

ANTIBIOTIKARESISTENZ BEI WASSERBAKTERIEN

SIND NUR GROSSE RESISTENT? DURCHFLUSSZYTOMETRIE VERKNÜPFT MIT MOLEKULARBIOLOGIE GIBT AUFSCHLUSS

Zu den kommenden Herausforderungen für die Überwachung der mikrobiologischen Qualität des Trinkwassers gehört die Bewertung möglicher Risiken durch antibiotikaresistente Bakterien. Analysemethoden sind aufwendig und teuer. Lässt sich das Vorkommen von Antibiotikaresistenzen mit bereits etablierten Methoden der Trinkwasserüberwachung, wie der Durchflusszytometrie, verknüpfen? Dieser Frage gingen Forscher der Eawag nach.

Helmut Bürgmann, Eawag: Das Wasserforschungsinstitut des ETH-Bereichs, Kastanienbaum*

Jangwoo Lee, Eawag, Kastanienbaum

Severin Erb, ZHAW Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften und Eawag, Kastanienbaum

RÉSUMÉ

LES GROSSES BACTÉRIES SONT-ELLES LES SEULES À RÉSISTER AUX ANTIBIOTIQUES?

La résistance aux antibiotiques gagne du terrain à l'échelle mondiale. Des stratégies reposant sur l'approche «One Health» sont mises en place pour essayer de contrer ce danger. Cela signifie qu'en plus du domaine médical, des aspects de propagation de résistances, concernant par exemple l'agriculture ou l'environnement, sont aussi pris en compte. Une importance toute particulière est donc naturellement accordée à l'eau potable en tant que lien potentiel entre la nature et l'homme. Les méthodes actuelles d'assurance qualité microbiologique ne sont pas conçues pour détecter la présence de résistances aux antibiotiques, d'autant plus que ces résistances peuvent aussi parvenir jusqu'à l'homme par le biais de bactéries environnementales inoffensives. Certes, il existe des possibilités de détection, mais elles sont laborieuses, c'est pourquoi cette étude s'est penchée sur la possibilité d'associer les indicateurs de cytométrie en flux avec le facteur de risque que représente la résistance aux antibiotiques. Nous avons pu montrer dans notre étude que les grosses bactéries «High Nucleic Acid» (HNA) étaient les principales concernées par la résistance aux antibiotiques. Cet aspect peut donc être pris en compte à l'avenir lors de l'interprétation de données de cytométrie en flux.

AUSGANGSLAGE

Die weltweite Zunahme von antibiotikaresistenten Erregern ist aktuell und in der absehbaren Zukunft ein Thema mit hoher medizinischer Brisanz und gesellschaftlicher Relevanz (Box). Dank der allgemein guten Rohwasserqualität und einer Qualitätssicherung auf hohem Niveau ist das Trinkwasser in der Schweiz eher kein relevanter Ausbreitungsweg für Antibiotikaresistenzen, wie frühere Studien zeigen konnten [1]. Aber die Zunahme anthropogener Aktivitäten, einschliesslich Ackerbau, Viehhaltung, fortschreitender Zersiedelung sowie Einleitung von gereinigtem und ungereinigtem (z.B. durch Regenwasserentlastungen) Abwasser in die Oberflächengewässer, kann auch hier zu Beeinträchtigungen der Trinkwasserressourcen führen. Im Gegensatz zu chemischen Belastungen, die dank der «Initiative für sauberes Trinkwasser» und der «Initiative für eine Schweiz ohne synthetische Pestizide» auch in der öffentlichen Diskussion sehr präsent gewesen sind, wird die einwandfreie mikrobiologische Qualität des Trinkwassers in der Schweiz meist als selbstverständlich vorausgesetzt. Trinkwasser in einwandfreier Qualität zur Verfügung zu stellen ist eines der zentralen Anliegen der Schweizer Trinkwasserversorger und ihres Fachverbandes SVGW (Schweizerischer

* Kontakt: helmut.buergmann@eawag.ch

(©AdobeStock)

StAR

2015 wurde die Nationale Strategie Antibiotikaresistenzen (StAR) lanciert. Sie zeigt auf, wo in der Schweiz Handlungsbedarf besteht, welche Ziele erreicht werden sollen und welche Massnahmen für die Bekämpfung von Antibiotikaresistenzen nötig sind. Eine der zentralen Massnahmen ist der Ausbau der Datenerhebung.

www.star.admin.ch

Verein des Gas- und Wasserfaches). Zudem sorgen in der Schweiz und in Europa strenge Normen für die Sicherheit des Trinkwassers. Tatsächlich hat in der Schweiz das Trinkwasser sogar ein Qualitätsniveau, das mit dem von Mineralwasser konkurrieren kann [2]. Dennoch sind die Trinkwasserversorger der Schweiz herausgefordert, das Thema Antibiotikaresistenzen im Blick zu behalten, um gegebenenfalls Bedenken hinsichtlich der Rolle des Trinkwassers bei der Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen bewerten zu können. Ein Monitoring des Vorkommens von Indikatoren für Antibiotikaresistenzen mit molekularbiologischen Methoden (z.B. Nachweis von Resistenzgenen mit quantitativer PCR) ist möglich und wurde in der Schweiz im Labor der Trinkwasserversorgung Zürich auch bereits durchgeführt. Allerdings sind diese Monitoringmethoden aufwendig und teuer. Da akute Gesundheitsrisiken durch Antibiotikaresistenzen im Trinkwasser nicht belegt sind, ist ein breiter Einsatz aktuell kaum zu rechtfertigen. Unter anderem stellt sich daher die Frage, inwieweit auch bereits im Einsatz befindliche Routinemethoden mit Informationen über Antibiotikaresistenzen verknüpft werden können. Eine der neueren Methoden des Trinkwassermonitorings ist die Durchflusszytometrie (*flow cytometry*, FCM). Derzeit findet sie zunehmend Verbreitung. Eines der Bewertungskriterien, das dabei zur Anwendung kommt, ist die Bestimmung des Anteils sogenannter «High Nucleic Acid»-(HNA-) gegenüber «Low Nucleic Acid»-(LNA-)Bakterien [3]. Diese Bakteriengruppen, die sich anhand ihrer durchflusszytometrischen Eigenschaften kategorisieren lassen, unterscheiden sich durch ihren Nuklein-

