



**Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin
der Medizinischen Universität Graz**

**Nachweis antibiotikaresistenter *Escherichia coli* -
Stämme aus Klärschlamm unter
Berücksichtigung der verschiedenen
Klärschlammbehandlungsverfahren**

im Zeitraum von
Jänner 2009 bis Juni 2010

Gefördert vom Amt der Steiermärkischen Landesregierung
Fachabteilung 19D Abfall- und Stoffflusswirtschaft
Hofrat Dipl.-Ing. Dr. Wilhelm Himmel

Förderungsnehmer: Medizinische Universität Graz, vertreten durch
Univ. Prof. Dr. Irmgard Theresia Lippe und
Univ.Prof. DDr. Egon Marth

Projektleitung am
Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin der MUG
Univ. Prof. Mag. Dr. Franz F. Reinthaler

Graz, Juni 2010

AutorInnen und MitarbeiterInnen:

Mag. Herbert GALLER (Projektangestellter)

Dr. Gernot ZARFEL (Projektangestellter, teilz.)

Ass.Prof. Dr. Gebhard FEIERL

Mag. Dr. Doris HAAS

Mag. Eva LEITNER

Bakk. Angelika MELKES

Mag. Josefa POSCH

Ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Franz F. REINTHALER

alle: Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin der Medizinischen Universität Graz,
Universitätsplatz 4, 8010 Graz

Mag. Dr. Ingrid WINTER

Amt der Steiermärkischen Landesregierung, Fachabteilung 19D, Bürgergasse 5a,
A-8010 Graz

INHALT

1	ZUSAMMENFASSUNG	4
2	EINLEITUNG	5
2.1	HINTERGRUND	5
2.2	ZIEL DES PROJEKTES	8
3	MATERIAL UND METHODEN	10
3.1	BESCHREIBUNG DER KLÄRANLAGEN UND DER KLÄRSCHLAMMVERWERTUNG	11
3.2	VERFAHREN ZUR BEHANDLUNG UND ENTSEUCHUNG DES KLÄRSCHLAMMS.....	12
3.3	LABORUNTERSUCHUNGEN	14
3.3.1	<i>Probenentnahme</i>	14
3.3.2	<i>Bestimmung der Kolonienzahlen für E. coli und Gesamtcoliforme</i>	14
3.3.3	<i>Einteilung der in der vorliegenden Studie verwendeten Antibiotika</i>	15
3.3.4	<i>ESBL-Screening</i>	20
3.3.5	<i>Bestimmung der Beta-Lactamase-Gruppe durch PCR-Nachweis von Beta-Lactamase (bla)-Genen</i>	20
3.4	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	21
4	ERGEBNISSE	22
4.1	VERGLEICH DER KEIMKONZENTRATIONEN (KBE/G).....	22
4.2	RESISTENZSITUATION VON <i>E. COLI</i> AUS KLÄRSCHLAMM	25
4.2.1	<i>Resistenzsituation und prozentueller Anteil von E. coli Stämmen aus allen Klärschlämmen</i>	25
4.2.2	<i>Resistenzsituation und prozentueller Anteil von E. coli Stämmen nach Klärschlammtypen</i>	25
4.2.3	<i>Resistenzsituation und prozentueller Anteil von E. coli Stämmen nach Kläranlagen</i>	28
4.2.4	<i>Resistenzsituation und prozentueller Anteil von E. coli Stämmen nach Kläranlagen und Klärschlammtypen</i>	28
4.2.5	<i>Regressionsmodell zur Beschreibung des Resistenzverhaltens</i>	35
4.3	ESBL-NACHWEIS IN KLÄRSCHLAMMPROBEN.....	37
5	DISKUSSION	38
5.1	VERGLEICH DER KEIMKONZENTRATIONEN (KBE/G).....	38
5.2	RESISTENZSITUATION VON <i>E. COLI</i>	39
5.3	ESBL-NACHWEIS	41
5.4	ZUSAMMENFASSENDE BEWERTUNG.....	43
6	LITERATUR	45
7	ANHANG	49

1 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Studie wurden antibiotikaresistente *Escherichia coli* Stämme im Zusammenhang mit unterschiedlichen Behandlungs- und Hygienisierungsverfahren von Klärschlämmen aus verschiedenen Kläranlagen in der Steiermark untersucht.

Im Zeitraum von Jänner bis Dezember 2009 wurden 110 Klärschlammproben aus fünf verschiedenen Kläranlagen entnommen und die kolonienbildenden Einheiten pro Gramm Klärschlamm von *E. coli* und coliformen Mikroorganismen untersucht. Zusätzlich wurde das Vorhandensein von ESBL-*E. coli* überprüft.

Von 110 untersuchten Klärschlammproben konnten 708 *E. coli* Stämme isoliert werden. Die höchsten Keimkonzentrationen für *E. coli* wurden mit $9,6 \times 10^4$ KBE/g entwässertem Klärschlamm nachgewiesen. Durch die Behandlung des Klärschlammes mit Kalkhydrat oder durch thermische Trocknung wurde eine Reduktion der *E. coli* Keimkonzentration erreicht. In allen 5 Kläranlagen wiesen die Antibiotika Cephalotin, Tetracyclin und Ampicillin die höchsten Resistenzraten auf.

Aus 76 Klärschlammproben konnten 95 ESBL-positive *E. coli*-Stämme isoliert werden, davon wurden drei unterschiedliche Beta-Lactamase-Gruppen (CTX-M, TEM und SHV) von bla Genen nachgewiesen.

Die vorliegende Klärschlammuntersuchung ergab, dass durch die Kalkbehandlung mit anschließender Entwässerung eine Reduktion und durch die thermische Trocknung des Klärschlammes eine Eliminierung von *E. coli* und coliformen Erregern stattfindet. Nur wenn der Klärschlamm nach den entsprechenden Hygienisierungsmaßnahmen als seuchenhygienisch unbedenklich eingestuft wird, darf gemäß den bodenschutzrechtlichen Vorgaben in der Steiermark eine landwirtschaftliche Verwertung erfolgen. Sowohl in nicht entwässertem/gekalktem Klärschlamm als auch in entwässertem Klärschlamm ohne Kalkbehandlung konnten resistente *E. coli* nachgewiesen werden. Aufgrund der in diesen Untersuchungen beobachteten Resistenzsituationen sollte für die landwirtschaftliche Aufbringung oder landschaftsbauliche Verwertung dieser Klärschlämme eine neue hygienische Bewertung erfolgen.

Eine Verbreitung von resistenten bzw. ESBL-positive *E. coli*-Stämmen ist vor allem aus jenen Kläranlagen zu erwarten, die lediglich eine Entwässerung ohne nachfolgende Kalkbehandlung durchführen und diese Klärschlämme einer landwirtschaftlichen Verwertung zuführen.

