

ANTIBIOTIKA- RESISTENZEN IN ROHWÄSSERN

Nachweis und Elimination

Veröffentlichungen aus dem DVGW-
Technologiezentrum Wasser

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	i
FINANZIELLE FÖRDERUNG.....	iv
DANKSAGUNG.....	v
ZUSAMMENFASSUNG.....	vi
ABSTRACT.....	vii
TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	viii
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	x
1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG.....	1
2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....	2
2.1 Antibiotikaresistenzen in der aquatischen Umwelt.....	2
2.1.1 Antibiotikaklassen und deren Wirkmechanismen.....	2
2.1.2 Resistenzmechanismen.....	4
2.1.3 β -Laktam-resistente Bakterien.....	5
2.2 Verbreitung und Übertragung von Antibiotikaresistenzen.....	7
2.3 Nachweis von Antibiotikaresistenzen in der Umwelt.....	10
2.3.1 Molekularbiologische Nachweisverfahren.....	11
2.3.2 Kulturbasierte Nachweisverfahren.....	13
2.4 Trinkwasseraufbereitung.....	14
2.4.1 Reaktive Verfahren.....	15
2.4.2 Membranfiltration.....	16
3 MATERIAL UND METHODEN.....	19
3.1 Verwendete Materialien, Medien und Chemikalien.....	19
3.2 Beprobung von Rohwasser und Sedimenten.....	19
3.2.1 Feld-Probenahme-Kampagnen.....	21
3.2.1.1 <i>Beprobung von Rohwasser und Sediment-Kernen aus dem Tai See.....</i>	<i>21</i>
3.2.1.2 <i>Beprobung von Wasserwerken am Tai See und Pilot-Versuchen zur Membranfiltration.....</i>	<i>24</i>
3.3 Molekularbiologische Methoden.....	25
3.3.1 DNA-Extraktion.....	25
3.3.1.1 <i>Aufkonzentrierung einer wässrigen Probe.....</i>	<i>25</i>
3.3.1.2 <i>Extraktion von genomischer DNA aus Umweltproben.....</i>	<i>26</i>
3.3.1.3 <i>Extraktion DNA aus Phagen und Viren.....</i>	<i>26</i>
3.3.2 Fluorometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	26
3.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	26
3.3.3.1 <i>Qualitative PCR.....</i>	<i>26</i>
3.3.3.2 <i>Quantitative real-time PCR (qPCR).....</i>	<i>27</i>
3.3.3.3 <i>Gradienten PCR.....</i>	<i>28</i>
3.3.4 Automatisierte Kapillargelelektrophorese.....	29
3.3.5 <i>16S rDNA</i> Sequenzierung.....	29
3.4 Mikrobiologische Methoden.....	29
3.4.1 Membranfiltration.....	29
3.4.2 Kulturverfahren.....	29
3.4.2.1 <i>Nachweis von antibiotikaresistenten Bakterien auf chromogenem Vollmedium....</i>	<i>29</i>
3.4.2.2 <i>Mikrodilutionstest zum Nachweis einer enzymatisch vermittelten β-Laktam-Resistenz.....</i>	<i>30</i>
3.4.3 Herstellung von kryogenen Lagerungskulturen.....	30
3.4.4 Durchflusszytometrie.....	31
3.5 Matrix-gestützte Laser-Desorption Ionisierung mit Time-of-Flight-Massenspektrometrie.....	31
3.6 Herstellung von Standards für die Quantifizierung von Genen.....	32
3.6.1 Klonierung mit dem pGEM-T Vector System.....	33
3.6.2 Plasmid-Aufreinigung und -Linearisierung.....	33