säuregehalt und ihre Grösse [3]. An der Eawag wurden in Flusswasser- und Abwasserproben Beobachtungen gemacht, die zur Hypothese führten, dass Antibiotikaresistenzen sehr deutlich in den HNA angereichert sind. Aufgrund dieser vorläufigen Ergebnisse wurde mit Unterstützung des Forschungsfonds Wasser (FOWA) des SVGW von der Eawag ein Forschungsprojekt durchgeführt, das zum Ziel hatte, diese Hypothese durch weitere Messungen an Proben mit Relevanz für die Trinkwasserversorgung (also Roh- bis Leitungswasser verschiedener Trinkwasserversorgungen) zu überprüfen.

VORGEHENSWEISE

Realisiert wurde die aktuelle Studie 2020 in Zusammenarbeit mit sechs Schweizer Trinkwasserversorgern. An jedem Standort wurden Proben von Rohwasser, von Trinkwasser nach der Aufbereitung und von Netzwasser entnommen (Tab. 1). Zur Gewinnung der bakteriellen Biomasse und für die Unterteilung in HNA- und LNA-Fractionen wurden Membranfilter verwendet. Für die Gesamtfraction wurden Proben direkt durch Membranfilter mit 0,2µm Porengrösse filtriert. Wie bereits durch wissenschaftliche Studien gezeigt wurde, kann mithilfe von Filtration durch Membranfilter mit 0,45µm Porengrösse eine Gröszen-

fraktionierung der Bakterien erreicht werden, welche weitgehend den mittels Durchflusszytometrie identifizierten HNA- und LNA-Clustern entspricht [3]. Die HNA-Fraction verblieb direkt auf dem 0,45-µm-Filter; das Filtrat wurde zur Gewinnung der LNA-Fraction nochmals durch Membranfilter mit 0,2µm Porengrösse filtriert. Anschliessend wurde aus den Filtern die DNA (Erbsubstanz) der Zellen extrahiert und aufgereinigt. An den DNA-Extrakten der verschiedenen Fractionen wurde daraufhin mittels quantitativer PCR das Vorhandensein und die Häufigkeit von zwei Marker-Genen für Antibiotikaresistenz bestimmt: das Sulfonamid-Resistenzgen *sul1* und das Integron-Integrase-Gen *intI1*. Beide sind häufig mit klinisch relevanten Mehrfachresistenzen assoziiert. Um ein Inventar aller Antibiotikaresistenzgene (ARG) in den Proben zu erstellen (Resistom-Analyse), wurden ausgewählte Proben ausserdem metagenomisch analysiert. Metagenomik bezeichnet ein Verfahren, bei dem der gesamte genetische Code in einer DNA-Probe gelesen wird (Fig. 1).

ERGEBNISSE**CHARAKTERISIERUNG DER PROBEN**

Bei der Probennahme sollte ein möglichst repräsentativer Querschnitt von unterschiedlichen Rohwasserqualitäten und Aufbereitungsverfahren (Tab. 1) be-

| Trinkwasserversorgung | Datum | Aufbereitung | Entnahmestellen |
|------------------------------|--------|--------------------------------|---|
| Betrieb A | 08.06. | (F, GW), AK, UV | A-1: Rohwasser Oberflächenwasser A-2: Rohwasser Grundwasser A-3: Trinkwasser nach UV A-4: Netzwasser |
| Betrieb B | 07.07. | (GW) | B-1: Rohwasser Oberflächenwasser B-2: Rohwasser Grundwasser B-3: Trinkwasser Reservoir B-4: Netzwasser |
| Betrieb C Aufbereitung 1 | 23.06. | O ₃ , AK, QF, Cl | C1-1: Rohwasser Oberflächenwasser 1 C2-2: Trinkwasser nach Ozonung C3-3: Trinkwasser Reservoir C-4: Netzwasser * |
| Betrieb C2 Aufbereitung 2 | 18.06 | F, O ₃ , MF, AK, UV | C2-1: Rohwasser Oberflächenwasser 2 C2-2: Trinkwasser nach Ozonung C2-3: Reservoir C-4: Netzwasser * |
| Betrieb D | 16.06. | (GW), UV | D-1: Rohwasser Oberflächenwasser D-2: Rohwasser Grundwasser D-3: Trinkwasser nach UV D-4: Netzwasser |
| Betrieb E | 13.06. | (GW) | E-1: Rohwasser Oberflächenwasser E-2: Rohwasser Grundwasser E-3: Netzwasser |

O₃: Ozonung; AK: Aktivkohlefilter; F: Sandfilter; QF: Quarzfilter; MF: Membranfilter; Cl: Chlorung; GW: Grundwasserinfiltration; UV: UV-Desinfektion; TW: Trinkwasseraufbereitung; (...): erweiterte Aufbereitung (z.B. Uferfiltration); * die Netzwasserentnahmestelle beim Betrieb C wurde nur einmal beprobt und erhält Wasser von beiden Aufbereitungen.

Tab. 1 Zeitpunkt der Probennahme, Art der Trinkwasseraufbereitung sowie Probenahmestandorte.