2 EINLEITUNG

2.1 Hintergrund

Antibiotikaresistente Keime stellen heute nicht nur ein Problem im Bereich des Gesundheitswesens dar, sondern finden sich zunehmend auch in der Umwelt. Hauptgrund für diese Entwicklung ist der Einsatz von Breitspektrum-Antibiotika in der Medizin und der Landwirtschaft. In besiedelten Gebieten lassen sich fast überall Antibiotika im Oberflächenwasser nachweisen, welche einen evolutionären Druck auf die mit ihnen in Kontakt kommenden Mikroorganismen ausüben (Zhang, 2009). Neben diesem Einfluss auf die Mikroorganismen erfolgt auch ein direkter Eintrag von antibiotikaresistenten Bakterien aus der Tierhaltung über Gülle und Mist sowie aus menschlichen Ausscheidungen über das Abwasser in die Umwelt. Ein Anstieg von pathogenen antibiotikaresistenten Bakterien kann nicht nur ein umweltmedizinisches sondern auch ein ökotoxikologisches Problem hervorrufen (Kümmerer, 2004; 2009). Zahlreiche Studien berichten, dass urbanes Abwasser und Klärschlamm zum Teil hohe Raten an antibiotikaresistenten Bakterien aufweisen und der Anteil an antibiotikaresistenten Bakterien im Rohabwasser als auch im Ablauf von Kläranlagen in den letzten Jahren deutlich zugenommen hat (Heier, 1983; Fernandez-Astorga et al., 1992; Feuerpfeil et al., 1999; Goni-Urriza et al., 2000; Reinthaler et al., 2003; Silva et al., 2006).

Wenn man von resistenten Keimen im Abwasser ausgeht, so kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese durch Verdunstung und Verwirbelung im Rahmen des Klärungsprozesses in die Umgebungsluft gelangen. Diese Keime stellen einerseits ein potentiell Infektionsrisiko für den Menschen dar, andererseits kann es zu Resistenzentwicklungen durch die Übertragung von Resistenz-Plasmiden auf sensitive Stämme kommen.

Horizontaler Gentransfer ist in der Natur oder in technischen Anlagen überall dort möglich, wo die Dichte der Bakterien hoch, und damit die Chance auf ein Aufeinandertreffen zweier geeigneter Bakterienzellen groß ist (Feuerpfeil et al., 1999). Marcinek et al., (1998) berichten, dass Kläranlagen nicht nur ein

Sammelbecken für antibiotikaresistente Bakterien sind, sondern dass es auch Hinweise darauf gibt, dass es in Kläranlagen, begünstigt durch die hohe Bakteriendichte, zum Genaustausch und damit zur Übertragung von Resistenzgenen kommen kann.

Die Zusammensetzung der Abwässer ist je nach Herkunft variabel, und stark von der wirtschaftlichen Struktur des Einzugsgebietes, sowie temporär auch von epidemiologischen Gegebenheiten geprägt. Resistente Keime sind vor allem in Bereichen zu finden, wo ein vermehrter Einsatz von antimikrobiellen Substanzen gegeben ist. Krankenhäuser sind Zentren der Resistenzentwicklung (Grabow u. Prozesky, 1973; Fontaine u. Hoadley, 1976; WHO, 1983), wo Erregerstämme, die an dieses Milieu angepasst sind, mit einem vielfältigen Selektionsdruck und einem infektionsempfänglichen Patientengut zusammentreffen (Witte u. Klare, 1999). Auch Guardabassi et al., (1998) berichten in ihrer Studie von einer Prädisposition von Bakterien, die unter dem Einfluss eines antibiotikaspezifischen Selektionsdruckes Resistenzen entwickeln.

Antibiotikaresistente Keime stellen für den Menschen überall dort eine Gefahr dar, wo potentieller Kontakt mit fäkal verunreinigtem Wasser, Klärschlamm oder Gülle gegeben ist. Aus verschiedenen Studien wird deutlich, dass durch die Abwasserreinigung keine ausreichende Eliminierung von Infektionserregern (inkl. resistenter Keime) stattfindet (Strauch, 1998). Die im Klärschlamm vorhandenen Erreger können durch fäkal-orale Übertragung Infektionskrankheiten hervorrufen (Mascher et al., 1996). Auch durch die Nutzung von gereinigten Abwässern oder deren Vorflutern für Fischerei, Viehtränken und für die Bewässerung landwirtschaftlicher Kulturen, könnten Infektionskreisläufe geschlossen werden. Zudem können natürliche (Bade-) Gewässer durch den „run off“ von klärschlammgedüngten Flächen nach Regenereignissen mit resistenten Bakterien kontaminiert werden.

Da die Reinigung der Abwässer keine ausreichende Eliminierung der Infektionserreger bewirkt, können resistente Bakterien über das geklärte Abwasser oder über den Klärschlamm wieder in die Nahrungskette gelangen (Perreten et al., 1997; Teuber, 1999; Salyers, 2002; Müller, 2004).

In Österreich wird der überwiegende Teil der Abwässer den Kläranlagen zugeführt und dort einem Reinigungsprozess unterworfen. Dieser gliedert sich in drei Reinigungsstufen:

1. Mechanische Reinigung: Am Beginn des Reinigungsprozesses wird das Abwasser vorerst so weit wie möglich von Feststoffen und Partikeln befreit.
2. Biologische Reinigung: Im Belebtschlammbecken erfolgt der aerobe Abbau organischer Stoffe. Der gebildete Belebtschlamm ist ein Konglomerat aus Bakterien, organischem Detritus und Ciliaten, welche Belebtschlammflocken im Abwasser bilden.
3. Chemische Reinigung: Im Zuge dieser Reinigungsstufe werden die mineralischen Endprodukte (vor allem Stickstoff- und Phosphorverbindungen) eliminiert.

Klärschlamm, der im Verlauf des Reinigungsprozesses entsteht, kann nach vorangegangener Hygienisierung als Düngerersatz auf landwirtschaftlich genutzte Flächen aufgebracht werden.

Durch Stabilisierungsprozesse erfolgt eine Reduktion von Krankheitserregern im Klärschlamm, jedoch kann es durch den Wasserentzug auch zu einer relativen Zunahme an Bakterien (z.B. *E. coli*) pro Gramm kommen.

Lange Zeit war man der Meinung, dass entweder einzelne Reinigungsstufen oder die Gesamtheit der Prozesse in der Lage seien, die pathogenen Agentien aus dem Abwasser zu entfernen. Wenn man die bisherigen Kenntnisse über die Wirkung von Abwasserreinigungsverfahren auf pathogene Agentien zusammenfasst, kann man feststellen, dass die Mehrzahl von Erregern in zahlenmäßig reduzierter Form die Abwasserreinigung übersteht, und von den Kläranlagen in die Vorfluter gelangt (Haas, 1995; Feuerpfeil et al., 1999). Stelzer und Ziegert (1988) bestätigen, dass aus gut funktionierenden

vollbiologischen Kläranlagen bedeutende Mengen von antibiotikaresistenten Bakterien mit dem gereinigten Abwasser in die Umwelt gelangen.

