg ctgtacacaccgcccgctc	Suzuki <i>et al.</i> , 2000
<i>sul1</i>	qSUL_1-653f qSUL_1-719r tpSUL1	ccgttgcccttcctgtaaag ttgccgatcgcgtgaagt cagcgagccttgccggcgg	Heuer & Smalla, 2007
<i>sul2</i>	qSUL2_595f qSUL2_654r tpSUL2_614	cggctgcgcttcgatt cgcgcgagaaaggatt cgggtcttctgtctgtttcgcg	Heuer <i>et al.</i> , 2008
<i>tet(A)</i>	tetA_qfw tetA_qrv tetA_tp	ccgcgcttggtcatt tggtcgcgtcccagtga tcggcgaggatcg	Guarddon <i>et al.</i> , 2011

Gen*	Primer und Sonden**	Sequenz (5'-3')	Referenz
<i>tet(M)</i>	tetM_qfw tetM_qrv tetM_tp	ggtttctcttgatacttaaatcaatcr ccaaccatayaatcctgttcr atgcagttatggargggatagctatggy	Smith <i>et al.</i> , 2004
<i>tet(Q)</i>	q-tetQ-fw q-tetQ-rv q-tetQ-probe	agggtgctgaacctgtttgattc ggccggacggaggattt tcgcatcagcatcccgtc	Smith <i>et al.</i> , 2004
<i>tet(W)</i>	q-tetW-fw q-tetW-rv q-tetW-probe	gcagagcgtggttcagtct gacaccgtctgctgatgataat ttcgggataagctctccgccga	Peak <i>et al.</i> , 2007
<i>strA</i>			
<i>qacE/</i> <i>qacEΔ1</i>	qacEall-F qPCR qacEall-R qPCR qacEall (probe)	cgcatTTTTTTTcttctctggtt cccgaccagactgcataagc tgaatccatccctgctcggtg	Jechalke <i>et al.</i> , 2014c
<i>int1</i>	int1-LC1 int1-LC5 int1-probe	gccttgatgttaccgagag gatcggtcgaatgcgtgt attcctggccgtggttctgggttt	Barraud <i>et al.</i> , 2010
<i>int2</i>	int2-LC2 int2-LC3 int2-probe	tgctttccacccttacc gacggctaccctctgttatctc tggatactcgcaaccaagtattttacgctg	Barraud <i>et al.</i> , 2010
IncP-1 (<i>korB</i>)	korB-F korB-Fz korB-R korB-Rge korB-Rd tp_korBgz tp_korB	tcatcgacaacgactacaacg tcgtggataacgactacaacg ttcttctgccccttcgccag tтыtctgccccttcgccag ttcttgactccccttcgccag tsaggtcgttgcgttgaggtytcaat tcagytcrttgcytgaggttctcgat	Jechalke <i>et al.</i> , 2013b
IncP-1ε (<i>trfA</i>)	trfAε941f trfAε1014r trfAε965tp	acgaagaaatggtgtcctgttc cgtcagcttgcggtacttctc ccggcgaccattacagcaagttcatt	Heuer <i>et al.</i> , 2012
LowGC (<i>traN</i>)	V216q667f V216q741r V216tp689	gcttggcggtcagcaat ttaggaataacaatcgctacacctttac cttctggctgctccgacacgaagc	Heuer <i>et al.</i> , 2009
IncF (<i>tral</i>)	682_F 1073_R 973_P	cacggatgtgggaratgcc tccggcggcagyatvccrac cagcaggcgggtrcraggc	Blau <i>et al.</i> , 2018
Incl1 (<i>tral</i>)	Incl1_tral_Fwd Incl1_tral_Rev Incl1_tral_TP	ttcttctcccctaccatc cattttccagcgtgttc cggctttcactctgtggtt	Blau <i>et al.</i> , 2018
Incl2 (<i>tral</i>)	Incl2_tral_Fwd Incl2_tral_Rev Incl2_tral_TP	caagaacagaacaggca tcccgagataacagata ccaaccaaccacaacca	Blau <i>et al.</i> , 2018
<i>gfp</i>	gfp-f gfp-r	agcgttcaactagcagacca aaagggcagattgtgtggac	Yankson & Steck, 2009

*Folgende Quellen dienten zur Herstellung der Standards: *Agrobacterium tumefaciens* (*rrn*); R388 (*sul1*); RFS1010 (*sul2*, *repB*); PCR-Produkt aus TC-DNS aus Gülle, verifiziert durch Sequenzierung (*tet(M)*); pBT1 (*tet(Q)*); *Butyrivibrio fibrisolvens*

(*tet(W)*); pKJK5 (*qacE/qacEΔ1, int11, korB, trfA*); pGT527 (*int12*); pHHV216 (*traN*); R64 (*traI, IncI1*); pHNSHP45 (*traI, IncI2*); F-Plasmid (*traI, IncF*);

**Alle Sonden mit folgender Modifizierung: 5': FAM(5/6), 3': TAMRA(5/6)Isomer.

2.5 Detektion Plasmid-spezifischer Sequenzen mittels PCR und Southern Blot-Hybridisierung

Die Detektion von Sequenzen, die spezifisch für die Plasmid-Inkompatibilitätsgruppen IncN, IncW und PromA sind, erfolgte über konventionelle PCR gefolgt von einer Southern Blot-Hybridisierung der PCR-Produkte mit Digoxigenin-markierten Sonden. Diese Methodik ist zwar nicht geeignet um die Ziel-Gene in einer Probe genau zu quantifizieren (semiquantitativ), hat aber den Vorteil, dass sie wesentlich empfindlicher ist und so die Detektion von Genen gestattet, die aufgrund einer geringen Abundanz via qPCR möglicherweise nicht erfasst würden (detaillierte Angaben zu den entsprechenden PCR-Assays sind der Tabelle 3 zu entnehmen).

Tabelle 3: Primersysteme, Amplicon-Größe, Bedingungen und Referenzen der genutzten PCR assays

Gen*	Primer	Sequenz (5'-3')	Amplicon-Größe (bp)	Annealing Temperatur (°C)	Referenz
IncN (<i>rep</i>)	IncN-rep-1 IncN-rep-2	agttcaccactactcgctccg caagttcttctgttgggattccg	165	55	Götz <i>et al.</i> , 1996
IncW (<i>oriV</i>)	IncW-oriV-1 IncW-oriV-2	gacccggaaaacaaaaata gtgagggtgagggtgctatc	1140	57	Götz <i>et al.</i> , 1996
PromA (<i>repA</i>)	repA-1 repA-2	tacggcaccctgccccggctgctgctgac cgcttcgataggtagctcatgcg	452	57	Zhang <i>et al.</i> , 2015
BOX	BOX_A1R	ctacggcaaggcgacgctgacg	-	53	Martin <i>et al.</i> , 1992
Integron- genkassetten	int1F int1B	ggcatccaagcagcaagc aagcagacttgacctgat	-	55	mod. Levesque <i>et al.</i> , 1995

*Als Positivkontrollen dienten RN3 (IncN), R388 (IncW) und pIPO2 (PromA).

2.6 Mikrokosmos-Experimente

Die Durchführung der Bodenmikrokosmos-Experimente erfolgte mit zwei Standardböden, welche von der LUFA Speyer bezogen wurden. Die detaillierten Bodencharakteristika des schluffigen Sandbodens 2.1 und des tonigen Lehmbodens 2.4 sind dem Anhang A.1 zu entnehmen. Pro Boden wurden je fünf Behandlungen zu vier Probenahmezeitpunkten (mit je vier Replikaten) verglichen: Zugabe von H₂O (0-Kontrolle), NPK-Dünger (rein mineralische Kontrolle), Klärschlamm der Anlage A (als Vergleich für Klärschlamm einer Anlage mit großer Ausbaugröße), sowie jeweils Klärschlamm der Anlagen I und J. Die aktuellsten Messwerte der Trockenmasse- und N-Gehalte wurden von den Anlagenbetreibern freundlicherweise vertraulich zur Verfügung gestellt. Die Böden wurden entsprechend der erlaubten Auftragsmenge für organische Düngemittel und der praxisüblichen Ausbringungsmenge von umgerechnet 60 kg N/ha (persönliche Mitteilung durch Herrn Henning Koch, Wasserverband Weddel-Lehre) mit den Düngemitteln versetzt, mit H₂O auf 50% der maximalen Wasserhaltekapazität gebracht, gründlich durchmischt und zu Portionen von umgerechnet je 300 g

Trockenmasse Boden in Plastiktöpfe gefüllt. Um den Wasserverlust zu minimieren, wurden die Töpfe mit Plastik-Petrischalen abgedeckt. Die Bodenmikrokosmen wurden bei 18 °C im Gewächshaus gelagert und der Wasserverlust mindestens zweimal pro Woche mittels Wiegen bestimmt und mit Leitungswasser ausgeglichen. Für die Probenahmen wurden die Inhalte der Töpfe gründlich homogenisiert und anschließend je ein 14 mL Falcontube befüllt und bis zur Verwendung bei -20 °C eingelagert. Die Extraktion der TC-DNA aus den Bodenproben erfolgte wie unter 2.3 beschrieben. Abweichend hiervon wurde die DNA für die qPCR Assays 1:5 mit 1xTE Puffer (pH 8,0) verdünnt. Die Zielgenabundanz in den unterschiedlich behandelten Mikrokosmen zu den einzelnen Probenahme-Zeitpunkten wurde mittels Tuckey's HSD test ($p < 0,05$) verglichen.

2.7 Exogene Plasmidisolierung aus Klärschlämmen

Für die exogene Plasmidisolierung wurde *Escherichia coli* (*E. coli*) CV601 *gfp* (resistent gegen Rifampicin und Kanamycin, grün fluoreszierend unter UV-Licht) als Rezipient ausgewählt. Von diesem Rezipienten wurde eine Übernachtskultur in 40 mL flüssigem Luria Bertani (LB)-Medium mit je 50 mg/L Rifampicin und Kanamycin angesetzt und bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1 mL der Rezipientensuspension bei 3.100 *g* für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand mit der Pipette abgenommen. Um Antibiotika-Rückstände zu entfernen, wurde das Pellet anschließend zweimal in je 1 mL Tryptic Soy Broth (TSB) resuspendiert, und unter den zuvor beschriebenen Bedingungen zentrifugiert. Im Anschluss wurde das gewaschene Pellet in 1 mL TSB resuspendiert. Pro Klärschlamm wurde eine Mischprobe aus den vier Replikaten hergestellt: je Replikat wurden 12,5 mL in einem 50 mL Falcontube vereinigt und bei 4.000 *g* für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, und die resultierenden Pellets mit sterilen Spateln homogenisiert. Fünf *g* pelletierter Klärschlamm wurde mit 45 mL 1/10 TSB in sterilen Erlenmeyerkolben vermengt und bei 28 °C für 2 h auf dem Schüttler unter schwachem Schütteln inkubiert. Für die Matings wurden anschließend je 50 µL der Rezipientensuspension und 1950 µL Klärschlammsuspension miteinander vermengt. Als Kontrollen dienten je 1950 µL Klärschlammsuspension ohne Rezipient und 50 µL Rezipientensuspension mit 1950 µL 1/10 TSB. Die Ansätze wurden bei 3.100 *g* bei Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert und die Überstände dekantiert. Die Pellets wurden mit Hilfe von sterilen Impfösen auf Millipore Filter (0,22 µm) übertragen, welche auf Plate Count Agar (PCA) Platten mit 100 mg/L Cycloheximid aufgelegt waren. Das Pellet der Rezipienten-Kontrolle wurde abweichend hiervon in 100 µL 1/10 TSB resuspendiert und die Suspension vollständig auf den Filter überführt. Die Platten wurden bei 28 °C für 24 h inkubiert. Daraufhin wurden die Filter in 50 mL Falcontubes mit 10 mL steriler 0,85%iger NaCl-Lösung überführt und für eine Minute gevortext, um die Zellen vom Filter zu lösen (entspricht einer Verdünnung von 10^{-2}). Hiervon wurde mit steriler 0,85%igen NaCl-Lösung eine dekadische Verdünnungsreihe bis 10^{-9} angesetzt. Um Transkonjuganten zu gewinnen, die Resistenzen gegen Sulfonamide bzw. Tetrazykline (TET) erworben hatten, wurden je 100 µL der 10^{-2} bis 10^{-4} Verdünnungen der Mating-Ansätze in Triplikaten auf Müller Hinton Agar-Platten mit 50 mg/L Rifampicin, 50 mg/L Kanamycin und 50 mg/L Sulfadiazin (SDZ), bzw. 15 mg/L TET ausplattiert. Für die Beurteilung des Hintergrundwachstums wurden 100 µL der 10^{-2} Verdünnungen der Kontrollen (Rezipient ohne Klärschlamm, Klärschlamm ohne Rezipient) in Duplikaten auf den entsprechenden Medien ausplattiert. Um die Zellzahl (Colony Forming Units (CFUs)) der Rezipienten in den Mating-Ansätzen zu bestimmen, wurden je 3 x 20 µL jeder Verdünnung auf PCA-Platten mit je 50 mg/L Rifampicin und Kanamycin aufgetragen. Alle Platten wurden bei 37 °C inkubiert und nach 24 und 48 h die gewachsenen Kolonien gezählt. Nach Kontrolle der Fluoreszenz unter dem UV-Licht wurden potentielle Transkonjuganten gepickt (bis zu 20 je Klärschlamm und Antibiotikum, wenn vorhanden). Die potentiellen Transkonjuganten wurden

erneut auf entsprechendem Selektivmedium ausgestrichen. Nach ausreichendem Zellwachstum wurde die Zellmasse pelletiert, die DNA isoliert und zur Identifizierung als Transkonjugant mittels qPCR auf das Vorhandensein des *gfp*-Gens (s. Tabelle 2), sowie via BOX-PCR (s. Tabelle 3) auf das Bandenmuster des Rezipienten analysiert.

2.7.1 Charakterisierung der gefischten Plasmide

Nach der Identifizierung als *E. coli*-Transkonjuganten wurde die Plasmid-DNA aus den jeweiligen Stämmen mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid Kits von Macherey und Nagel (Düren, Deutschland) entsprechend den Vorgaben des Herstellers isoliert. Zur näheren Charakterisierung der gefischten Plasmide wurde deren DNA anschließend mittels konventioneller PCR auf das Vorhandensein von (und gleichzeitig die Größe evtl. vorhandener) Integron-Genkassetten und spezifischen Sequenzen für Plasmide der Inkompatibilitätsgruppen IncN, IncW und PromA untersucht (s. Tabelle 3). Desweiteren wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe von qPCR assays auf die RGs *sul1*, *sul2*, *tet(A)*, *qacE/qacEΔ1* und spezifische Sequenzen für die MGEs *intI1*, *intI2*, IncP-1, IncP-1 ϵ , LowGC, IncI1, IncI2, IncF und IncQ untersucht (s. Tabelle 2).

2.7.2 Transformation ausgewählter Plasmide in *E. coli* DH5 α

Um zu untersuchen, welche Antibiotika-Resistenzen durch die entsprechenden Plasmide transferiert werden, wurden diese in einen Wirt übertragen, der selbst keinerlei Antibiotika-Resistenzen aufweist. Anhand der unter 2.7.1 gewonnenen Erkenntnisse wurden deshalb 32 Transkonjuganten ausgewählt, deren Plasmide mittels Elektroporation in *E. coli* DH5 α transformiert wurden. Hierzu wurden zunächst elektrokompente von *E. coli* DH5 α hergestellt, wie durch Choi et al. (2006) beschrieben. Es wurden 50 mL einer *E. coli* DH5 α -Kultur in LB-Medium angesetzt und bei 37 °C und 150 rpm auf dem Schüttler über Nacht inkubiert. Je 1,5 mL dieser Übernachtskultur wurden in 2 mL Reaktionsgefäße überführt und bei 12.775 *g* 2 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden anschließend zweimal mit 500 μ L steriler Sucrose-Lösung (300 mM) gewaschen und bei 12.775 *g* für je 1 Minute zentrifugiert. Die Pellets wurden in 15-20 μ L Sucrose-Lösung resuspendiert und zu Portionen á 100 μ L vereinigt, welche für zwei Elektroporations-Ansätze ausreichen. Je 50 μ L der frisch hergestellten elektrokompenten Zellen wurden vorsichtig mit 5 μ L Plasmid-DNA vermischt und in eine 2 mm Elektroporations-Küvette überführt. Anschließend wurde an die Küvette in einer Elektroporations-Maschine (Eporator, Eppendorf) für 4 ms eine Spannung von 2.500 Volt angelegt. Unmittelbar nach dem Elektropuls wurden 950 μ L SOC-Medium in die Küvette gegeben, der Inhalt anschließend in ein steriles Eppendorf Cup überführt und horizontal für 1,5 h bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Daraufhin wurden je 100 μ L pro Ansatz auf entsprechendem Selektivmedium ausplattiert (Müller Hinton Agar; für Plasmide, die auf SDZ isoliert wurden mit 50 mg/L SDZ, für Plasmide, die auf TET isoliert wurden mit 15 mg/L TET) und bei 37 °C für 24-48 h inkubiert. Im Anschluss wurden die gewachsenen Kolonien gepickt und auf entsprechendem Selektivmedium ausplattiert um genügend Zellmaterial für die Anlage einer Cryo-Kultur und die Durchführung von Antibiotogrammen (s. 2.7.3) zu gewinnen.

2.7.3 Erstellung von Antibiotogrammen transformierter Plasmide

Um zu testen, gegen welche Antibiotika die aus den Klärschlämmen gefischten und in *E. coli* DH5 α transformierten Plasmide Resistenzen vermitteln, wurden Antibiotogramme mit Hilfe von Platten-Diffusionstests erstellt. Hierfür wurde je eine frisch gewachsene Kolonie der Transformanten (und des nicht-transformierten Rezipienten *E. coli* DH5 α als Kontrolle) in 800 μ L steriler 0,85%iger NaCl-Lösung mittels Vortexen suspendiert. Es wurden je 100 μ L der Bakteriensuspension auf Müller Hinton Agar ausplattiert (zwei Replikate, je Transformant sechs

Platten). Mit steriler Pinzette wurden anschließend Antibiotika-Plättchen folgender Konzentrationen auf die Platten aufgelegt: Ampicillin (AMP; 5 µg), Cefotaxim (CTX; 30 µg), Chloramphenicol (CHL; 30 µg), Ciprofloxacin (CIP; 5 µg), Colistin (COL; 10 µg), Doxzyklin (DOXY; 30 µg), Ofloxacin (OFL; 5 µg), Streptomycin (STR; 10 µg), SDZ (250 µg), TET (30 µg) und Trimethoprim (TMP; 5 µg). Die Platten wurden anschließend bei 37 °C inkubiert. Die Bestimmung der Inhibitionszonen erfolgte nach jeweils 24 und 48 h.

2.7.4 Charakterisierung der Plasmid-DNA aus dem Transkonjuganten I4.18 und dem Transformanten I4.18

Nach Auswertung der Antibiotogramme wurde der Transformant I4.18, bzw. dessen Plasmid für die Sequenzierung via PacBio ausgewählt. Hierzu wurde zunächst die Plasmid-DNA aus dem Transformanten mit Hilfe des Qiagen Plasmid Midi Kits entsprechend den Vorgaben des Herstellers isoliert. Da der Transkonjugant I4.18, aus dem die transformierte Plasmid-DNA stammt, via PCR/Southern Blot-Hybridisierung positiv auf IncN-spezifische Sequenzen getestet wurde, wurde diese Analyse mit den Transformanten wiederholt. Da sich der Transformant als IncN-negativ erwies, wurde ebenfalls die Plasmid-DNA des Transkonjuganten mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit isoliert. Zusätzlich wurde zur näheren Charakterisierung die Plasmid-DNA des Transkonjuganten und Transformanten I4.18 sowie das Standard IncN-Plasmid RN3 einem Restriktionsverdau mit dem Enzym EcoRV-HF unterzogen (entsprechend den Empfehlungen des Herstellers).

2.7.5 PacBio-Sequenzierung der Plasmid-DNA aus dem Transkonjuganten I4.18 und dem Transformanten I4.18

Die Plasmid-DNAs, die aus dem Transkonjuganten I4.18 und dem hieraus hervorgegangenem Transformanten I4.18 isoliert wurden, wurden zur PacBio-Sequenzierung an die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig gesandt.

2.8 Nachweis von coliformen Bakterien und Salmonellen

Um coliforme Bakterien und Salmonellen in den untersuchten Klärschlämmen zu detektieren, wurden zunächst wie unter 2.3 aufgeführt, Pellets der Proben hergestellt und homogenisiert. Pro Replikat wurden fünf g Pellet in sterile Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 45 mL sterilem, gepuffertem Peptonwasser suspendiert. Diese Suspension (10^{-1}) diente als Grundlage für weitere Verdünnungen der Größenordnungen 10^{-2} und 10^{-3} in gepuffertem Peptonwasser.

2.8.1 Direkter Nachweis coliformer Bakterien

Es wurden jeweils zwei technische Replikate á 100 µL der Verdünnungen 10^{-2} und 10^{-3} auf Chromocult-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die CFUs der coliformen Bakterien bestimmt. Hierbei wurden nur farbige Kolonien berücksichtigt. Kolonien mit einer dunkelblauen bis violetten Färbung wurden als *E. coli* identifiziert, lachsrote bis rote als verdächtige coliforme Bakterien (z.B. *Citrobacter* oder *Enterobacter*). Es erfolgte keine weitere Bestätigung der verdächtigen Kolonien.

2.8.2 Nachweis resistenter coliformer Bakterien nach Anreicherung

Das restliche Volumen der oben genannten 10^{-1} Suspension wurde zur Anreicherung bei 37 °C und 150 rpm auf dem Schüttler über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden aus dieser Suspension mit gepuffertem Peptonwasser Verdünnungen der Größenordnungen 10^{-2} und 10^{-3} hergestellt. Zur Detektion von coliformen Bakterien, die resistent gegen β -Laktame oder Colistin

sind, wurden je zwei technische Replikate á 100 µL der 10⁻² und 10⁻³ Verdünnung auf Chromocult-Agar welcher mit je 2 mg/L oder 4 mg/L Cefotaxim, bzw. mit 2 mg/L Colistin versetzt war, ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die CFUs der coliformen Bakterien auf den Platten bestimmt (wie unter 2.7.1 beschrieben).

2.8.3 Nachweis von Salmonellen nach Anreicherung

Zur Detektion von Salmonellen in den Klärschlammproben wurden pro Replikat 10 µL der über Nacht angereicherten 10⁻¹ Suspension (s. 2.7.2) mit 190 µL RVS-Medium gemischt und über Nacht bei 42 °C auf dem Schüttler bei 300 rpm inkubiert. Anschließend wurden hiervon je 50 µL auf XLD-Agar ausplattiert, bei 37 °C über Nacht inkubiert und am Folgetag auf das Wachstum von Salmonellen (in Form von schwarzen Kolonien) untersucht.

2.9 Chemische Analyse der Klärschlämme auf Schwermetalle, Antibiotika und Desinfektionsmittel

Nach Ausschreibung der entsprechenden Analysen und Auswertung der eingegangenen Angebote wurden die Analysen an folgende Institute vergeben:

1. Antibiotika: Institut für klinische Pharmakologie, Medizinische Fakultät, TU Dresden
2. Schwermetalle: AGROLAB Agrar und Umwelt GmbH
3. TCS und TCC: Institut für Boden und Umwelt, LUFA Nord-West
4. QACs: Institut für Bodenkunde und Bodenerhaltung, Justus-Liebig-Universität Giessen

Die Klärschlammproben wurden den Auftragsnehmern in ausreichender Menge und gekühlt per über Nacht-Express zugestellt.

2.10 Korrelation der Gen-Abundanz mit Konzentrationen an Schwermetallen, Antibiotika und Desinfektionsmitteln, sowie der Größe der Kläranlage und dem Vorhandensein einer Klinik oder Industrie im Einzugsgebiet

Um mögliche Zusammenhänge zwischen der Abundanz der untersuchten RGs und MGEs in den Klärschlämmen und deren Konzentrationen an selektiven Substanzen oder der Ausbaugröße der Anlagen aufzudecken, wurden mit Hilfe der CORR Prozedur von SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) die entsprechenden Pearson Korrelations-Koeffizienten (r) und die p -Werte berechnet. Da sich abzeichnete, dass die entwässerten ($n=2$) und die flüssigen Klärschlämme ($n=10$) sich sehr voneinander unterscheiden, wurde diese Analyse sowohl separat für die flüssigen Klärschlämme als auch für alle Klärschlämme zusammen durchgeführt. Aufgrund der geringen Aussagekraft wurde auf eine separate Auswertung der beiden entwässerten Klärschlämme verzichtet.

2.11 Analyse der Zusammensetzung der prokaryotischen Gemeinschaften in den Klärschlämmen via Illumina Sequenzierung von 16S Amplicons

Die 16S Amplicon Illumina Sequenzierung wurde als Auftragsvergabe am Institut für Biologie (Bereich Mikrobiologie) der Universität Kopenhagen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in Form von „amplicon sequence variants (ASV)“-Tabellen zur Verfügung gestellt und anschließend mit Excel ausgewertet. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Auflistung der dominanten

bakteriellen Phyla auf Klassen beschränkt, deren Anteil mindestens 1% der relativen Abundanz in mindestens einer der Klärschlammproben ausmachte.

3 Ergebnisse

3.1 Bestimmung der Trockenmasse

Die durch die Firma AGROLAB ermittelten Trockenmasse-Gehalte der untersuchten Klärschlämme sind in Tabelle 4 aufgeführt. Diese variierten von 1,80 bis 4,73 % für die flüssigen, und von 22,2 bis 26,83 % für die entwässerten Klärschlämme. Laut Angaben der Anlagenbetreiber liegen die Trockenmasse-Gehalte der Klärschlämme regelmäßig zwischen 2 und 3,5 %. Da der Trockenmassegehalt der Klärschlämme in den Kläranlagen kontinuierlichen Schwankungen unterliegt, könnten die beobachteten Abweichungen eventuell darauf zurückzuführen sein, dass unsere Probenahmen zu anderen Zeitpunkten stattfanden als die für die routinemäßigen, betriebseigenen Untersuchungen.

Tabelle 4: Trockenmassen der analysierten Klärschlämme

KA	Trockenmasse in %*	KA	Trockenmasse in %*
AT	22,20 ± 0,22	G	3,25 ± 0,57
AIII	25,15 ± 0,77		
B	3,80 ± 0,35	H	4,73 ± 0,66
C	1,80 ± 0,22	I	2,65 ± 0,57
D	1,88 ± 0,10	J	2,33 ± 0,33
E	4,53 ± 0,24	K	2,38 ± 0,05
F	26,83 ± 0,82	L	4,08 ± 0,17

*Gelistet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus den vier Replikaten.

3.2 Extraktion TC-DNA

Aus allen Replikaten aller Klärschlämme konnte erfolgreich TC-DNA isoliert werden.

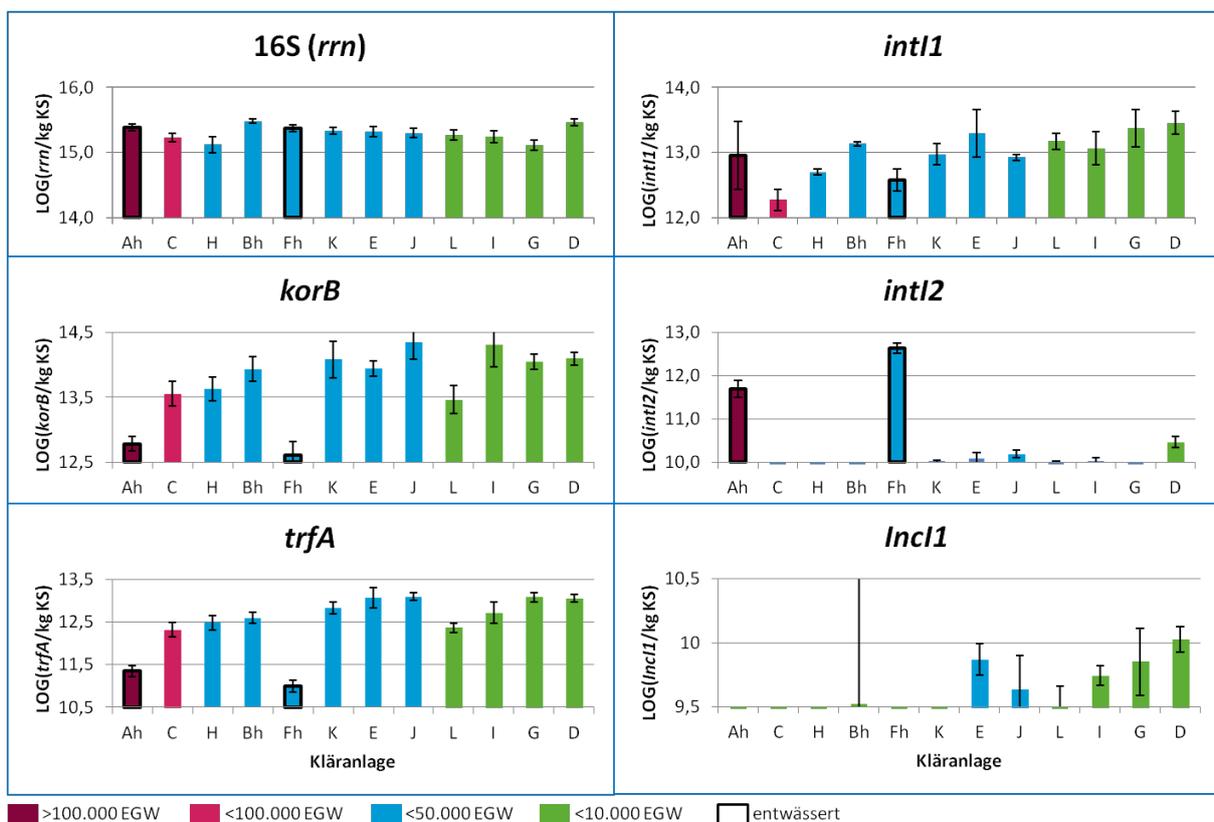
3.3 Quantifizierung von RGs und MGEs in TC-DNA aus Klärschlämmen

Die große Mehrzahl an getesteten Zielgenen konnte mittels qPCR assays in den Klärschlammproben nachgewiesen werden (s. Abbildungen 1-3; die entsprechenden Zahlenwerte sind den Anhängen A.2 und A.3 zu entnehmen). Die ermittelte Abundanz der 16S-Genkopienanzahl lag bezogen auf den Trockenmassegehalt in allen Proben auf einem ähnlich hohen Niveau von ca. 10^{15} bis $10^{15,5}$ (s. Abbildung 1). Integrasogene der Klasse 1 sowie IncP-1 Plasmide wurden in allen Klärschlämmen in hoher Abundanz detektiert. Auffällig war hierbei, dass die Abundanz der IncP-1 spezifischen Sequenzen (*korB* und *trfA*) deutlich niedriger in den entwässerten Klärschlämmen war als in den flüssigen (s. Abbildung 1). In einzelnen Proben, den Klärschlämmen aus den Anlagen D, E, G und I, konnten via qPCR zusätzlich IncI1 Plasmide in niedriger Abundanz (weniger als umgerechnet $10^{7,6}$ Genkopien pro g Trockenmasse) nachgewiesen werden (s. Abbildung 1). Klasse 2 Integrons (*intI2*) wurden lediglich in den entwässerten Klärschlämmen detektiert (s. Abbildung 1). Mit Ausnahme des Fluorochinolon-RG *qnrA* und dem Tetracyclin-RG *tet(A)* in Anlage H, wurden alle getesteten RGs in den Klärschlämmen detektiert (s. Abbildungen 2 und 3). In den Klärschlämmen, die der Verbrennung zugeführt werden (Anlage C und H), lag die Abundanz der RGs oftmals niedriger als in den Klärschlämmen, die landwirtschaftlich genutzt werden (s. Abbildungen 2 und 3). Für die meisten Zielgene konnte außerdem beobachtet werden, dass deren Abundanz bezogen auf

den Trockenmassegehalt in den Klärschlämmen aus kleinen Kläranlagen ähnlich hoch war als in den größeren Kläranlagen. Die einzigen Ausnahmen bilden hierbei das Sulfonamid-RG *sul2* und das Aminoglykosid-RG *strA*, die beide in der größten Kläranlage dieser Studie die höchste Abundanz aufwiesen (s. Abbildung 2). Die Abundanzen der MGEs LowGC, IncI2 und IncF Plasmide sowie das Fluorochinolon-RG *qnrA* lagen unterhalb der Detektionsgrenze (nicht gezeigt).