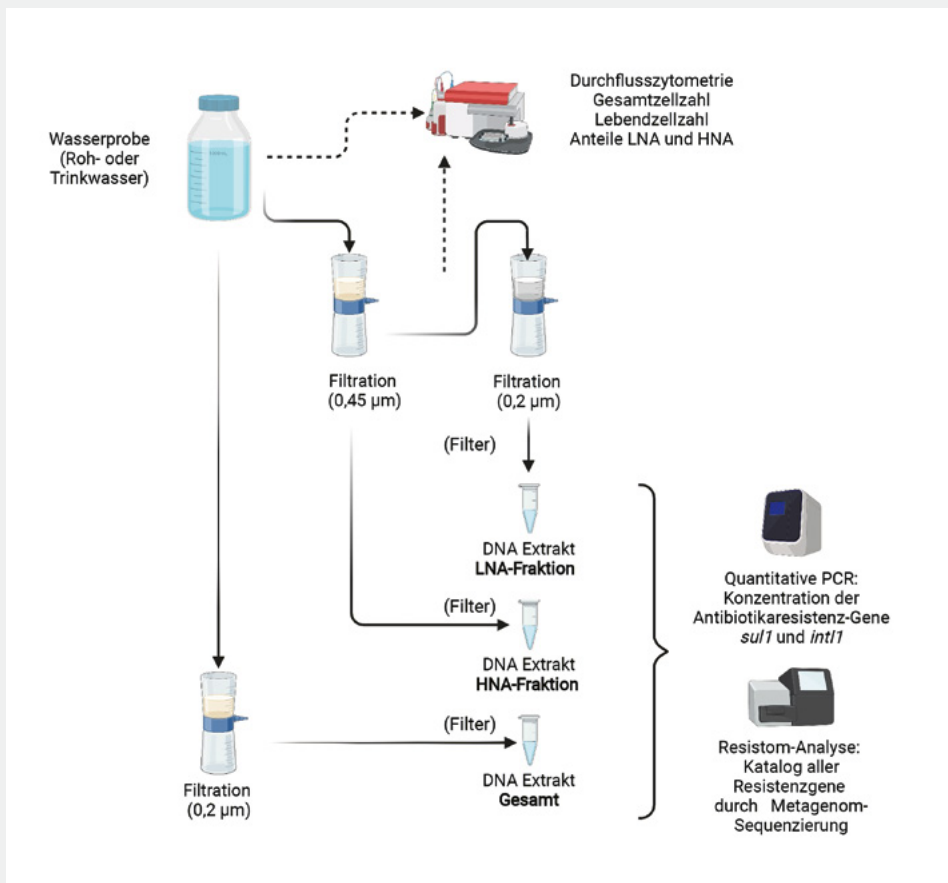


Fig. 1 Vorgehensweise bei der Fraktionierung und der Analyse der Wasserproben (erstellt mit BioRender.com).

rücksichtigt werden. Die Wasserproben sowie das Filtrat nach der 0,45-µm-Filtration wurden mittels Durchflusszytometrie (SYBR-Green-Methode) charakterisiert und der Anteil intakter Zellen (Lebendzellzahl) der HNA- und LNA-Bakterien bestimmt (SYBR-Green-u.

Propidium-Iodid-Färbung). Die Gesamtkeimzahlen in den untersuchten Wasserproben variierten gemäss FCM über mehrere Größenordnungen zwischen ca. 5×10^2 und 5×10^6 Zellen/ml (Fig. 2). Die höchsten Zellzahlen wurden dabei erwartungsgemäss in Oberflächenwasser-

proben gemessen. Die Zahl intakter (lebender) Zellen lag in den meisten Proben zwischen 60 und 80% der Gesamtzellzahl (Fig. 2). Im ozonierten Trinkwasser aus Betrieb C1 (C1-2 und C1-3) wurden deutlich niedrigere Anteile von intakten Zellen gemessen (15 und 7% der Gesamtzellzahl).

Der Anteil der HNA variierte in den untersuchten Proben stark, zwischen 9 und 87%. Hohe HNA-Anteile wurden vor allem in Fluss-, See- und Rohwasserproben gefunden. Eine Ausnahme stellte das Oberflächenwasser C1-1 dar, das einen sehr hohen Anteil an LNA aufwies. Das Ziel, Wasserproben mit unterschiedlichen mikrobiologischen Eigenschaften zu beproben, wurde demnach erreicht.

FRAKTIONIERUNG DER BAKTERIEN HNA UND LNA

Nach der Filtration durch die 0,45-µm-Membran (zur Fraktionierung der HNA und LNA) war der LNA-Anteil im Filtrat deutlich angereichert und betrug im Mittel $90 \pm 5\%$. Dass die Filtrationsmethode nicht zu 100% trennscharf ist, ist bekannt [3]. Umgekehrt muss man auch mit einem Anteil von LNA-Bakterien rechnen, der zusammen mit den HNA auf dem 0,45-µm-Filter verbleibt. Für die Zwecke dieser Untersuchung wurde die Anreicherung nach der Filtrationsmethode aber als ausreichend angesehen.

HÄUFIGKEIT VON RESISTENZINDIKATOREN

Etliche der untersuchten Wasserproben, insbesondere Grundwasser- und Netzwasserproben, weisen geringe Zelldichten auf (Fig. 2). Dies stellt auch eine Herausforderung für die weitere molekularbiologische Analyse dar, da nur geringe Mengen DNA aus den Proben gewonnen werden konnten. Zudem sind Antibiotikaresistenzgene in diesen Wasserproben rar (bspw. im Gegensatz zu Abwasser, vergl. [4]). Daher wurden die Analysen für zwei Gene (*sul1* und *int11*) durchgeführt, die erfahrungsgemäss vergleichsweise häufig vorkommen, aber dennoch als gute Indikatoren für das Vorkommen von erworbenen Antibiotika- und auch Mehrfachresistenzen gelten [5].