Insgesamt hat sich in den letzten Jahren die Resistenzsituation bei vielen Infektionserregern drastisch verschärft. Aktuelles Beispiel aus dem Krankenhausbereich und zunehmend auch aus dem ambulanten Bereich mit erheblichem Gefährdungspotential sind ESBL (**E**xtended **S**pectrum **B**eta-**L**actamasen)-bildende Enterobacteriaceae. ESBLs sind β -Lactamasen mit einem erweiterten Wirkungsspektrum und entstehen durch Mutationen von nicht ESBL β -Lactamasen. Sie gehören unterschiedlichen β -Lactamasen Typen (wie TEM, SHV, CTX-M) an, die untereinander bisweilen eine relativ niedrige Homologie (um die 25%) aufweisen (Paterson u. Bonomo, 2005). Diese Enzyme sind meist auf Plasmiden codiert und somit leicht horizontal übertragbar. Sie hydrolysieren Beta-Lactam-Antibiotika und verleihen dem Keim damit Resistenz gegenüber Penicillinen, Cephalosporinen und Aztreonam. Seit den 80iger Jahren sind sie Ursache von nosokomialen Ausbrüchen mit ansteigender Tendenz in den letzten Jahren.

Stelzer und Ziegert (1988) fanden eine enorme Belastung des Abwassers mit antibiotikaresistenten Bakterien mit einer Vielzahl von Resistenztypen und gehen davon aus, dass einmal entstandene R-Plasmide sehr lange in der Umwelt zirkulieren.

2.2 Ziel des Projektes

Ziel des vorliegenden Projektes war antibiotikaresistente Bakterien (Leitkeim *E. coli*) im Zusammenhang mit den unterschiedlichen Behandlungs- und Hygienisierungsverfahren von Klärschlämmen aus verschiedenen Kläranlagen in der Steiermark zu untersuchen.

Aus den aktuellen Ergebnissen sollten die unterschiedlichen Behandlungsverfahren des Klärschlammes beurteilt und der weitere Einsatz in der Landwirtschaft diskutiert werden. Ein Vergleich der unterschiedlichen Klärschlammarten erfolgte durch die quantitative Untersuchung von *E. coli* und coliformen Keimen.

In dieser Studie wurden Klärschlämme mit folgenden Behandlungsverfahren untersucht:

- Simultane aerobe Schlammstabilisierung
- Anaerobe Schlammstabilisierung (Schlammfäulung)
- Behandlung von Klärschlamm mit Kalk als Ca(OH)_2

3 MATERIAL UND METHODEN

Im Zeitraum von Jänner bis Dezember 2009 wurden an neun Tagen Klärschlammproben aus fünf verschiedenen steirischen Kläranlagen (Tab. 1) gezogen. Die sechs Entnahmestellen wurden entsprechend den Schlammtypen Belebtschlamm, stabilisierter Schlamm, entwässerter Schlamm, entwässerter/gekalkter Schlamm, nicht entwässerter/gekalkter Schlamm und getrockneter Schlamm gewählt.

Das Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) wurde für die Keimzahlbestimmung sowie für die Resistenzuntersuchung ausgewählt. Dieser fakultativ pathogene Kommensalkeim kommt im menschlichen und tierischen Dickdarm vor und ist daher auch in den Ausscheidungen in hoher Zahl enthalten. In der österreichischen Trinkwasserverordnung dienen *E. coli* und coliforme Bakterien als Leitkeime für eine fäkale Verunreinigung. Auch für die Bestimmung der mikrobiologischen Qualität von Klärschlamm wird *E. coli* als Parameter verwendet. *E. coli* ist in der Umwelt überlebensfähig und kann leicht aus Klärschlammproben isoliert und identifiziert werden. Da *E. coli* auf alle getesteten Antibiotika sensibel reagieren sollte, kann man Änderungen oder Auffälligkeiten seines Resistenzverhaltens erkennen und interpretieren.

Nach Anzucht und Kultivierung wurden die kolonienbildenden Einheiten für *E. coli* und coliforme Keime pro Gramm (KBE/g) Klärschlamm bestimmt. Zusätzlich wurde das Vorhandensein von antibiotikaresistenten *E. coli* sowie ESBL-*E. coli* untersucht.

3.1 Beschreibung der Kläranlagen und der Klärschlammverwertung

In der vorliegenden Untersuchung wurden fünf abwassertechnische Anlagen mit Belebtschlammverfahren und unterschiedlichen Reinigungsstufen ausgewählt. In Tabelle 1 sind die technischen Daten der Kläranlagen angeführt. Drei der fünf verschiedenen Kläranlagen (A, D, E) führen ihre Klärschlämme einer landwirtschaftlichen Verwertung zu. Eine Anlage (B) führt den Klärschlamm einer Mechanisch-Biologischen-Abfallbehandlungsanlage (Abfall-Deponie) zu (Neubauer u. Öhlinger, 2006). Aus einer Anlage (C) werden die Klärschlämme verbrannt. Die Behandlung von Abwasserschlamm erfolgt in vier Anlagen durch die simultane, aerobe Schlammstabilisierung (A, B, D, E) und anschließender Entwässerung (A, B, D) und in zwei Anlagen (D, E) durch Kalkzugabe ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) (Tab.1).

Tabelle 1: Technische Daten der beprobten Kläranlagen

<i>Technische Daten</i>	Kläranlage A	Kläranlage B	Kläranlage C	Kläranlage D	Kläranlage E
Hygienisierung	-	-	-	Kalkzugabe $\text{Ca}(\text{OH})_2$	Kalkzugabe $\text{Ca}(\text{OH})_2$
Endprodukt	Fester Klärschlamm	Fester Klärschlamm	Fester Klärschlamm	Fester Klärschlamm	Flüssiger Klärschlamm
Verwertung	Landwirtschaftlich	Abfall-Deponie	Verbrennung	Landwirtschaftlich	Landwirtschaftlich
Abwasserfracht L/min					
Bevölkerungsäquivalent					

3.2 Verfahren zur Behandlung und Entseuchung des Klärschlammes

Die gesetzlichen Grundlagen für die Verwertung von Klärschlamm auf landwirtschaftlichen Böden in der Steiermark sind das **Steiermärkische landwirtschaftliche Bodenschutzgesetz** und die **Steiermärkische Klärschlammverordnung 2007**. Die Bestimmungen dieses Gesetzes und der beiden Verordnungen sehen unter anderem vor, dass die Aufbringung von Klärschlamm auf geeignete Böden nur dann erfolgen darf, wenn der Klärschlamm „**seuchenhygienisch unbedenklich**“ ist und hierfür ein von einer anerkannten Untersuchungsstelle ausgestelltes Überprüfungszeugnis vorliegt. Der Begriff „seuchenhygienisch unbedenklich“ ist in Bezug auf die mikrobiologische Qualität des Klärschlammes im Untersuchungsgebiet (Steiermark) definiert, wenn in 1 g Schlamm nicht mehr als 100 *E. coli* nachweisbar sind, 1 g Schlamm frei von Salmonellen ist und keine ansteckungsfähigen Wurmeier vorhanden sind.

Weltweit werden unterschiedliche Verfahren zur weiteren Behandlung von Klärschlamm eingesetzt.