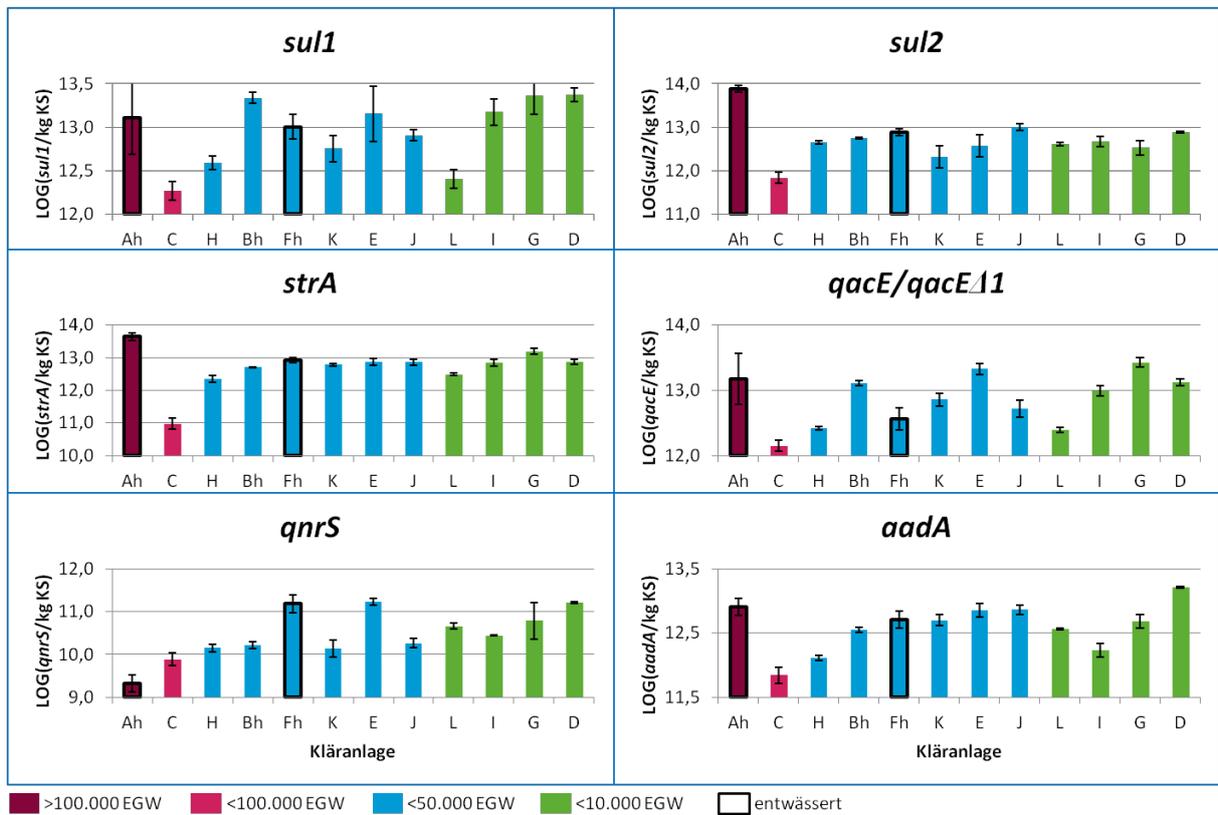
Die Zahlenwerte der entsprechenden Zielgen-Abundanz in der Originalsubstanz ist dem Anhang A.3 zu entnehmen.

Abbildung 1: Logarithmierte Werte und Standardabweichungen der absoluten Genabundanz von *rrn* und MGE (bezogen auf kg Trockenmasse) in Klärschlammproben



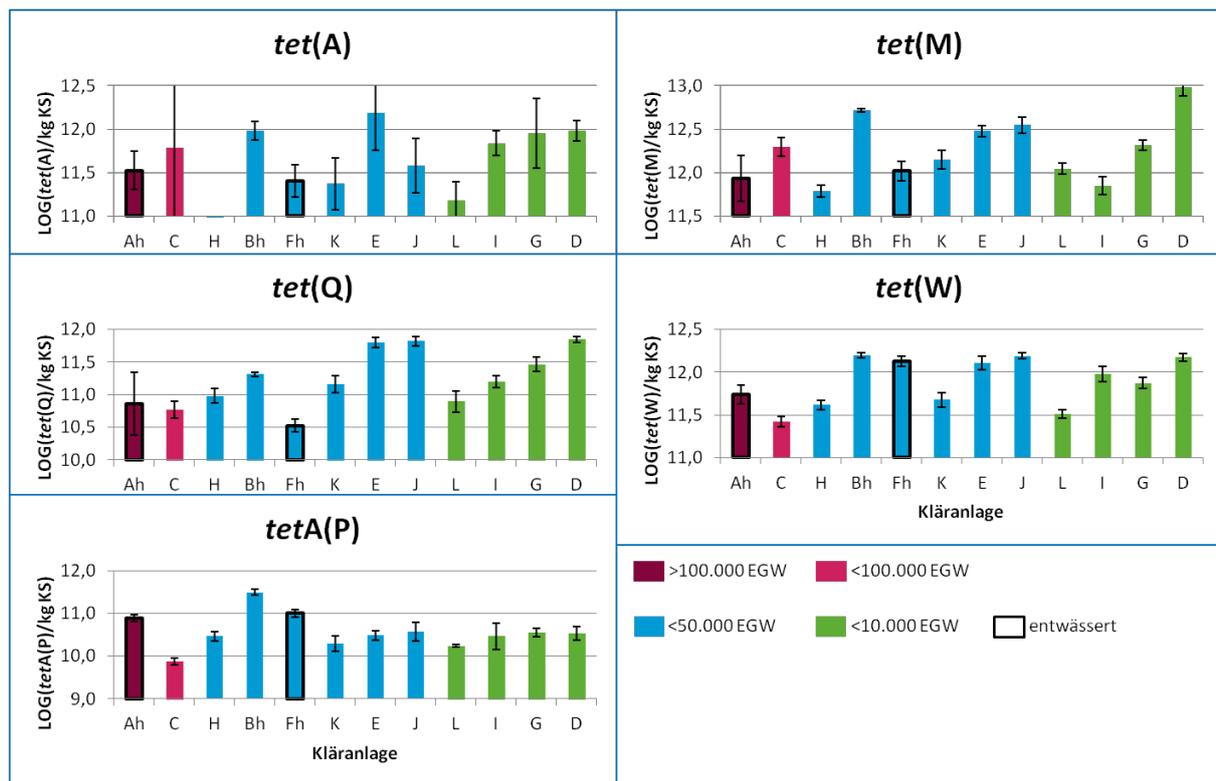
n=4. Das Vorhandensein einer Klinik im Einzugsgebiet der Kläranlage ist durch ein zusätzliches „h“ an der Buchstaben-Kodierung indiziert.

Abbildung 2: Logarithmierte Werte und Standardabweichungen der absoluten Genabundanz von RGs (bezogen auf kg Trockenmasse) in Klärschlammproben



n=4. Das Vorhandensein einer Klinik im Einzugsgebiet der Kläranlage ist durch ein zusätzliches „h“ an der Buchstaben-Kodierung indiziert.

Abbildung 3: Logarithmierte Werte und Standardabweichungen der absoluten Genabundanz von Tetracyclin-RGs (bezogen auf kg Trockenmasse) in Klärschlammproben



n=4. Das Vorhandensein einer Klinik im Einzugsgebiet der Kläranlage ist durch ein zusätzliches „h“ an der Buchstaben-Kodierung indiziert.

3.4 Detektion Plasmid-spezifischer Sequenzen in TC-DNA aus Klärschlämmen mittels PCR/Southern Blot Hybridisierung

In allen untersuchten Klärschlämmen konnten durch konventionelle PCR und anschließende Southern Blot Hybridisierung Sequenzen nachgewiesen werden, welche spezifisch für PromA Plasmide sind (s. Tabelle 5). Schon nach kurzer Belichtungszeit traten in allen Proben deutliche und teils sehr starke Signale auf. Obwohl diese Methodik nur semiquantitativ ist, weist diese Beobachtung auf eine hohe Abundanz von PromA Plasmiden in dem Probenmaterial hin. Auffällig war hierbei eine deutliche Tendenz von schwächeren Signalen in entwässerten Klärschlämmen.

Desweiteren war es möglich, nach sehr langer Belichtungszeit DNA-Fragmente in den Proben nachzuweisen, die spezifisch für IncN Plasmide sind. Mit Ausnahme von Proben aus Anlage A und K traten in allen Proben positive Signale auf, wobei diese im Falle der Anlagen B, C, H und J sehr schwach waren. Dieses weist auf eine niedrige Abundanz von IncN Plasmiden in den Klärschlämmen hin (mit Ausnahme von A und K; s. Tabelle 5).

Zusätzlich konnten mit dieser Methodik nach langer Belichtungszeit positive Signale für IncW spezifische Sequenzen in TC-DNA aus Klärschlämmen der Anlagen E, F und L (und zusätzlich sehr schwache Signale für H und J) beobachtet werden (s. Tabelle 5). Hierbei traten die mit Abstand stärksten Signale in den vier Replikaten aus Anlage F auf. Da für den Nachweis eine lange Belichtungszeit erforderlich war, deutete dies auf eine eher geringe Abundanz von IncW Plasmiden in den Proben hin.

Tabelle 5: Nachweis von Plasmid-spezifischen Sequenzen in TC-DNA aus Klärschlämmen mittels PCR/Southern Blot-Hybridisierung

Inkompatibilitätsgruppe	AIII	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
PromA	+	+++	++	+++	+++	+	+++	++	++	+++	++	+
IncN	-	(+)	(+)	+	+	+	+	(+)	+	(+)	-	+
IncW	-	-	-	-	+	+++	-	(+)	-	(+)/-	-	+

n=4. Belichtungszeiten: PromA: 10 Minuten, IncW: 1 h, IncN: 2 h 30 Minuten. -: nicht detektiert, (+): sehr schwaches Signal, +: positives Signal, ++: starkes Signal, +++: sehr starkes Signal.

3.5 Quantifizierung von RGs und MGEs in TC-DNA aus Bodenmikrokosmen

In den Mikrokosmos-Experimenten ließ sich eine signifikante Erhöhung der 16S (*rrn*)-Genkopienanzahl in beiden getesteten Böden nach Einbringen des Klärschlammes im Vergleich zu den Kontrollen beobachten (s. Abbildung 4). In beiden Böden konnte für die meisten Gene nach der Ausbringung der Klärschlämme ein Anstieg der Abundanz (absolut und relativ) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen festgestellt werden. Auffällig war hierbei, dass ausschließlich in den Böden, die mit Klärschlamm behandelt wurden RGs und MGEs detektiert wurden. Für beide Böden und alle analysierten Gene gilt, dass die erhöhte Abundanz nach der Ausbringung von Klärschlamm im Laufe der Zeit abnahm und nach 112 Tagen zumeist wieder unter der Nachweisgrenze bzw. auf dem Niveau der Kontrollmikrokosmen lag (s. Abbildung 4 und 5). Als Ausnahme sind hier die Gene *sul1* und *qacE/qacEA1* zu nennen, die auch nach 112 Tagen noch in beiden Böden nachweisbar waren, nicht aber in den Kontrollböden. Das *sul2* Gen, das nach 112 Tagen im tonigen Lehm Boden, der mit Klärschlamm J behandelt wurde, detektiert wurde (s. Abbildung 5). Letzteres Gen ist zeitgleich das einzige, für das sich ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Bodentypen feststellen ließ, da es im Sandboden lediglich bis zum Tag 14 des Experimentes oberhalb der Detektionsgrenze lag. Die Gene *tet(Q)* und *tet(A)* waren ausschließlich zum Zeitpunkt t_0 (Tag 0) in den Mikrokosmen detektierbar, die mit den Klärschlämmen J und I gedüngt wurden (nicht gezeigt). Während *intI2* zu diesem Zeitpunkt in der Mehrzahl der mit Klärschlamm gedüngten Replikate nachweisbar war, war es 14 Tage nach der Klärschlammausbringung ausschließlich im tonigen Lehm Boden, der mit Klärschlamm A gedüngt wurde, zu detektieren (nicht gezeigt). Zu späteren Probenahmezeitpunkten konnte dieses Gen in keiner Probe mehr nachgewiesen werden.

Bezüglich der Abundanz der Zielgene an Tag 0 des Experimentes und deren Persistenz lässt sich festhalten, dass die Genabundanz teilweise deutlich die jeweilig unterschiedlichen Eintragsmengen mit den unterschiedlichen Klärschlämmen widerspiegelt. So lag die absolute Abundanz des Gens *sul2* höher in den Mikrokosmen, die den entwässerten Klärschlamm erhielten, und die von *trfA* (IncP-1ε Plasmide) deutlich höher in Mikrokosmen, die mit flüssigem Klärschlamm behandelt wurden (s. Abbildungen 4 und 5). Obwohl mit dem Klärschlamm A mehr selektive Substanzen eingebracht wurden als mit den flüssigen Klärschlämmen (berechnete Eintragsmengen s. Anhang A.4), war keine verlängerte Persistenz für die untersuchten Zielgene in den jeweiligen Mikrokosmen zu verzeichnen.

Abbildung 4: Absolute Abundanz 16S und MGEs (logarithmierte Mittelwerte und Standardabweichungen) pro g in den Bodenmikrokosmen zu unterschiedlichen Probenahmezeitpunkten (n=4). Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede nach Tukey's HSD-Test zwischen den Behandlungen eines Zeitpunktes an.

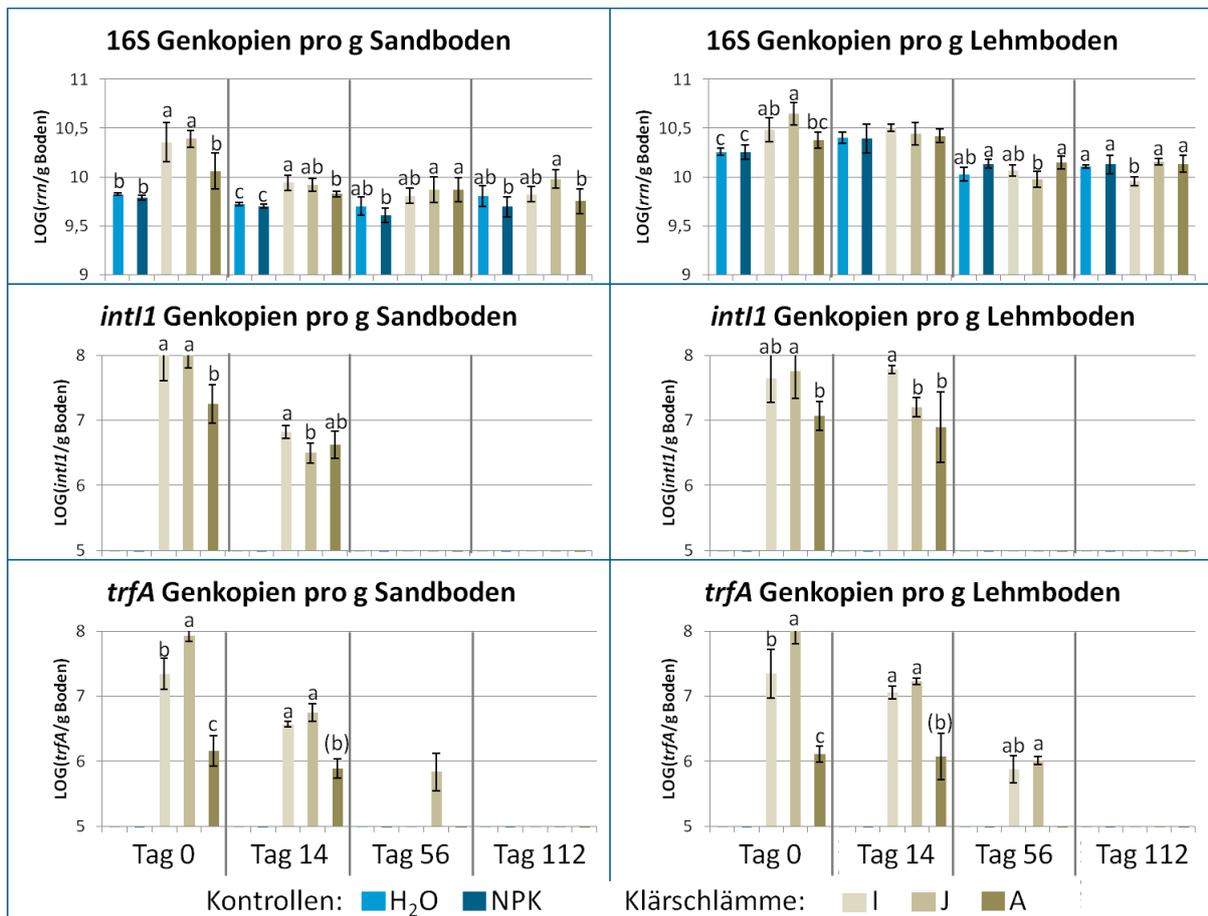
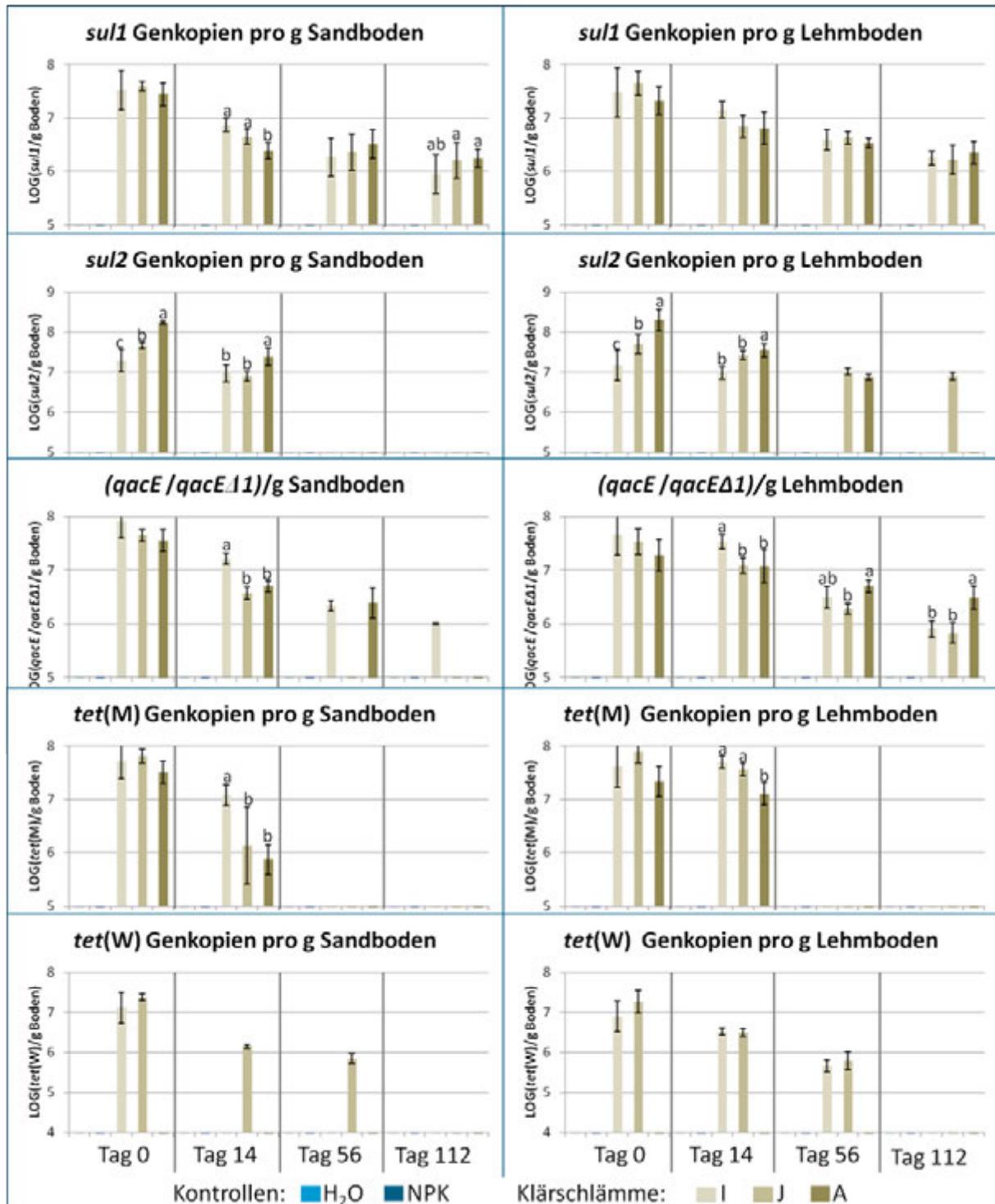


Abbildung 5: Absolute Abundanz RGs (logarithmierte Mittelwerte und Standardabweichungen) pro g in den Bodenmikrokosmen zu unterschiedlichen Probenahmezeitpunkten(n=4). Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede nach Tukey's HSD-Test zwischen den Behandlungen eines Zeitpunktes an.



3.6 Exogene Plasmidisolierung

Mit Ausnahme vom Klärschlamm aus der Kläranlage D konnten aus allen Klärschlämmen Transkonjuganten gewonnen werden (s. Tabelle 6). Insgesamt wurden 103 Transkonjuganten via BOX-PCR als solche identifiziert, von denen 51 auf TET und 52 auf SDZ isoliert wurden.

Tabelle 6: Anzahl Transkonjuganten aus den unterschiedlichen Klärschlämmen

KA	Isoliert auf TET 15 [mg/L]	Isoliert auf SDZ 50 [mg/L]
AT	6	10
AIII	n.a.	n.a.
B	6	4
C	9	7
D	-	-
E	-	4
F	-	1
G	2	3
H	9	2
I	4	9
J	1	3
K	10	5
L	4	4

3.6.1 Charakterisierung der gefischten Plasmide

Von den insgesamt 103 gefischten Plasmiden konnten 61 via qPCR der Inkompatibilitätsgruppe IncP-1 zugeordnet werden (*korB* und *trfA*), und weitere 23 mit Hilfe von PCR/Southern Blot Hybridisierung der Gruppe IncN (s. Tabelle 7). Keines der verbleibenden Plasmide konnte den Inkompatibilitätsgruppen IncW, IncQ, IncF, IncI1, IncI2 oder PromA zugeordnet werden. In vielen Transkonjuganten (n=70) konnten Klasse 1 Integrons, sowie in den meisten Fällen auch die hiermit assoziierten Gene *sul1* und *qacEΔ1* nachgewiesen werden. Sequenzen, welche spezifisch für Klasse 2 Integrons oder das Sulfonamid-RG *sul2* sind, wurden in jeweils 2 und 21 Transkonjuganten nachgewiesen. In 68 Transkonjuganten wurde zudem das Tetracyclin-RG *tet(A)* detektiert, während *tet(M)* nur in 16 Transkonjuganten gefunden wurde. Außerdem wurden Integron-Genkassetten-Amplicons unterschiedlicher Größe in den Transkonjuganten nachgewiesen.

Tabelle 7: Charakterisierung Transkonjuganten

KA	Σ	<i>korB</i>	<i>trfA</i>	<i>IncN</i>	<i>int1</i>	<i>int2</i>	<i>qacE/qacEΔ1</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>tet(A)</i>	<i>tet(M)</i>	Größe Genkassette [kb]
A	16	16	16	-	16	-	16	16	-	16	-	2100
B	10	8	10	-	10	-	10	10	-	10	2	700, 1300, 1600
C	16	12	9	4	10	-	10	10	5	10	4	700, 1100, 2200/700
E	4	1	-	-	4	-	4	4	-	-	-	3200/200
F	1	1	-	-	1	1	1	1	-	-	1	700
G	5	2	2	(1)	4	1	4	4	-	2	1	2100/700, 4000/200, 3200
H	11	7	5	-	8	-	7	7	2	5	4	500, 700, 800, 2000
I	13	1	-	5(6)	3	-	3	3	3	5	-	3200/200
J	4	1	1	-	1	-	1	1	-	1	3	2000/700
K	15	7	5	8	7	-	6	7	8	12	1	200,1000, 2000/700
L	8	3	2	4	6	-	6	6	3	7	-	2000/700, 3200/200

3.6.2 Erstellung von Antibiogrammen transformierter Plasmide

Es konnten 28 von 32 Plasmiden erfolgreich in *E. coli* DH5 α transformiert werden. Von diesen 28 erwiesen sich im Nachhinein (durch Ergänzen der Identifizierung als Transkonjugant über BOX-PCR zusätzlich zur *gfp*-qPCR) 23 als echte Transkonjuganten. Das Auswertungsschema der Antibiogramme, welches sich an den breakpoints für *Enterobacteriaceae* entsprechend CLSI orientiert (mit Ausnahme von Colistin), ist in Tabelle 8 wiedergegeben. Zusätzlich zu den dort genannten Antibiotika wurde ebenfalls auf Resistenz gegen Cefotaxim (CTX) getestet, gegen das alle Transformanten empfindlich waren (nicht gezeigt). Die Ergebnisse der entsprechenden Antibiogramme sind in Tabelle 9 aufgeführt. Alle 23 Plasmide vermittelten Antibiotika-Resistenzen an ihren normalerweise Antibiotika-empfindlichen *E. coli* DH5 α -Wirt. Insgesamt wurden 19 unterschiedliche Resistenzmuster unter den 23 getesteten Plasmiden beobachtet. Insbesondere das Plasmid I4.18, welches aus Klärschlamm der Anlage I gefischt wurde, vermittelte besonders viele (9 von 11 getesteten) Resistenzen. Aufgrund dieser Tatsache wurde dieses Plasmid zur näheren Charakterisierung zur Sequenzierung ausgewählt.

Tabelle 8: Auswertungsschema Antibiogramme (Durchmesser der Hemmhöfe in mm)

Antibiotikum	Menge pro disc [μg]	Resistent	Moderat empfindlich	Empfindlich
OFL	5	≤ 12	13-15	≥ 16
SDZ	250	≤ 12	13-16	≥ 17
STR	10	≤ 11	12-14	≥ 15
TMP	5	≤ 10	11-15	≥ 16
TET	30	≤ 11	12-14	≥ 15
AMP	10	≤ 13	14-16	≥ 17
DOXY	30	≤ 10	11-13	≥ 14
COL*	10	≤ 8	9-18	≥ 19
CHL	30	≤ 12	13-17	≥ 18
CIP	5	≤ 15	16-20	≥ 21

*Laut CLSI-Vorgaben ist disc diffusion nicht die Methode der Wahl um Colistin-Resistenz ist zu testen.

Tabelle 9: Ergebnisse Antibiogramme transformierter Plasmide

Transformant	OFL ⁵	SDZ ²⁵⁰	STR ¹⁰	TMP ⁵	TET ³⁰	AMP ¹⁰	DOXY ³⁰	COL ¹⁰	CHL ³⁰	CIP ⁵
AT1		m	r	r	r		m			
AT2		m	m	r	r		r			
AT7		r	r	r	r	m	m			
AT8		m	m	r	r		m			
B1.1		m	m	r	r		r			
B1.17		m	r		r		m			
B2.1		r	m	r	r		r			
B3.12		r	m	r	r		r		r	
C1.1		m	m	r	r		m			
C1.2		m		r	r		m			
C1.15		m	r							
G21		(m)								
G30		m				r				
G33		(m)								
H3		m			r		m			
H7		m		r	r		r			
H15		m	r		m					
H21		m								

Transformant	OFL ⁵	SDZ ²⁵⁰	STR ¹⁰	TMP ⁵	TET ³⁰	AMP ¹⁰	DOXY ³⁰	COL ¹⁰	CHL ³⁰	CIP ⁵
I4.18	r	r	r	r	r	m		r	r	r
J3.5		m	m	r	r		r			
K2.2		m	m	r	r	r	m			
K3.19		r								
L1.7		r	m	r	r	r	r			m
<i>E. coli</i> DH5α	s	s	s	s	s	s	s	m	s	s

Aufgeführt sind ausschließlich Unterschiede zum Wirtsbakterium *E. coli* DH5α (s= sensitiv, m= moderat empfindlich, r= resistent). Blau unterlegt sind Transformanten, deren Plasmide mit TET selektiert wurden, Transformanten ohne farbige Unterlegung wurden mit SDZ isoliert.

3.6.3 Charakterisierung der Plasmid-DNA aus dem Transkonjuganten I4.18 und dem Transformanten I4.18

Im direkten Vergleich nach der elektrophoretischen Auftrennung auf einem Agarosegel konnte gezeigt werden, dass nach der Isolierung zwei Plasmid-Banden im Transkonjuganten I4.18, aber nur eine Bande im Transformanten (entspricht ca der Größe des kleinen Plasmids aus dem Transkonjuganten) auftrat (s. Abbildung 6). Während die Plasmid-DNA aus dem Transkonjuganten positiv auf IncN-spezifische Sequenzen getestet wurde, erwies sich der Transformant als IncN-negativ (s. Abbildung 7). Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Restriktionsverdau, waren deutlich unterschiedliche Bandenmuster für den Transkonjuganten I4.18 und das Standard IncN-plasmid RN3 zu erkennen, während der Transformant kein Bandenmuster aufwies (s. Abbildung 8).