3.7	Etablierung neuer Methoden zum Nachweis von Antibiotikaresistenzen	34
3.7.1	Fraktions-basierte Untersuchungen in Wasser und Sediment-Partikeln.....	34
3.7.1.1	<i>Kaskadenfiltration zur Untersuchung von Sediment-Partikel-assoziierten Antibiotikaresistenzen</i>	34
3.7.1.2	<i>Fraktionierung von Phagen und freier DNA aus aquatischen Umweltproben</i>	35
3.7.2	Etablierung von kulturbasierten Verfahren zum Nachweis von antibiotikaresistenten Umweltbakterien.....	35
3.7.2.1	<i>Vorversuche zur Etablierung der Methode</i>	35
3.7.2.2	<i>Untersuchung von Oberflächenwasser Proben auf β-Laktam resistente Umweltbakterien</i>	39
3.7.3	Etablierung von Long-Amplikon (LA) qPCR Methoden zum Nachweis intakter Antibiotikaresistenzgene.....	40
3.7.3.1	<i>Primer-Design</i>	40
3.7.3.2	<i>Behandlungsexperimente zum Vergleich der Short und Long-Amplikon qPCR</i>	41
3.8	Laborversuche zur Elimination von Resistenzgen-Fragmenten durch Layer-by-Layer beschichtete und unbeschichtete Ultrafiltrations-Membranen	42
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	46
4.1	Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen in aquatischen Umweltproben	46
4.1.1	Resistenzgen-Monitoring im Tai See, China.....	46
4.1.2	Resistenzgen-Monitoring in Oberflächengewässern in Deutschland.....	51
4.1.3	Fazit des Resistenzgen-Monitorings.....	52
4.2	Etablierung neuer Verfahren zum Nachweis von Antibiotikaresistenzen in der Umwelt	53
4.2.1	Fraktionierung von Umweltproben.....	53
4.2.1.1	<i>Vorversuche zur Etablierung der Methode</i>	53
4.2.1.2	<i>Fraktionierung von Rohwasserproben</i>	56
4.2.1.3	<i>Fazit der Methodenetablierung</i>	59
4.2.2	Kulturbasierte Verfahren zum Nachweis β -Laktam-resistenter Umweltbakterien....	60
4.2.2.1	<i>Vorversuche zur Etablierung der Methode</i>	60
4.2.2.2	<i>Anwendung auf aquatischen Umweltproben</i>	65
4.2.2.3	<i>Identifikation der antibiotikaresistenten Umwelt-Isolate</i>	69
4.2.2.4	<i>Nachweis von enzymatisch vermittelten β-Laktam-Resistenzen durch den Micronaut S-Test</i>	73
4.2.2.5	<i>Fazit der Methodenetablierung</i>	75
4.2.3	Long-Amplikon qPCR.....	76
4.2.3.1	<i>Primer-Design</i>	76
4.2.3.2	<i>Methodenetablierung für ausgewählte ARG</i>	76
4.2.3.3	<i>Anwendung der Long-Amplikon qPCR für die Beurteilung der UV- und Chlorbehandlung sowie Ozonung</i>	80
4.2.3.4	<i>Fazit der Methodenetablierung</i>	86
4.3	Elimination von Resistenzgenen	87
4.3.1	Elimination von Antibiotikaresistenzgenen durch konventionelle Behandlungsverfahren.....	87
4.3.1.1	<i>Trinkwasseraufbereitung am Tai See</i>	87
4.3.1.2	<i>Trinkwasseraufbereitung in Deutschland</i>	92
4.3.2	Elimination von Antibiotikaresistenzgenen durch Dichte-Ultrafiltration.....	95
4.3.2.1	<i>Rückhalt und Cut-Off der unbeschichteten Membran</i>	96
4.3.2.2	<i>Rückhalt durch die beschichteten Membranen</i>	97
4.3.2.3	<i>Pilot-Versuche</i>	99
4.3.3	Fazit der Untersuchungen zur Elimination von Resistenzgenen.....	104
5	FAZIT	105
6	AUSBLICK	107
7	LITERATURVERZEICHNIS	108
8	ANHANG	130
8.1	Materialen-, Medien- & Chemikalien-Listen	130
8.2	Rohdaten der qPCR für das Monitoring von Resistenzgenen in der aquatischen Umwelt	133
8.2.1	Daten des Tai See Resistenzgen-Monitorings.....	133

8.2.2	Daten des Monitorings von deutschen Oberflächenwässern	135
8.3	Zusatzmaterial zur Fraktionierung von Wasserproben	136
8.4	Rohdaten der Kulturverfahren	136
8.4.1	Vorversuche zur Etablierung von Kulturverfahren für den Nachweis resistenter Umweltbakterien	136
8.4.1.1	<i>Ausplattierung vs. Membranfiltration und Inkubation auf R2A-Medien</i>	<i>136</i>
8.4.1.2	<i>Wachstum von Umweltsolaten auf nährstoffreichem Medium</i>	<i>137</i>
8.4.2	Zusatzmaterial zur Anwendung der etablierten Kulturverfahren auf Umweltproben.....	139
8.5	Rohdaten zur Long-Amplikon qPCR	154
8.5.1	Gensequenzen für das Primer-Design	154
8.5.2	Rohdaten der Behandlungsexperimente zum Vergleich von LA und konventioneller qPCR	157
8.6	Rohdaten zur Elimination von Antibiotikaresistenzgenen	158
8.6.1	qPCR Rohdaten zur Trinkwasseraufbereitung am Tai See	158
8.6.2	qPCR Rohdaten zur Trinkwasseraufbereitung in Deutschland	159
8.6.3	Rohdaten der Labor-Experimente zum Antibiotikaresistenzgenen-Rückhalt durch Ultrafiltration und Dichte-Ultrafiltration.....	160
8.6.4	qPCR Rohdaten der Pilot-Kampagnen zum Rückhalt von Antibiotikaresistenzgenen mittels Dichte-Ultrafiltration	161
9	BISHERIGE VERÖFFENTLICHUNGEN	163