Der in den Kläranlagen durch den Reinigungsprozess aus dem Abwasser abgeschiedene Schlamm - auch Frischschlamm genannt - setzt sich aus ca. 60% organischen und 40% anorganischen Bestandteilen zusammen. Der Klärschlamm ist ein guter Bakteriennährboden, dadurch geht er schnell in Fäulnis über und muss daher vor seiner weiteren Verwertung und Ablagerung einer Stabilisierung zugeführt werden. Je nach Abwasserbehandlungsart unterscheidet man verschiedene Klärschlammarten.

Für die Behandlung von Klärschlamm bestehen verschiedene Verwertungs- und Beseitigungsmöglichkeiten, wobei die Kompostierung mit anschließender Anwendung in der Landwirtschaft und im Landschaftsbau, die direkte landwirtschaftliche Verwertung, die thermische Verwertung und die mechanisch-biologische Behandlung mit anschließender Deponierung mengenmäßig am bedeutendsten sind.

Eine Entseuchung bzw. Desinfektion von Klärschlamm ist möglich unter Nutzung einer ausreichenden Hitzeeinwirkung, einer ausreichenden pH-Wert Verschiebung oder einer ausreichenden Ionisierung.

Verschiedene erprobte und bewährte Verfahren zur Behandlung und Entseuchung von Klärschlamm lassen sich grundsätzlich nennen. Die Vorschriften über Verfahren zur Hygienisierung von Klärschlamm sind nicht gesetzlich geregelt. Neben der anaeroben und aeroben Gärung (Stabilisierung) werden auch Behandlungen in Form von Kompostierung, Pasteurisierung und Kalkung durchgeführt (Arthurson, 2008). Die Kalkung von Klärschlamm stellt eine kosteneffektive Alternative zur anaeroben und aeroben Gärung dar (Czechowski u. Marcinkowski, 2006).

Im Folgenden sind die Behandlungs- bzw. Entseuchungsverfahren der simultan-aeroben Schlammstabilisierung, der anaeroben Schlammstabilisierung (Schlammfäulung) und der Schlammbehandlung mit dem Zuschlagstoff Kalk beschrieben.

Simultan aerobe Schlammstabilisierung

Die simultan aerobe Schlammstabilisierung erfolgt gemeinsam mit der biologischen Abwasserreinigung, bei der unter guter Belüftung bzw. Sauerstoffzufuhr Biomasse abgebaut wird. Dabei entsteht eine geringe Menge an Überschussschlamm. Die Mikroorganismen enthalten keine gespeicherten Reservestoffe mehr und die Fäulnisorganismen haben nur geringe Entwicklungsmöglichkeiten. Ein Nachteil dieses Stabilisierungsverfahren liegt in der schlechten Entwässerbarkeit der so behandelten Schlämme.

Anaerobe Schlammstabilisierung (Schlammfäulung)

Die anaerobe Schlammstabilisierung ist unter dem Begriff der Fäulung bekannt, und findet in sog. Faulbehältern statt. Der in Form von Kohlehydraten, Proteinen und Fetten vorliegende Energiegehalt des Rohschlammes soll dabei weitgehend unter Luft- bzw. Sauerstoffabschluss abgebaut werden. Dabei setzen die Bakterien die Biomasse im Schlamm zu Faulgas bzw. Methan um.

In der ersten thermophilen Stufe findet der Vorabbau der organischen Substanzen bei ca. 55 °C statt. Die zweite Faulstufe ist hingegen temperaturanfällig, da nur die spezialisierten acetogenen Bakterien und die Methanbakterien tätig sind. Sie fühlen sich im mittleren Temperaturbereich bei 35 °C wohl. In der Praxis werden die Faultürme im mesophilen Bereich (30-38 °C) betrieben.

Die Behandlung von Klärschlamm mit Kalk als Ca(OH)_2 (Kalkhydrat, Löschkalk): Die Zugabe von Ca(OH)_2 zu flüssigem Schlamm dient zur Entseuchung vor dessen Verwertung oder Konditionierung vor dessen Entwässerung. Es kommt zu einem Anstieg des pH-Werts in Abhängigkeit von der zugegebenen Schlammmenge und -eigenschaften. Das Gemisch muss einen Anfangswert von $\text{pH}=12,5 \pm 0,3$ betragen und vor Abgabe mindestens 3 Monate gelagert werden.

3.3 Laboruntersuchungen

3.3.1 Probenentnahme

Die Klärschlammproben wurden mit Hilfe von sterilen Weithalsflaschen entnommen. Der Transport erfolgte in einer gekühlten Transportbox ins Labor, wo die Proben im Kühlschrank bei 4-8 °C bis zur Aufarbeitung zwischengelagert wurden.

3.3.2 Bestimmung der Kolonienzahlen für *E. coli* und Gesamtcoliforme

1 g Klärschlamm wurde in 9 mL sterile Kochsalzlösung (0,9% NaCl) suspendiert. Zur Verringerung der Keimdichte wurde eine dezimale Verdünnungsreihe mit physiologischer Kochsalzlösung angelegt. Anschließend wurden je 0,1 mL der gut homogenisierten Verdünnungen im Doppelansatz auf

Chromocult Agar (CCA) Medium ausplattiert und für 24 Stunden bei 44 °C inkubiert.

Nach Inkubation wurden infolge der Farbreaktion des Chromocult Mediums violett/blau erscheinenden *E. coli* Kolonien und rosa/rot erscheinende andere Coliforme Kolonien ausgezählt. Die Gesamtcoliformen ergeben sich aus den *E. coli* Kolonien und den Coliformen Kolonien.

Aus den Doppelansätzen wurde der Mittelwert gebildet. Die KBE (kolonienbildenden Einheiten) wurden pro Gramm Klärschlamm berechnet.

3.3.3 Einteilung der in der vorliegenden Studie verwendeten Antibiotika

Eine Einteilung der wichtigsten Antibiotika ist nach verschiedenen Gesichtspunkten möglich. Aufgrund ihrer chemischen Struktur, ihrer biologischen Herkunft oder nach der therapeutischen Anwendung lassen sich verschiedene Gruppen bilden. In Tabelle 2 ist die Gliederung der in dieser Studie verwendeten Substanzen ersichtlich. Antibiotika der gleichen Gruppe ähneln sich in ihrem Wirkungsmechanismus und Wirkungsspektrum, sie führen in der Regel zu einer partiellen Kreuzresistenz und haben eine ähnliche Toxizität (Simon u. Stille, 1997).

Um Reinkulturen zu erhalten, wurden je Probe 10 Kolonien *E. coli* von den CCA-Nährmedienplatten ausgewählt und mit einer sterilen Impföse auf Blutagarplatten überimpft. Die Blutagarplatten wurden für 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die so erhaltenen Reinkulturen der vorselektierten *E. coli* wurden mittels Vitek2 biochemisch identifiziert und auf ihr Resistenzverhalten gegenüber 21 Antibiotika getestet. Für 3 weitere Antibiotika erfolgte die Bestimmung des Resistenzmusters mit Hilfe des Agar-diffusionstests.