Dennoch war die Häufigkeit des *sul1*-Antibiotikaresistenzgens und des Indikators *int11* in den untersuchten Wasserproben insgesamt gering. In etlichen Proben blieb sie unterhalb der Nachweis- oder der Quantifizierungsgrenze der quantitativen PCR-Methodik, wobei

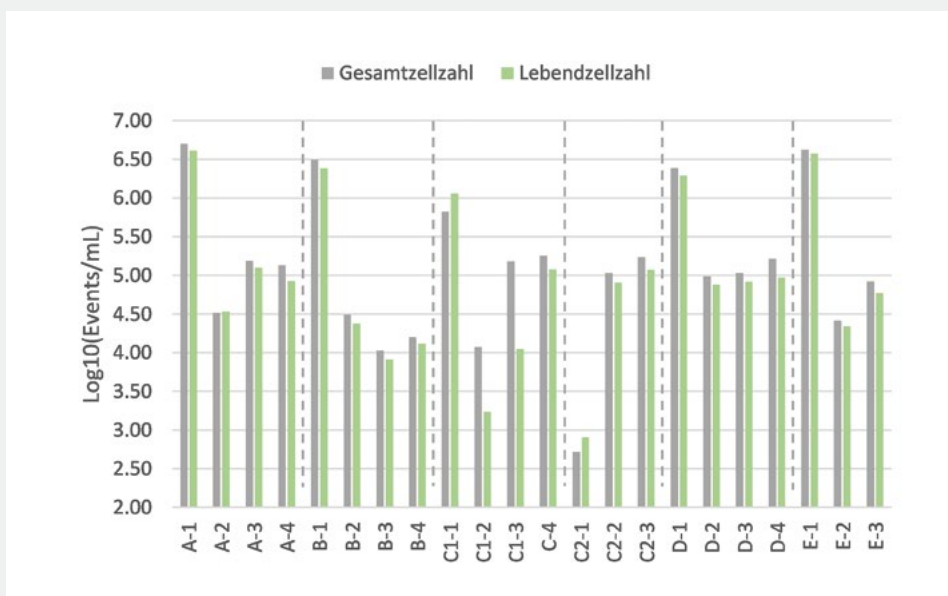


Fig. 2 Gesamtzellzahl (SYBR-Green-Methode) und Lebendzellzahl (Propidium-Iodid-Methode) in den untersuchten Wasserproben. Für jeden Standort sind die Proben von links nach rechts in der Reihenfolge Rohwasser zu Netzwasser sortiert; für die genaue Zuordnung siehe Tabelle 1.

der Nachweis von *intI1* in mehr Proben gelang als bei *sulI* (Fig. 3). Gleichwohl zeigt die Abbildung klar, dass in Proben, für die ein Gen quantifizierbar ist, die HNA- und die Gesamtfractionen eine sehr ähnliche Häufigkeit aufweisen. In mehreren Proben konnte *sulI* oder *intI1* in der Gesamt- und der HNA-Fraktion quantifiziert werden, war aber in der LNA-Fraktion der jeweiligen Probe nicht quantifizier- oder nicht detektierbar. Das *sulI*-Gen war in der LNA-Fraktion nur in drei Proben quantifizierbar, das *intI1*-Gen in sechs. In diesen Proben lag die Häufigkeit der Gene in der LNA-Fraktion jeweils deutlich unter 0,5% der Häufigkeit in der HNA-Fraktion.

SIND HNA-BAKTERIEN TRÄGER DER ANTI-BIOTIKARESISTENZ?

Diese Resultate deuten bereits auf eine Assoziation der Resistenzmarker mit der HNA-Fraktion hin. Allerdings muss für eine gründliche Betrachtung die bakterielle Häufigkeit in der HNA- und LNA-Fraktion mitberücksichtigt werden. Durch Normalisierung der Häufigkeit der Resistenzindikatorgene gegen die Häufigkeit eines Marker-Gens für die gesamte bakterielle Population (verwendet wird hierzu das Gen für 16S ribosomale RNA, das in allen Bakterien vorhanden ist) erhält man ein Mass für die relative Häufigkeit des Resistenzmerkmals in der bakteriellen Population jeder Probe. Alternativ kann die relative Häufigkeit auch durch Normalisierung auf die mittels Durchflusszytometrie gemessene Zellzahl in der Probe berechnet werden. Mit diesen Werten lässt sich wiederum ein Anreicherungsfaktor für die Resistenzmarker in der HNA-Fraktion bestimmen, allerdings nur für die Proben, für welche