Abbildung 6: Gelelektrophoretische Auftrennung der isolierten Plasmid-DNA aus dem Transkonjuganten I4.18, dem Transformanten I4.18 und dem Standard-Plasmid RN3 (IncN)

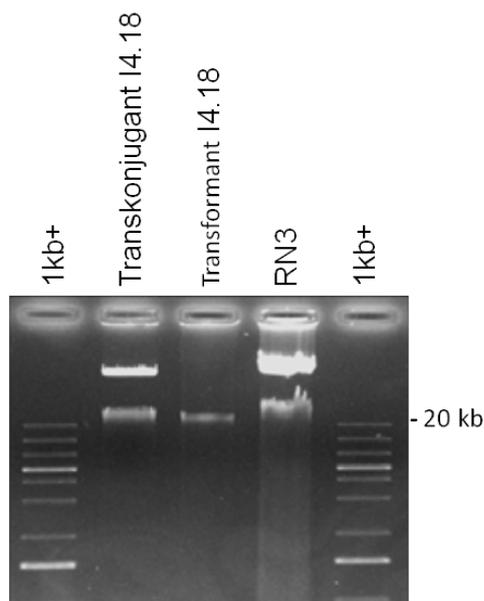


Abbildung 7: Ergebnis der IncN-spezifischen PCR für Plasmid-DNA isoliert aus dem Transkonjuganten I4.18 und dem Transformanten I4.18

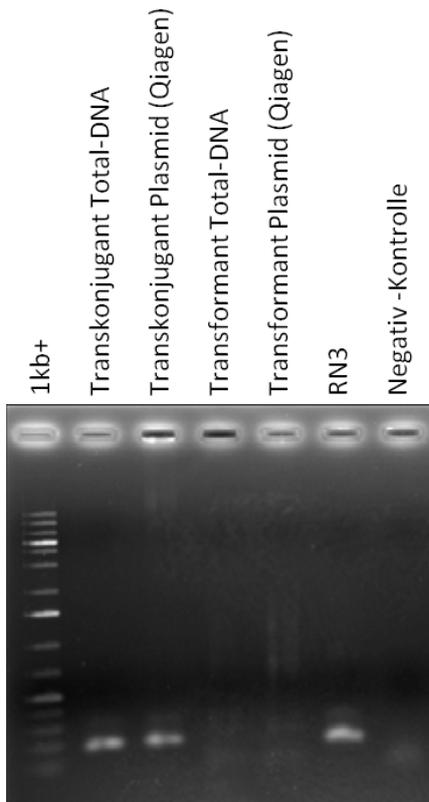
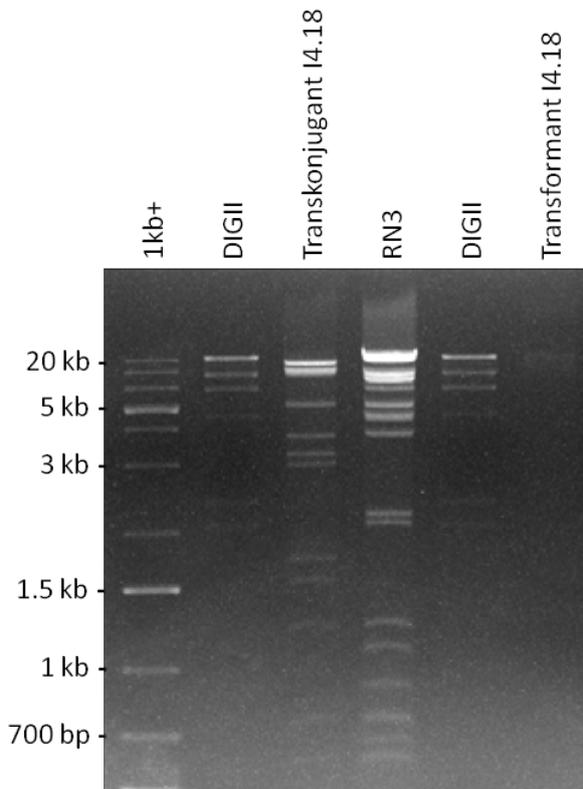


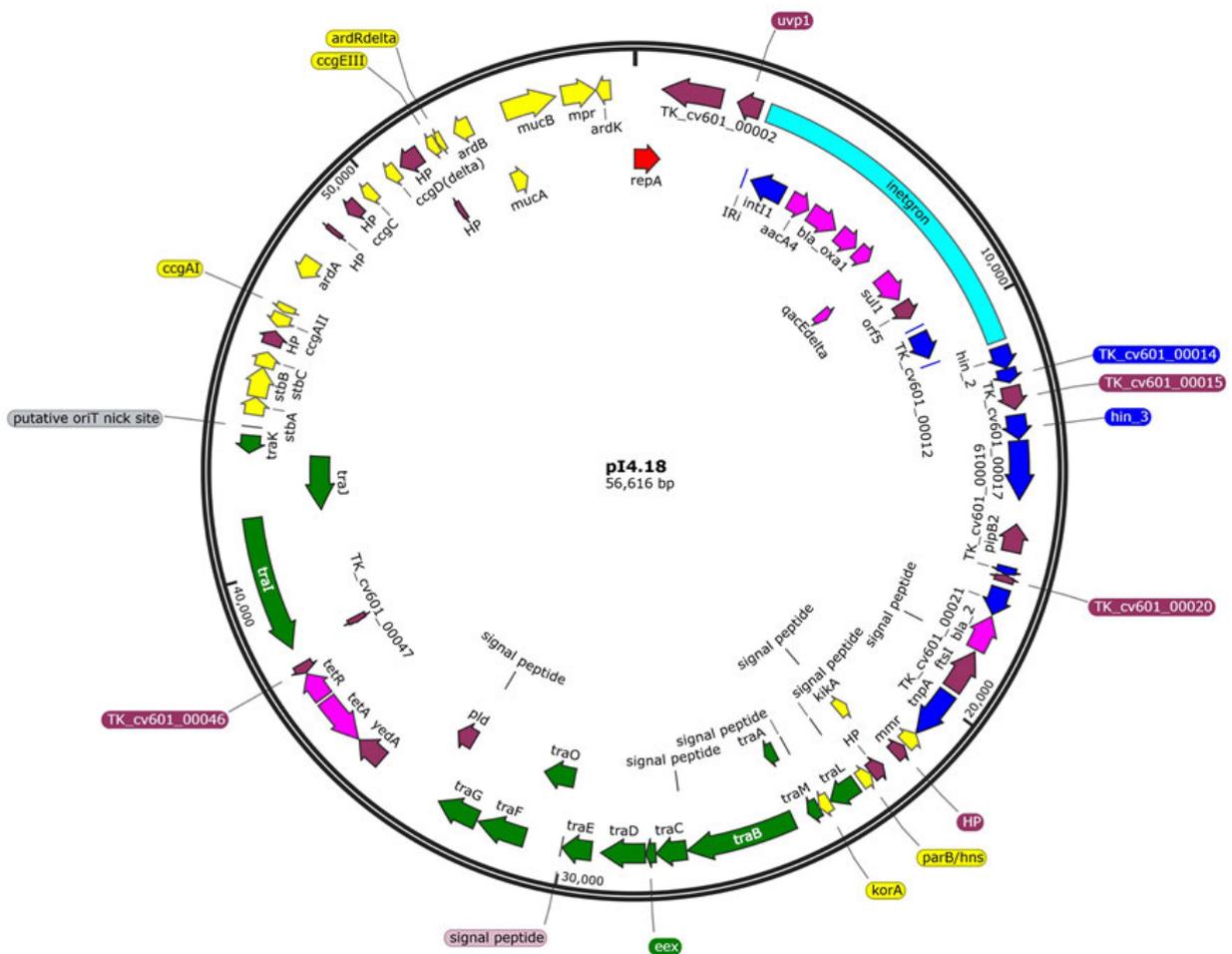
Abbildung 8: Restriktionsverdau der Plasmid-DNA, isoliert aus dem Transkonjuganten I4.18 und dem Transformanten I4.18



3.6.4 PacBio-Sequenzierung der Plasmid-DNA aus dem Transkonjuganten I4.18 und dem Transformanten I4.18

Obwohl das Antibiotogramm des Transformanten I4.18 Resistenzen gegen neun von elf getesteten Antibiotika zeigte, ergab die Sequenzierung, dass es sich bei der DNA isoliert aus dem Transformanten I4.18 nicht um Plasmid-DNA handelte. Es konnten demnach nur Aussagen zur Sequenzierung des erfolgreich sequenzierten Plasmids pI4.18 aus dem Transkonjuganten gemacht werden, die im Vergleich zum Antibiotogramm nur ein moderateres genotypisches Resistenzprofil zeigte. Das Plasmid gehört zur Inkompatibilitätsgruppe N und hat eine Gesamtgröße von 56.616 bp (Abb. 9).

Abbildung 9: Assemblierung des IncN Plasmids pI4.18 aus dem Transkonjuganten I4.18



Die Nukleotidsequenz des Plasmids pI4.18 wurde mit der des gut charakterisierten IncN-Plasmids R46 verglichen (Hall und Vockler, 1987). Die Plasmidrückgrat-Gene der IncN Plasmide zuständig für Plasmid-Replikation, -Erhaltung, -Vererbung und -Transfer waren in beiden Fällen gut konserviert (Abb. 10). Unterschiede zwischen beiden Plasmiden zeigten sich in deren Resistenzgenen: Zwar trugen beide *tetA-tetR* Gene; im Plasmid pI4.18 waren diese jedoch Teil eines Transposon-artigen Elements mit einem partiellen *pecM* und einem verkürzten Transposase-Gen, langen inverted repeats (245 bp) sowie 5bp-direct repeats, die Ähnlichkeit zu

(Jové et al., 2010) gilt (Abb. 11B). Diese Beobachtungen führen zu der Vermutung, dass die Integrone auf den IncN Plasmiden pI4.18 und R46 eine erhöhte Expression von Genkassetten ermöglichen.

3.7 Nachweis von coliformen Bakterien und Salmonellen

3.7.1 Direkter Nachweis coliformer Bakterien

In allen Klärschlämmen wurden coliforme Bakterien nachgewiesen, deren Konzentrationen im Bereich von $10^{4,2}$ bis $10^{6,6}$ CFUs/g pelletierter Klärschlamm bzw. $10^{5,3}$ bis $10^{8,6}$ CFUs/g Trockenmasse lagen (s. Tabelle 10).

3.7.2 Nachweis resistenter coliformer Bakterien nach Anreicherung

In allen untersuchten Klärschlämmen konnten Colistin-resistente coliforme Bakterien detektiert und aus diesen isoliert werden (s. Tabelle 10).

Tabelle 10: Logarithmierte CFU counts coliformer Bakterien und Detektion Colistin-resistenter Bakterien aus den Klärschlämmen

KA	LOG CFUs coliforme Bakterien/g pelletiertem Klärschlamm	LOG CFUs coliforme Bakterien/g Trockenmasse Klärschlamm	Detektion coliformer Colistin-resistenter Bakterien
AT	n.a.*	n.a.	n.a.
AIII	n.a.	n.a.	n.a.
B	4,24 (\pm 0,04)	5,31	+
C	4,49 (\pm 0,13)	5,55	+
D	6,32 (\pm 0,05)	7,49	+
E	6,40 (\pm 0,07)	7,42	+
F	5,47 (\pm 0,07)	6,03	+
G	6,17 (\pm 0,10)	7,12	+
H	5,48 (\pm 0,08)	6,53	+
I	6,49 (\pm 0,07)	8,59	+
J	5,64 (\pm 0,08)	7,73	+
K	5,76 (\pm 0,12)	7,95	+
L	6,56 (\pm 0,08)	8,58	+

Gelistet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus den vier Replikaten. n. a.: Für die Klärschlämme aus Anlage A wurden die Nachweise für coliforme Bakterien und Salmonellen nach einer Anreicherung durchgeführt. Hiermit sind die Werte nicht repräsentativ und hier nicht gelistet.

3.7.3 Nachweis von Salmonellen nach Anreicherung

In keinem der beprobten Klärschlämme konnte in einem Untersuchungsvolumen von umgerechnet 0,56 bis 1,34 μ L bzw. 16,7 bis 68,7 μ g Trockenmasse nach der beschriebenen Methodik durch Anreicherung Salmonellen detektiert werden.

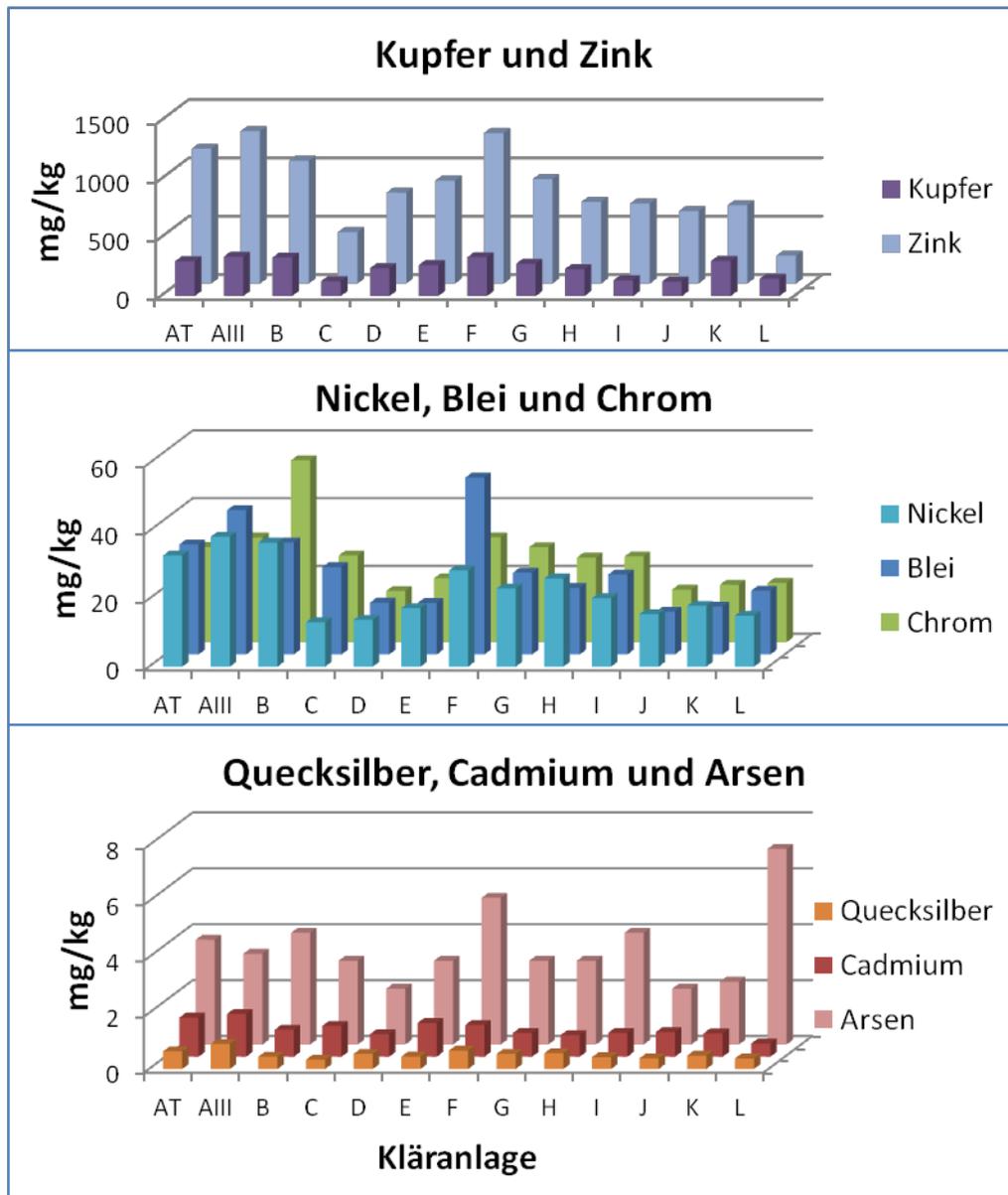
3.8 Chemische Analysen

Die Schwermetall-Analysen wurden durch die Firma AGROLAB Agrar und Umwelt GmbH durchgeführt. Diese erfolgten nach folgenden DIN-Vorschriften:

- DIN EN ISO 11885 : 2009-09: Blei (Pb), Cadmium (Cd), Chrom (Cr), Kupfer (Cu), Nickel (Ni) und Zink (Zn)
- DIN EN ISO 17294-2 : 2017-01: Arsen (As) und Thallium (Tl)
- DIN 19734 : 1999-01 (OB): Chrom VI
- DIN EN 16175-1 : 2016-12: Quecksilber (Hg)

Die Ergebnisse der Schwermetall-Analysen sind in Abbildung 12 zusammengefasst (die entsprechenden Zahlenwerte samt Standardabweichungen sind dem Anhang A.5 zu entnehmen). Die höchsten Konzentrationen bezogen auf die Trockenmasse wurden jeweils in den entwässerten Klärschlämmen (Anlagen A und F) nachgewiesen, mit beispielsweise 336 mg Cu und 1,3 g Zn/kg Trockenmasse in Klärschlamm AIII. Nur in vereinzelt Proben wurde Tl und in keiner Probe CrVI nachgewiesen (s. Anhang A.5). Bis auf eine Ausnahme (Cd-Gehalt in Anlage AIII) lagen alle bestimmten Schwermetallkonzentrationen unterhalb der gesetzlich vorgeschriebenen Grenzwerte. Die Ergebnisse der Schwermetallanalysen bezogen auf die Originalsubstanz sind dem Anhang A.6 zu entnehmen.

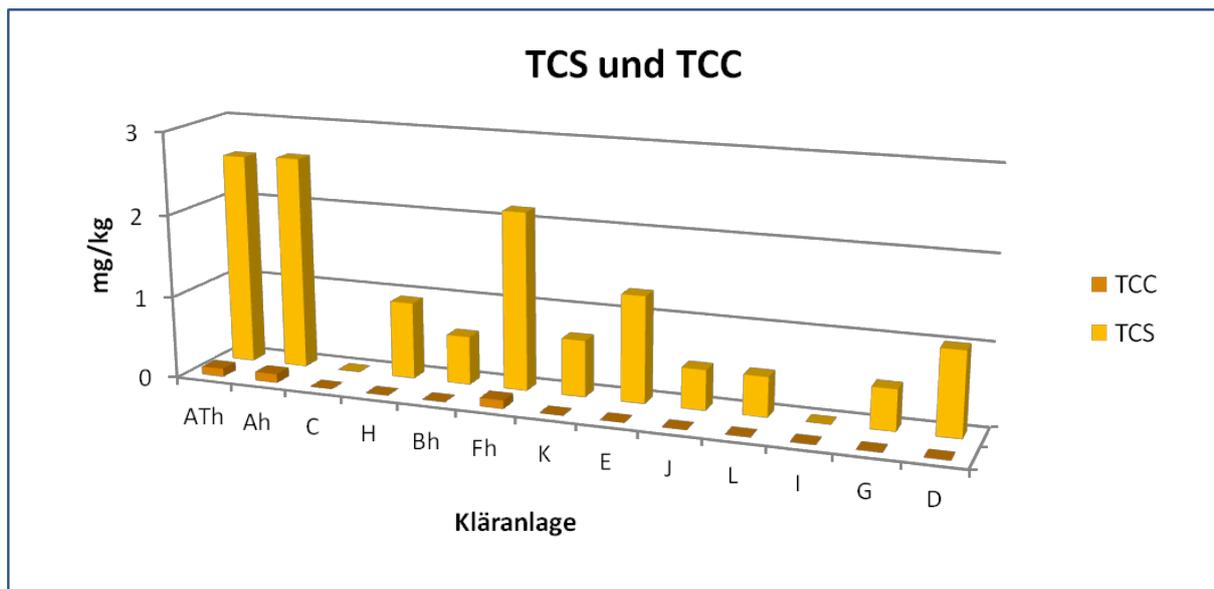
Abbildung 12: Schwermetall-Konzentrationen [mg] in den Klärschlämmen pro kg Trockenmasse



Dargestellt sind die Mittelwerte aus den vier Replikaten. Das Vorhandensein einer Klinik im Einzugsgebiet der Kläranlage ist durch ein zusätzliches „h“ an der Buchstaben-Kodierung indiziert.

Die Analyse der Rückstände an Triclosan (TCS) und Triclocarban (TCC) in den Klärschlämmen erfolgte bei der LUFA Nord-West am Institut für Boden und Umwelt und wurde anhand der Methode ASU L 00.00-115; 2014-02 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2019) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 aufgeführt. Die höchsten Konzentrationen an TCS (2,59 mg/kg Trockenmasse) und TCC (0,11 mg/kg Trockenmasse) wurden jeweils in den entwässerten Klärschlämmen detektiert. Während TCS in allen Klärschlämmen außer denen aus Anlage C und I nachgewiesen werden konnte, wurde TCC ausschließlich in den getrockneten Klärschlämmen (Anlagen A und F) gefunden. Die Zahlenwerte der Konzentrationen bezogen auf den Trockenmasse-Gehalt der Klärschlammte sind dem Anhang A.5 zu entnehmen, die entsprechenden Werte für die Konzentrationen an TCS und TCC in der Originalsubstanz sind im Anhang A.6 aufgelistet.

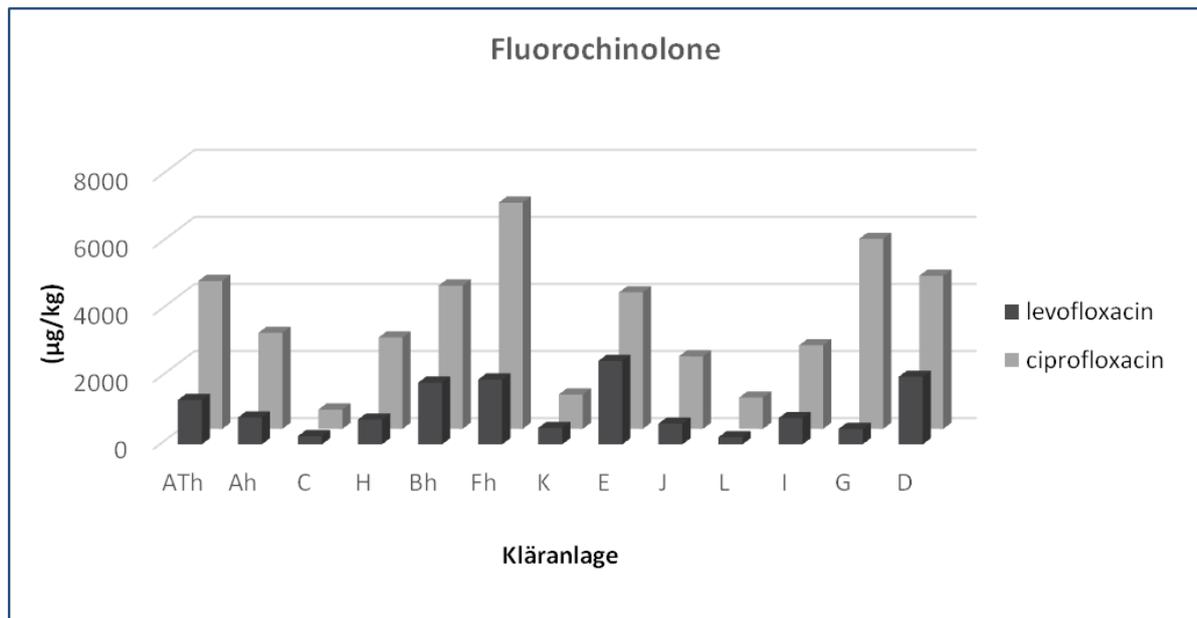
Abbildung 13: Konzentrationen an TCS und TCC [mg/kg Trockenmasse] in den Klärschlämmen



Dargestellt sind die Mittelwerte aus den vier Replikaten. Das Vorhandensein einer Klinik im Einzugsgebiet der Kläranlage ist durch ein zusätzliches „h“ an der Buchstaben-Kodierung indiziert.

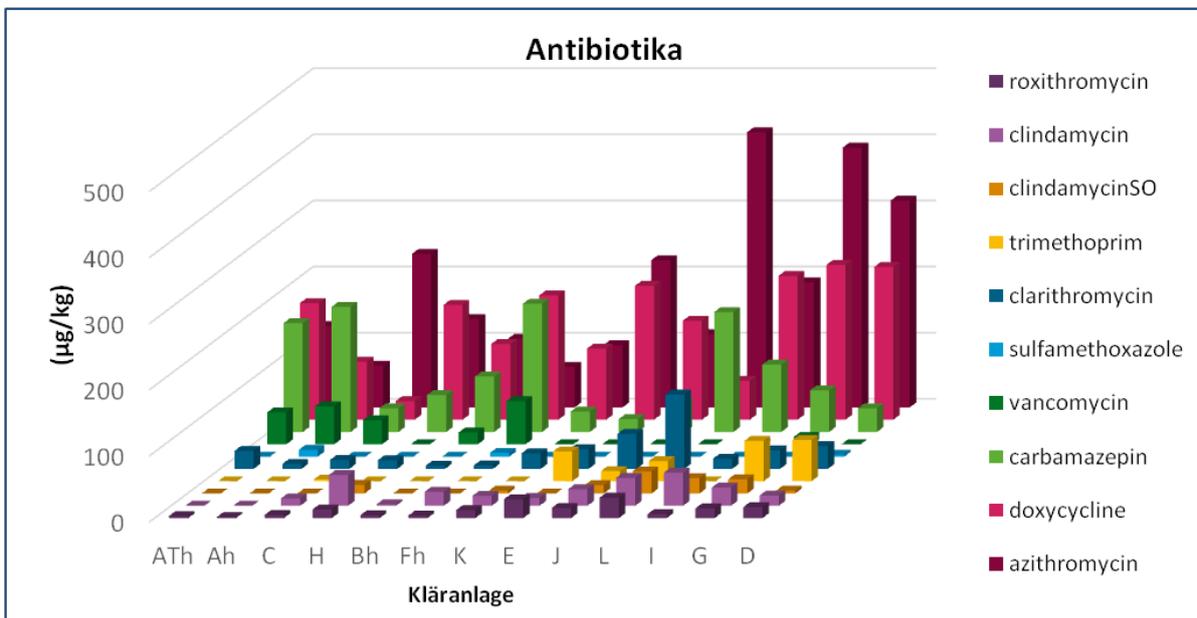
Die Analyse der Klärschlämme auf Antibiotika-Rückstände erfolgte durch das Institut für klinische Pharmakologie der Medizinischen Fakultät der TU Dresden entsprechend bereits veröffentlichter Methoden (Marx et al., 2015) für folgende Substanzen: Sulfamethoxazol (SMX), DOXY, CIP, Levofloxacin (LEVO), Penicillin V, Piperacillin, Amoxicillin, TMP, Clindamycin (CLIN), Clindamycinsulfoxid (CLINSO), Erythromycin, Azithromycin (AZI), Clarithromycin (CLAR), Roxithromycin (ROX), Vancomycin (VAN), Cefuroxim (CEF) und CTX. Zusätzlich zu Antibiotika erfasst diese Methode auch Carbamazepin (CARB), ein Antiepileptikum, welches häufig als Arzneimittel-Rückstand in Abwasser und Klärschlamm nachgewiesen wird. Da die Methodik nur eine getrennte Analyse der wässrigen Überstände und der Festsubstanz (pelletierte und luftgetrocknete Klärschlämme) zuließ, wurden die Konzentrationen in der Originalsubstanz, unter Berücksichtigung der bekannten Trockenmassegehalte durch Berechnung ermittelt. Diese Ergebnisse (Zahlenwerte) sind im Anhang A.7 gelistet. Die Ergebnisse bezogen auf die Trockenmasse sind für die Fluorochinolon-Antibiotika, die in hohen Konzentrationen (im mg/kg-Bereich) nachgewiesen wurden, in der Abbildung 6, und für die Nicht-Fluorochinolon-Antibiotika in Abbildung 14 dargestellt. Neben den hohen Fluorochinolon-Konzentrationen von bis zu 6,75 mg/kg Trockenmasse für CIP wurden auch AZI, DOXY und CARB mit mehreren hundert µg/kg Trockenmasse nachgewiesen (s. Abbildung 15). CLIN, SMX und TMP wurden nur vereinzelt in Klärschlämmen detektiert, ebenso wie VAN, welches nur in entwässerten und sporadisch in flüssigen Klärschlämmen gefunden wurde (s. Abbildung 15). Es konnten keine Cephalosporine, Penicilline oder Erythromycin in den Klärschlämmen detektiert werden. Abgesehen von CIP und LEVO mit maximalen Konzentrationen von jeweils 1,8 mg/kg und 521 µg/kg, lagen alle determinierten Antibiotika-Konzentrationen in der Originalsubstanz unterhalb der MIC breakpoints laut EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; 2019). Die Zahlenwerte der separat gemessenen Konzentrationen in den wässrigen Überständen der Klärschlämme, sowie die berechneten Konzentrationen in der Originalsubstanz sind dem Anhang zu entnehmen (s. Anhang A.8 und A.9).

Abbildung 14: Konzentrationen Fluorochinolon-Antibiotika [μg] in den Klärschlämmen pro kg Trockenmasse



Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier Replikaten. Das Vorhandensein einer Klinik im Einzugsgebiet der Kläranlage ist durch ein zusätzliches „h“ an der Buchstaben-Kodierung indiziert.