Tabelle 2: Einteilung der getesteten Antibiotika

β-LACTAME			
GRUPPE	UNTERGRUPPE	DERIVATE	ABKÜRZUNG
Penicilline	Aminobenzylpenicilline + β-Lactamaseinhibitor	Ampicillin	AM
		Amoxicillin+Clavulansäure	AMC (AUG)
	Acylaminopenicilline + β-Lactamaseinhibitor	Piperacillin	PIP
		Piperacillin + Tazobactam	P/TZP (PT)
Cephalosporine	I (P)	Cefalothin	CF
	II (P)	Cefuroxim	CXM
	II (O)	Cefuroxim-Axetil	CXMAX
	II (P)	Cefoxitin	FOX
	III (O)	Cefpodoxim	CPD
	III (P)	Cefotaxim	CTX
	III (P)	Ceftazidim	CAZ
	IV (P)	Cefepim	FEP
Carbapeneme		Meropenem	MEM
NICHT β-LACTAME			
Aminoglycoside	Neuere Aminoglycoside	Gentamycin	GM
		Tobramycin	TM (NN)
		Amikacin	AN
Bakteriostatische Breitspektrum- Antibiotika	Tetracycline	Tetracyclin	TE
	Chloramphenicol	Chloramphenicol	C
ANTIBAKTERIELLE CHEMOTHERAPEUTIKA			
Sulfonamid- Diaminopyrimidin- Kombinationen	-	Co-Trimoxazol (Trimethoprim +Sulfonamid)	SXT
Nitrofurane	-	Nitrofurantoin	FT (FM)
Gyrasehemmer	Chinolone (ältere)	Nalidixinsäure	NA
	Fluochinolone (neuere)	Norfloxacin	NOR
		Ciprofloxacin	CIP
		Ofloxacin	OFL (OFX)

β-Lactamaseinhibitor: Clavulansäure, Tazobactam

P: parenteral

O: oral

Vitek2 (bioMerieux)

Vitek2 ist ein automatisiertes System, das mittels Einwegtestkarten zur Identifizierung gramnegativer, grampositiver, aerober und anaerober Bakterien sowie Hefen und zur Resistenzbestimmung dient.

Beim Vitek2 Testsystem erfolgen die Identifizierung der Keime mit Hilfe von Fluoreszenztechnik und die Resistenzbestimmung durch eine photometrische Messung der Trübungsänderung. Die Einwegtestkarten enthalten biochemische Reagenzien, die man mit Probenmaterial beimpft.

Das Vitek2 Testsystem besteht aus folgenden Einheiten:

- Vitek2 Densicheck: Zur Überprüfung der Keimdichte.
- Carrierstation und Scanner: Zum Einlesen der Testkarten.
- Vitek2 Kassette: Zum Einsetzen der mit Keimmaterial beimpften Kunststoffröhrchen.
- Inkubations- und Ablesestation: Zur automatischen Ablesung der Testkarten während der Inkubation.
- Computerstation: Zur automatischen Auswertung der Ablesedaten.
- Terminal und Drucker: Zur Kommunikation mit dem System, bzw. zum Ausdrucken der Ergebnisse.
- Testkarten: Zur Identifizierung und Resistenzbestimmung.

Vitek2 Keimidentifizierung:

Die durch das CCA-Medium vorselektierten *E. coli* Keime wurden mit der Vitek2-gramnegativen Identifizierungskarte „ID-GNB“ und dem Vitek2 Testsystem zur automatischen Identifizierung bestimmt. Dabei wird der Keim 41 etablierten biochemischen Tests und 2 Tests für die Negativkontrolle unterzogen. Durch die automatische Auswertung der typischen Testreaktionen wird der Keim einer bestimmten Spezies zugeordnet.

Vitek2 Resistenzbestimmung:

Die Resistenzbestimmung der *E. coli* Keime wurde mit der Vitek2-gramnegativen Resistenzbestimmungskarte „AST-N020“ und dem Vitek2 Testsystem zur automatischen Resistenzbestimmung durchgeführt. Als Testprinzip diente dazu die Methode der Bestimmung der minimalen

Hemmkonzentration (MHK). Bei dieser Methode wird in vitro die Hemmung des Wachstums der Keime in einem flüssigen oder festen Medium bei der geringsten Antibiotikakonzentration gemessen. Für das Vitek2 Resistenzbestimmungsverfahren wurde eine große Anzahl von klinischen Keimen und Stammkeimen getestet und die Ergebnisse der Tests wurden mit den Ergebnissen einer Referenzmethode verglichen. Aus dieser Analyse wurde ein Algorithmus entwickelt, der als Grundlage für die Beurteilung aller Antibiotika des Vitek2 Resistenzbestimmungsverfahrens dient (bioMerieux Vitek, 1998).

Vitek2 Durchführung der Identifizierung und Resistenzbestimmung:

1. Es wurden mittels eines Dispensers 3 mL einer sterilen Kochsalzlösung (0,45 – 0,5% NaCl, pH 5,5 – 7,2) in ein keimfreies, transparentes Kunststoffeströhrchen (12x75 mm) eingebracht.
2. Zur Identifizierung und Resistenzbestimmung wurde Keimmaterial einer Reinkultur mit Hilfe eines sterilen Wattetupfers vom Nährmedium der Petrischale abgenommen und in das vorbereitete Teströhrchen eingerührt. Die zu bestimmende Kultur sollte am ersten Tag nach der Inkubation verwendet werden, da ein längeres Aufbewahren der Keime die Testergebnisse verfälschen könnte.
3. Die für die Identifizierung erforderliche Inokulumdichte eines McFarland-Standards von 0,55-0,62 wurde mit dem Vitek2 Densichek überprüft.
4. Das Teströhrchen wurde in die erste Position der Trägerkassette gesteckt.
5. Für die Resistenzbestimmung wurde ein leeres Teströhrchen in die zweite Position gesteckt, da das Vitek2 Gerät die Verdünnung des Inokulums automatisch vornimmt.
6. Jeder der zu testenden Keime wurde durchnummeriert und die zugehörige ID-GNB Karte in Position 1 bzw. die AST-N020 Karte in Position 2 wurde eingescannt.
7. Die beladene Kassette wurde in den dafür vorgesehenen „Schlitten“ des Vitek2 Geräts platziert.

8. Die Analyse erfolgte automatisch durch das Vitek2 System.
9. Die Auswertungsdauer für die Keimidentifizierung betrug ca. 3 Stunden, für die Resistenzbestimmung ungefähr 5 Stunden.