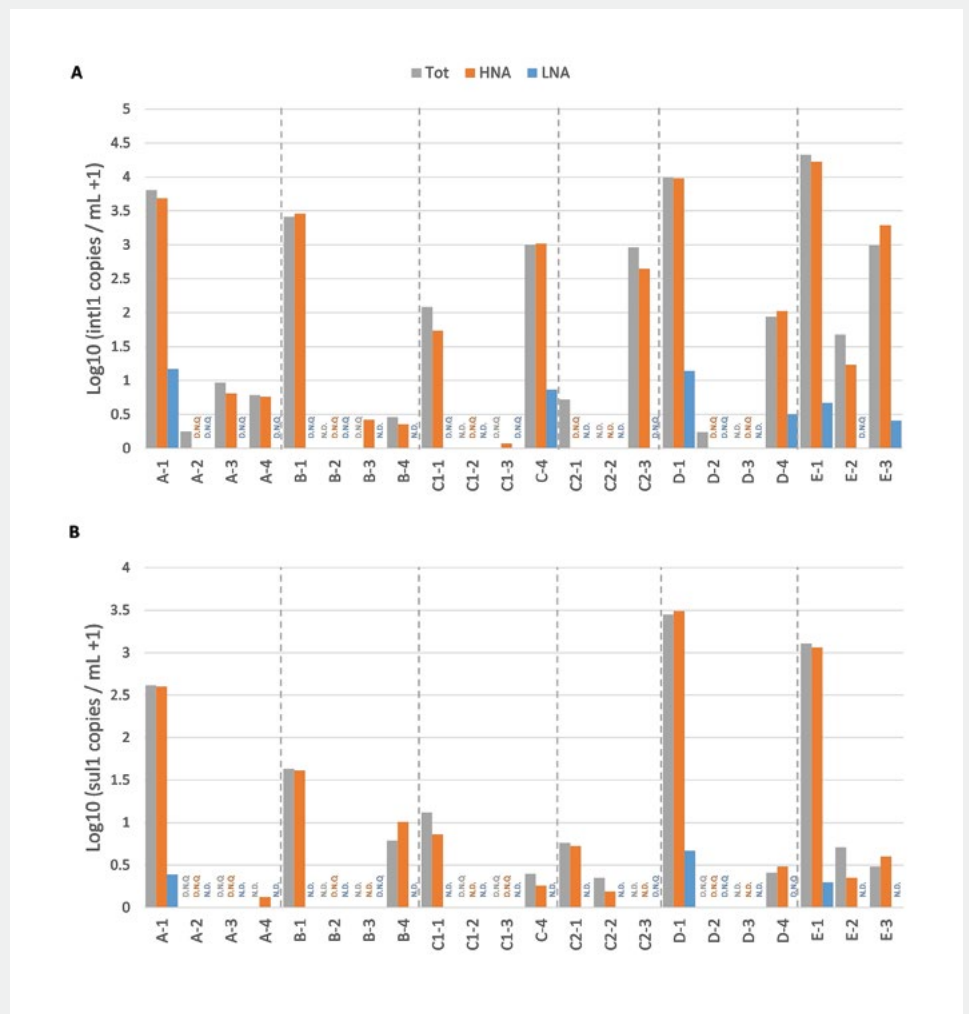


Fig. 3 Häufigkeit (logarithmiert) (A) des Indikators *intI1* und (B) des Sulfonamid-Resistenzgens *sulI* in den Wasserproben und ihren Zellfraktionen.

Tot: Gesamtfraction (0,2-µm-Filter direkt), HNA: HNA-Fraktion (0,45-µm-Filter direkt), LNA: LNA-Fraktion (0,2-µm-Filter nach 0,45-µm-Filtration). N.D: nicht detektiert, D.N.Q: detektiert, nicht quantifizierbar.

Werte sowohl von der HNA- wie auch von der LNA-Fraktion vorhanden sind. Für das *intI1*-Gen stellen wir fest, dass diese relative Häufigkeit in der HNA-Fraktion immer deutlich höher ist (Tab. 2). Die relative Häufigkeit (16S-

normalisiert) in der HNA-Fraktion war dabei um einen Faktor von 1,6 bis 360 höher als in der LNA-Fraktion derselben Probe (RA-Faktor, Tab. 2). Wird auf FCM normalisiert, war sie in der HNA-Fraktion sogar um einen Faktor von 6 bis

| Probe | Rel. Häufigkeit 16S rRNA | | RA-Faktor | Rel. Häufigkeit FCM | | RA-Faktor |
|-------|--------------------------|-----------------------|-------------|-----------------------|-----------------------|-------------|
| | HNA <i>intI1/16S</i> | LNA <i>intI1/16S</i> | HNA/LNA | HNA <i>intI1/cell</i> | LNA <i>intI1/cell</i> | HNA/LNA |
| A-1 | 6,2×10 ⁻⁰⁴ | 2,1×10 ⁻⁰⁴ | 7,12 | 1,1× ⁻⁰³ | 1,96× ⁻⁰⁵ | 57 |
| A-4 | 2,4×10 ⁻⁰⁴ | 3,3×10 ⁻⁰⁵ | 213 | 4,0× ⁻⁰⁵ | 1,84× ⁻⁰⁶ | 22 |
| B-1 | 5,6×10 ⁻⁰⁴ | 1,7×10 ⁻⁰⁶ | 362 | 9,6× ⁻⁰⁵ | 2,72× ⁻⁰⁷ | 353 |
| C1-1 | 7,6×10 ⁻⁰⁵ | 3,6×10 ⁻⁰⁷ | 14,1 | 4,8× ⁻⁰³ | 1,94× ⁻⁰⁶ | 2489 |
| C2-3 | 2,0×10 ⁻⁰² | 5,5×10 ⁻⁰⁵ | 334 | 6,8× ⁻⁰³ | 3,51× ⁻⁰⁴ | 19 |
| C-4 | 2,5×10 ⁻⁰² | 1,7×10 ⁻⁰³ | 4,74 | 9,4× ⁻⁰⁴ | 6,53× ⁻⁰⁷ | 1437 |
| D-1 | 2,3×10 ⁻⁰³ | 1,4×10 ⁻⁰³ | 10,3 | 4,3× ⁻⁰³ | 1,21× ⁻⁰⁵ | 356 |
| D-4 | 3,6×10 ⁻⁰³ | 1,9×10 ⁻⁰³ | 1,57 | 2,7× ⁻⁰² | 1,38× ⁻⁰⁴ | 195 |
| E-1 | 1,4×10 ⁻⁰³ | 2,9×10 ⁻⁰⁴ | 1,83 | 4,3× ⁻⁰³ | 6,36× ⁻⁰⁵ | 68 |
| E-3 | 9,5×10 ⁻⁰³ | 9,2×10 ⁻⁰⁴ | 7,12 | 7,1× ⁻⁰⁴ | 1,26× ⁻⁰⁴ | 6 |