Abbildung 15: Konzentrationen von Nicht-Fluorochinolon-Antibiotika [μg] in den Klärschlämmen pro kg Trockenmasse

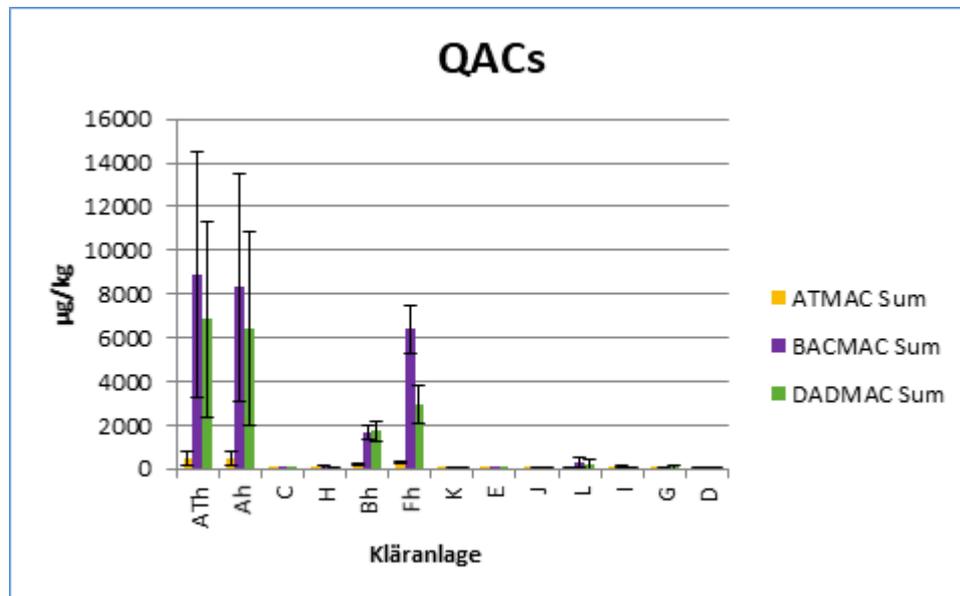


Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier Replikaten. Das Vorhandensein einer Klinik im Einzugsgebiet der Kläranlage ist durch ein zusätzliches „h“ an der Buchstaben-Kodierung indiziert.

Die Rückstandanalytik für QACs in den Klärschlämmen wurde durch das Institut für Bodenkunde und Bodenerhaltung der Justus-Liebig-Universität in Giessen durchgeführt und erwies sich insbesondere in den flüssigen Klärschlämmen als herausfordernd. Dementsprechend, obgleich viele der analysierten Homologe detektiert und quantifiziert werden konnten (summierte Werte der einzelnen QAC-Gruppen: Alkyldimethyl- (ATMAC),

Benzyl dimethyl- (BACMAC) und Dialkyldimethylammoniumverbindungen (DADMAC), s. Abbildung 16 und Zahlenwerte s. Anhang 13), sind die Standardabweichungen sehr hoch - teilweise sogar höher als der errechnete Mittelwert.

Abbildung 16: Summierte Konzentrationen von QAC-Gruppen in den Klärschlämmen pro kg Trockenmasse



Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier Replikaten. Das Vorhandensein einer Klinik im Einzugsgebiet der Kläranlage ist durch ein zusätzliches „h“ an der Buchstaben-Kodierung indiziert.

3.9 Korrelations- Analysen

Da sich bei den vorliegenden Analysen abzeichnete, dass die entwässerten Klärschlämme auch bezogen auf den Trockenmassegehalt stärker mit vielen selektiven Substanzen kontaminiert waren als die flüssigen, und sich die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften in entwässerten und flüssigen Klärschlämmen unterschieden, wurden die beiden entwässerten Klärschlämme von der Korrelationsanalyse ausgeschlossen, um eventuelle auftretende Korrelationen nicht zu verzerren (die Korrelationswerte für die Analysen unter Einbeziehung aller Klärschlämme sind, der Vollständigkeit halber, im Anhang A.10 aufgelistet). Da die maximale Auftragsmenge an Klärschlamm pro Jahr und Hektar (u. a.) über die eingetragene Trockenmasse definiert ist, wurden die Analysen bezogen auf die Genabundanz und Schadstoffkonzentration pro Einheit Trockenmasse durchgeführt (s. Tabellen 11 & 12). Da das Gen *intI2* und Plasmide der Gruppe IncI nur in vereinzelten Proben detektiert wurden, wurden diese von der Analyse ausgeschlossen.

Unter den analysierten Antibiotika ergaben sich vor allem für die Fluorochinolone (CIP und LEVO), sowie für DOXY und TMP zahlreiche signifikante und positive Korrelationen mit Zielgenen (s. Tabelle 11). Besonders starke Korrelationskoeffizienten ($r > 0,7$) traten auf für die Beziehungen zwischen CIP und *sul1*, sowie zwischen TMP und *intI1*, *aadA* und *qnrS*. Ebenso wurden zahlreiche signifikante und positive Korrelationen zwischen dem Desinfektionsmittel TCS und den Schwermetallen Cu und Zn mit Zielgenen in den flüssigen Klärschlämmen aufgedeckt (s. Tabelle 12). Hierbei wiesen insbesondere die Kombinationen aus Zn und *sul1* und *qacE/qacEΔ1* hohe Korrelationskoeffizienten auf. Im Gegensatz hierzu war die Mehrzahl der Korrelationen zwischen der Konzentration an As, Pb und Cr mit den Zielgenen negativ.

Besonders starke negative Korrelationen ($r < -0,7$) ergaben sich für die Kombinationen aus Cr und Ni mit *tetA(P)*. Auffällig war zudem, dass auch die Korrelationswerte zwischen der Abundanz der Zielgene (mit Ausnahme von *tet(A)*) und der Ausbaugröße der Kläranlagen in den meisten Fällen negativ und signifikant waren (s. Tabelle 12).

Aufgrund der Schwierigkeiten bei der QAC-Rückstandanalytik sind die entsprechenden Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Pearson lediglich der Vollständigkeit halber im Anhang aufgeführt (s. Anhang 13). Beschränkt auf die flüssigen Klärschlämme ließen sich für die Konzentrationen annähernd aller untersuchten QAC-Homologe starke und signifikante positive Korrelationen zu den Zielgenen *rrn*, *tetA(P)*, *tet(W)* und *sul1* beobachten.

Um eventuelle selektive Effekte der tatsächlich in der Original-Klärschlammsubstanz vorliegenden Konzentrationen an selektiven Substanzen nicht zu übersehen, wurde auch für diese Werte (mit Ausnahme der QACs) eine entsprechende Analyse durchgeführt, welche dem Anhang A.11 zu entnehmen ist. Hier ließen sich noch deutlich zahlreichere positive Korrelationen zwischen der jeweiligen Zielgen-Abundanz und den Konzentrationen an potentiell selektiven Substanzen verzeichnen.

Tabelle 11: Korrelationskoeffizienten nach Pearson zwischen absoluter Genabundanz und Antibiotika-Konzentrationen in den Klärschlämmen pro Trockenmasse-Einheit

	<i>rrn</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>tet(A)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>tet(Q)</i>	<i>tet(W)</i>	<i>strA</i>
ROX	-0,04	-0,13	0,12	-0,23	0,00	0,29	-0,03	0,12
AZI	-0,14	0,10	-0,12	-0,20	0,09	0,03	-0,16	0,28
CLIN	-0,52 ***	-0,18	0,12	-0,11	-0,48 **	-0,28	-0,32 *	0,06
CLINSO	-0,40 *	-0,13	0,01	-0,16	-0,35 *	-0,27	-0,27	0,15
TMP	0,10	0,49 **	0,19	-0,20	0,47 **	0,58 ***	0,27	0,63 ***
CLAR	0,00	-0,25	0,22	-0,21	-0,06	0,07	-0,14	0,01
LEVO	0,56 ***	0,52 ***	0,32 *	-0,16	0,54 ***	0,55 ***	0,64 ***	0,18
CIP	0,19	0,71 ***	0,31	-0,24	0,38 *	0,41 **	0,51 ***	0,61 ***
DOXY	0,03	0,55 ***	0,37 *	-0,28	0,27	0,46 **	0,44 **	0,66 ***
CARB	-0,07	-0,14	0,02	-0,19	-0,27	-0,42 **	-0,24	-0,11
	<i>intl1</i>	<i>korB</i>	<i>trfA</i>	<i>qacE/qacEΔ1</i>	<i>aadA</i>	<i>tetA(P)</i>	<i>qnrS</i>	
ROX	0,29	-0,22	0,21	0,13	0,30	-0,33 *	0,47 **	
AZI	0,40 *	-0,14	0,09	0,23	0,18	-0,26	0,31	

	<i>rrn</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>tet(A)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>tet(Q)</i>	<i>tet(W)</i>	<i>strA</i>
CLIN	-0,03	0,11	-0,16	-0,21	-0,30	-0,39 *	-0,17	
CLINSO	0,10	0,10	-0,13	-0,08	-0,23	-0,25	-0,23	
TMP	0,72 ***	-0,05	0,59 ***	0,64 ***	0,71 ***	-0,24	0,76 ***	
CLAR	0,15	-0,13	0,00	-0,19	0,16	-0,29	0,12	
LEVO	0,46 **	-0,01	0,41 **	0,43 **	0,49 **	0,33 *	0,61 ***	
CIP	0,56 ***	0,03	0,49 **	0,68 ***	0,39 *	0,28	0,47 **	
DOXY	0,52 ***	0,36 *	0,53 ***	0,58 ***	0,43 **	-0,05	0,45 **	
CARB	-0,04	-0,13	-0,40 **	-0,24	-0,29	0,10	-0,26	

Starke Korrelationskoeffizienten ($0,7 > r < -0,7$) sind fett hervorgehoben (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Tabelle 12: Korrelationskoeffizienten nach Pearson zwischen absoluter Genabundanz und Schwermetall- sowie TCS-Konzentrationen in den Klärschlämmen pro Trockenmasse-Einheit und der Ausbaugröße der Anlagen

	<i>rrn</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>tet(A)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>tet(Q)</i>	<i>tet(W)</i>	<i>strA</i>
TCS	0,31 *	0,20	0,22	0,03	0,38 *	0,51 ***	0,33 *	0,12
Pb	0,06	0,21	-0,33 *	0,10	-0,07	-0,52 ***	-0,05	-0,09
Cd	0,08	0,20	-0,13	0,07	0,12	0,30	0,29	0,05
Cr	0,27	0,32 *	-0,12	0,04	0,05	-0,35 **	0,21	-0,03
Cu	0,34 *	0,47 **	-0,13	-0,09	0,26	0,06	0,23	0,34 *
Ni	0,18	0,35 *	0,03	0,02	-0,03	-0,28	0,23	0,10
Hg	-0,01	0,25	0,09	0,11	0,23	0,13	0,05	0,27
Zn	0,33 *	0,71 ***	0,20	-0,09	0,38 *	0,36 *	0,62 ***	0,51 ***
As	-0,24	-0,32 *	-0,30	-0,03	-0,59 ***	-0,60 ***	-0,42 **	-0,25
TI	-0,09	-0,17	-0,43 **	0,20	-0,08	0,08	-0,13	-0,27

	<i>rrn</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>tet(A)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>tet(Q)</i>	<i>tet(W)</i>	<i>strA</i>
Größe	-0,07	-0,45 **	-0,52 ***	0,34 *	-0,19	-0,46 **	-0,39 *	-0,65 ***
	<i>intl1</i>	<i>korB</i>	<i>trfA</i>	<i>qacE/qacE11</i>	<i>aadA</i>	<i>tetA(P)</i>	<i>qnrS</i>	
TCS	0,37 *	-0,16	0,36 *	0,29	0,53 ***	0,03	0,59 ***	
Pb	-0,13	-0,13	-0,44 **	0,10	-0,50 **	0,64 ***	-0,35 *	
Cd	-0,04	0,03	0,26	0,34 *	0,00	0,13	0,24	
Cr	-0,10	-0,08	-0,30	0,17	-0,38 *	0,89 ***	-0,32 *	
Cu	0,31	-0,16	0,18	0,55 ***	0,21	0,53 ***	0,25	
Ni	-0,03	-0,05	-0,18	0,24	-0,32 *	0,84 ***	-0,28	
Hg	0,24	-0,04	0,20	0,31	0,23	0,00	0,25	
Zn	0,32 *	0,18	0,42 **	0,70 ***	0,26	0,61 ***	0,30	
As	-0,19	-0,25	-0,51 ***	-0,22	-0,63 ***	0,12	-0,35 *	
Tl	-0,08	-0,27	0,02	0,06	-0,14	-0,22	0,28	
Größe	-0,52 ***	-0,35 *	-0,52 ***	-0,46 **	-0,51 ***	0,10	-0,43 **	

Starke Korrelationskoeffizienten ($0,7 > r < -0,7$) sind fett hervorgehoben (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

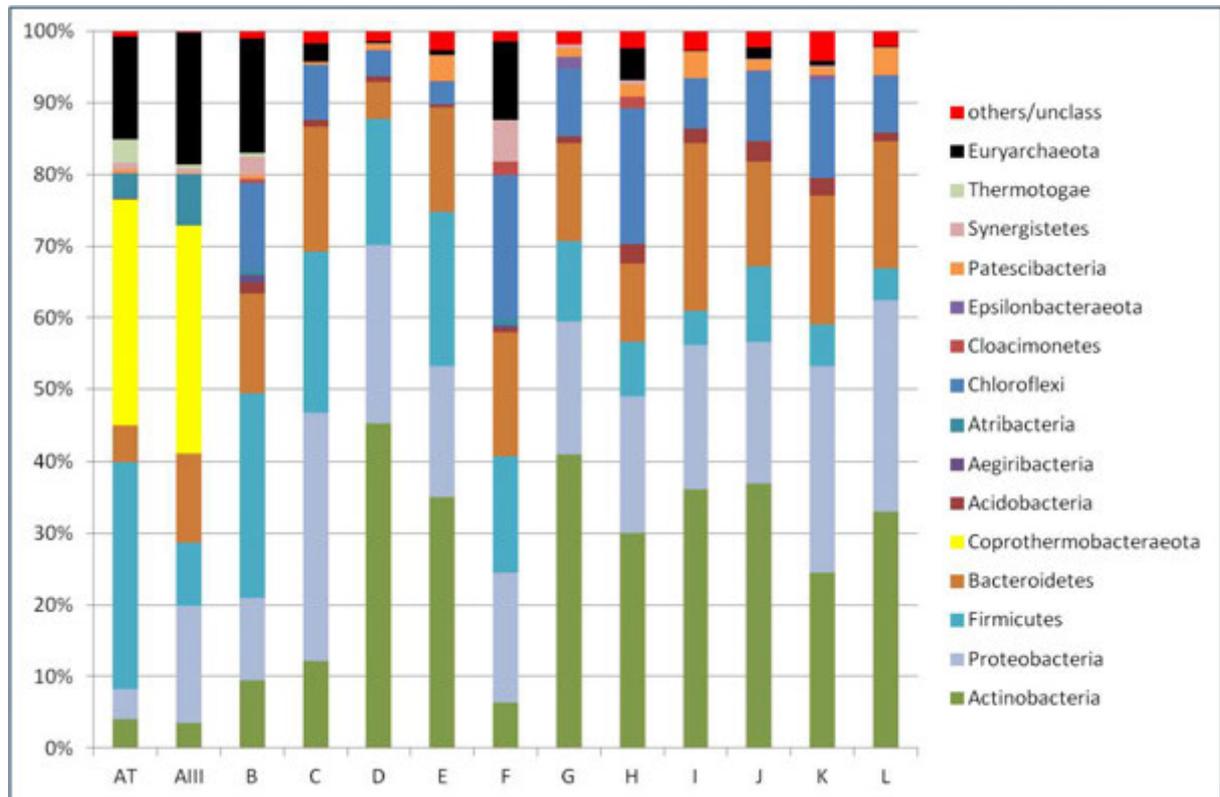
3.10 Analyse der Zusammensetzung der prokaryotischen Gemeinschaften in den Klärschlämmen via Illumina Sequenzierung von 16S Amplicons*

Durch Illumina-Sequenzierung von 16S rRNA Genfragmenten wurden 2104 Ampliconsequenzvarianten (ASVs) erhalten. Die Rarefaction-Analyse zeigte, dass ausreichend Sequenzen pro Probe erhalten wurden, um deren Diversität zu beschreiben. Die durchschnittliche Zahl von ASVs pro Klärschlammprobe schwankte zwischen 120 (Standardabweichung 20,9) für Kläranlage F bis 416 ASVs (Standardabweichung 23,3 in Anlage K. Die Größe des Einzugsgebiets (EW) hatte keinen signifikanten Einfluß auf die Diversitätsindices. In der Ordinationsanalyse war die Clusterung der Proben zunächst durch die Anlage, gefolgt vom Vorhandensein einer Klinik oder Lebensmittelindustrie bestimmt. Die Größe der Anlage hatte hingegen keinen signifikanten Effekt. Die Mehrzahl der in den Klärschlämmen identifizierten Taxa waren typische Vertreter von Klärschlämmen. In den Klärschlämmen der meisten Anlagen waren filamentöse Actinobacteria Candidatus *Microthrix* dominant. Eine sehr hohe relative Abundanz der Gattung Coprothermobacter (Mittelwert: 41,4; Standardabweichung: 4,5%). Wenn alle Gattung mit mehr als 2% relativer Abundanz berücksichtigt wurden, zeigte sich ebenfalls, dass die Proben nach der Anlage und

Vorhandensein einer Klinik oder Lebensmittelindustrie beeinflusst wurden. Obwohl die Größe der Anlagen keinen signifikanten Einfluß auf die Beta Diversität hatte, waren sich doch die mikrobiellen Gemeinschaften der kleineren Anlagen ähnlicher als die der großen Anlagen. Auch die Entwässerung der Klärschlämme hatte einen starken Einfluß auf deren Diversität.

Die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften in den Klärschlämmen der unterschiedlichen Anlagen auf der Phylumebene ist in Abbildung 17 dargestellt. Die entsprechend ihrer relativen Abundanz häufigsten bakteriellen Phyla in den Klärschlammproben dieses Projektes waren Actinobacteria (3,5 – 45,3%), Proteobacteria (4,2 – 34,6%), Firmicutes (4,5 – 31,7%), Bacteroidetes (5,1 – 23,5%) und, wenn auch ausschließlich in Klärschlämmen aus der Anlage A detektierbar, Coprothermobacteraeota (ca. 31,5%). Im Falle der Actinobacteria konnte beobachtet werden, dass deren relative Abundanz niedriger in den entwässerten Klärschlämmen war (3,5 - 6,3% im Vergleich zu 9,4 - 45,3%). Desweiteren waren in geringerer relativer Abundanz in allen Klärschlämmen Patescibacteria und Chloroflexi nachweisbar, sowie in einzelnen Proben Atribacteria, Acidobacteria, Aegiribacteria, Cloacimonetes, Epsilonbacteria, Synergistetes und Tenericutes. Zudem wurden in allen Proben Archaea detektiert (0,1 - 18,5%). Hierbei fiel auf, dass die relative Abundanz von Archaea deutlich höher in Klärschlämmen aus den Anlagen war, in deren Einzugsgebiet eine Klinik liegt (11,0 - 18,5%) als in den übrigen Klärschlämmen (0,1 – 4,5%). Die Zahlenwerte der relativen Abundanz der einzelnen Klassen in den Proben sind in Anhang A14 aufgelistet. Im Rahmen dieser Studie wurden ein spezifisches subset von ASVs untersucht, die zu Gattungen mit klinischer Relevanz gehörten. Insgesamt wurden 84 ASVs, die zu fünf Gattungen gehörten (*Acinetobacter*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* und *Streptococcus*) im Detail untersucht. Diese Taxa waren in Klärschlämmen mit Krankenhäusern bzw. Lebensmittelindustrie signifikant erhöht.

Abbildung 17: Zusammensetzung der prokaryotischen Gemeinschaften in den Klärschlämmen auf dem Klasse-Level (berücksichtigt wurden nur Klassen, deren relative Abundanz in mindestens einer Probe mindestens 1% der Sequenzen ausmacht).



*Die Analyse der Ampliconsequenzierung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Soren Sorensen, Universität Kopenhagen

4 Diskussion

Durch diese Studie konnten wertvolle Erkenntnisse über die Kontamination von Klärschlämmen aus kleinen Abwasserbehandlungsanlagen mit RGs, MGEs und selektiven Substanzen gewonnen werden.

4.1 Klärschlamm als wichtiges Reservoir an RGs und MGEs

Die Auswertungen der qPCR Ergebnisse (bezogen auf den Trockenmassegehalt) haben gezeigt, dass die Abundanz der meisten Zielgene in den Klärschlämmen aus kleinen Abwasserbehandlungsanlagen vergleichbar hoch (teilweise sogar etwas höher) ist wie in Klärschlämmen aus großen Anlagen. Somit scheint eine Kategorisierung von Klärschlämmen anhand der Größe der Kläranlagen, wie indirekt durch die Novellierung der Klärschlammverordnung vollzogen, nicht geeignet, um Rückschlüsse auf deren Belastung mit RGs und MGEs zu ziehen. Im Gegensatz zur Größe der Kläranlagen hat sich die Beschaffenheit des Klärschlammes im Falle mehrerer Zielgene als wichtiger Faktor erwiesen, der deren Abundanz in den Proben (bezogen auf die Trockenmasse) zu beeinflussen scheint. Die Beobachtung, dass die Abundanz von IncP-1 Plasmiden deutlich niedriger in den entwässerten Klärschlämmen ist, lässt darauf schließen, dass die vorliegenden Bedingungen in den flüssigen Klärschlämmen für deren bakterielle Wirte wesentlich günstiger sind. Umgekehrt scheinen die Bedingungen in entwässerten Klärschlämmen günstiger für Bakterien zu sein, die Klasse 2 Integrons (*intl2*) tragen, als in flüssigen Klärschlämmen. Bemerkenswert ist die Beobachtung, dass gerade in den Klärschlämmen, die nicht auf landwirtschaftliche Flächen ausgebracht werden dürfen, sondern verbrannt werden, für viele Zielgene die geringste Abundanz festzustellen war. Da die beiden betreffenden Klärschlämme aus unterschiedlichen Gründen der Verbrennung zugeführt werden, und die beiden Anlagen sich bezüglich ihrer Größe und ihres Einspeisungsgebietes unterscheiden, könnte über eine mögliche Kausalität dieses Zusammenhangs bestenfalls spekuliert werden.

Der zusätzliche semi-quantitative Nachweis von Sequenzen, welche spezifisch für Plasmide der Inkompatibilitätsgruppen PromA, IncN und IncW sind, verdeutlicht das Übertragungspotential welches von den im Klärschlamm vorhandenen Bakterien ausgeht. Vor allem PromA Plasmide sind für ihre Rolle als Vermittler für die konjugative Übertragung von mobilisierbaren Plasmiden zwischen Bakterien bekannt (Zhang et al., 2015). Auch wenn PromA Plasmide typischerweise keinerlei RGs tragen, können sie so trotzdem zur Verbreitung von RGs, die auf anderen Plasmiden liegen, beitragen. Unter einer Vielzahl von Plasmiden, die aus Klärschlämmen in Japan isoliert wurden, stellte die Gruppe der PromA Plasmide die deutlich größte Fraktion dar (persönliche Mitteilung Masaki Shintani, 2018), was zusammen mit den vorliegenden Ergebnissen darauf hindeutet, dass diese Plasmide generell sehr abundant in Klärschlamm sind. Im Hinblick auf eine mögliche Weiterverbreitung bis hin den klinischen Kontext ist es vor allem interessant, dass IncN und IncW (und die via qPCR nachgewiesenen IncP-1) Plasmide sowohl aus organischen Düngemitteln (Wolters et al., 2016a) als auch aus klinischen Pathogenen (Zhang et al., 2014) bekannt sind. Letztere Plasmidgruppen sind außerdem mit einer Vielzahl unterschiedlicher RGs assoziiert (Gonzales-Zorn et al., 2005; Revilla et al., 2008; Eikmeyer et al., 2012) und haben einen breiten Wirtsbereich. Somit könnten klinische Pathogene durch Aufnahme dieser Plasmide Resistenzen gegen diverse Antibiotika erwerben, was eine erfolgreiche Behandlung der entsprechenden Infektionen immens erschwert oder im schlimmsten Falle gänzlich verhindert.

Sowohl die Quantifizierung von RGs und MGEs mittels qPCR als auch der Nachweis mehrerer Plasmid-spezifischer Sequenzen via Southern Blot-Hybridisierung, bestätigt die Rolle von

Klärschlamm als wichtige Quelle von RGs und MGEs. So wurde bereits eine Vielzahl an RGs in Klärschlämmen in anderen Studien detektiert (Ghosh et al., 2009, Diehl & LaPara, 2010; Ma et al., 2011, Zhang et al., 2011, Calero-Cáceres et al., 2014, Jang et al., 2018). Neben den genannten Plasmidgruppen, wurden ebenso zahlreiche weitere Plasmide (die in der vorliegenden Studie nicht berücksichtigt wurden) in Klärschlämmen nachgewiesen oder aus diesen isoliert (Akiyama et al., 2010; Eikmeyer et al., 2012; Dropa et al., 2016; Yao et al., 2017).

4.2 Einfluss der Ausbringung von Klärschlamm auf RGs und MGEs in Böden

Die Quantifizierung von RGs und MGEs in den Bodenmikrokosmen zeigte deutlich, dass RGs und MGEs in den Kontrollböden unterhalb der Detektionsgrenze der qPCR lagen. Auch der bloße Eintrag von Nährstoffen, wie in den NPK-gedüngten Böden simuliert, führte nicht dazu, dass eventuell im Boden vorhandene resistente Bakterien proliferierten. Lediglich in den mit Klärschlamm behandelten Böden konnten RGs und MGEs nachgewiesen werden. Die hier verwendeten Standardböden wurden von der Lufa Speyer bezogen und wurden seit mindestens 4 Jahren nicht mehr mit organischem Dünger behandelt. Im Gegensatz dazu können landwirtschaftliche Böden, die über längere Zeit organische Düngemittel erhielten, eine Hintergrundbelastung mit resistenten Bakterien aufweisen. So konnte unter anderem im Rahmen eines vorausgehenden Projektes gezeigt werden, dass in einem Ackerboden, der über mehrere Jahre hinweg mit Gülle und Gärresten aus Biogasanlagen gedüngt wurde, auch vor der ersten Düngung nach der Winterperiode und nach anschließender rein mineralischer Düngung RGs und MGE mittels qPCR detektiert werden können (Wolters et al., 2018). Während somit einerseits die Akkumulation von RGs und MGEs über Jahre in organisch gedüngten Böden bereits dokumentiert ist, lässt sich andererseits dennoch feststellen, dass die Abundanz von RGs und MGEs, in organisch gedüngten Böden in der Regel nach der letzten Applikation über die Zeit abnimmt (Burch et al., 2014; Rahube et al., 2016; Wolters et al., 2018 & 2019; Lau et al., 2017). Als Grund für diese oft beobachtete Abnahme von RGs wird vermutet, dass die jeweiligen Wirtsbakterien (aus dem Klärschlamm) nur bedingt in der Lage sind, sich an die Bedingungen im Boden anzupassen und infolgedessen absterben oder deutlich in ihrer Abundanz abnehmen (Hammesfahr et al., 2008; Heuer et al., 2008). Dennoch könnten RGs (sofern auf MGEs lokalisiert) zwischen Klärschlamm-Bakterien und Bodenbakterien über HGT ausgetauscht werden, und so unabhängig von ihren ursprünglichen Wirten oder als freie DNA persistieren. Ebenfalls lässt sich nicht ausschließen, dass sporenbildende Bakterien aus dem Klärschlamm über längere Zeit im Boden überdauern, ohne aktiv zu sein bzw. zu proliferieren. Als wichtige Faktoren, die Einfluss darauf haben, wie lange bestimmte RGs und MGEs im Boden persistieren können, wurden z. B. der parallele Eintrag von Antibiotika, der Bodentyp, und das Bodenkompartment, identifiziert (Chessa et al., 2016; Blau et al., 2017; Wolters et al., 2018). Die Bedeutung des Bodentyps wurde auch in der vorliegenden Studie für einige Zielgene beobachtet. So waren die beiden Gene *sul2* und *qacE/qacEA1* länger im Lehm Boden nachweisbar. Auch unter Berücksichtigung der Tatsache, dass in Deutschland das Ausbringen von Klärschlamm unter anderem auf Böden, auf denen Obst und Gemüse angebaut wird, und im ökologischen Landbau generell untersagt ist (Umweltbundesamt, 2019), kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine vorrausgehende, jahrelange Düngung des Bodens auch für die folgenden Anbauperioden Risiken birgt. Ebenso wurde gezeigt, dass RGs nicht nur durch direkten Auftrag, sondern auch durch passiven Abdrift über die Luft (z.B. mit Staub) weiterverbreitet werden können (Salviati et al., 2015; Zhang et al. 2018b; Zhang et al. 2019). Somit ist nicht auszuschließen, dass auch RGs von einem mit Klärschlamm gedüngten Feld auf benachbarte Felder übertragen werden, auf denen z. B. Gemüse für den menschlichen Verzehr angebaut wird. Ebenso ist zu bedenken, dass der Einsatz von Klärschlamm als Dünger in der Lebensmittelherstellung in anderen Ländern ggf. nicht so streng geregelt bzw. beschränkt wird wie in Deutschland.

4.3 Transfer-Potential von Resistenz-Plasmiden aus Klärschlämmen

Die erfolgreiche exogene Isolierung von Resistenz-Plasmiden aus nahezu allen der untersuchten Klärschlämme belegt das oben bereits erwähnte RG-Übertragungspotential, das von diesen ausgeht. Dieses wird noch bekräftigt durch die Tatsache, dass viele der gefischten Plasmide der Gruppe der IncP-1 Plasmide zugeordnet werden konnte. Diese Plasmide sind für ihren breiten Wirtsbereich und ihren außergewöhnlich effektiven Transfer zwischen Wirtsbakterien bekannt (Pukall et al., 1996; Heuer et al., 2012; Shintani et al., 2014; Klümper et al., 2015). Ursprünglich entdeckt wurden IncP-1 Plasmide in klinischen Pathogenen und seitdem wurden sie in zahlreichen weiteren Habitaten (einschließlich organischen Düngemitteln) nachgewiesen. Abgesehen davon werden sie mit zahlreichen Antibiotika-Resistenzen in Verbindung gebracht (Wolters et al., 2015). Der Nachweis von Klasse 1 Integrons und Genkassetten-Amplikons unterschiedlicher Größe in vielen Transkonjuganten zeigt auf, dass die entsprechenden bakteriellen Wirte in der Lage wären, unter Umständen noch weitere, für RGs kodierende, Genkassetten aufzunehmen. Ebenso wie die IncP-1 Plasmide, sind auch IncN Plasmide, deren spezifische Sequenzen in einigen der gefischten Transkonjuganten detektiert wurden, bereits in der Klinik nachgewiesen worden. Neben den identifizierten Plasmiden wurden auch bislang nicht identifizierte Plasmide in den Transkonjuganten nachgewiesen. Auch diese vermittelten Antibiotika Resistenz und waren transferabel. Zusätzlich zu dem breiten Pool an Plasmiden, können laut Lood et al. (2017) und Wu et al. (2017) auch Bakteriophagen als „Überlebenskapseln“ für RGs eine wichtige Rolle bei der Verbreitung von RGs via Transduktion aus Klärschlämmen spielen. Diese sind oft in der Lage, Hygienisierungsmaßnahmen zu überstehen, die darauf abzielen Bakterien abzutöten.