Agardiffusionstest (Antibiogramm)

Das Prinzip des Agardiffusionstests beruht auf einer Empfindlichkeitsüberprüfung von bakteriellen Erregern gegenüber Antibiotika bzw. Chemotherapeutika (Oxoid, 1993). Dabei wird ein mit einer definierten Menge an Antibiotikum bzw. Chemotherapeutikum bestücktes Papiertestplättchen auf die Oberfläche eines mit dem Erreger homogen beimpften, festen Nährmediums aufgelegt. Das Antibiotikum diffundiert in den Agar, wobei die Konzentration des antimikrobiellen Wirkstoffes kontinuierlich mit der Diffusionsstrecke abnimmt. Sensitive, also auf das Antibiotikum empfindliche Keime wachsen unter Ausbildung eines Hemmhofes um das Testplättchen. Der Keim ist dabei dem Konzentrationsgradienten um das Testplättchen ausgesetzt. Je resistenter ein Keim ist, desto geringer bleibt die wachstumsfreie Zone um das Plättchen. Der Hemmhofdurchmesser ist dementsprechend ein Maß für die Empfindlichkeit eines Erregers (Wiedemann, 1992). Durch festgelegte Grenzwerte (CLSI, 2008) nach dem CLSI / NCCLS (Clinical and Laboratory Standards Institute / National Committee for Clinical Laboratory Standards) kann der untersuchte *E. coli* Stamm als „sensibel“, „mäßig sensibel / intermediär“, oder „resistent“ eingestuft werden. Alle Stämme, die ein intermediäres und resistentes Verhalten zeigten, wurden unter dem Begriff „resistent“ vereint. Alle anderen Stämme wurden unter dem Begriff „sensibel“ eingestuft.

3.3.4 ESBL-Screening

100 mg Klärschlamm wurden in 3 mL Thioglycolat überführt und bei 37 °C für 24 h inkubiert. Mit einer sterilen Impföse/Tupfer wurde Material auf ESBL Screening Agar (bioMerieux, ESBL-Screening, 37 °C, 24 h) überimpft. Um Reinkulturen zu erhalten wurden ESBL verdächtige Kolonien auf Blut- und Endoagar ausgestrichen (37 °C, 24 h).

Die Identifikation erfolgte mit Vitek2 ID-GN, die Resistenzbestimmung mit AST-N020.

Bei Vorliegen von ESBL verdächtigen Kolonien wurden außerdem zur Bestätigung „CLSI Screening and Confirmatory Tests for ESBLs in *E. coli*“ (CLSI, 2008) durchgeführt.

3.3.5 Bestimmung der Beta-Lactamase-Gruppe durch PCR-Nachweis von Beta-Lactamase (bla)-Genen

Ausgewählte ESBL-positive Stämme wurden in 5 mL BHI Medium (Brain Heart Infusion) angezüchtet und mittels Plasmidisolierung die Resistenzplasmide aus den Zellen gewonnen.

Die isolierte Plasmid-DNA diente als Template für eine gruppenspezifische PCR zum Nachweis bestimmter Beta-Lactamase (bla) Gene von 8 unterschiedlichen β -Lactamase Typen. Primer (Tab. 3) und PCR-Bedingungen wurden wie in der Literatur beschrieben angewendet (Kiratisin et al., 2008). Die Auswertung erfolgte mittels Gelelektrophorese.

Tabelle 3: Verwendete Primer und PCR-Produktgrößen (modif. nach Kiratisin et al., 2008)

Zielsequenz	Primer Name	Primer Sequenz	PCR Produktgröße
<i>bla</i> _{TEM}	TEM-F	TCCGCTCATGAGACAATAACC	931
	TEM-R	TTGGTCTGACAGTTACCAATGC	
<i>bla</i> _{SHV}	SHV-F	TGGTTATGCGTTATATTCGCC	868
	SHV-R	GGTTAGCGTTGCCAGTGCT	
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX-F	TCTTCCAGAATAAGGAATCCC	909
	CTX-R	CCGTTTCCGCTATTACAAAC	
<i>bla</i> _{VEB}	VEB-F	GATAGGAGTACAGACATATG	914
	VEB-R1	TTTATTCAAATAGTAATTCCACG	
<i>bla</i> _{OXA-2gr}	OXA-2-F	AAGAAACGCTACTCGCCTGC	478
	OXA-2-R	CCACTCAACCCATCCTACCC	
<i>bla</i> _{OXA-10gr}	OXA-10-F	GTCTTTTCGAGTACGGCATT	720
	OXA-10-R	ATTTTCTTAGCGGCAACTTAC	
<i>bla</i> _{PER}	PER-F	ATGAATGTCATCACAAAATG	927
	PER-R	TCAATCCGGACTCACT	
<i>bla</i> _{GES}	GES-F	ATGCGCTTCATTACGCAC	864
	GES-R	CTATTTGTCCGTGCTCAGG	

3.4 Statistische Auswertung

Die Daten wurden tabellarisch erfasst und mittels Microsoft Excel 2003 und SPSS® Version 17.0 statistisch ausgewertet. Mit Microsoft Excel 2003 wurden zusätzlich die Grafiken erstellt. Die als „signifikant“ bezeichneten Korrelationen oder Unterschiede sind bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner als 5% gegeben. Mit dem Programm „R“ wurden logistische Regressionsmodelle für die Antibiotika in Abhängigkeit von Kläranlage und Klärschlammtyp erstellt.

4 ERGEBNISSE

Alle 708 aus dem Klärschlamm isolierten *E. coli* Stämme wurden nach den in Kapitel 3 beschriebenen Methoden untersucht.

4.1 Vergleich der Keimkonzentrationen (KBE/g)

Insgesamt wurden in neun Messserien 110 Klärschlammproben untersucht. Die höchsten Keimkonzentrationen für *E. coli* wurden mit $9,6 \times 10^4$ KBE/g Klärschlamm in der Anlage C nachgewiesen. Im Median wurden in den Belebtschlammproben der Kläranlagen $2,6 \times 10^3$ bis $1,6 \times 10^4$ KBE/g Klärschlamm *E. coli* gefunden. Für den entwässerten Klärschlamm der Anlagen A, B und C wurden Keimkonzentrationen für *E. coli* im Median von $4,0 \times 10^2$ bis $2,0 \times 10^3$ KBE/g ermittelt. In den Anlagen D und E konnte durch die Hygienisierung des Klärschlammes mit Kalkhydrat eine Reduktion der *E. coli* im Median auf 0 KBE/g Klärschlamm erreicht werden. Im getrockneten Klärschlamm der Anlage C konnten Maximalwerte für *E. coli* von $3,6 \times 10^2$ KBE/g nachgewiesen werden. Tabelle 4 zeigt die Minimal-, Maximal- und Medianwerte der KBE/g Klärschlamm von *E. coli* und Gesamtcoliformen Keimen. Die grafische Darstellung der KBE/g von *E. coli* und Gesamtcoliformen Keimen ist in Abbildung 1 ersichtlich.

Betrachtet man die Unterschiede zwischen den Klärschlammtypen und den zu erwartenden *E. coli* Konzentrationen mit Hilfe von loglinearen Gammamodellen, so zeigte sich, dass im Vergleich zu entwässerten/gekalkten Klärschlämmen signifikant höhere Konzentrationen in entwässerten ($p < 0,0001$) und in nicht entwässerten/gekalkten ($p < 0,006$) Klärschlämmen gemessen wurden. Zwischen entwässerten/gekalkten Klärschlämmen und getrockneten Schlämmen konnten keine signifikanten *E. coli* Konzentrationsunterschiede festgestellt werden.