Tab. 2 Relative Häufigkeit von *intI1* in der LNA- und HNA-Fraktion von Proben, für die das Gen in beiden Fraktionen quantifizierbar war. Die Kolonnen RA-Faktor bilden ihr Verhältnis ab.

| Probe | Rel. Häufigkeit 16S | | RA-Faktor | Rel. Häufigkeit FCM | | RA-Faktor |
|-------|----------------------|----------------------|-------------|----------------------|----------------------|-----------|
| | HNA sul1/16S | LNA sul1/16S | HNA/LNA | HNA intl1/cell | LNA intl1/cell | HNA/LNA |
| A-1 | $5,1 \times 10^{-5}$ | $2,2 \times 10^{-5}$ | 2,30 | $9,2 \times 10^{-5}$ | $2,1 \times 10^{-6}$ | 45 |
| D-1 | $7,3 \times 10^{-4}$ | $4,1 \times 10^{-4}$ | 1,20 | $2,9 \times 10^{-4}$ | $3,3 \times 10^{-6}$ | 90 |
| D-4 | $7,0 \times 10^{-5}$ | $2,1 \times 10^{-5}$ | 1,79 | $1,4 \times 10^{-3}$ | $1,8 \times 10^{-5}$ | 77 |
| E-1 | $9,3 \times 10^{-5}$ | $7,7 \times 10^{-5}$ | 3,39 | $1,4 \times 10^{-5}$ | $1,3 \times 10^{-6}$ | 10 |

Tab. 3 Relative Häufigkeit von *sul1* in der LNA- und HNA-Fraktion von Proben, für die das Gen in beiden Fraktionen quantifizierbar war. Die Kolonnen RA-Faktor bilden ihr Verhältnis ab.

WICHTIGE BEGRIFFE

Durchflusszytometrie

Eine Methode, bei der die optischen Eigenschaften von Partikeln in einem kapillaren Flüssigkeitsstrom gemessen und Partikel gezählt werden. Sie erlaubt im Zusammenspiel mit verschiedenen Färbemethoden die Bestimmung des Bakteriengehaltes einer Wasserprobe (Gesamtzellzahl) und, ob diese intakt/lebendig sind (Lebendzellzahl).

HNA – «High Nucleic Acid»-Bakterien

Eine diverse Gruppe von Bakterien, die durchflusszytometrisch bestimmt werden können und die sich durch grosse Zellen mit hohem DNA-Gehalt auszeichnen.

LNA – «Low Nucleic Acid»-Bakterien

Eine diverse Gruppe von Bakterien, die durchflusszytometrisch bestimmt werden können und die sich durch kleine Zellen mit geringem DNA-Gehalt auszeichnen.

Quantitative PCR (qPCR)

Eine molekularbiologische Methode, bei der mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) die Anzahl der Kopien eines vorgegebenen Gens in einer Probe bestimmt wird.

Antibiotikaresistenzgen

Ein Gen, das die genetische Eigenschaft für eine bestimmte Antibiotikaresistenz codiert.

sul1

Ein Antibiotikaresistenzgen, das Resistenz gegen Sulfonamid-Antibiotika verleiht. Es kommt häufig gemeinsam mit anderen Resistenzgenen in «Integrans» genannten genetischen Strukturen vor, in die sich verschiedene Gene einlagern können und die manchmal von einem Bakterium an ein anderes weitergegeben werden.

intl1

Das sogenannte «Integron-Integrase»-Gen ist notwendiger Bestandteil der oben beschriebenen Integron-Strukturen und daher, wie *sul1*, ein guter Indikator für übertragbare, mehrfache Antibiotikaresistenzen.

Resistom

Die Summe aller Antibiotikaresistenzgene in einer Bakteriengemeinschaft.

Metagenomik

Eine Methode, bei welcher der genetische Code einer ganzen Bakteriengemeinschaft durch Sequenzierung bestimmt wird.

Sequenzierung

Eine Methode, um den genetischen Code eines DNA-Moleküls auslesen.

2500 höher. Für *sul1* fallen die Unterschiede insgesamt weniger dramatisch aus, wobei auch hier die relative Häufigkeit (16S) des Resistenzgens in der HNA-Population um einen Faktor von 1,2 bis 3,4 höher ist als in der LNA-Fraktion. Bei FCM-normalisierten Häufigkeiten war sie 10- bis 90-mal höher (Tab. 3).

Da die quantifizierte Häufigkeit von *sul1* in der LNA-Fraktion immer sehr gering war, ist es möglich, dass diese Werte mit einem grösseren relativen Fehler behaftet sind. Insbesondere ist bei der Interpretation auch die durch Filtration nicht ganz vollständige Trennung von HNA und LNA in Betracht zu ziehen. Eine gewisse Verunreinigung durch die jeweils andere Fraktion tritt sowohl bei der HNA- wie auch bei der LNA-Fraktion auf. Unter der Annahme, dass die Resistenzmarker in der HNA-Fraktion in der Tat häufiger vorkommen (was durch die erhaltenen Ergebnisse qualitativ gut belegt ist), führen diese Kontaminationen insgesamt zu einer Unterschätzung der Anreicherungsfaktoren. In Wahrheit liegen die Anreicherungsfaktoren also vermutlich höher als in Tabelle 2 und 3 angegeben.