4.4 Vorkommen von Indikatorbakterien in Klärschlämmen

In den Klärschlämmen dieser Studie konnten keine Salmonellen nachgewiesen werden. Hierbei muss darauf hingewiesen werden, dass der entsprechende Nachweis nicht über die übliche Standardmethode erfolgte, und ein Vorliegen von Salmonellen in den Proben in sehr niedriger Abundanz somit dennoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann. Der positive Nachweis von coliformen Bakterien war zu erwarten. Hingegen stimmt die Beobachtung, dass in allen Klärschlämmen zudem coliforme Bakterien nachgewiesen werden konnten, die resistent gegen das Reserve-Antibiotikum Colistin sind, bedenklich.

4.5 Konzentration von potentiell selektiven Substanzen in Klärschlämmen und deren Einfluss auf die Abundanz von RGs und MGEs

Wie bereits für die RGs und MGEs beobachtet, so deuten auch die in Auftrag gegebenen chemischen Analysen der Klärschlämme darauf hin, dass die Konzentrationen an potentiell selektiven Substanzen (bezogen auf den Trockenmassegehalt) nicht niedriger in Klärschlämmen aus kleinen Abwasserbehandlungsanlagen sind als in Klärschlämmen aus großen Anlagen. Auch hierbei zeichnete sich die Beschaffenheit des Klärschlammes (entwässert, flüssig) für einige Analyte als bedeutender Faktor ab. Häufig traten höhere Konzentrationen (pro kg Trockenmasse) an entsprechenden Substanzen in den entwässerten Klärschlämmen auf. Die Konzentrationen an Schwermetallen lagen bis auf eine Ausnahme alle unterhalb der gesetzlichen Grenzwerte. Unter den Antibiotika lagen vor allem die Fluorochinolone in besonders hoher Konzentration vor (mehrere mg/kg Trockenmasse). Ähnlich hohe Werte wurden bereits von Golet et al. (2005), Thomas et al., (2007) und Gao et al. (2012) in Klärschlamm beschrieben. Der Nachweis und die Persistenz von Antibiotika in Klärschlämmen hängen unter anderem maßgeblich von der Antibiotikaklasse und den Behandlungsstufen innerhalb einer Kläranlage ab. Dementsprechend werden die sehr labilen Penicilline

normalerweise nicht nachgewiesen, während die stabileren Fluorochinolone und Tetrazykline in Konzentrationen bis zu mehreren mg/kg Trockenmasse detektiert werden (s. oben).

Für viele der untersuchten Substanzen ist bekannt, dass diese selektiv auf RGs wirken können (Gullberg et al., 2014) und für einzelne Vertreter wurde auch berichtet, dass sie den horizontalen Gentransfer zwischen Bakterien fördern können (Kim et al., 2014; Jutkina et al., 2017; Zhang et al., 2018c). In der vorliegenden Studie erwiesen sich vor allem die Konzentrationen an den Schwermetallen Zink und Kupfer, dem Desinfektionsmittel Triclosan, sowie der Antibiotika CIP, LEVO, DOXY und TMP als positiv korreliert mit vielen der getesteten Zielgene. Ähnliche Zusammenhänge, die auf einen von den Substanzen ausgehenden Selektionsdruck hinweisen wurden z. B. bereits für Kupfer und Zink berichtet (Knapp et al., 2011; Xu et al., 2017). Mittels Ko- oder Kreuz-Resistenz können Schwermetalle und Desinfektionsmittel zur Verbreitung von Antibiotika-RGs beitragen (Baker-Austin et al., 2006, Pal et al., 2015; Wales & Davies, 2015). In einer Studie von Song et al. (2017) erwiesen sich die Konzentrationen an beiden Schwermetallen sogar als relevanter für die Häufigkeit Tetrazyklin-RGs in landwirtschaftlich genutztem Boden als Tetrazyklin selbst. Entgegen den Erwartungen, ergab die Korrelationsanalyse nach Pearson keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der Abundanz des QAC-RGs *qacE/qacE11* und den QAC-Konzentrationen in den Proben. Dieses könnte einerseits bedeuten, dass kein kausaler Zusammenhang auftritt, andererseits lässt sich nicht ausschließen, dass die bereits erwähnte Problematik der chemischen Analyse in den Klärschlämmen die Ergebnisse beeinflusst. Abgesehen hiervon sind diverse weitere QAC RGs bekannt, die ebenfalls das Potential haben, über Ko-Selektion die Abundanz von Antibiotika RGs zu erhöhen. Zudem vermittelt laut Paulsen et al. (1993) das in dieser Studie berücksichtigte Genfragment *qacE11* (das genutzte qPCR assay unterscheidet nicht zwischen dem vollständigen *qacE*- Gen und dessen Fragment) lediglich eine „low-level“ Resistenz. Somit ist es möglich, dass diese geringgradige Resistenz nicht ausreichend war, um die bakteriellen Wirte des Gens effektiv vor den Wirkungen der QACs zu schützen. Die beobachteten Korrelationen zwischen den QAC-Konzentrationen und den RGs in den Klärschlämmen könnten auf deren Ko-Lokalisierung mit anderen QAC RGs als *qacE/qacE11* hinweisen (z. B. *qacA*, *qacB* oder *qacC*, reviewed in Mulder et al., 2018). In Bezug auf diese letztgenannten Korrelationen ist zu bedenken, dass auch diese Ergebnisse möglicherweise durch die Schwierigkeiten der Rückstandanalytik beeinflusst wurden. Die Abundanz der meisten Zielgene war leicht negativ mit der Größe der Kläranlagen korreliert, was die visuelle Auswertung der qPCR Ergebnisse bestätigt. Trotz dieser Beobachtung ist festzuhalten, dass die jeweiligen Korrelationswerte nur niedrig sind, was auf einen eher schwachen Zusammenhang schließen lässt. Deshalb ist es nicht möglich, basierend hierauf Vorschläge für gesetzliche Grenzwerte für die entsprechenden Substanzen vorzuschlagen. Desweiteren gilt es zu bedenken, dass auch die Konzentrationen weiterer Substanzen, die hier nicht erfasst werden konnten, eine bedeutende Rolle für die Abundanz der Zielgene spielen könnten (z. B. andere Antibiotika, Metalle oder Desinfektionsmittel anderer Klassen). Ebenso sind die Aussagen auf die untersuchten Zielgene beschränkt.

In Bezug auf die Korrelationsanalysen, die für die Konzentrationen und Genabundanz in der Originalsubstanz durchgeführt wurden, wurde deutlich, dass die Abundanz einiger Zielgene stärker (oder überhaupt nur) mit den Konzentrationen korreliert waren, denen die bakteriellen Wirte tatsächlich im flüssigen Klärschlamm ausgesetzt waren, als mit den auf den Trockenmassegehalt bezogenen.

4.6 Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaften in Klärschlämmen

Da die Abundanz von RGs und MGEs wenig aussagekräftig ist ohne Kenntnis der vorliegenden Bakterien, wurde zusätzlich eine Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften (Bakterien, Archaea) in den Klärschlämmen durchgeführt. Hierbei wurden bereits publizierte Kenntnisse über die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften in Klärschlamm bezüglich der dominanten Phyla und Klassen weitestgehend bestätigt, wobei oft eine höhere relative Abundanz an Proteobacteria als in der vorliegenden Studie berichtet wurde (Stiborova et al., 2015; Chen et al., 2019; Wolters et al., 2019). Die hingegen auffällige Beobachtung, dass ausschließlich im Klärschlamm aus der Anlage A ein hoher Anteil an Sequenzen dem Genus *Coprothermobacter* zugeordnet werden konnte, bestätigt frühere Analysen für die betreffende Anlage (Wolters et al., 2019). Die Biologie dieses Bakteriums (reviewed in Gagliano et al., 2015), das strikt anaerob und thermophil ist, lässt darauf schließen, dass es deshalb einzig und allein in Anlage A nachgewiesen wurde (und dieses in so hoher relativer Abundanz), weil nur auf dieser Anlage der Klärschlamm thermophil vergärt wird. Während sich für viele der untersuchten Parameter ein Einfluss der Beschaffenheit des Klärschlamm abzeichnete, wurde *Coprothermobacter* nicht in dem ebenfalls entwässerten Klärschlamm aus Anlage F (die zudem ebenfalls eine Klinik in ihrem Einzugsbereich enthält) detektiert. Im Rahmen dieser Studie waren wir besonders interessiert, die Einbringung potentiell opportunistischer Pathogene mit Klärschlamm in den Boden zu bewerten. Wir konnten das Vorkommen von potentiellen opportunistischen Pathogenen in allen Klärschlämmen zeigen, die ein Krankenhaus bzw. Lebensmittelindustrie im Einzugsbereich haben. Wir vermuten, dass die häufige Nutzung von Desinfektionsmittel wesentlich zur Selektion von opportunistischen Pathogenen und RG beiträgt. Zumindest ist dieser Faktor wichtiger als die Größe der Kläranlage.

4.7 Schlussfolgerungen aus dem zur Studie durchgeführten Workshop

Im Rahmen des am 05.06.2019 am JKI in Braunschweig durchgeführten Abschlusstreffen des Projektes wurde deutlich, wie wichtig und bereichernd für die betreffenden Fragestellungen nicht nur die Expertise von Wissenschaftlern, sondern mindestens ebenso von Vertretern von Abwasserverbänden und Klärwerksbetreibern ist. So wurde besonders deutlich, dass für die Experten des Abwasserverbandes hauptsächlich die unterschiedlichen Behandlungsmöglichkeiten auf den Kläranlagen relevant sind für die Kontamination der anfallenden Klärschlämme. Um den finanziellen Druck auf die Betreiber kleinerer Anlagen abzuschwächen, wird diesen vom Gesetzgeber zwar eine längere Zeit eingeräumt um ihre Anlagen zur Rückgewinnung des Phosphors aus Klärschlamm umzustellen. Unter rein mikrobiologischen oder schadstoffanalytischen Gesichtspunkten sind Klärschlämme aus kleinen Abwasserbehandlungsanlagen allerdings ähnlich stark belastet und deren Ausbringung auf Böden deshalb ebenso risikobelastet wie für Klärschlämme aus großen Anlagen. Desweiteren wurde darauf hingewiesen, dass deutlich weniger Klärschlamm auf landwirtschaftlichen Böden ausgebracht wird als Gülle, welche ebenfalls ein wichtiges Reservoir an RGs, MGEs und selektiven Substanzen darstellt. Für alle organischen Wirtschaftsdünger sollten daher Behandlungen, die zu einer Reduktion der Belastung mit potentiell Humanpathogenen Keimen, transferablen Antibiotikaresistenzen führen. Eine entscheidende Maßnahme ist die Reduzierung der Belastung der in dieser Studie untersuchten potentiell selektiven Stoffe. Im Hinblick auf die Nutzung von Gülle und Gärresten kann ein Verbot der Ausbringung von Klärschlamm auf Böden nur ein Beitrag sein, die anthropogen verursachte Verbreitung von RGs und MGEs in der Umwelt zu reduzieren.

4.8 Einschränkungen der Studie

Neben der Eingrenzung auf bestimmte Zielgene und Substanzen, treten weitere Einschränkungen der Aussagekraft dieser Studie dadurch auf, dass diese in relativ kleinem Rahmen (nur wenige Anlagen, zeitlich begrenzt) durchgeführt wurde. Abgesehen von den Unterschieden bezüglich der Einzugsgebiete (Größe, Vorhandensein einer Klinik, Industrie) der Kläranlagen, gilt es zu bedenken, dass diesen unterschiedliche Behandlungsmöglichkeiten für das bezogene Abwasser und die anfallenden Klärschlämme zur Verfügung stehen. Eventuell könnten so höhere Eintragungen an selektiven Substanzen (z. B. Antibiotika und Desinfektionsmittel aus Krankenhäusern), RGs und MGEs, durch weitergehende Behandlungsstufen oder auch die unterschiedlichen Retentionszeiten in den unterschiedlichen Anlagen reduziert werden. So wurde beispielweise berichtet, dass die anaerobe Vergärung von Klärschlamm zu einer Reduzierung dessen Belastung mit einigen RGs und *int11* beitragen kann (Ghosh et al., 2009; Diehl & LaPara, 2010; Ma et al., 2011; Miller et al., 2013). Andererseits kann durch Entwässerung des Klärschlamm mittels Zentrifugation die Konzentration an Substanzen, die dazu neigen an die Feststoffe im Schlamm zu binden erhöht werden (z. B. Fluorochinolone), während eher hydrophile Substanzen (z. B. die relativ hydrophilen Sulfonamide) in der wässrigen Phase angereichert werden können (Mailler et al., 2017). Da RGs und MGEs in Bakterien vorliegen, deren Zellzahl keine statische Konstante ist, sondern sich entsprechend der vorherrschenden Bedingungen schnell signifikant ändern kann (Eintragung von Nährstoffen, Selektionsdruck), kann allerdings eine anschließende Proliferation dieser Gene nicht ausgeschlossen werden. So wurde beispielsweise für Gärreste aus Biogasanlagen gezeigt, dass die zuvor im Zuge der Behandlung innerhalb der Anlage reduzierte Abundanz von RGs und MGEs in den gelagerten Gärresten wieder anstieg (Wolters et al., 2016b).

4.9 Weiterer Forschungsbedarf

Da eine Studie dieses Ausmaßes (12 Kläranlagen) nicht ausreichend für die Entscheidungsfindung, bzw. eine Empfehlung für entsprechende Grenzwerte an Schwermetallen, Desinfektionsmitteln und Antibiotika ist, ist es wichtig, weitergehende Untersuchungen durchzuführen. Hierbei sollten nach Möglichkeit weitere Substanzen berücksichtigt werden. Desweiteren scheint ein systematischer Vergleich der Klärschlämme mehrerer Anlagen vor und nach dem Entwässerungsprozess sinnvoll, da die Beschaffenheit des Klärschlammes in dieser Studie einen maßgeblichen Einfluss auf die untersuchten Parameter zu haben schien. Ein besonderes Augenmerk sollte hier außerdem auf die Substanzen gelegt werden, die hier sich in der vorliegenden Studie als positiv korreliert mit der Abundanz vieler Zielgene erwiesen (z. B. Fluorochinolone, TCS, Cu und Zn). Desweiteren wäre es interessant, die Konzentrationen dieser einzelnen Substanzen und deren Einfluss auf die Abundanz von RGs und MGEs in Böden zu untersuchen, die in der Vergangenheit mit Klärschlamm behandelt wurden (im Vergleich zu Böden, die seit Jahren keine organische Düngung erhielten). Hierdurch könnten wichtige Hinweise darauf gewonnen werden, inwieweit die Substanzen über die Zeit evtl. im Boden akkumulieren bzw. die Abundanz der Zielgene bei wiederholter Ausbringung von Klärschlamm auf lange Sicht beeinflussen.

4.10 Fazit

Zusammenfassend lässt sich nach dieser Studie schlussfolgern, dass Klärschlämme aus kleinen Abwasserbehandlungsanlagen eine ähnlich hohe Belastung der untersuchten Zielgene und potentiell selektiven Substanzen aufweisen, als solche aus großen Kläranlagen. Somit ist die bloße Ausbaugröße einer Kläranlage nicht geeignet, um auf die Belastung des jeweiligen Klärschlammes mit RGs oder MGEs zu schließen. Die Rolle von Klärschlamm als bedeutendes

Reservoir an RGs, MGEs und Schadstoffen konnte bestätigt werden. Die Ergebnisse sind nicht dazu geeignet, konkrete Grenzwerte für selektive Substanzen in Klärschlämmen festzulegen. Dennoch konnten Fluorochinolone, Doxycylin, Triclosan, Kupfer und Zink als Zielsubstanzen herausgearbeitet werden, deren Konzentrationen positiv mit der Abundanz vieler untersuchter Zielgene korrelieren.

5 Quellenverzeichnis

Zeitschriftenaufsatz

- Allmeier, H., Cresnar, B., Greck, B. & Schmitt, R. (1992): Complete nucleotide sequence of Tn1721: gene organization and a novel gene product with features of a chemotaxis protein. In: *Gene*, 1992, 111(1), S. 11-20
- Akiyama, T., Asfahl, K.L. & Savin, M.C. (2010): Boad-host-range plasmids in treated wastewater effluent and receiving streams. In: *Journal of Environmental Quality*, 2010, 39, S. 2211-2215
- Baker-Austin, C., Wright, M.S., Stepanauskas, R. & McArthur, J.V. (2006): Co-selection of antibiotic and metal resistance. In: *TRENDS in Microbiology*, 2006, 14(4), Elsevier, S. 176-182
- Barraud, O., Baclet, M.C., Denis, F. & Ploy, M.C. (2010): Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons. In: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2010, 65, S. 1642-1645
- Binh, C.T.T., Heuer, H., Kaupenjohann, M. & Smalla, K. (2008): Piggery manure used for soil fertilization is a reservoir for transferable antibiotic resistance plasmids. In: *FEMS Microbiology and Ecology*, 2008, 6, S. 25-37
- Blau, K., Casadevall, L., Wolters, B., Van der Meersche, T., Kreuzig, R., Smalla, K. & Jechalke, S. (2017): Soil texture-depending effects of doxycycline and streptomycin applied with manure on the bacterial community composition and resistome. In: *FEMS Microbiology Ecology*, 2017, 93, doi: 10.1093/femsec/fix145
- Blau, K., Bettermann, A., Jechalke, S., Fornefeld, E., Vanrobaeys, Y., Stalder, T., Top, E. & Smalla, K. (2018): The transferable resistome of produce. In: *mBio*, 2018, 9(6), doi: 10.1128/mBio.01300-18
- Bondarczuk, K., Markowitz, A. & Piotrowska-Seget, Z. (2016): The urgent need for risk assessment on the antibiotic resistance spread via sewage sludge land application. In: *Environment international*, 2016, 87, Elsevier, S. 49-55
- Boucher, Y., Labbate, M., Koenig, J.E. & Stokes, H.W. (2007): Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. In: *TRENDS in Microbiology*, 2007, 15(7), Elsevier, S. 301-309
- Burch, T.R., Sadowsky, M.J. & LaPara, T.M. (2013): Aerobic digestion reduces the quantity of antibiotic resistance genes in residual municipal wastewater solids. In: *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4, doi: 10.3389/fmicb.2013.00017
- Burch, T.R., Sadowsky, M.J. & LaPara, T.M. (2014): Fate of antibiotic resistance genes and class 1 integrons in soil microcosms following the application of treated residual municipal wastewater solids. In: *Environmental Science and Technology*, 2014, 48, S. 5620-5627
- Calero-Cárceles, W., Melgarejo, A., Colomer-Lluch, M., Stoll, C., Lucena, F., Jofre, J. & Muniesa, M. (2014): Sludge as a potential important source of antibiotic resistance genes in both the bacterial and bacteriophage fractions. In: *Environmental Science & Technology*, 2011, 48, S. 7602-7611
- Chen, F., Ying, G.G., Ma, Y.B., Chen, Z.F., Lai, H.F. & Peng, F.J. (2014): Field Dissipation and risk assessment of typical personal care products TCC, TCS, AHTN and HHCB in biosolid-amended soils. In: *Science of the Total Environment*, 2014, 470-471, S. 1078-1086
- Chen, Q., An, X., Li, H., Su, J., Ma, Y. & Zhu, Y.G. (2016): Long-term field application of sewage sludge increases the abundance of antibiotic resistance genes in soil. In: *Environment International*, 2016, 92-93, S. 1-10
- Chen, C., Peng, X., Huang, S., Wang, Y., Liao, S. & Wei, Y. (2019): Data on microbial community composition of sludge from high altitude wastewater treatment plants determined by 16S rRNA gene sequencing. In: *data in brief*, 2019, 103739
- Chessa, L., Jechalke, S., Ding, G.-C., Pusione, A., Mangia, N.P. & Smalla, K. (2016): The presence of tetracycline in cow manure changes the impact of repeated manure application on soil bacterial communities. In: *Biology and Fertility of Soils*, 2016, 52, S. 1121-1134

- Clarke, B.O. & Smith, S.R. (2011): Review of “emerging” organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. In: *Environment International*, 2011, 37, S. 226-247
- Data, N. & Hedges, R.W. (1971): Compatibility groups among *fir* factors. In: *Nature*, 1971, 234, S. 222-223
- D’Costa, V.M., McGrann, K.M., Hughes, D.W. & Wright, G.D. (2006): Sampling the antibiotic resistome. In: *Science*, 2006, 311, S. 374-377
- Diehl, D.L. & LaPara, T.M. (2010): Effect of temperature on the fate of genes encoding tetracycline resistance and the integrase of class 1 integrons within anaerobic and aerobic digesters treating municipal wastewater solids. In: *Environmental Science and Technology*, 2010, 44, S. 9128-9133
- Dolejska, M., Villa, L., Hasman, H., Hansen, L. & Carattoli, A. (2013): Characterization of IncN plasmids carrying bla CTX-M-1 and qnr genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* from animals, the environment and humans. *The Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 2013, 68(2), S. 333-339
- Dropa, M., Lincopan, N., Balsalobre, L.C., Oliveira, D.E., Moura, R.A., Rodriguez Fernandes, M., Moura da Silva, Q., Matté, G.R., Sato, M.I.Z. & Matté, M.H. (2016): Genetic background of novel sequence types of CTX-M-8- and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from public wastewater treatment plants in Sao Paulo, Brazil. In: *Environmental science and Pollution Research*, 2016, 23, S. 4953-4958
- Eikmeyer, F., Hadiati, A., Szczepanowski, R., Wibberg, D., Schneiker-Bekel, S., Rogers, L.M., Brown, C.J., Top, E.M., Pühler, A. & Schlüter, A. (2012): The complete genome sequences of four new IncN plasmids from wastewater treatment plant effluent provide new insights into IncN plasmid diversity and evolution. In: *Plasmid*, 2012, 68, Elsevier, S. 13-24
- Forsberg, K. J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E.M., Sommer, M.O.A. & Dantas, G. (2012): The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. In: *Science*, 2012, 337, S. 1107-1111
- Fu, Q., Wu, X., Ye, Q., Ernst, F. & Gan, J. (2016): Biosolids inhibit bioavailability and plant uptake of triclosan and triclocarban. In: *Water Research*, 2016, 102, S. 117-124
- Gagliano, M.C., Braguglia, C.M., Petruccioli, M. & Rossetti, S. (2015): Ecology and biotechnological potential of the thermophilic fermentative *Coprothermobacter* spp.. In: *FEMS Microbiology Ecology*, 2015, 91, doi: 10.1093/femsec/fiv018
- Gao, L., Shi, Y., Li, W., Niu, H., Liu, J. & Cai, Y. (2012): Occurrence of antibiotics in eight sewage treatment plants in Beijing, China. In: *Chemosphere*, 2012, 86, S. 665-671
- Ghosh, S., Ramsden, S.J. & LaPara, T.M. (2009): The role of anaerobic digestion in controlling the release of tetracycline resistance genes and class 1 integrons from municipal wastewater treatment plants. In: *Applied microbiology and Biotechnology*, 2009, 84, S. 791-796
- Gillings, M. (2014): Integrons: Past, present, and future. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2014, 78(2), S. 257-277
- Gillings, M., Gaze, W.H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J.M. & Zhu, Y.-G. (2015): Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. In: *The ISME Journal*, 2014, 9(6), S. 1269-1279
- Girlich, D., Poirel, L. & Nordmann, P. (2011): Diversity of clavulanic acid-inhibited extended-spectrum β -lactamases in *Aeromonas* spp. from the Seine River, Paris, France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55(3), S. 1256-1261
- Götz, A., Pukall, R., Smit, E., Tietze, E., Prager, R., Tschäpe, H., van Elsas, J.D. & Smalla, K. (1996): Detection and characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(7), S. 2621-2628

- Golet, E.M., Xifra, I., Siegrist, H., Alder, A.C. & Giger, W. (2003): Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. In: *Environmental Science and Technology*, 2003, 37(15), S. 3243-3249
- González-Zorn, B., Catalan, A., Escudero, J.A., Domínguez, L., Teshager, T., Porrero, C. & Moreno, M.A. (2005): Genetic basis for dissemination of *armA*. In: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2005, 56, S. 583-585
- Guarddon, M., Miranda, J.M., Rodríguez, J.A., Vázquez, B.I., Cepeda, A. & Franco, C.M. (2011): Real-time polymerase chain reaction for the quantitative detection of *tetA* and *tetB* bacterial tetracycline resistance genes in food. In: *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 146, S. 284-289
- Gullberg, E., Albrecht, L.M., Karlsson, C., Sandegren, L. & Andersson, D.I. (2014): Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals. In: *mBio*, 2014, 5(5), e01918-14
- Hall, R.M., Vockler, C. (1987): The region of the IncN plasmid R46 coding for resistance to beta-lactam antibiotics, streptomycin/spectinomycin and sulphonamides is closely related to antibiotic resistance segments found in IncW plasmids and in Tn21-like transposons. In: *Nucleic acids research*, 1987, 15(18), S. 7491-7501
- Halling, S.M., Simons, R.W., Way, J.C., Walsh, R.B. and Kleckner, N. (1982): DNA sequence organization of IS10-right of Tn10 and comparison with IS10-left. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1982, 79(8), S. 2608-2612
- Hammesfahr, U., Heuer, H., Manzke, B., Smalla, K. & Thiele-Bruhn, S. (2008): Impact of the antibiotic sulfadiazine and pig manure on the microbial community structure in agricultural soils. In: *Soil Biology & Biochemistry*, 2008, 40, Elsevier, S. 1583-1591
- Heuer, H. & Smalla, K. (2007): Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. In: *Environmental Microbiology*, 2007, 9(3), S. 657-666
- Heuer, H., Focks, A., Lamshöft, M., Smalla, K., Matthies, M & Spiteller, M. (2008): Fate of sulfadiazine administered to pigs and its quantitative effect on the dynamics of bacterial resistance genes in manure and manured soil. In: *Soil Biology & Biochemistry*, 2008, 40, Elsevier, S. 1892-1900
- Heuer, H., Kopmann, C., Binh, C.T.T., Top, E. & Smalla, K. (2009): Spreading resistance through spread manure: Characteristics of a novel plasmid type with low %G+C content. In: *Environmental Microbiology*, 2009, 11(4), S. 937-949
- Heuer, H., Schmitt, H. & Smalla, K. (2011a): Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. In: *Current Opinion in Microbiology*, 2011, 14, S. 236-243
- Heuer, H., Solehati, Q., Zimmerling, U., Kleineidam, K., Schloter, M., Müller, T., Focks, A., Thiele-Bruhn, S. & Smalla, K. (2011b): Accumulation of sulfonamide resistance genes in arable soil due to repeated application of manure containing sulfadiazine. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(7), S. 2527-2530
- Heuer, H., Binh, C.T.T., Jechalke, S., Kopmann, C., Zimmerling, U., Krögerrecklenfort, E., Ledger, T., González, B., Top, E. & Smalla, K. (2012): IncP-1 ϵ plasmids are important vectors of antibiotic resistance genes in agricultural systems: Diversification driven by class 1 integron gene cassettes. In: *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3, doi: 10.3389/fmicb.2012.00002
- Hu, H.-W., Han, X.-M., Shi, X.-Z., Wang, J.-T., Han, L.-L., Chen, D. & He, J.-Z. (2016a): Temporal changes of antibiotic-resistance genes and bacterial communities in two contrasting soils treated with cattle manure. In: *FEMS Microbiology Ecology*, 2016, 92, doi: 10.1093/femsec/fiv169
- Hu, H.-W., Wang, J.-T., Li, J., Li, J.-J., Ma, Y.-B., Chen, D. & He, J.-Z. (2016b): Field-based evidence for copper contamination induced changes of antibiotic resistance in agricultural soils. In: *Environmental Microbiology*, 2016, 18(11), S. 3896-3909

- Hu, H.-W., Wang, J.-T., Li, J., Shi, X.-Z., Ma, Y.-B., Chen, D. & He, J.-Z. (2017): Long-term nickel contamination increases the occurrence of antibiotic resistance genes in agricultural soils. In: *Environmental Science and Technology*, 2017, 51, S. 790-800
- Jacquiod, S., Brejnrod, A., Morberg, S.M., Al-Soud, W.A., Sørensen, S.J. & Riber, L. (2017): Deciphering conjugative plasmid permissiveness in wastewater microbiomes. In: *Molecular Ecology*, 2017, Wiley, S.1-16
- Jang, H.M., Lee, J., Kim, Y.B., Jeon, J.H., Shin, J., Park, M.-R. Kim, Y.M. (2018): Fate of antibiotic resistance genes and metal resistance genes during thermophilic aerobic digestion of sewage sludge. In: *Bioresource Technology*, 2018, 249, S. 635-645
- Jechalke, S., Kopmann, C., Rosendahl, I., Groeneweg, J., Weichelt, V., Krögerrecklenfort, E., Brandes, N., Nordwig, M., Ding, G.-C., Siemens, J., Heuer, H. & Smalla, K. (2013a): Increased abundance and transferability of resistance genes after field application of manure from sulfadiazine-treated pigs. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(5), S. 1704-1711
- Jechalke, S., Dealtry, S., Smalla, K. & Heuer, H., (2013b): Quantification of IncP-1 plasmid prevalence in environmental samples. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(4), S. 1410-1413
- Jechalke, S., Focks, A., Rosendahl, I., Groeneweg, J., Siemens, J., Heuer, H. & Smalla, K. (2014a): Structural and functional response of the soil bacterial community to application of manure from difloxacin-treated pigs. In: *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 87, S. 78-88
- Jechalke, S., Heuer, H., Siemens, J., Amelung, W. & Smalla, K. (2014b): Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. In: *Trends in microbiology*, 2014, 22(9), S. 536-545
- Jechalke, S., Schreiter, S., Wolters, B., Dealtry, S., Heuer, H. & Smalla, K. (2014c): Widespread dissemination of class 1 integron components in soil and related ecosystems as revealed by cultivation-independent analysis. In: *Frontiers in Microbiology*, 2014, 4, doi: 10.3389/fmicb.2013.00420
- Jové, T., Da Re, S., Denis, F., Mazel, D. & Ploy, M.-C. (2010): Inverse correlation between promoter strength and excision activity in class 1 integrons. In: *PLoS genetics*, 2010, 6(1)
- Jutkina, J., Marathe, N.P., Flach, C.-F. & Larsson, D.G.J. (2018): Antibiotics and common antibacterial biocides stimulate horizontal transfer of resistance at low concentrations. In: *Science of the Total Environment*, 2018, 616-617, S. 172-178
- Kim, S., Yun, Z., Ha, U.-H., Lee, S., Park, H., Kwon, E.E., Cho, Y., Choung, S., Oh, J., Medriano, C.A. & Chandran, K. (2014): Transfer of antibiotic resistance plasmids in pure and activated sludge cultures in the presence of environmentally representative micro-contaminant concentrations. In: *Science of the Total Environment*, 2014, 468-469, Elsevier, S. 813-820
- Kopmann, C., Jechalke, S., Rosendahl, I., Groeneweg, J., Krögerrecklenfort, E., Zimmerling, U., Weichelt, V., Siemens, J., Amelung, W., Heuer, H & Smalla, K. (2013): Abundance and transferability of antibiotic resistance as related to the fate of sulfadiazine in maize rhizosphere and bulk soil. In: *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 83, S. 125-134
- Klümper, U., Riber, L., Dechesne, A., Sannazzarro, A., Hansen, L.H., Sørensen, S.J. & Smets, B.F. (2015): Broad host range plasmids can invade an unexpectedly diverse fraction of a soil bacterial community. In: *The ISME Journal*, 2015, 9, S. 934-945
- Klümper, U., Dechesne, A., Riber, L., Brandt, K.K., Gülay, A., Sørensen, S.J. & Smets, B.F. (2017): Metal stressors consistently modulate bacterial conjugal plasmid uptake potential in a phylogenetically conserved manner. In: *The ISME Journal*, 2017, 11(1), S. 152-165