Tabelle 4: *E. coli* und Gesamtcoliforme aus Klärschlamm in KBE/g

Anlage	Schlammtyp	<i>E. coli</i> KBE/g			Gesamtcoliforme KBE/g		
		min	max	Median	min	max	Median
A	1	1,5x10 ³	7,6x10 ³	5,0x10 ³	5,2x10 ³	3,0x10 ⁴	1,4x10 ⁴
	2	1,6x10 ³	3,0x10 ⁴	7,8x10 ³	4,0x10 ³	5,2x10 ⁴	3,8x10 ⁴
	3	0	8,0x10 ³	4,0x10 ²	0	4,4x10 ⁵	6,7x10 ³
B	1	2,0x10 ³	1,3x10 ⁴	4,4x10 ³	4,0x10 ³	2,1x10 ⁴	1,0x10 ⁴
	3	8,0x10 ²	8,4x10 ³	2,0x10 ³	3,6x10 ³	2,9x10 ⁴	4,9x10 ³
C	1	1,2x10 ³	1,7x10 ⁴	2,6x10 ³	2,4x10 ³	1,7x10 ⁵	1,3x10 ⁴
	2	2,0x10 ²	3,0x10 ³	5,5x10 ²	4,0x10 ²	9,0x10 ³	1,1x10 ³
	3	4,0x10 ²	9,6x10 ⁴	1,9x10 ³	1,2x10 ³	1,3x10 ⁵	4,6x10 ⁴
	4	0	3,6x10 ²	0	0	2,0x10 ³	0
D	1	1,3x10 ³	6,2x10 ³	3,8x10 ³	6,3x10 ³	4,6x10 ⁴	2,0x10 ⁴
	6	0	0	0	0	0	0
E	1	3,2x10 ³	6,5x10 ⁴	1,6x10 ⁴	4,7x10 ³	3,1x10 ⁵	7,3x10 ⁴
	5	0	5,0x10 ²	0	0	9,0x10 ²	3,0x10 ²

Schlammtyp: 1= Belebtschlamm; 2= Stabilisierter Schlamm; 3= Entwässerter Schlamm; 4= Getrockneter Schlamm; 5= Nicht entwässerter/gekalkter Schlamm; 6= Entwässerter/gekalkter Schlamm

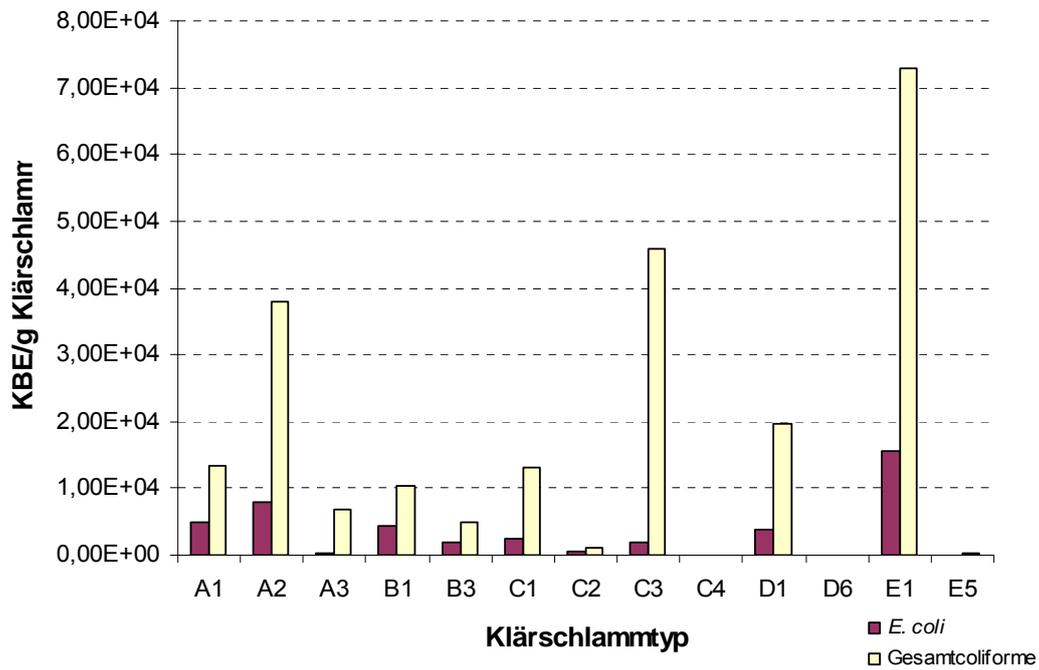


Abbildung 1: *E. coli* und Gesamtcoliforme Keime nach Klärschlammtyp

A1, B1, C1, D1, E1 = Belebtschlamm; A2, C2 = Stabilisierter Schlamm; A3, B3, C3= Entwässerter Schlamm; C4= Getrockneter Schlamm; E5= Nicht entwässerter/gekalkter Schlamm; D6= Entwässerter/gekalkter Schlamm

4.2 Resistenzsituation von *E. coli* aus Klärschlamm

4.2.1 Resistenzsituation und prozentueller Anteil von *E. coli*

Stämmen aus allen Klärschlämmen

In allen 110 Klärschlämmen erwiesen sich, unter den Aminoglycosiden Amikacin (AN) und das Carbapenem Meropenem (MEM) als 100%ig wirksam. Gegen die getesteten Penicilline Ampicillin (AM), Amoxicillin+Clavulansäure (AMC), Piperacillin (PIP) und Piperacillin+Tazobactam (P/TZP) zeigte *E. coli* eine Resistenzrate zwischen Minimum 0,6% bis Maximum 12,4%. Unter den Cephalosporinen hatte Cefalothin (CF) mit 21,6% die geringste Wirksamkeit. Die restlichen Cephalosporine zeigten Resistenzraten von 0,4% bis 4,9%. Von den getesteten Aminoglycosiden zeigten Gentamycin (GM) und Tobramycin (TM) Resistenzraten von 1,0% und 1,1%. Von den Gyrasehemmern zeigte Nalidixinsäure (NA), die älteste Substanz aus dieser Gruppe, die geringste Wirksamkeit gegen *E. coli* mit einer Resistenzrate von 10%. Norfloxacin (NOR), Ciprofloxacin (CIP) und Ofloxacin (OFL) lagen zwischen 2,5% und 2,7%. Für das Antibiotikum Tetracyclin (TE) wurde der zweitgrößte Anteil an resistenten Keimen mit 18,2% isoliert. Für Co-Trimoxazol (SXT) lag der Anteil der resistenten *E. coli* Bakterien bei 5,9%; für Nitrofurantoin (FT) und Chloramphenicol (C) lag diese bei 2,0% bzw. 3,1% (Tab. 5).