DAS RESISTOM VON HNA- UND LNA-BAKTERIEN

An ausgewählten Proben haben wir eine metagenomische Sequenzierung des Genmaterials der Bakteriengemeinschaft durchgeführt. Anschliessend wurde diese genetische Information mit Datenbanken von Antibiotikaresistenzgenen verglichen und so der Gehalt an Antibiotikaresistenzgenen (das sogenannte Resistom) in der Bakteriengemeinschaft bestimmt. Diese Antibiotikaresistenzgene wurden anschliessend anhand ihrer Resistenzwirkung gegen verschiedene Wirkstoffklassen zusammengefasst und gegen den Gehalt an 16S-Genen normalisiert (Fig. 4). Die Resistom-Analyse offenbarte, dass Resistenzmechanismen gegen diverse Antibiotikaklassen in den Wasserproben nachgewiesen werden konnten, auch in den Netzwasserproben A-4, D-4 und C-4 (Fig. 4). ARG gegen MLS (Macrolid-, Lincosamid-, Streptogramin-Antibiotika), Aminoglycoside, Fosmidomycin, Nitroimidazol und Peptid-Antibiotika wurden in den meisten Proben und meist in höherer Häufigkeit identifiziert. Die von uns auch als Resistenzmarker für quantitative PCR (*sul1*) verwendete Sulfonamidresistenz wurde dagegen nur mit geringer Häufigkeit nachgewiesen (max. 8 per Mille, A-4). Dies zeigt, dass es durchaus Resistenzen gibt, die häufiger vorkommen als das von uns verwendete Indikatorgen.

In der HNA-Fraktion wurden jeweils Resistenzen gegen mehr verschiedene Wirkstoffklassen gefunden als in der LNA-Fraktion der gleichen Probe (ausser bei LSP 2, hier hatten beide Fraktionen die gleiche Anzahl). Auch war die aufsummierte relative Häufigkeit der Resistenzgene insgesamt jeweils niedriger (Fig. 4). Besonders ausgeprägt war dies im Netzwasser. Diese Tendenz trifft in den meisten Fällen

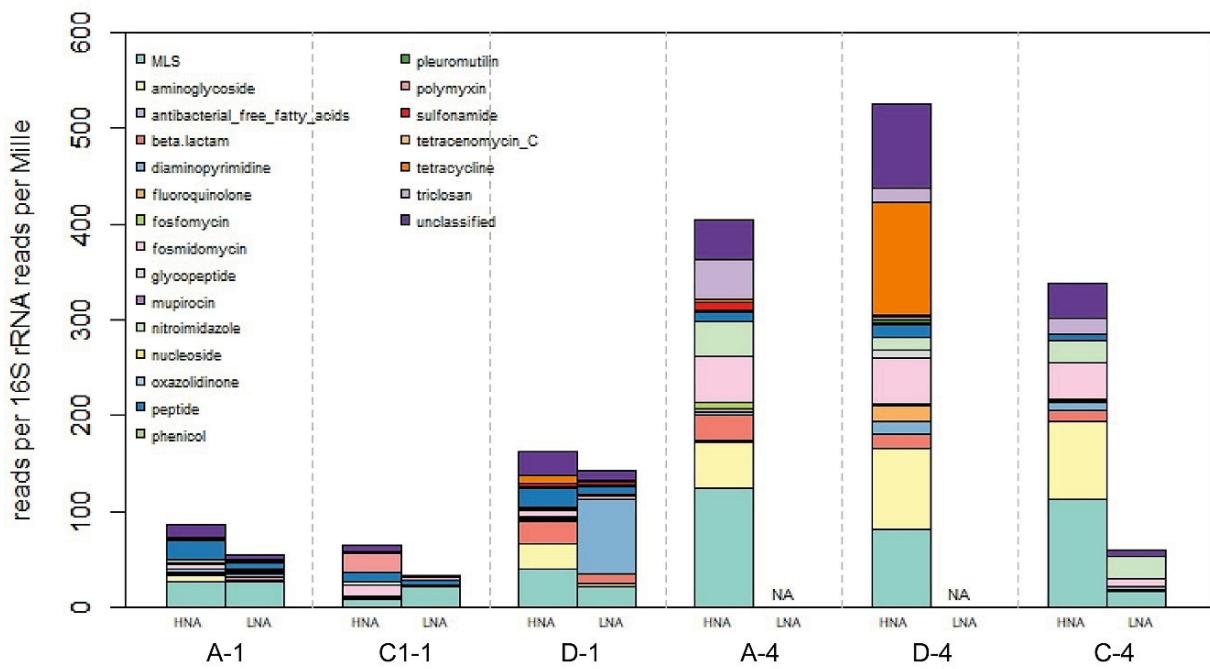


Fig. 4 Resistom-Analyse der Metagenome verschiedener Wasserproben und Zellfraktionen. Gezeigt ist die relative Häufigkeit von Sequenzen, die Antibiotika-resistenzgenen (ARG) für verschiedene Antibiotika-Wirkstoffklassen zugeordnet werden konnten, normiert gegen die Häufigkeit von 16S-rRNA-Sequenzen. Einige hoch abundante, jedoch unspezifische Resistenzen mit allgemeiner Verbreitung in der Umwelt (Bacitracin-, Multidrug- und Rifamycin-Resistenz) werden nicht gezeigt. NA: nicht analysierbar (DNA Gehalt zu gering).

auch für die einzelnen Wirkstoffkategorien zu: Für fünf Resistenzklassen waren die Mittelwerte in der HNA-Fraktion statistisch signifikant höher als in der LNA-Fraktion (paarweiser t-Test, $p < 0,05$; Tab. 4). Gemittelt über alle paarweisen Verhältnisse der relativen Häufigkeit aller Resistenzklassen, war die relative Häufigkeit in der HNA-Fraktion um den Faktor 11 höher als in der LNA-Fraktion (Median 2,3). Im paarweisen Vergleich war in 68 von 100 Fällen die relative Häufigkeit in der HNA-Fraktion höher (in 23 davon keine Detektion in der LNA-Fraktion). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Resistenzen in der LNA-Fraktion grösstenteils auf die Kontamination mit HNA zurückgehen, auch wenn sich das mit den vorhandenen Daten nicht abschliessend belegen lässt.