- Knapp, C.W., McCluskey, S.M., Singh, B.K., Campbell, C.D., Hudson, G. & Graham, D.W., (2011): Antibiotic resistance gene abundances correlate with metal and geochemical conditions in archived, Scottish soils. In: PLoS ONE, 2011, 6(11), e27300
- Knapp, C.W., Callan, A.C., aitken, B., Shearn, R., Koenders, A. & Hinwood, A. (2017): Relationship between antibiotic resistance genes and metals in residential soil samples from Western Australia. In: Environmental Science and Pollution Research international, 2017, 24(3), S. 2484-2494
- Lau, C.H.-F., li, B., Zhang, T., tien, Y.-C., Scott, A., Murray, R., Sabourin, L., Lapen, D.R., Duenk, P. & Topp, E. (2017): Impact of pre-application treatment on municipal sewage sludge composition, soil dynamics of antibiotic resistance genes, and abundance of antibiotic-resistance genes on vegetables at harvest. In: Science of the Total Environment, 2017, 587-588, S. 214-222
- Lévesque, C., Piché, L., Larose, C. Roy, P.H. (1995): PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1995, 39(1), S. 185-191
- Liu, M., Zhang, Y., Yang, M., tian, Z., Ren, L. & Zhang, S. (2012): Abundance and distribution of tetracycline resistance genes and mobile elements in an oxytetracycline production wastewater treatment system. In: Environmental Science and Technology, 2012, 46, S. 7551-7557
- Lood, R., Ertürk, G. & Mattiasson, B. (2017): Revisiting antibiotic resistance spreading in wastewater treatment plants- bacteriophages as a much neglected potential transmission vehicle. In: Frontiers in microbiology, 2017, 8, doi: 10.3389/fmicb.2017.02298
- Lozano, N., Rice, C.P., Ramirez, M. & Torrents, A. (2010): Fate of triclosan in agricultural soils after biosolid applications. In: Chemosphere, 2010, 78, S. 760-766
- Lozano, N., Rice, C.P., Ramirez, M. & Torrents, A. (2017): Fate of triclocarban in agricultural soils after biosolid applications. In: Environmental Science and Pollution Research, 2017, doi: 10.1007/s11356-017-0433-0
- Ma, Y., Wilson, C.A., Novak, J.T., Riffat, R., Aynur, S., Murthy, S. & Pruden, A. (2011): Effect of various sludge digestion conditions on sulphonamide, macrolide, tetracycline resistance genes and class1 integrons. In: Environmental Science & Technology, 2011, 45, S. 7855-7861
- Mailer, R., Gasperi, J., Patureau, D., Vulliet, E., Delgenes, N., Danel, A., Deshayes, S., eudes, V., Guerin, S., Moillon, R., Chebbo, G. & Rocher, V. (2017): Fate of emerging and priority micropollutants during the sewage sludge treatment: Case study of Paris conurbation. Part 1: Contamination of the different types of sewage sludge. In: Waste Management, 2017, 59, S. 379-393
- Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walker, J., Mitchell, T., Andrew, P., Prudhomme, M., Alloing, G., Hakenbeck, R., Morrison, D.A., Boulnois, G.J. & Claverys, J.-P. (1992): A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. In: Nucleic Acids Research, 1992, 20(13), S. 3479-3483
- Martin, J., Camacho-Munoz, M.D., Santos, J.L, Aparicio, I. & Alonso, E. (2012): Distribution and temporal evolution of pharmaceutically active compounds alongside sewage sludge treatment. Risk assessment of sludge application onto soil. In: Journal of Environmental Management, 2012, 102, S. 18-25
- Miller, J.H., Novak, J.T., Knocke, W.R., Young, K., Hong, Y., Vikesland, P.J., Hull, M.S. & Pruden, A. (2013): Effect of silver nanoparticles and antibiotics on antibiotic resistance genes in anaerobis digestion. In: water Environment Research, 2013, 85(5), S. 411-421
- Mulder, I., Siemens, J., Sentek, V., Amelung, W., Smalla, K. & Jechalke, S. (2018): Quaternary ammonium compounds in soil: Implications for antibiotic resistance development. In: Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 2018, doi: 10.1007/s11157-017-9457-7

- Nolvak, H., Truu, M., Kanger, K., Tampere, M., Espenberg, M., Loit, E., Raave, H. & Truu, J. (2016): Inorganic and organic fertilizers impact the abundance and proportion of antibiotic resistance and integron-integrase genes in agricultural grassland soil. In: *Science of the Total Environment*, 2016, 562, S. 678-689
- Pal, C., Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E. & Larsson, D.G.J. (2015): Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. In: *BMC Genomics*, 2015, 16 (964), doi: 10.1186/s12864-015-2153-5
- Paulsen, I.T., Littlejohn, T.G., Radström, P., Sundström, L., Sköld, O., Swedberg, G. & Skurray, R.A. (1993): The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1993, 37(4), S. 761-768
- Peak, N., Knapp, C.W., Yang, R.K., Hanfelt, M.M., Smith, M.S., Aga, D.S. & Graham, D.W. (2007): Abundance of six tetracycline resistance genes in wastewater lagoons at cattle feedlots with different antibiotic use strategies. In: *Environmental Microbiology*, 2007, 9(1), S. 143-151
- Pukall, R., Tschäpe, H. & Smalla, K. (1996): Monitoring the spread of broad host and narrow host range plasmids in soil microcosms. In: *FEMS Microbiology Ecology*, 1996, 20, S. 53-66
- Rahube, T.O., Marti, R., Scott, A., Tien, Y.-C., Murray, R., Sabourin, L., Zhang, Y., Duenk, P., Lapen, D.R. & Topp, E. (2014): Impact of fertilizing with raw or anaerobically digested sewage sludge on the abundance of antibiotic-resistant coliforms, antibiotic resistance genes, and pathogenic bacteria in soil and vegetables at harvest. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(22), S. 6898-6907
- Rahube, T.O., Marti, R., Scott, A., Tien, Y.-C., Murray, R., Sabourin, L., Duenk, P., Lapen, D.R. & Topp, E. (2016): Persistence of antibiotic resistance and plasmid-associated genes in soil following application of sewage sludge and abundance on vegetables at harvest. In: *Canadian Journal of Microbiology*, 2016, 62, S. 600-607
- Rawlings, D.E. & Tietze, E. (2001): Comparative biology of IncQ and IncQ-like plasmids. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2001, 65(4), S. 481-496
- Revilla, C. Garcillán-Barcia, M.P., Fernández-López, R., Thomson, N.R., Sanders, M., Cheung, M., Thomas, C.M. & de la Cruz, F. (2008): Different pathways to acquiring resistance genes illustrated by the recent evolution of IncW plasmids. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, 2008, 52(4), S. 1472-1480
- 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. In: *Science of the Total Environment*, 2013, 447, Elsevier, S. 345-360
- Salviati, C., Laube, H., Guerra, B., Roesler, U. & Friese, A. (2015): Emission of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from pig fattening farms to surrounding areas. In: *Veterinary Microbiology*, 2015, 175(1), S. 77-84
- Sandberg, K.D. & LaPara, T.M. (2016): The fate of antibiotic resistance genes and class 1 integrons following the application of swine and dairy manure to soils. In: *FEMS microbiology Ecology*, 2016, 92, doi:10.1093/femsec/fiw001
- Schlüter, A., Heuer, H., Szczepanowski, R., Forney, L.J., Thomas, C.M., Pühler, A. & Top, E.M. (2003): The 64 508 bp IncP-1beta antibiotic multiresistance plasmid pB10 isolated from a waste-water treatment plant provides evidence for recombination between members of different branches of the IncP-1beta group. In: *Microbiology*, 2003, 149(11), S. 3139-3153.
- Schlüter, A., Szczepanowski, R., Pühler, A. & Top, E.M. (2007): genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool. In: *FEMS Microbiology Reviews*, 2007, 32, S. 449-477

- Shintani, M., Matsui, K., Inoue, J.-I., Hosoyama, A., Ohji, S., Yamazoe, A., Nojiri, H., Kimbara, K. & Ohkuma, M. (2014): Single-cell analyses revealed transfer ranges of IncP-1, IncP-7, and IncP-9 plasmids in a soil bacterial community. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(1), S. 138-145
- Smith, M.S., Yang, R.K., Knapp, C.W., Niu, Y., Peak, N., Hanfelt, M.M., Galland, J.C. & Graham, D.W. (2004): Quantification of tetracycline resistance genes in feedlot lagoons by real-time PCR. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(2), S. 7372-7377
- Song, J., Rensing, C., Holm, P.E., Virta, M. & Brandt, K.K. (2017): Comparison of metals and tetracycline as selective agents for development of tetracycline resistant bacterial communities in agricultural soil. In: *Environmental Science and Technology*, 2017, 51, S. 3040-3047
- Stiborova, H., Wolfram, J., Demnerova, K., Macek, T. & Uhlik, O. (2015): Bacterial community structure in treated sewage sludge with mesophilic and thermophilic anaerobic digestion. In: *Folia Microbiologica*, 2015, 60 (6), S. 531-539
- Stokes, H.W. & Hall, R.M. (1989): A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. In: *Molecular Microbiology*, 1989, 3(12), S. 1669-1683
- Stokes, H.W. & Hall, R.M. (1992): The integron In1 in plasmid R46 includes two copies of the *oxa2* gene cassette. In: *Plasmid*, 1992, 28(3), S. 225-234
- Su, J.-Q., Wei, B., Ou-Yang, W.-Y., Huang, F.-Y., Zhao, Y., Xu, H.-J. & Zhu, Y.-G. (2015): Antibiotic resistome and its association with bacterial communities during sewage sludge composting. In: *Environmental Science & Technology*, 2015, 49, S. 7356-7363
- Suzuki, M.T., Taylor, L.T. & DeLong, E.F. (2000): Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66, S. 4605-4614
- Szczepanowski, R., Krahn, I., linke, B., Goesmann, A., Pühler, A. & Schlüter, A. (2004): Antibiotic multiresistance plasmid pRSB101 isolated from a wastewater treatment plant is related to plasmids residing in phytopathogenic bacteria and carries eight different resistance determinants including a multidrug transport system. In: *Microbiology*, 2004, 150, S. 3613-3630
- Thomas, K.V., Dye, C. Schlabach, M. & Langford, K.H. (2007): Source to sink tracking of selected human pharmaceuticals from two Oslo city hospitals and a wastewater treatment works. In: *Journal of Environmental Monitoring*, 2007, 9, S. 1410-1418
- Udikovic-Kolic, N., Wichmann, F., Broderick, N. & Handelsmann, J. (2014): Bloom of resident antibiotic-resistant bacteria in soil following manure fertilization. In: *PNAS*, 2014, 111(42), S. 15202-15207
- Verlicchi, P. & Zambello, E. (2015): Pharmaceuticals and personal care products in untreated and treated sewage sludge: occurrence and environmental risk in the case of application on soil- A critical review. In: *Science of the Total Environment*, 2015, 538, Elsevier, S. 750-767
- Wales, A.D. & Davies, R.H. (2015): Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its relevance to foodborne pathogens. In: *Antibiotics*, 2015, 4, S. 567-604
- Wang, M., Tran, J.H., Jacoby, G.A., Zhang, Y., Wang, F. & Cooper, D.C. (2003): Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 47(7), S. 2242-2248
- Wellington, E.M.H., Boxall, A.B.A., Cross, P., Feil, E.J., Gaze, W.H., Hawkey, P.M., Johnson-Rollings, A.S., Jones, D.L., Lee, N.M., Otten, W., Thomas, C.M. & Williams, A.P. (2013): The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. In: *The Lancet Infectious Diseases*, 2013, 13, doi: 10.1016/S1473-3099(12)70317-1

- Wolters, B., Kyselková, M., Krögerrecklenfort, E., Kreuzig, R. & Smalla, K. (2015): Transferable antibiotic resistance plasmids from biogas plant digestates often belong to the IncP-1 ϵ subgroup. In: *Frontiers in Microbiology*, 2015, 5, doi: 10.3389/fmicb.2014.00765
- Wolters, B., Widyasari-Mehta, A., Kreuzig, R. & Smalla, K. (2016a): Contamination of organic fertilizers with antibiotic residues, resistance genes, and mobile genetic elements mirroring antibiotic use in livestock? In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(17), Springer, doi: 10.1007/s00253-016-7742-y
- Wolters, B., Ding, G.-C., Kreuzig, R. & Smalla, K. (2016b): Full-scale mesophilic biogas plants using manure as C-source: bacterial community shifts along the process cause changes in the abundance of resistance genes and mobile genetic elements. In: *FEMS Microbiology Ecology*, 2016, 92, doi: 10.1093/femsec/fiv163
- Wolters, B., Jacquiod, S., Sørensen, S.J., Widyasari-Mehta, A., Bech, T.B., Kreuzig, R. & Smalla, K. (2018): Bulk soil and maize rhizosphere resistance genes, mobile genetic elements and microbial communities are differently impacted by organic and inorganic fertilization. In: *FEMS Microbiology Ecology*, 2018, 94, doi: 10.1093/femsec/fiy027
- Wolters, B., Fornefeld, E., Jechalke, S., Su, J.-Q., Zhu, Y.-G., Sørensen, S.J., Smalla, K. & Jacquiod, S. (2019): Soil amendment with sewage sludge affects soil prokaryotic community composition, mobilome and resistome. In: *FEMS Microbiology Ecology*, 2019, 95(1), doi: 10.1093/femsec/fiy193
- World Health Organization (2014): antimicrobial resistance. Fact sheet 194.
- Wu, D., Dolfig, J. & Xie, B. (2017): Bacterial perspectives on the dissemination of antibiotic resistance genes in domestic wastewater bio-treatment systems: beneficiary to victim. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, doi: 10.1007/s00253-017-8665-y
- Wuana, R.A. & Okieimen, F.E. (2011): Heavy metals in contaminated soils: A review of sources, chemistry, and best available strategies for remediation. In: *ISRN Ecology*, 2011, doi: 10.5402/2011/402647
- Xie, W.-Y., McGrath, S.P., Su, J.-Q., Hirsch, P.R., Clark, I.M., Shen, Q., Zhu, Y.-G. & Zhao, F.-J. (2016): Long-term impact of fertilization of sewage sludge on soil antibiotic resistance. In: *Environmental Science and Technology*, 2016, 50, S. 12602-12611
- Xu, Y., Xu, J., Mao, D. & Luo, Y. (2017): Effect of the selective pressure of sub-lethal level of heavy metals on the fate and distribution of ARGs in the catchment scale. In: *Environmental Pollution*, 2017, 220, S. 900-908
- Yanagiya K., Maejima, Y., Nakata, H., Tokuda, M., Moriuchi, R., Dohra, H., Inoue, K., Ohkuma, M., Kimbara, K. & Shintani, M. (2018): Novel self-transmissible and broad-host-range plasmids exogenously captured from anaerobic granules or cow manure. In: *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9, article 2602
- Yang, Y., Wang, Y., Westerhoff, P., Hristovski, K., Jin, V.L., Johnson, M.-V. V. & Arnold, J.G. (2014): Metal and nanoparticle occurrence in biosolid-amended soils. *Science of the Total Environment*, 2014, 485-486, S. 441-449
- Yang, L., Wu, L., Liu, W., Huang, Y., Luo, Y. & Christie, P. (2018): Dissipation of antibiotics in three different agricultural soils after repeated application of biosolids. In: *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25, S. 104-114
- Yankson, K.K. & Steck, T.R. (2009): Strategy for extracting DNA from clay soil and detecting a specific target sequence via selective enrichment and real-time (quantitative) PCR amplification. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(18), S. 60176021
- Yao, Y., Lazaro-Perone, F., Falgenhauer, L., Valverde, A., Imirzalioglu, C., Dominguez, L., Cantón, R., Mongorance, J. & Chakraborty, T. (2017): Insights into a novel bla_{KPC-2}-encoding IncP-6 plasmid reveal carbapenem-resistance circulation in several *Enterobacteriaceae* species from wastewater and a hospital source in Spain. In: *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8, doi: 10.3389/fmicb.2017.01143

- Zhang, T., Zhang, X.-X. & Ye, L. (2011): Plasmid metagenome reveals high levels of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in activated sludge. In: PLoS ONE, 2011, 6(10), e26041
- Zhang, M.Z., Pereira e Silva, M.D.C., De Mares Maryam, C. & van Elsas, J.D. (2014a): The mycosphere constitutes an arena for horizontal gene transfer with strong evolutionary implications for bacterial-fungal interactions. In: FEMS microbiology Ecology, 2014, 89, S. 516-526
- Zhang, G.-Q., Yao, Y.-H., Yu, X.-L & Niu, J.-J. (2014b): A survey of five broad-host-range plasmids in gram-negative bacilli isolated from patients. In: Plasmid, 2014, 74, Elsevier, S. 9-14
- Zhang, M., Visser, S., Pereira e Silva, M.C. & van Elsas, J.D. (2015): IncP-1 and PromA group plasmids are major providers of horizontal gene transfer capacities across bacteria in the mycosphere of different soil fungi. In: Microbiology Ecology, 2015, 69, S. 169-179
- Zhang, F., Zhao, X., Li, Q., Li, J., Ding, J., Wu, H., Zhao, Z., Ba, Y., Cheng, X., Cui, L., Li, H. & Zhu, J. (2018a): Bacterial community structure and abundance of antibiotic resistance genes in heavy metals contaminated agricultural soil. In: Environmental Science and Pollution Research, 2018, doi: 10.1007/s11356-018-1251-8
- Zhang, M., Zuo, J., Yu, X., Shi, X., Chen, L. & Li, Z. (2018b): Quantification of multi-antibiotic resistant opportunistic pathogenic bacteria in bioaerosols in and around a pharmaceutical wastewater treatment plant. In: Journal of Environmental Sciences, 2018, 72, S. 53-63
- Zhang, Y., Gu, A.Z., Cen, T., Li, X., He, M., li, D. & Chen, J. (2018c): Sub-inhibitory concentrations of heavy metals facilitate the horizontal transfer of plasmid-mediated antibiotic resistance genes in water environment. In: Environmental Pollution, 2018, 237, S. 74-82
- Zhang, T., Li, X., Wang, M., Chen, H., Yang, Y., Chen, Q.-L. & Yao, M. (2019): Time-resolved spread of antibiotic resistance genes in highly polluted air. In: Environment International, 2019, 127, S. 333-339

Internetadresse

- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (2019): https://www.bvl.bund.de/DE/09_Untersuchungen/01_Aufgaben/04_Amtliche_Sammlung_Untersuchungsverfahren/untersuchungen_SammlungUntersuchungsverfahren_node.html (02.11.2019)
- Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz: Klärschlammverordnung (AbfKlärV) (2017): https://www.gesetze-im-internet.de/abfkl_rv_2017/Abfkl%C3%A4rV.pdf
- Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit (2017): [https://www.bmu.de/gesetz/verordnung-zur-neuordnung-der-klärschlammverwertung/\(02.11.2019\)](https://www.bmu.de/gesetz/verordnung-zur-neuordnung-der-klärschlammverwertung/(02.11.2019))
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2019): [http://www.eucast.org/\(02.11.2019\)](http://www.eucast.org/(02.11.2019))
- Umweltbundesamt (2019): Kompost und Klärschlamm. <https://www.umweltbundesamt.de/themen/boden-landwirtschaft/umweltbelastungen-der-landwirtschaft/kompost-klärschlamm#textpart-1> (15.07.2019)

A Anhang

A.1 Bodenparameter Standardböden

Tabelle 13: Bodenparameter der in den Mikrokosmen verwendeten Standardböden (Quelle: LUFA Speyer)

Standardboden	2.1	2.4
Probenahmedatum	03.05.2018	27.04.2018
Organischer Kohlenstoff in % C	0,67 ± 0,08	1,99 ± 0,21
Stickstoff in % N	0,06 ± 0,02	0,22 ± 0,01
pH-Wert (0,01 M CaCl ₂)	4,7 ± 0,1	7,4 ± 0,1
Kationen Austausch Kapazität (meq/100g)	4,1 ± 0,7	23,0 ± 14,9
Verteilung Partikelgröße (mm) entsprechend DIN (%):		
<0,002	3,9 ± 0,6	26,4 ± 0,4
0,002-0,006	1,5 ± 0,6	7,9 ± 0,4
0,006-0,02	3,3 ± 0,4	14,9 ± 1,0
0,02-0,063	6,6 ± 1,1	23,8 ± 1,9
0,063-0,2	28,9 ± 1,1	19,8 ± 0,9
0,2-0,63	53,4 ± 1,5	5,6 ± 0,5
0,63-2,0	2,4 ± 0,4	1,6 ± 0,3
Bodentyp	Schluffiger Sandboden	Toniger Lehmboden
Verteilung Partikelgröße (mm) entsprechend USDA (%):		
<0,002	3,7 ± 0,8	26,3 ± 0,5
0,002-0,05	10,2 ± 1,3	41,6 ± 1,5
0,05-2,0	86,1 ± 0,7	32,1 ± 1,6
Bodentyp	Lehmiger Sand	Lehmboden
Maximale Wasserhalte Kapazität (g/100g)	32,0 ± 2,2	44,8 ± 2,0
Gewicht pro Volumen (g/1000mL)	1416 ± 36	1247 ± 33

A.2 Zahlenwerte Zielgenabundanz in Klärschlämmen bezogen auf Trockenmasse

Tabelle 14: Absolute Abundanz der Zielgene in den Klärschlämmen [pro kg Trockenmasse]. Gelistet sind die logarithmierten Mittelwerte und Standardabweichungen.

KA	16S (rrn)	sul1	sul2	qacE/qacE11	int11	int12
AIII	15,39 ± 0,05	13,11 ± 0,42	13,88 ± 0,08	13,18 ± 0,39	12,95 ± 0,52	11,70 ± 0,20
B	15,48 ± 0,03	13,34 ± 0,06	12,74 ± 0,02	13,11 ± 0,04	13,13 ± 0,04	n.q.
C	15,23 ± 0,06	12,27 ± 0,11	11,83 ± 0,13	12,15 ± 0,08	12,27 ± 0,16	n.q.
D	15,46 ± 0,05	13,37 ± 0,08	12,88 ± 0,01	13,12 ± 0,05	13,46 ± 0,18	n.q.
E	15,32 ± 0,08	13,15 ± 0,32	12,57 ± 0,25	13,32 ± 0,09	13,30 ± 0,36	n.q.
F	15,37 ± 0,05	13,00 ± 0,14	12,89 ± 0,07	12,56 ± 0,17	12,58 ± 0,17	12,63 ± 0,12
G	15,11 ± 0,08	13,36 ± 0,21	12,53 ± 0,16	13,43 ± 0,08	13,37 ± 0,29	n.q.
H	15,12 ± 0,12	12,59 ± 0,07	12,64 ± 0,03	12,42 ± 0,02	12,70 ± 0,05	n.q.
I	15,24 ± 0,09	13,17 ± 0,15	12,67 ± 0,12	12,99 ± 0,07	13,06 ± 0,25	n.q.
J	15,30 ± 0,07	12,91 ± 0,06	13,00 ± 0,08	12,72 ± 0,13	12,93 ± 0,05	n.q.
K	15,33 ± 0,06	12,75 ± 0,15	12,31 ± 0,25	12,86 ± 0,10	12,97 ± 0,16	n.q.
L	15,27 ± 0,08	12,40 ± 0,11	12,61 ± 0,03	12,39 ± 0,04	13,18 ± 0,12	n.q.
KA	tet(A)	tet(M)	tet(Q)	tet(W)	strA	korB
AIII	11,52 ± 0,22	11,94 ± 0,27	10,85 ± 0,48	11,74 ± 0,11	13,65 ± 0,12	12,79 ± 0,11
B	11,98 ± 0,11	12,72 ± 0,02	11,31 ± 0,04	12,19 ± 0,03	12,71 ± 0,02	13,93 ± 0,19
C	11,78 ± 1,80	12,30 ± 0,11	10,77 ± 0,13	11,42 ± 0,06	10,98 ± 0,17	13,55 ± 0,19
D	11,98 ± 0,12	12,98 ± 0,10	11,85 ± 0,05	12,18 ± 0,04	12,88 ± 0,07	14,09 ± 0,10
E	12,19 ± 0,43	12,48 ± 0,06	11,80 ± 0,07	12,11 ± 0,08	12,88 ± 0,10	13,94 ± 0,12
F	11,40 ± 0,19	12,02 ± 0,11	10,52 ± 0,10	12,13 ± 0,06	12,93 ± 0,08	12,61 ± 0,21
G	11,95 ± 0,40	12,31 ± 0,06	11,47 ± 0,12	11,87 ± 0,07	13,19 ± 0,09	14,04 ± 0,11
H	n.q.	11,79 ± 0,07	10,98 ± 0,11	11,62 ± 0,06	12,35 ± 0,11	13,63 ± 0,18
I	11,84 ± 0,14	11,85 ± 0,10	11,20 ± 0,09	11,97 ± 0,09	12,85 ± 0,10	14,30 ± 0,33
J	11,58 ± 0,31	12,54 ± 0,09	11,82 ± 0,07	12,19 ± 0,04	12,86 ± 0,09	14,34 ± 0,26
K	11,37 ± 0,30	12,15 ± 0,10	11,16 ± 0,13	11,68 ± 0,09	12,78 ± 0,05	14,08 ± 0,28
L	11,18 ± 0,22	12,04 ± 0,06	10,89 ± 0,17	11,51 ± 0,05	12,48 ± 0,04	13,46 ± 0,21
KA	trfA	aadA	qnrS	tetA(P)	Incl	
AIII	11,35 ± 0,13	12,90 ± 0,13	9,32 ± 0,19	10,89 ± 0,07	n.q.	
B	12,60 ± 0,14	12,55 ± 0,04	10,22 ± 0,08	11,49 ± 0,06	n.q.	
C	12,31 ± 0,17	11,84 ± 0,13	9,89 ± 0,16	9,88 ± 0,08	n.q.	

KA	16S (rrn)	sul1	sul2	qacE/qacE11	int11	int12
D	13,05 ± 0,09	13,21 ± 0,01	11,22 ± 0,02	10,53 ± 0,16	10,03 ± 0,10	
E	13,07 ± 0,23	12,85 ± 0,10	11,24 ± 0,08	10,48 ± 0,11	9,87 ± 0,12	
F	11,00 ± 0,13	12,71 ± 0,13	11,18 ± 0,21	11,00 ± 0,09	n.q.	
G	13,08 ± 0,11	12,68 ± 0,10	10,79 ± 0,43	10,55 ± 0,10	9,85 ± 0,26	
H	12,48 ± 0,17	12,11 ± 0,04	10,15 ± 0,09	10,46 ± 0,11	n.q.	
I	12,72 ± 0,24	12,23 ± 0,10	10,44 ± 0,00	10,46 ± 0,31	9,75 ± 0,07	
J	13,09 ± 0,09	12,86 ± 0,07	10,27 ± 0,12	10,56 ± 0,22	9,64 ± 0,26	
K	12,82 ± 0,13	12,70 ± 0,09	10,14 ± 0,20	10,29 ± 0,18	n.q.	
L	12,37 ± 0,11	12,56 ± 0,02	10,66 ± 0,07	10,24 ± 0,03	n.q.	

Gelistet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus den vier Replikaten (n.q.: nicht quantifizierbar).

A.3 Zahlenwerte Zielgenabundanz in Klärschlamm-Originalsubstanz

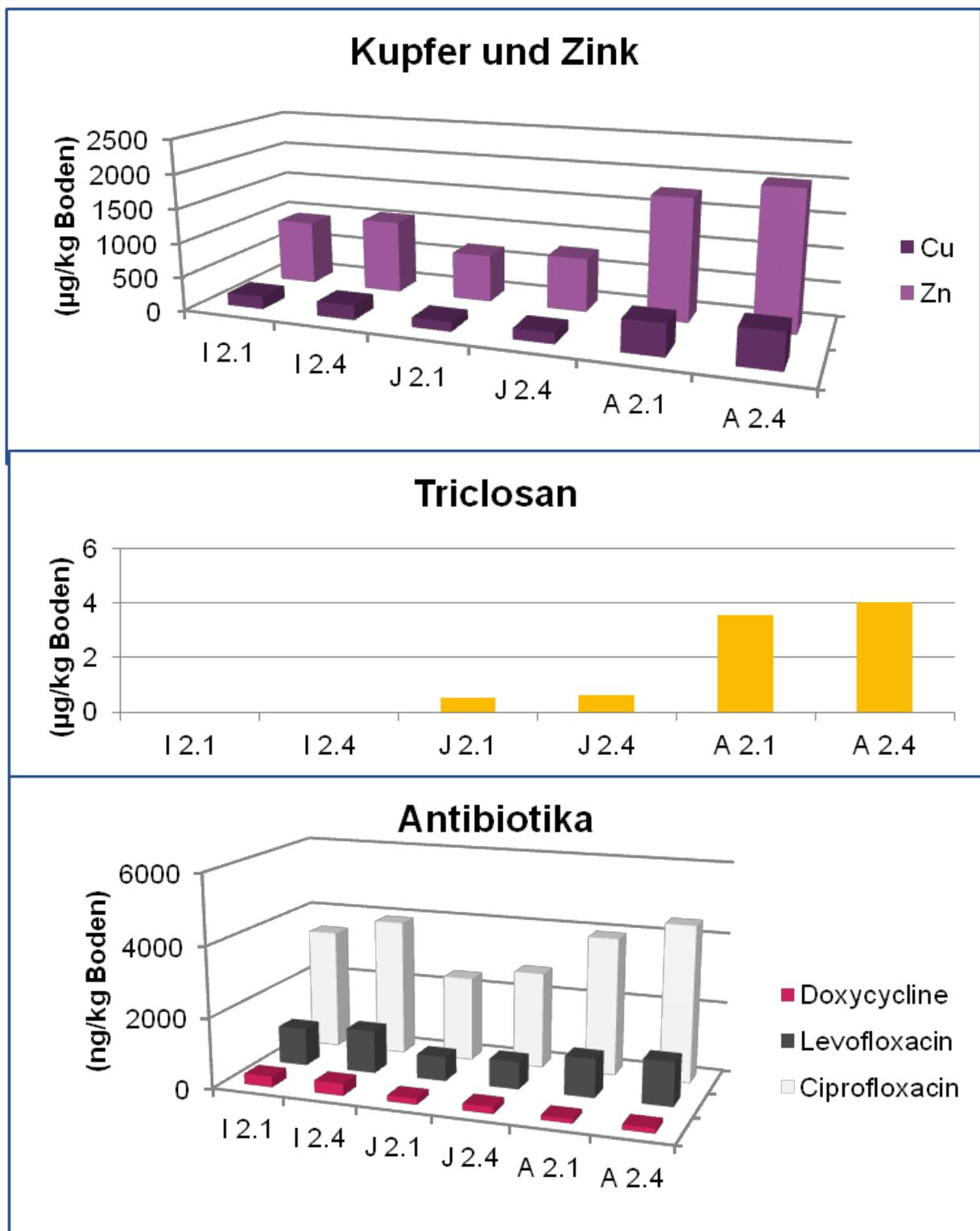
Tabelle 15: Absolute Abundanz der Zielgene in der Klärschlamm-Originalsubstanz [pro kg]. Gelistet sind die logarithmierten Mittelwerte und Standardabweichungen (n.q.: nicht quantifizierbar).