WARUM SIND HNA RESISTENZTRÄGER, ABER LNA NICHT?

Die Resultate stützen damit insgesamt klar die Hypothese, dass Resistenzen in erster Linie in den HNA vorhanden sind.

| AB-Klasse | p | Signifikanzniveau |
|---------------------|-------|-------------------|
| Aminoglykoside | 0,055 | ° |
| Bacitracin | 0,002 | ** |
| Fosmidomycin | 0,011 | * |
| Peptid-Antibiotika | 0,008 | ** |
| Rifamycin | 0,006 | ** |
| Sulfonamide | 0,026 | * |
| Nicht klassifiziert | 0,012 | * |

Tab. 4 Signifikante Unterschiede der relativen Häufigkeit von verschiedenen Resistenzklassen zwischen HNA und LNA im paarweisen t-Test.

Vorherige Studien hatten gezeigt, dass LNA sich in der Artenzusammensetzung klar von den HNA unterscheiden [3]. Unter den LNA finden sich viele Arten mit reduziertem Genom, die vermutlich sehr spezifisch an bestimmte ökologische Nischen in der Umwelt angepasst sind. Auch symbiotische Lebensformen finden sich darunter und viele Arten, die noch gar nicht im Labor kultiviert werden konnten [3]. Solche Lebensformen stehen wahrscheinlich unter erhöhtem ökologischem Druck, alle nicht unbedingt benötigten Funktionen, wie z.B. Antibiotikaresistenzen, aus ihrem Genom zu

entfernen. Dagegen finden sich unter den HNA viele Arten, die engere Verwandtschaftsbeziehungen zu menschlichen Kommensalen und Krankheitserregern haben. Damit kommen sie eher für einen Gentransfer infrage und können auch eher von der Fähigkeit zur Antibiotikaresistenz profitieren.

HNA ALS INDIKATOR FÜR ANTIKOTIKARESISTENZ?

Die Ergebnisse dieser Studie sollten nicht überinterpretiert werden. Zwar wurde gezeigt, dass Antibiotikaresistenzgene

DANKSAGUNG

Wir bedanken uns für die Förderung dieses Projektes durch den Forschungsfonds Wasser (FOWA) des SVGW. Wir danken *Markus Biner* (SVGW), *Andreas Peter* (Wasserversorgung Zürich), *Richard Wülser* (IWB), *Patricia Schubert* (IWB) und *Rolf Stettler* (Stadtwerke St. Gallen) für Diskussionen und Unterstützung bei der Projektvorbereitung. Unser herzlichster Dank geht an die beteiligten Trinkwasseraufbereitungen, die uns den Zugang zu ihren Betrieben ermöglichten und uns bei der Probenahme unterstützt haben; insbesondere *Patricia Schubert* und *Rainer Windisch* (IBW, Basel), *Thomas Leu* (EWL, Luzern), *Joanna Matuszkiewicz*, *Stefan Wassmer* und *Philipp Wolterstorff* (Stadtwerke Winterthur), *Marc Scheiwiler* (TBW, Weinfelden) und *Ante Jularic* (TGB, Bischofszell). Wir bedanken uns bei *Theo Smits* (ZHAW Wädenswil), der die Bachelorarbeit von *Severin Erb* an der Eawag ermöglicht und unterstützt hat. Zudem danken wir *Frederik Hammes* (Eawag) für das Gegenlesen des Projektreports, der diesem Artikel zugrunde liegt.

in erster Linie mit den HNA assoziiert sind. Das bedeutet im Umkehrschluss aber nicht, dass nun das Vorhandensein von HNA mit einer gefährlichen Kontamination durch antibiotikaresistente Bakterien gleichzusetzen ist. Die Risikobewertung

von Antibiotikaresistenzgenen in Umweltbakterien ist sehr komplex und kann nicht anhand von stark vereinfachten Parametern durchgeführt werden. Vielmehr fügen sich unsere Resultate in das bereits vorhandene Bild von HNA als einer schnell wachsenden und, im Vergleich zu LNA, potenziell eher problematischeren Bakteriengruppe ein [6].

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Bürgmann, H.; Imminger, S. (2017): Antibiotikaresistenzen im Trinkwasser? *Aqua & Gas* 10, 60-66
- [2] Blanc, P.; Schädler, B. (2014): *Water in Switzerland – An Overview*. Swiss Hydrological Commission, 28
- [3] Proctor, C.R. et al. (2018): Phylogenetic clustering of small low nucleic acid-content bacteria across diverse freshwater ecosystems. *The ISME Journal* 12, 1344–1359, <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0070-8>
- [4] Lee, J. et al. (2021): Unraveling the riverine antibiotic resistome: The downstream fate of anthropogenic inputs. *Water Research* 197, 117050, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117050>
- [5] Berendonk, T.U. et al. (2015): Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature Reviews Microbiology* 13(5), 310-317, <https://doi.org/10.1038/nrmicro3439>
- [6] Besmer M.D. et al. (2014): The feasibility of automated online flow cytometry for in-situ monitoring of microbial dynamics in aquatic ecosystems. *Frontiers in Microbiology* 5, 265, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00265>

Beschriftung von Einlaufschächten**Rondelles « Ne polluez pas nos eaux »**

Effektiver Schutz und Sensibilisierung durch Rondellen zur Beschriftung von Einlaufschächten, die direkt in einen Bach oder einen See fließen bzw. im Grundwasser versickern.

Une protection et une sensibilisation efficaces grâce à des rondelles pour l'étiquetage des grilles qui rejettent les eaux directement dans un cours d'eau ou un lac ou qui les infiltrent dans les eaux souterraines.



Jetzt im VSA-Shop
dans la boutique VSA