KA	16S (rrn)	sul1	sul2	qacE/qacE11	int11	int12
AIII	14,79 ± 0,05	12,51 ± 0,42	13,28 ± 0,08	12,58 ± 0,39	12,36 ± 0,52	11,10 ± 0,20
B	14,06 ± 0,03	11,92 ± 0,06	11,32 ± 0,02	11,69 ± 0,04	11,71 ± 0,04	n.q.
C	13,49 ± 0,06	10,52 ± 0,11	10,09 ± 0,13	10,40 ± 0,08	10,53 ± 0,16	n.q.
D	13,74 ± 0,05	11,64 ± 0,08	11,15 ± 0,01	11,39 ± 0,05	11,73 ± 0,18	n.q.
E	13,98 ± 0,08	11,81 ± 0,32	11,23 ± 0,25	11,98 ± 0,09	11,95 ± 0,36	n.q.
F	14,80 ± 0,05	12,43 ± 0,14	12,32 ± 0,07	11,99 ± 0,17	12,01 ± 0,17	12,06 ± 0,12
G	13,62 ± 0,08	11,87 ± 0,21	11,04 ± 0,16	11,94 ± 0,08	11,88 ± 0,29	n.q.
H	13,80 ± 0,12	11,26 ± 0,07	11,32 ± 0,03	11,09 ± 0,02	11,37 ± 0,05	n.q.
I	13,66 ± 0,09	11,60 ± 0,15	11,09 ± 0,12	11,42 ± 0,07	11,49 ± 0,25	n.q.
J	13,67 ± 0,07	11,27 ± 0,06	11,36 ± 0,08	11,08 ± 0,13	11,29 ± 0,05	n.q.
K	13,71 ± 0,06	11,13 ± 0,15	10,69 ± 0,25	11,23 ± 0,10	11,35 ± 0,16	n.q.
L	13,88 ± 0,08	11,01 ± 0,11	11,22 ± 0,03	11,00 ± 0,04	11,79 ± 0,12	n.q.
KA	tet(A)	tet(M)	tet(Q)	tet(W)	strA	korB
AIII	10,92 ± 0,22	11,34 ± 0,27	10,25 ± 0,48	11,14 ± 0,11	13,05 ± 0,12	12,19 ± 0,11
B	10,56 ± 0,11	11,30 ± 0,02	9,89 ± 0,04	10,77 ± 0,03	11,29 ± 0,02	12,51 ± 0,19
C	10,04 ± 1,80	10,55 ± 0,11	9,02 ± 0,13	9,68 ± 0,06	9,23 ± 0,17	11,81 ± 0,19
D	10,25 ± 0,12	11,25 ± 0,10	10,12 ± 0,05	10,45 ± 0,04	11,15 ± 0,07	12,36 ± 0,10

KA	16S (rrn)	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>qacE/qacEΔ1</i>	<i>int1</i>	<i>int2</i>
E	10,84 ± 0,43	11,13 ± 0,06	10,46 ± 0,07	10,76 ± 0,08	11,53 ± 0,10	12,60 ± 0,12
F	10,83 ± 0,19	11,44 ± 0,11	9,95 ± 0,10	11,56 ± 0,06	12,36 ± 0,08	12,04 ± 0,21
G	10,46 ± 0,40	10,82 ± 0,06	9,98 ± 0,12	10,39 ± 0,07	11,70 ± 0,09	12,56 ± 0,11
H	n.q.	10,46 ± 0,07	9,65 ± 0,11	10,29 ± 0,06	11,02 ± 0,11	12,30 ± 0,18
I	10,26 ± 0,14	10,27 ± 0,10	9,62 ± 0,09	10,40 ± 0,09	11,27 ± 0,10	12,72 ± 0,33
J	9,94 ± 0,31	10,91 ± 0,09	10,19 ± 0,07	10,56 ± 0,04	11,23 ± 0,09	12,71 ± 0,26
K	9,75 ± 0,30	10,52 ± 0,10	9,53 ± 0,13	10,05 ± 0,09	11,16 ± 0,05	12,46 ± 0,28
L	9,79 ± 0,22	10,65 ± 0,06	9,50 ± 0,17	10,12 ± 0,05	11,09 ± 0,04	12,07 ± 0,21
KA	<i>trfA</i>	<i>aadA</i>	<i>qnrS</i>	<i>tetA(P)</i>	Incl	
AIII	10,75 ± 0,13	12,30 ± 0,13	8,72 ± 0,19	10,29 ± 0,07	n.q.	
B	11,18 ± 0,14	11,13 ± 0,04	8,80 ± 0,08	10,07 ± 0,06	n.q.	
C	10,57 ± 0,17	10,10 ± 0,13	8,14 ± 0,16	8,13 ± 0,08	n.q.	
D	11,32 ± 0,09	11,48 ± 0,01	9,49 ± 0,02	8,80 ± 0,16	8,30 ± 0,10	
E	11,72 ± 0,23	11,51 ± 0,10	9,89 ± 0,08	9,14 ± 0,11	8,53 ± 0,12	
F	10,43 ± 0,13	12,14 ± 0,13	10,61 ± 0,21	10,43 ± 0,09	n.q.	
G	11,59 ± 0,11	11,19 ± 0,10	9,30 ± 0,43	9,06 ± 0,10	8,36 ± 0,26	
H	11,16 ± 0,17	10,79 ± 0,04	8,83 ± 0,09	9,14 ± 0,11	n.q.	
I	11,14 ± 0,24	10,65 ± 0,10	8,87 ± 0,00	8,88 ± 0,31	8,17 ± 0,07	
J	11,46 ± 0,09	11,23 ± 0,07	8,63 ± 0,12	8,93 ± 0,22	8,01 ± 0,26	
K	11,20 ± 0,13	11,08 ± 0,09	8,52 ± 0,20	8,66 ± 0,18	n.q.	
L	10,98 ± 0,11	11,17 ± 0,02	9,27 ± 0,07	8,85 ± 0,03	n.q.	

A.4 Eintragungsmengen an selektiven Substanzen in die Bodenmikrokosmen

Abbildung 18: Eintragungsmengen an potentiell selektiven Substanzen in die Bodenmikrokosmen [pro kg Boden]



A.5 Konzentrationen der Schwermetalle, TCS und TCC in den Klärschlämmen bezogen auf die Trockenmasse

Tabelle 16: Konzentrationen an Schwermetallen, TCS und TCC in den Klärschlämmen [mg/kg Trockenmasse].

KA	CrVI	Pb	Cd	Cr	Cu	Ni
AT	b.q.	32,5 ± 1,53	1,41 ± 0,117	28,1 ± 0,77	297 ± 11,9	32,9 ± 1,12
AIII	b.q.	42,6 ± 1,95	1,54 ± 0,126	30,9 ± 1,75	336 ± 28,3	38,4 ± 1,89
B	b.q.	33,1 ± 2,94	0,97 ± 0,113	53,7 ± 3,32	329 ± 8,1	36,7 ± 2,90
C	b.q.	25,8 ± 1,46	1,11 ± 0,108	25,6 ± 0,74	127 ± 10,2	13,1 ± 0,45
D	b.q.	15,3 ± 0,51	0,81 ± 0,074	15,2 ± 0,24	237 ± 5,2	13,9 ± 0,48
E	b.q.	15,2 ± 0,80	1,21 ± 0,067	18,9 ± 1,79	264 ± 10,5	17,3 ± 1,11
F	b.q.	52,2 ± 0,49	1,14 ± 0,040	31,0 ± 1,71	331 ± 9,1	28,4 ± 0,59
G	b.q.	24,2 ± 1,11	0,85 ± 0,075	28,1 ± 1,65	276 ± 11,0	23,1 ± 0,24
H	b.q.	19,6 ± 1,66	0,78 ± 0,061	25,0 ± 0,72	230 ± 4,3	26,1 ± 0,40
I	b.q.	23,6 ± 4,13	0,86 ± 0,057	25,3 ± 4,70	135 ± 8,8	20,3 ± 1,22
J	b.q.	12,7 ± 0,17	0,88 ± 0,056	15,6 ± 0,41	124 ± 3,3	15,6 ± 0,72
K	b.q.	14,2 ± 1,03	0,84 ± 0,033	17,0 ± 0,15	299 ± 4,9	18,0 ± 0,44
L	b.q.	18,9 ± 0,58	0,48 ± 0,041	17,5 ± 1,22	148 ± 3,1	15,1 ± 0,43
KA	Tl	Hg	Zn	As	TCS	TCC
AT	b.q.	0,633 ± 0,0189	1153 ± 53,8	3,75 ± 0,5	2,567 ± 0,0703	0,098 ± 0,0025
AIII	b.q.	0,893 ± 0,1541	1303 ± 97,4	3,75 ± 0,5	2,586 ± 0,1195	0,105 ± 0,0069
B	b.q.	0,443 ± 0,0275	1050 ± 28,3	4 ± 0	0,590 ± 0,1175	b.q.
C	0,2 ± 0	0,335 ± 0,1439	439 ± 32,2	3 ± 0	b.q.	b.q.
D	b.q.	0,543 ± 0,1706	777 ± 17,7	b.q.	1,013 ± 0,0817	b.q.
E	0,2 ± 0	0,445 ± 0,1196	880 ± 30,1	3 ± 0	1,289 ± 0,1115	b.q.
F	b.q.	0,660 ± 0,0424	1288 ± 35,9	5,25 ± 0,5	2,155 ± 0,0956	0,1007 ± 0,0048
G	b.q.	0,543 ± 0,0556	893 ± 33,9	3 ± 0	0,542 ± 0,1077	b.q.
H	b.q.	0,568 ± 0,1090	698 ± 12,9	3 ± 0	0,941 ± 0,1332	b.q.
I	b.q.	0,423 ± 0,0885	684 ± 62,1	4 ± 0	b.q.	b.q.
J	b.q.	0,385 ± 0,0733	619 ± 17,9	2 ± 0	0,491 ± 0,0759	b.q.
K	b.q.	0,480 ± 0,0821	669 ± 9,8	2,25 ± 0,5	0,686 ± 0,1593	b.q.
L	b.q.	0,380 ± 0,0920	237 ± 4,7	7 ± 0	0,481 ± 0,0756	b.q.

Gelistet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus den vier Replikaten (b.q.: below quantification level, keine Detektion in mindestens 2 Replikaten).

A.6 Konzentrationen der Schwermetalle, TCS und TCC in der Klärschlamm-Originalsubstanz [pro kg]

Tabelle 17: Konzentrationen an Schwermetallen, TCS und TCC in der Klärschlamm-Originalsubstanz [mg/kg].

KA	CrVI	Pb	Cd	Cr	Cu	Ni
AT	b.q.	7,22 ± 0,38	0,3121 ± 0,0285	6,24 ± 0,188	66,0 ± 3,2	7,30 ± 0,300
AIII	b.q.	10,73 ± 0,61	0,3860 ± 0,0320	7,77 ± 0,287	84,3 ± 4,6	9,65 ± 0,299
B	b.q.	1,26 ± 0,21	0,0366 ± 0,0066	2,03 ± 0,252	12,5 ± 1,0	1,39 ± 0,177
C	b.q.	0,47 ± 0,07	0,1121 ± 0,1093	0,46 ± 0,050	2,5 ± 0,6	0,24 ± 0,032
D	b.q.	0,29 ± 0,02	0,0151 ± 0,0011	0,29 ± 0,013	4,5 ± 0,6	0,26 ± 0,014
E	b.q.	0,69 ± 0,06	0,0546 ± 0,0053	0,85 ± 0,111	12,0 ± 0,8	0,78 ± 0,086
F	b.q.	14,00 ± 0,51	0,3052 ± 0,0158	8,31 ± 0,691	88,8 ± 3,0	7,62 ± 0,219
G	b.q.	0,79 ± 0,14	0,0278 ± 0,0060	0,91 ± 0,174	8,8 ± 1,5	0,75 ± 0,139
H	b.q.	0,93 ± 0,19	0,0367 ± 0,0065	1,18 ± 0,187	11,0 ± 1,6	1,23 ± 0,182
I	b.q.	0,64 ± 0,25	0,0225 ± 0,0040	0,68 ± 0,237	3,8 ± 1,0	0,54 ± 0,129
J	b.q.	0,29 ± 0,04	0,0204 ± 0,0029	0,36 ± 0,062	3,0 ± 0,0	0,36 ± 0,056
K	b.q.	0,34 ± 0,03	0,0197 ± 0,0008	0,40 ± 0,008	7,0 ± 0,0	0,43 ± 0,013
L	b.q.	0,77 ± 0,05	0,0194 ± 0,0023	0,71 ± 0,039	6,0 ± 0,0	0,61 ± 0,032
KA	TI	Hg	Zn	As	TCS	TCC
AT	b.q.	0,14 ± 0,005	256,0 ± 14,3	1 ± 0	0,570 ± 0,012	0,022 ± 0,000
AIII	b.q.	0,23 ± 0,041	327,0 ± 14,9	1 ± 0	0,651 ± 0,043	0,027 ± 0,002
B	b.q.	0,02 ± 0,002	39,8 ± 3,9	b.q.	0,022 ± 0,004	b.q.
C	b.q.	0,01 ± 0,003	7,8 ± 1,5	b.q.	b.q.	b.q.
D	b.q.	0,01 ± 0,003	14,5 ± 0,6	b.q.	0,019 ± 0,002	b.q.
E	b.q.	0,02 ± 0,006	39,5 ± 2,6	b.q.	0,058 ± 0,005	b.q.
F	b.q.	0,18 ± 0,014	345,3 ± 11,5	1,25 ± 0,5	0,578 ± 0,011	0,027 ± 0,001
G	b.q.	0,02 ± 0,004	29,0 ± 5,4	b.q.	0,016 ± 0,003	b.q.
H	b.q.	0,03 ± 0,009	33,3 ± 5,4	b.q.	0,044 ± 0,005	b.q.
I	b.q.	0,01 ± 0,004	18,3 ± 4,6	b.q.	b.q.	b.q.
J	b.q.	0,01 ± 0,003	14,5 ± 1,7	b.q.	0,011 ± 0,001	b.q.
K	b.q.	0,01 ± 0,002	16,0 ± 0,0	b.q.	0,016 ± 0,004	b.q.
L	b.q.	0,02 ± 0,004	9,5 ± 0,6	b.q.	0,020 ± 0,002	b.q.

Gelistet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus den vier Replikaten (b.q.: below quantification level, keine Detektion in mindestens 2 Replikaten).

A.7 Konzentrationen der Antibiotika in den Klärschlämmen bezogen auf die Trockenmasse

Tabelle 18: Konzentrationen an Antibiotika und Carbamazepin in den Klärschlämmen [$\mu\text{g}/\text{kg}$ Trockenmasse].

KA	ROX	AZI	CLIN	CLINSO	TMP	CLAR
AT	3,21 ± 0,45	122,90 ± 29,18	b.q.	b.q.	b.q.	27,28 ± 4,00
AIII	1,68 ± 0,19	63,19 ± 10,55	b.q.	b.q.	b.q.	7,42 ± 0,68
B	4,51 ± 0,32	103,52 ± 35,20	b.q.	b.q.	b.q.	5,04 ± 1,04
C	4,91 ± 1,81	232,26 ± 121,87	11,25 ± 2,79	b.q.	b.q.	13,70 ± 4,68
D	16,66 ± 5,19	312,74 ± 242,38	15,62 ± 11,05	b.q.	62,24 ± 18,86	34,74 ± 15,95
E	28,63 ± 4,08	222,64 ± 70,13	12,14 ± 4,32	b.q.	45,12 ± 6,39	29,87 ± 7,08
F	3,73 ± 1,32	61,35 ± 14,78	21,18 ± 5,51	b.q.	b.q.	5,28 ± 1,34
G	14,74 ± 6,16	392,93 ± 149,06	27,76 ± 11,64	b.q.	61,18 ± 20,24	28,03 ± 22,20
H	13,21 ± 3,94	133,53 ± 45,09	46,62 ± 14,79	13,17 ± 4,92	b.q.	13,33 ± 2,21
I	6,07 ± 1,81	189,11 ± 40,54	50,15 ± 13,57	23,14 ± 8,56	b.q.	15,47 ± 2,94
J	15,51 ± 4,16	110,89 ± 31,34	25,25 ± 8,78	12,56 ± 3,19	15,34 ± 3,08	52,95 ± 18,34
K	12,10 ± 3,48	94,25 ± 15,24	15,05 ± 4,56	4,20 ± 2,83	b.q.	23,65 ± 7,86
L	31,08 ± 8,73	416,07 ± 161,34	42,31 ± 7,32	33,30 ± 7,89	30,50 ± 3,33	112,46 ± 32,15
KA	SMX	LEVO	CIP	VAN	DOXY	CARB
AT	b.q.	1321,0 ± 386,26	4413,0 ± 1572,40	48,21 ± 5,05	176,32 ± 11,29	164,62 ± 36,63
AIII	b.q.	789,1 ± 22,56	28064,6 ± 247,51	57,25 ± 32,66	87,59 ± 4,92	189,04 ± 45,95
B	b.q.	1839,2 ± 662,15	4273,6 ± 2458,33	b.q.	114,59 ± 14,05	83,92 ± 9,31
C	b.q.	242,7 ± 55,82	576,5 ± 181,24	b.q.	28,14 ± 32,61	35,89 ± 8,14
D	b.q.	2016,5 ± 641,86	4567,2 ± 1736,19	b.q.	230,97 ± 92,51	35,82 ± 10,65
E	b.q.	2486,4 ± 1446,47	4069,7 ± 2142,67	b.q.	202,39 ± 26,32	19,36 ± 2,73
F	b.q.	1932,3 ± 443,96	6748,3 ± 1275,08	65,22 ± 46,34	187,87 ± 30,65	193,99 ± 87,96
G	b.q.	459,9 ± 159,19	5668,1 ± 442,28	b.q.	234,10 ± 69,08	62,93 ± 15,98
H	b.q.	740,0 ± 312,80	2724,7 ± 1309,02	b.q.	173,57 ± 60,66	56,08 ± 14,99
I	b.q.	781,0 ± 285,03	2493,2 ± 737,17	b.q.	217,52 ± 64,77	101,83 ± 11,93
J	b.q.	616,2 ± 293,19	2163,7 ± 1478,87	b.q.	149,67 ± 67,28	45,15 ± 9,69
K	b.q.	489,5 ± 162,74	1025,1 ± 407,92	b.q.	107,59 ± 31,98	31,02 ± 21,53
L	b.q.	212,3 ± 44,83	933,0 ± 120,05	b.q.	58,67 ± 14,62	181,43 ± 70,33

Gelistet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus den vier Replikaten (b.q.: below quantification level, keine Detektion in mindestens 2 Replikaten).

A.8 Errechnete Konzentrationen der Antibiotika und von Carbamazepin in der Klärschlamm-Originalsubstanz

Tabelle 19: Errechnete Konzentrationen an Antibiotika und Carbamazepin in der Klärschlamm-Originalsubstanz [$\mu\text{g}/\text{kg}$].

KA	ROX	AZI	CLIN	CLINSO	TMP	CLAR
AT	0,71 ± 0,10	27,30 ± 6,59	b.q.	b.q.	b.q.	6,06 ± 0,94
AIII	0,42 ± 0,04	15,88 ± 2,65	b.q.	b.q.	b.q.	1,86 ± 0,13
B	0,41 ± 0,06	4,97 ± 1,04	0,16 ± 0,19	0,10 ± 0,01	b.q.	0,32 ± 0,04
C	0,10 ± 0,02	4,60 ± 1,61	0,23 ± 0,06	0,02 ± 0,00	0,05 ± 0,10	0,27 ± 0,06
D	1,48 ± 0,36	11,27 ± 5,53	0,61 ± 0,30	0,73 ± 0,19	1,68 ± 0,41	1,65 ± 0,38
E	2,07 ± 0,24	11,30 ± 3,08	0,75 ± 0,23	0,30 ± 0,06	2,79 ± 0,35	1,61 ± 0,34
F	1,00 ± 0,33	16,45 ± 3,89	5,68 ± 1,46	b.q.	b.q.	1,41 ± 0,35
G	1,53 ± 0,19	21,59 ± 3,61	1,26 ± 0,40	1,06 ± 0,79	2,39 ± 0,37	1,56 ± 0,74
H	0,98 ± 0,25	7,70 ± 3,38	2,51 ± 0,92	1,02 ± 0,41	0,11 ± 0,01	0,81 ± 0,17
I	0,22 ± 0,06	6,50 ± 1,64	1,84 ± 0,45	0,88 ± 0,18	b.q.	0,50 ± 0,11
J	0,65 ± 0,15	3,40 ± 0,94	0,97 ± 0,28	0,54 ± 0,10	0,56 ± 0,12	1,73 ± 0,59
K	0,54 ± 0,11	2,79 ± 0,40	0,50 ± 0,10	0,18 ± 0,07	b.q.	0,78 ± 0,20
L	1,46 ± 0,35	17,49 ± 7,06	1,99 ± 0,31	1,82 ± 0,30	1,36 ± 0,09	4,86 ± 1,21
KA	SMX	LEVO	CIP	VAN	DOXY	CARB
AT	b.q.	293,54 ± 87,52	979,19 ± 346,71	10,70 ± 1,12	39,13 ± 2,29	36,59 ± 8,44
AIII	b.q.	200,80 ± 10,49	721,07 ± 74,83	14,49 ± 8,34	22,03 ± 1,48	47,64 ± 12,06
B	0,02 ± 0,01	70,77 ± 26,46	165,59 ± 98,71	b.q.	4,58 ± 0,76	4,61 ± 0,85
C	0,02 ± 0,00	4,35 ± 0,67	10,37 ± 3,00	b.q.	0,47 ± 0,55	1,29 ± 0,12
D	0,24 ± 0,09	39,40 ± 13,56	91,16 ± 35,33	b.q.	4,39 ± 1,97	1,94 ± 0,22
E	0,13 ± 0,02	119,26 ± 65,84	192,41 ± 97,07	b.q.	9,36 ± 1,56	1,32 ± 0,20
F	b.q.	520,75 ± 134,54	1803,18 ± 293,32	17,34 ± 12,05	50,50 ± 9,22	52,57 ± 25,57
G	0,07 ± 0,04	15,21 ± 4,14	190,16 ± 47,37	b.q.	7,37 ± 1,43	3,07 ± 0,62
H	0,06 ± 0,01	37,37 ± 19,82	136,48 ± 71,75	b.q.	8,47 ± 3,80	4,81 ± 1,25
I	0,06 ± 0,02	20,75 ± 7,65	65,99 ± 20,34	b.q.	5,92 ± 2,33	4,94 ± 0,63
J	0,05 ± 0,01	14,94 ± 8,10	51,90 ± 33,77	b.q.	3,67 ± 2,02	2,66 ± 0,33
K	b.q.	12,90 ± 4,03	26,12 ± 9,89	b.q.	2,66 ± 0,79	2,08 ± 0,54
L	b.q.	9,35 ± 1,40	39,36 ± 3,78	b.q.	2,45 ± 0,54	9,16 ± 2,79

Gelistet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus den vier Replikaten (b.q.: below quantification level, keine Detektion in mindestens 2 Replikaten).

A.9 Konzentrationen der Antibiotika in den separat analysierten wässrigen Überständen der Klärschlamm [ng/L]

Tabelle 20: Konzentrationen der Antibiotika in den separat analysierten wässrigen Klärschlamm-Überständen [ng/L].

KA	ROX	AZI	CLIN	CLINSO	TMP	CLAR
B	252,9 ± 42,0	1106,1 ± 299,3	62,8 ± 9,4	103,2 ± 14,5	b.q.	130,9 ± 11,0
C	15,5 ± 4,9	589,3 ± 102,9	27,1 ± 2,6	24,9 ± 1,7	b.q.	25,9 ± 3,2
D	1190,4 ± 264,7	5329,5 ± 617,3	322,8 ± 94,4	660,2 ± 206,7	512,1 ± 17,8	1003,3 ± 64,7
E	816,2 ± 182,4	1329,6 ± 258,7	209,3 ± 48,0	310,7 ± 59,8	794,5 ± 93,9	279,8 ± 69,5
G	1106,5 ± 239,5	9358,5 ± 3605,3	359,5 ± 111,7	451,7 ± 58,3	503,0 ± 67,8	696,6 ± 174,3
H	361,3 ± 66,7	1231,4 ± 372,0	251,2 ± 18,0	390,5 ± 124,3	112,2 ± 13,3	184,3 ± 16,8
I	54,0 ± 18,3	1414,4 ± 282,5	508,0 ± 68,1	272,1 ± 73,5	b.q.	91,5 ± 21,8
J	285,6 ± 38,8	806,1 ± 115,3	379,5 ± 76,7	253,8 ± 32,4	201,9 ± 73,1	474,1 ± 64,9
K	259,2 ± 57,5	561,3 ± 139,8	141,5 ± 13,9	81,1 ± 14,7	b.q.	221,9 ± 38,2
L	209,5 ± 10,3	387,7 ± 48,6	273,9 ± 55,7	496,0 ± 24,5	125,8 ± 20,2	309,2 ± 48,6
KA	SMX	LEVO	CIP	DOXY	CARB	
B	25,3 ± 9,6	963,2 ± 30,7	1793,4 ± 274,7	216,5 ± 72,1	1475,4 ± 426,8	
C	15,9 ± 3,3	52,1 ± 5,9	116,4 ± 17,3	b.q.	666,9 ± 41,6	
D	181,9 ± 33,7	1238,8 ± 168,5	4847,8 ± 451,4	b.q.	1291,2 ± 24,7	
E	136,0 ± 16,0	6915,2 ± 640,5	9045,6 ± 1010,0	179,9 ± 35,7	470,5 ± 110,2	
G	67,8 ± 42,9	611,6 ± 642,9	4506,5 ± 298,8	b.q.	1099,4 ± 231,2	
H	64,5 ± 10,6	972,6 ± 146,4	2562,6 ± 969,7	b.q.	2197,4 ± 281,0	
I	56,9 ± 20,9	228,6 ± 68,2	565,5 ± 111,0	b.q.	2299,6 ± 195,6	
J	51,0 ± 12,9	359,9 ± 12,3	1543,1 ± 315,8	105,8 ± 13,7	1640,2 ± 114,8	
K	b.q.	1302,5 ± 212,3	1799,2 ± 51,0	104,9 ± 18,2	1374,8 ± 179,9	
L	b.q.	785,7 ± 92,8	1512,0 ± 158,1	70,5 ± 9,9	1828,6 ± 257,9	

Gelistet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus den vier Replikaten (b.q.: below quantification level, keine Detektion in mindestens 2 Replikaten).

A.10 Konzentrationen der QACs in den Klärschlämmen [$\mu\text{g}/\text{kg}$ Trockenmasse]

Tabelle 21: Konzentrationen der QACs in den Klärschlämmen [$\mu\text{g}/\text{kg}$].

KA	ATMAC8	ATMAC10	ATMAC12	ATMAC14	ATMAC16	ATMAC SUM
AT	2,7 ± 1,0	56,4 ± 23,1	112,4 ± 53,7	29,8 ± 20,4	280,8 ± 234,1	482,2 ± 330,6
AIII	2,2 ± 0,8	53,3 ± 18,6	105,4 ± 43,3	28,2 ± 16,5	262,2 ± 188,7	451,4 ± 307,7
B	1,3 ± 0,6	12,3 ± 1,6	68,2 ± 12,6	19,0 ± 3,6	128,3 ± 27,0	229,2 ± 49,1
C	b.q.	b.q.	b.q.	b.q.	b.q.	b.q.
D	0,4 ± 0,1	1,5 ± 0,3	3,0 ± 0,7	1,5 ± 0,4	15,6 ± 11,2	21,6 ± 14,5
E	0,6 ± 0,3	1,7 ± 0,2	2,2 ± 0,2	b.q.	b.q.	4,9 ± 1,0
F	1,5 ± 0,6	7,3 ± 0,5	48,0 ± 2,4	16,6 ± 2,3	229,7 ± 66,6	303,0 ± 81,4
G	b.q.	4,8 ± 2,2	3,8 ± 1,3	b.q.	6,2 ± 2,0	12,3 ± 10,3
H	b.q.	1,8 ± 0,4	2,8 ± 0,8	b.q.	b.q.	9,9 ± 7,9
I	0,5 ± 0,0	1,9 ± 0,4	3,4 ± 1,0	1,4 ± 0,2	9,1 ± 1,2	16,4 ± 2,2
J	0,6 ± 0,6	2,3 ± 0,5	2,3 ± 0,2	b.q.	4,4 ± 0,6	8,7 ± 1,9
K	b.q.	2,4 ± 0,3	2,7 ± 0,3	b.q.	5,1 ± 0,8	10,0 ± 0,6
L	1,3 ± 0,7	7,6 ± 1,0	5,6 ± 1,0	1,5 ± 0,5	15,8 ± 11,7	31,8 ± 15,6
KA	BAC8	BAC10	BAC12	BAC14	BAC16	BACMAC18
AT	5,3 ± 0,8	73,9 ± 30,4	6940,8 ± 4027,0	1820,1 ± 1516,1	57,5 ± 38,9	b.q.
AIII	5,8 ± 0,6	69,7 ± 24,5	6460,6 ± 3245,8	1694,9 ± 1222,1	53,6 ± 31,8	13,7 ± 6,4
B	b.q.	15,7 ± 1,8	1295,2 ± 225,7	293,7 ± 80,9	48,5 ± 25,2	22,6 ± 12,6
C	b.q.	b.q.	5,8 ± 1,6	b.q.	b.q.	b.q.
D	b.q.	5,4 ± 1,3	45,6 ± 25,4	15,9 ± 12,5	b.q.	b.q.
E	b.q.	4,4 ± 0,2	9,7 ± 0,9	2,8 ± 0,3	3,2 ± 0,0	b.q.
F	3,2 ± 0,9	36,7 ± 4,6	4781,9 ± 452,7	1388,1 ± 405,7	142,9 ± 78,9	30,6 ± 16,2
G	2,4 ± 0,1	b.q.	67,2 ± 6,0	11,5 ± 2,4	4,0 ± 0,7	b.q.
H	b.q.	5,3 ± 1,5	76,1 ± 66,3	18,8 ± 16,5	b.q.	b.q.
I	b.q.	5,0 ± 1,6	118,6 ± 16,7	21,0 ± 9,2	2,8 ± 0,4	b.q.
J	b.q.	b.q.	19,1 ± 11,2	4,6 ± 1,6	b.q.	b.q.
K	3,7 ± 0,2	5,5 ± 0,9	15,5 ± 2,6	4,5 ± 0,3	b.q.	2,1 ± 0,1
L	4,2 ± 0,3	b.q.	273,7 ± 168,7	41,8 ± 35,6	b.q.	b.q.

KA	ATMAC8	ATMAC10	ATMAC12	ATMAC14	ATMAC16	ATMAC SUM
KA	BAC SUM	DADMAC8	DADMAC10	DADMAC SUM	Chlormequat	Benzethonium
AT AIII	8897,7 ± 5595,3 8298,3 ± 5213,4	2357,9 ± 1145,4 2195,4 ± 923,2	4504,6 ± 3654,9 6387,5 ± 4437,7	6864,9 ± 4771,3 826,0 ± 358,6	b.q. b.q.	14,8 ± 12,7 15,4 ± 9,3
B	1676,3 ± 350,4	380,0 ± 54,3	1343,6 ± 363,1	1726,3 ± 454,3	1,3 ± 0,8	6,2 ± 0,9
C	8,4 ± 2,1	b.q.	b.q.	b.q.	b.q.	b.q.
D	68,9 ± 49,4	17,2 ± 5,8	33,9 ± 36,6	51,1 ± 48,8	0,4 ± 0,2	4,0 ± 1,0
E	18,6 ± 2,7	10,4 ± 1,3	7,5 ± 4,4	17,9 ± 4,6	0,2 ± 0,1	b.q.
F	6383,4 ± 1095,5	972,0 ± 88,8	2019,3 ± 672,4	2991,3 ± 872,3	1,6 ± 1,1	16,4 ± 2,9
G	65,8 ± 43,9	59,6 ± 51,6	43,2 ± 43,6	102,8 ± 104,7	b.q.	3,1 ± 0,2
H	103,0 ± 95,7	15,6 ± 7,5	b.q.	28,6 ± 24,4	0,3 ± 0,1	b.q.
I	148,4 ± 30,1	21,9 ± 2,0	27,3 ± 9,7	49,3 ± 12,4	0,5 ± 0,1	3,6 ± 0,3
J	25,4 ± 15,8	16,5 ± 4,4	7,7 ± 5,2	24,2 ± 11,0	0,6 ± 0,0	b.q.
K	31,3 ± 4,0	10,5 ± 1,9	16,2 ± 3,9	26,7 ± 3,6	0,6 ± 0,2	2,9 ± 0,2
L	329,2 ± 238,1	75,1 ± 35,8	152,1 ± 168,4	236,7 ± 234,7	b.q.	4,3 ± 0,8

Gelistet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus den vier Replikaten (b.q.: below quantification level, keine Detektion in mindestens 2 Replikaten). Ergebnisse der Korrelationsanalyse für die absolute Zielgenabundanz und potentiell selektiven Substanzen bezogen auf die Klärschlamm-Trockenmasse unter Berücksichtigung aller Klärschlämme

Tabelle 22: Korrelationskoeffizienten für die absolute Zielgenabundanz und potentiell selektive Substanzen (bezogen auf Trockenmasse) und Anlagengröße [EW] unter Berücksichtigung aller Klärschlämme.

	<i>rrn</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>tet(A)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>tet(Q)</i>	<i>tet(W)</i>	<i>strA</i>
TCS	0,36 *	0,14	0,69 ***	-0,09	-0,06	-0,06	0,14	0,65 ***
Pb	0,23	0,12	0,46 **	-0,06	-0,27	-0,54 ***	0,05	0,45 **
Cd	0,22	0,22	0,67 ***	-0,04	-0,10	-0,02	0,11	0,63 ***
Cr	0,31 *	0,31 *	0,16	0,00	-0,03	-0,40 **	0,20	0,16
Cu	0,42 **	0,42 **	0,38 **	-0,14	0,06	-0,14	0,20	0,47 ***
Ni	0,29 *	0,32 *	0,60 ***	-0,06	-0,19	-0,39 **	0,11	0,59 ***
Hg	0,17	0,22	0,69 ***	-0,03	-0,06	-0,14	-0,04	0,65 ***
Zn	0,41 **	0,50 ***	0,54 ***	-0,15	0,04	-0,04	0,42 **	0,62 ***
ROX	-0,14	-0,13	-0,33 *	-0,14	0,13	0,39 **	-0,03	-0,29
AZI	-0,22	0,07	-0,28	-0,13	0,19	0,15	-0,15	-0,17
CLIN	-0,54 ***	-0,21	-0,37 **	-0,07	-0,33 *	-0,15	-0,21	-0,34 *
CLINSO	-0,44 **	-0,13	-0,22	-0,11	-0,23	-0,13	-0,25	-0,16
TMP	0,01	0,42 **	-0,20	-0,14	0,52 ***	0,61 ***	0,23	-0,02
CLAR	-0,08	-0,23	-0,18	-0,15	0,03	0,17	-0,14	-0,20
SMX	0,20	0,18	0,52 ***	-0,08	-0,03	-0,15	0,02	0,48 ***
LEVO	0,52 ***	0,43 **	-0,04	-0,17	0,45 **	0,40 **	0,66 ***	-0,01
CIP	0,23	0,54 ***	0,01	-0,24	0,22	0,18	0,54 ***	0,16
DOXY	0,00	0,46 **	-0,18	-0,26	0,27	0,42 **	0,48 ***	0,00
CARB	0,09	-0,06	0,46 ***	-0,21	-0,36	-0,49 ***	-0,12	0,39 **

	<i>rrn</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>tet(A)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>tet(Q)</i>	<i>tet(W)</i>	<i>strA</i>
Größe	0,18	0,05	0,95 ***	-0,03	-0,23	-0,26	-0,26	0,86 ***
	<i>intl1</i>	<i>korB</i>	<i>trfA</i>	<i>qacE/qacE11</i>	<i>aadA</i>	<i>tetA(P)</i>	<i>qnrS</i>	
TCS	0,00	-0,43 **	-0,30 *	0,19	0,40 **	0,14	0,30 *	
Pb	-0,26	-0,41 **	-0,63 ***	0,03	-0,13	0,44 **	0,08	
Cd	-0,10	-0,25	-0,19	0,36 *	0,16	0,17	0,08	
Cr	-0,14	-0,18	-0,38 **	0,17	-0,31 *	0,89 ***	-0,20	
Cu	0,14	-0,35 *	-0,15	0,45 **	0,26	0,51 ***	0,25	
Ni	-0,10	-0,29 *	-0,43 **	0,29 *	-0,10	0,70 ***	-0,20	
Hg	0,03	-0,31 *	-0,26	0,28	0,31 *	0,09	0,11	
Zn	0,06	-0,20	-0,15	0,47 ***	0,28	0,50 ***	0,27	
ROX	0,33 *	0,01	0,40 **	0,06	0,19	-0,36 *	0,28 *	
AZI	0,44 **	0,05	0,27	0,17	0,10	-0,29 *	0,16	
CLIN	0,00	0,22	0,03	-0,27	-0,34 *	-0,38 **	-0,07	
CLINSO	0,16	0,22	0,06	-0,08	-0,26	-0,28	-0,22	
TMP	0,71 ***	0,09	0,64 ***	0,51 ***	0,60 ***	-0,27	0,54 ***	
CLAR	0,20	0,02	0,17	-0,16	0,10	-0,31 *	0,03	
SMX	0,10	-0,20	-0,22	0,14	0,33 *	0,06	0,00	
LEVO	0,33 *	-0,08	0,25	0,26	0,42 **	0,34 *	0,63 ***	
CIP	0,33 *	-0,12	0,18	0,39 **	0,33 *	0,31 *	0,53 ***	
DOXY	0,45 **	0,34 *	0,47 ***	0,39 **	0,34 *	-0,04	0,47 ***	
CARB	-0,18	-0,36 *	-0,57 ***	-0,11	-0,08	0,16	0,03	

	<i>rrn</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>tet(A)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>tet(Q)</i>	<i>tet(W)</i>	<i>strA</i>
Größe	-0,13	-0,35 *	-0,44 **	0,20	0,12	0,08	-0,29 *	

A.11 Ergebnisse der Korrelationsanalyse zwischen der absoluten Zielgenabundanz, potentiell selektiven Substanzen und der Anlagengröße bezogen auf die Klärschlamm-Originalsubstanz unter Berücksichtigung der flüssigen Klärschlämme

Tabelle 23: Korrelationskoeffizienten zwischen absoluter Zielgenabundanz, potentiell selektiven Substanzen (in der Klärschlamm-Originalsubstanz) und Anlagengröße [EW] unter Berücksichtigung der flüssigen Klärschlämme.

	<i>rrn</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>tet(A)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>tet(Q)</i>	<i>tet(W)</i>	<i>strA</i>
TCS	0,59 ***	0,28	0,47 **	0,21	0,32 *	0,60 ***	0,50 ***	0,25
Pb	0,58 ***	0,42 **	0,35 *	0,07	0,20	-0,10	0,39 *	0,19
Cd	-0,09	-0,09	-0,28	0,20	-0,05	-0,05	-0,10	-0,19
Cr	0,67 ***	0,50 ***	0,41 **	0,06	0,36 *	-0,03	0,54 ***	0,18
Cu	0,70 ***	0,56 ***	0,41 **	0,08	0,38 *	0,33 *	0,58 ***	0,41 **
Ni	0,64 ***	0,44 **	0,52 ***	0,13	0,25	0,03	0,49 **	0,22
Hg	0,37 *	0,26	0,43 **	0,18	0,03	0,16	0,24	0,26
Zn	0,62 ***	0,68 ***	0,48 **	0,06	0,43 **	0,46 **	0,73 ***	0,50 ***
ROX	0,28	0,36 *	0,32 *	-0,09	0,32 *	0,62 ***	0,29	0,53 ***
AZI	-0,02	0,28	0,05	-0,15	0,04	0,13	-0,04	0,54 ***
CLIN	-0,13	-0,17	0,33 *	-0,03	-0,49 **	-0,19	-0,25	0,06
CLINSO	-0,10	-0,16	0,18	-0,11	-0,27	-0,20	-0,29	0,11
TMP	0,17	0,46 **	0,16	-0,12	0,34 *	0,69 ***	0,32 *	0,70 ***
CLAR	0,17	-0,16	0,26	-0,15	-0,04	0,09	-0,12	0,10
SMX	0,04	0,31	0,18	-0,04	0,54 ***	0,54 ***	0,32 *	0,23

	<i>rrn</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>tet(A)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>tet(Q)</i>	<i>tet(W)</i>	<i>strA</i>
LEVO	0,64 ***	0,57 ***	0,46 **	-0,07	0,56 ***	0,69 ***	0,76 ***	0,33 *
CIP	0,42 **	0,67 ***	0,43 **	-0,13	0,40 **	0,48 **	0,60 ***	0,60 ***
DOXY	0,26	0,48 **	0,46 **	-0,09	0,16	0,49 **	0,46 **	0,58 ***
CARB	0,25	-0,15	0,31 *	-0,09	-0,22	-0,39 *	-0,13	-0,11
Größe	-0,10	-0,32 *	-0,43 **	0,17	-0,16	-0,36 *	-0,25	-0,54 ***
	<i>intl1</i>	<i>korB</i>	<i>trfA</i>	<i>qacE/qacE11</i>	<i>aadA</i>	<i>tetA(P)</i>	<i>qnrS</i>	
TCS	0,45 **	-0,08	0,49 **	0,45 **	0,52 ***	0,11	0,65 ***	
Pb	0,20	0,02	-0,02	0,32 *	-0,16	0,67 ***	0,02	
Cd	-0,12	-0,21	-0,08	-0,02	-0,21	-0,03	0,02	
Cr	0,17	0,05	0,01	0,33 *	-0,10	0,85 ***	-0,02	
Cu	0,43 **	0,00	0,38 *	0,60 ***	0,28	0,55 ***	0,41 **	
Ni	0,20	0,04	0,09	0,33 *	-0,06	0,70 ***	0,06	
Hg	0,28	-0,03	0,28	0,34 *	0,11	0,17	0,29	
Zn	0,41 **	0,19	0,49 **	0,69 ***	0,28	0,57 ***	0,43 **	
ROX	0,67 ***	-0,11	0,61 ***	0,58 ***	0,76 ***	-0,20	0,78 ***	
AZI	0,51 ***	-0,11	0,26	0,43 **	0,30	-0,17	0,38 *	
CLIN	0,05	0,06	-0,07	-0,14	-0,23	-0,32	-0,05	
CLINSO	0,18	-0,05	-0,11	-0,10	-0,03	-0,29	-0,03	
TMP	0,73 ***	-0,01	0,69 ***	0,72 ***	0,78 ***	-0,23	0,83 ***	
CLAR	0,29	-0,20	0,05	-0,04	0,32 *	-0,25	0,24	
SMX	0,35 *	0,10	0,37 *	0,29	0,66 ***	-0,14	0,51 ***	
LEVO	0,52	0,09	0,56	0,58	0,55	0,35	0,66	

	<i>rrn</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>tet(A)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>tet(Q)</i>	<i>tet(W)</i>	<i>strA</i>
	***		***	***	***	*	***	
CIP	0,51 ***	0,09	0,53 ***	0,68 ***	0,37 *	0,34 *	0,48 **	
DOXY	0,46 **	0,32 *	0,53 ***	0,60 ***	0,33 *	0,06	0,49 **	
CARB	0,00	-0,09	-0,33 *	-0,25	-0,24	0,14	-0,23	
Größe	-0,42 **	-0,37 *	-0,40 *	-0,34 *	-0,52 ***	0,12	-0,32 *	

A.12 Ergebnisse der Korrelationsanalyse zwischen der absoluten Zielgenabundanz und den QAC-Konzentrationen unter Berücksichtigung der flüssigen Klärschlämme

Tabelle 24: Korrelationskoeffizienten zwischen absoluter Zielgenabundanz und QAC-Konzentrationen unter Berücksichtigung der flüssigen Klärschlämme.

	<i>rrn</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>tet(A)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>tet(Q)</i>	<i>tet(W)</i>	<i>strA</i>
ATMACSUM	0,56 ***	0,34 *	0,13	-0,11	0,29	-0,14	0,41 **	-0,07
BACMAC SUM	0,51 ***	0,29	0,09	-0,11	0,22	-0,20	0,35 *	-0,11
DADMAC SUM	0,52 ***	0,32 *	0,09	-0,10	0,25	-0,16	0,37 *	-0,07
Chlormequat	0,46 **	0,21	0,19	0,07	0,31	0,03	0,42 **	-0,07
Benzethoni m	0,37 *	0,35 *	0,18	-0,30	0,20	-0,18	0,27	0,16
	<i>intl1</i>	<i>korB</i>	<i>trfA</i>	<i>qacE/qacEΔ1</i>	<i>aadA</i>	<i>tetA(P)</i>	<i>qnrS</i>	
ATMACSUM	0,02	-0,10	-0,23	0,09	-0,09	0,96 ***	-0,19	0,02
BACMAC SUM	-0,01	-0,12	-0,29	0,05	-0,15	0,94 ***	-0,22	-0,01
DADMAC SUM	0,00	-0,11	-0,24	0,10	-0,12	0,96 ***	-0,20	0,00
Chlormequat	-0,09	0,19	-0,10	0,03	0,04	0,62 ***	-0,16	-0,09
Benzethoni m	0,20	0,12	-0,19	0,08	0,03	0,60 ***	-0,18	0,20

A.13 Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften in den Klärschlämmen (Illumina Sequenzierung von 16S Ampicons)

Tabelle 25: Relative Abundanz [MW und STABW in %] der dominanten mikrobiellen Phyla und Klassen in den Klärschlämmen (gelistet sind nur Klassen, deren relative Abundanz in mindestens einer Probe mindestens 1% beträgt).

Bacteria	Acidobacteria	Aminicenantia	0,25 ± 0,10	- ± -	1,24 ± 0,08	- ± -	- ± -	- ± -	0,45 ± 0,36
Bacteria	Acidobacteria	Blastocatellia (Subgroup 4)	- ± -	- ± -	0,10 ± 0,09	0,71 ± 0,36	0,38 ± 0,26	0,38 ± 0,27	- ± -
Bacteria	Actinobacteria		4,10 ± 1,91	3,46 ± 2,30	9,43 ± 4,12	12,19 ± 4,51	45,31 ± 12,36	35,07 ± 9,65	6,31 ± 5,00
Bacteria	Actinobacteria	Acidimicrobiia	2,72 ± 0,78	0,43 ± 0,14	2,74 ± 0,94	1,68 ± 0,57	35,68 ± 8,00	15,32 ± 3,04	1,59 ± 0,30
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	1,27 ± 0,98	2,95 ± 2,02	6,33 ± 2,69	9,83 ± 3,46	8,34 ± 3,70	19,09 ± 6,17	4,23 ± 3,93
Bacteria	Actinobacteria	Thermoleophilia	0,08 ± 0,09	0,07 ± 0,11	0,30 ± 0,37	0,68 ± 0,48	1,25 ± 0,60	0,65 ± 0,42	0,21 ± 0,33
Bacteria	Aegiribacteria		- ± -	- ± -	1,15 ± 0,36	- ± -	- ± -	- ± -	0,37 ± 0,07
Bacteria	Atribacteria		3,28 ± 0,33	7,18 ± 0,75	0,69 ± 0,16	- ± -	- ± -	- ± -	0,98 ± 0,87
Bacteria	Atribacteria	Caldatribacteriaia	3,28 ± 0,33	7,18 ± 0,75	0,47 ± 0,10	- ± -	- ± -	- ± -	0,85 ± 0,86
Bacteria	Bacteroidetes		5,09 ± 0,91	12,55 ± 9,99	14,06 ± 4,52	17,41 ± 6,99	5,26 ± 3,45	14,64 ± 7,21	17,16 ± 5,84
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	5,08 ± 0,90	12,55 ± 9,99	13,76 ± 4,28	17,18 ± 6,74	5,17 ± 3,31	13,34 ± 6,72	17,15 ± 5,83
Bacteria	Bacteroidetes	Ignavibacteria	0,01 ± 0,01	- ± -	0,30 ± 0,23	0,22 ± 0,25	0,09 ± 0,14	1,30 ± 0,49	0,01 ± 0,01
Bacteria	Chloroflexi		0,19 ± 0,36	0,01 ± 0,02	12,14 ± 4,59	7,70 ± 3,58	3,49 ± 2,10	3,10 ± 1,97	20,11 ± 4,93
Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	0,17 ± 0,32	- ± -	12,12 ± 4,56	7,28 ± 3,30	3,21 ± 1,83	3,07 ± 1,91	20,09 ± 4,91
Bacteria	Cloacimonetes		- ± -	- ± -	0,58 ± 0,42	- ± -	- ± -	- ± -	1,81 ± 1,20
Bacteria	Cloacimonetes	Cloacimonadia	- ± -	- ± -	0,58 ± 0,42	- ± -	- ± -	- ± -	1,81 ± 1,20
Bacteria	Coprothermobacteraeota		31,39 ± 4,16	31,64 ± 4,21	- ± -	- ± -	- ± -	- ± -	- ± -
Bacteria	Coprothermobacteraeota	Coprothermobacteria	31,39 ± 4,16	31,64 ± 4,21	- ± -	- ± -	- ± -	- ± -	- ± -
Bacteria	Epsilonbacteraeota		- ± -	0,01 ± 0,02	- ± -	0,01 ± 0,01	0,15 ± 0,08	0,14 ± 0,12	- ± -

UMWELT & GESUNDHEIT Erarbeitung anspruchsvoller Standards für die mittelfristige Fortführung der bodenbezogenen Verwertung von Klärschlämmen aus Abwasserbehandlungsanlagen mit kleiner Ausbaugröße Abschlussbericht

Bacteria	Epsilonbacteraeota	Campylobacteria	- ± -	0,01 ± 0,02	- ± -	0,01 ± 0,01	0,15 ± 0,08	0,14 ± 0,12	- ± -
Bacteria	Firmicutes		31,72 ± 12,74	8,72 ± 7,76	28,38 ± 18,77	22,46 ± 9,21	17,53 ± 12,89	21,50 ± 6,77	16,22 ± 11,01
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	15,95 ± 7,62	4,53 ± 3,61	22,17 ± 14,65	6,68 ± 2,81	14,47 ± 10,92	18,87 ± 5,04	4,92 ± 4,67
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	15,62 ± 4,89	3,91 ± 3,91	5,87 ± 3,79	14,84 ± 5,77	2,61 ± 1,74	1,80 ± 1,20	10,68 ± 5,59
Bacteria	Patescibacteria		0,52 ± 0,34	0,17 ± 0,25	0,54 ± 0,55	0,36 ± 0,46	0,90 ± 0,75	3,65 ± 1,59	0,02 ± 0,04
Bacteria	Patescibacteria	Saccharimonadia	0,51 ± 0,33	0,17 ± 0,25	0,36 ± 0,32	0,19 ± 0,30	0,88 ± 0,72	3,60 ± 1,51	0,02 ± 0,03
Bacteria	Proteobacteria		4,15 ± 3,11	16,47 ± 15,29	11,57 ± 8,75	34,57 ± 11,17	24,85 ± 16,84	18,15 ± 12,06	18,24 ± 10,36
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	0,69 ± 0,75	4,67 ± 4,54	2,33 ± 2,05	4,59 ± 3,08	9,03 ± 5,67	7,15 ± 4,54	2,20 ± 2,31
Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	0,01 ± 0,02	0,19 ± 0,26	0,76 ± 0,44	0,67 ± 0,75	0,39 ± 0,68	0,82 ± 0,87	1,64 ± 0,67
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	3,45 ± 2,34	11,61 ± 10,49	8,47 ± 6,24	29,29 ± 7,32	15,40 ± 10,44	10,18 ± 6,65	14,40 ± 7,39
Bacteria	Synergistetes		0,99 ± 0,80	0,65 ± 0,31	2,53 ± 0,96	0,09 ± 0,11	0,07 ± 0,12	0,03 ± 0,05	5,80 ± 1,22
Bacteria	Synergistetes	Synergistia	0,99 ± 0,80	0,65 ± 0,31	2,53 ± 0,96	0,09 ± 0,11	0,07 ± 0,12	0,03 ± 0,05	5,80 ± 1,22
Bacteria	Thermotogae		3,15 ± 0,83	0,55 ± 0,40	0,60 ± 0,30	- ± -	- ± -	- ± -	0,02 ± 0,04
Bacteria	Thermotogae	Thermotogae	3,15 ± 0,83	0,55 ± 0,40	0,60 ± 0,30	- ± -	- ± -	- ± -	0,02 ± 0,04

Tabelle 26 (Fortsetzung Tabelle 25): Relative Abundanz [MW und STABW in %] der dominanten mikrobiellen Phyla und Klassen in den Klärschlämmen (gelistet sind nur Klassen, deren relative Abundanz in mindestens einer Probe mindestens 1% beträgt).

Domain	Phylum	Class	G	H	I	J	K	L
Archaea	Euryarchaeota		0,11 ± 0,12	4,46 ± 1,22	0,22 ± 0,23	1,61 ± 0,88	0,72 ± 0,33	0,07 ± 0,07
Archaea	Euryarchaeota	Methanobacteria	0,07 ± 0,05	0,03 ± 0,04	0,11 ± 0,03	0,12 ± 0,09	0,03 ± 0,06	0,01 ± 0,03
Archaea	Euryarchaeota	Methanomicrobia	0,05 ± 0,08	4,41 ± 1,15	0,11 ± 0,20	1,48 ± 0,78	0,67 ± 0,26	0,05 ± 0,04
Bacteria	Acidobacteria		1,06 ± 1,51	2,74 ± 2,51	1,99 ± 1,53	2,90 ± 2,28	2,42 ± 1,98	1,19 ± 0,73
Bacteria	Acidobacteria	Aminicenantia	- ± -	0,01 ± 0,02	- ± -	- ± -	- ± -	- ± -
Bacteria	Acidobacteria	Blastocatellia (Subgroup 4)	0,27 ± 0,39	1,10 ± 0,78	0,54 ± 0,47	0,74 ± 0,75	0,81 ± 0,74	0,68 ± 0,37
Bacteria	Actinobacteria		41,05 ± 10,55	30,06 ± 9,19	36,08 ± 7,56	36,98 ± 9,45	24,47 ± 7,52	33,08 ± 6,99
Bacteria	Actinobacteria	Acidimicrobiia	35,27 ± 7,02	16,41 ± 4,10	24,60 ± 3,73	19,19 ± 3,96	12,89 ± 2,89	24,54 ± 2,97
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	4,53 ± 3,16	11,72 ± 4,32	10,99 ± 3,61	17,07 ± 5,21	11,06 ± 4,31	8,31 ± 3,88
Bacteria	Actinobacteria	Thermoleophilia	1,26 ± 0,37	1,90 ± 0,70	0,48 ± 0,21	0,71 ± 0,27	0,49 ± 0,28	0,21 ± 0,12
Bacteria	Aegiribacteria		- ± -	- ± 0,01	- ± -	- ± -	- ± -	- ± -
Bacteria	Atribacteria		- ± -	0,01 ± 0,02	- ± -	- ± -	- ± -	- ± -
Bacteria	Atribacteria	Caldatribacteriia	- ± -	0,01 ± 0,01	- ± -	- ± -	- ± -	- ± -
Bacteria	Bacteroidetes		13,57 ± 9,27	10,96 ± 6,56	23,45 ± 8,55	14,61 ± 7,62	18,04 ± 8,21	17,76 ± 6,94
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	13,09 ± 8,41	9,26 ± 5,33	22,58 ± 7,85	13,81 ± 6,88	16,41 ± 7,32	17,04 ± 6,54
Bacteria	Bacteroidetes	Ignavibacteria	0,48 ± 0,87	1,70 ± 1,22	0,87 ± 0,69	0,80 ± 0,75	1,63 ± 0,88	0,72 ± 0,40
Bacteria	Chloroflexi		9,45 ± 3,76	18,97 ± 7,69	7,08 ± 3,43	9,71 ± 5,75	13,67 ± 5,52	7,87 ± 4,16
Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	8,48 ± 3,40	18,01 ± 7,28	6,43 ± 2,91	8,75 ± 5,04	13,21 ± 5,24	7,33 ± 3,79
Bacteria	Cloacimonetes		- ± -	1,51 ± 0,39	- ± -	- ± -	- ± -	- ± -
Bacteria	Cloacimonetes	Cloacimonadia	- ± -	1,51 ± 0,39	- ± -	- ± -	- ± -	- ± -
Bacteria	Coprothermobacteraeota		- ± -	- ± -	- ± -	- ± -	- ± -	- ± -
Bacteria	Coprothermobacteraeota	Coprothermobacteria	- ± -	- ± -	- ± -	- ± -	- ± -	- ± -

Domain	Phylum	Class	G	H	I	J	K	L
Bacteria	Epsilonbacteraeota		1,61 ± 0,51	0,02 ± 0,03	0,04 ± 0,08	0,06 ± 0,12	0,58 ± 0,15	0,13 ± 0,12
Bacteria	Epsilonbacteraeota	Campylobacteria	1,61 ± 0,51	0,02 ± 0,03	0,04 ± 0,08	0,06 ± 0,12	0,58 ± 0,15	0,13 ± 0,12
Bacteria	Firmicutes		11,36 ± 3,12	7,64 ± 3,75	4,64 ± 1,56	10,64 ± 5,45	5,89 ± 2,57	4,51 ± 1,89
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	9,39 ± 1,48	3,06 ± 0,93	3,09 ± 0,57	7,75 ± 2,39	3,12 ± 0,75	3,93 ± 1,22
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	1,47 ± 1,27	4,19 ± 2,32	1,31 ± 0,78	2,15 ± 2,42	2,04 ± 1,33	0,43 ± 0,51
Bacteria	Patescibacteria		1,23 ± 0,82	1,85 ± 1,56	3,76 ± 2,19	1,58 ± 1,28	1,12 ± 0,93	3,91 ± 1,65
Bacteria	Patescibacteria	Saccharimonadia	1,09 ± 0,59	1,55 ± 1,07	3,28 ± 1,68	1,39 ± 1,05	0,88 ± 0,69	3,76 ± 1,43
Bacteria	Proteobacteria		18,32 ± 14,24	18,91 ± 12,74	20,16 ± 12,73	19,56 ± 15,50	28,69 ± 15,74	29,35 ± 11,91
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	4,39 ± 4,25	7,66 ± 5,29	10,22 ± 5,41	7,94 ± 6,05	7,98 ± 4,49	14,44 ± 5,42
Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	1,16 ± 1,39	0,56 ± 0,91	1,17 ± 1,33	0,92 ± 1,36	1,67 ± 1,54	1,27 ± 0,98
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	12,77 ± 8,60	10,68 ± 6,52	8,76 ± 5,96	10,69 ± 8,08	19,03 ± 9,68	13,61 ± 5,46
Bacteria	Synergistetes		0,46 ± 0,76	0,55 ± 0,53	- ± -	0,15 ± 0,20	0,26 ± 0,31	0,01 ± 0,02
Bacteria	Synergistetes	Synergistia	0,46 ± 0,76	0,55 ± 0,53	- ± -	0,15 ± 0,20	0,26 ± 0,31	0,01 ± 0,02
Bacteria	Thermotogae		- ± -	- ± -	- ± -	- ± -	- ± -	- ± -
Bacteria	Thermotogae	Thermotogae	- ± -	- ± -	- ± -	- ± -	- ± -	- ± -