4.2.2 Resistenzsituation und prozentueller Anteil von *E. coli*

Stämmen nach Klärschlammtypen

Vergleicht man die Resistenzraten der *E. coli* Isolate aus den unterschiedlichen Klärschlammtypen, so zeigte sich für Belebtschlamm die höchste Resistenz für die Substanz CF mit 21,9% und für entwässerte Schlämme mit 26,5%. Die stabilisierten Klärschlämme wiesen beim Antibiotikum TE die höchste Resistenzrate mit 21,4% auf. Im entwässerten und gekalkten Klärschlamm wurden keine resistenten *E. coli* Isolate gefunden. In nicht entwässerten und gekalkten sowie in getrockneten Klärschlämmen war das Vorkommen von

resistenten *E. coli* Stämmen gering, jedoch erwies sich unter den Penicillinen AM in 22,2% als unwirksam (Tab. 6).

Tabelle 5: Resistenzraten von *E. coli* aus Klärschlamm

		Resistenzraten der <i>E. coli</i> Isolate aus Klärschlamm [n=708]	
SUBSTRAT-GRUPPE	ANTIBIOTIKUM	% sensibel	% resistent
Penicilline	AM	87,6	12,4
	AMC	97,2	2,8
	PIP	94,1	5,9
	P/TZP	99,4	0,6
Cephalosporine	CF	78,4	21,6
	CXM	97,3	2,7
	CXMAX	95,1	4,9
	FOX	99,3	0,7
	CPD	99,3	0,7
	FEP	99,6	0,4
	CTX	99,6	0,4
	CAZ	99,6	0,4
Carbapeneme	MEM	100	0
Aminoglycoside	GM	99,0	1,0
	TM	98,9	1,1
	AN	100	0
Gyrasehemmer	NA	90,0	10,0
	NOR	97,3	2,7
	CIP	97,5	2,5
	OFL	97,5	2,5
Andere	TE	81,8	18,2
	SXT	94,1	5,9
	FT	98,0	2,0
	C	96,9	3,1

AM= Ampicillin; AMC= Amoxicillin+Clavulansäure; PIP= Piperacillin; P/TZP= Piperacillin+Tazobactam; CF= Cefalothin; CXM= Cefuroxim; CXMAX= Cefuroxim-Axetil; FOX= Cefoxitin; CPD= Cefpodoxime; FEP= Cefepim; CTX= Cefotaxim; CAZ= Ceftazidim; MEM= Meropenem; GM= Gentamicin; TM= Tobramycin; AN= Amikacin; NA= Nalidixinsäure; NOR= Norfloxacin; CIP= Ciprofloxacin; OFL= Ofloxacin; TE= Tetracyclin; SXT= Sulfamethoxazol/Trimethoprim; FT= Nitrofurantoin; C= Chloramphenicol
 resistent: „intermediär + resistent“ wurde in dieser Gruppe zusammengefasst betrachtet

Tabelle 6: Resistenzraten von *E. coli* aus Klärschlamm nach Klärschlammtyp

		Resistenzraten der <i>E. coli</i> Isolate aus Klärschlamm [%]					
		KLÄRSCHLAMMTYP					
SUB-STRAT-GRUPPE	ANTIBIOTIKUM	belebt [n=373]	stabilisiert [n=117]	entwässert [n=185]	entwässert /gekalkt [n=6]	nicht entwässert /gekalkt [n=18]	getrocknet [n=9]
Penicilline	AM	13,4	12,0	10,8	0	22,2	0
	AMC	2,9	4,3	2,2	0	0	0
	PIP	6,4	6,0	4,9	0	11,1	0
	P/TZP	0,3	1,7	0,5	0	0	0
Cephalosporine	CF	21,9	17,1	26,5	0	5,6	11,1
	CXM	2,4	4,3	2,7	0	0	0
	CXMAX	4,8	7,7	4,3	0	0	0
	FOX	0,5	2,6	0	0	0	0
	CPD	0,8	0,9	0,5	0	0	0
	FEP	0,5	0	0,5	0	0	0
	CTX	0,5	0	0,5	0	0	0
	CAZ	0,8	0	0	0	0	0
Carbapeneme	MEM	0	0	0	0	0	0
Aminoglycoside	GM	1,6	0	0,5	0	0	0
	TM	1,9	0	0,5	0	0	0
	AN	0	0	0	0	0	0
Gyrasehemmer	NA	8,8	12,8	10,3	0	16,7	11,1
	NOR	1,6	4,3	4,3	0	0	0
	CIP	1,6	4,3	3,8	0	0	0
	OFL	1,6	4,3	3,8	0	0	0
Andere	TE	19,0	21,4	16,8	0	11,1	0
	SXT	6,7	6,8	4,3	0	5,6	0
	FT	2,1	3,4	1,1	0	0	0
	C	4,0	4,3	1,1	0	0	0

AM= Ampicillin; AMC= Amoxicillin+Clavulansäure; PIP= Piperacillin; P/TZP= Piperacillin+Tazobactam; CF= Cefalothin; CXM= Cefuroxim; CXMAX= Cefuroxim-Axetil; FOX= Cefoxitin; CPD= Cefpodoxime; FEP= Cefepim; CTX= Cefotaxim; CAZ= Ceftazidim; MEM= Meropenem; GM= Gentamicin; TM= Tobramycin; AN= Amikacin; NA= Nalidixinsäure; NOR= Norfloxacin; CIP= Ciprofloxacin; OFL= Ofloxacin; TE= Tetracyclin; SXT= Sulfamethoxazol/Trimethoprim; FT= Nitrofurantoin; C= Chloramphenicol
 resistant: „intermediär + resistant“ wurde in dieser Gruppe zusammengefasst betrachtet

4.2.3 Resistenzsituation und prozentueller Anteil von *E. coli*

Stämmen nach Kläranlagen

In allen 5 Anlagen wiesen die Antibiotika CF und TE die höchsten Resistenzraten auf; in Anlage E zusätzlich die Substanzen AM und SXT. Die wirksamsten Substanzen waren in allen Anlagen AN aus der Gruppe der Aminoglycoside und das Carbapenem MEM (Tab. 7).

4.2.4 Resistenzsituation und prozentueller Anteil von *E. coli*

Stämmen nach Kläranlagen und Klärschlammtypen

Kläranlage A:

Von den drei untersuchten Klärschlammtypen hatte der entwässerte Schlamm ohne Kalkung die höchste Resistenzrate für *E. coli* für CF von 45,2%. Beim Belebtschlamm war der Anteil für CF bei 25%; beim stabilisierten Schlamm bei 18,7%. Für TE wurden im stabilisierten Schlamm anteilig 20,0%; im entwässerten Schlamm 19,4% und im Belebtschlamm 15,5% nachgewiesen (Tab. 8, Abb. 2).

Kläranlage B:

Von den zwei untersuchten Klärschlammtypen zeigte sich in der Gruppe der Cephalosporine für CF die höchste Resistenzrate im entwässerten Klärschlamm mit 24,7%. Der Anteil der CF-resistenten *E. coli* im Belebtschlamm lag bei 21,6%. Im entwässerten Schlamm wurden auch hohe Resistenzraten für TE mit 17,3% und AM mit 14,8% gefunden (Tab. 8, Abb. 3).

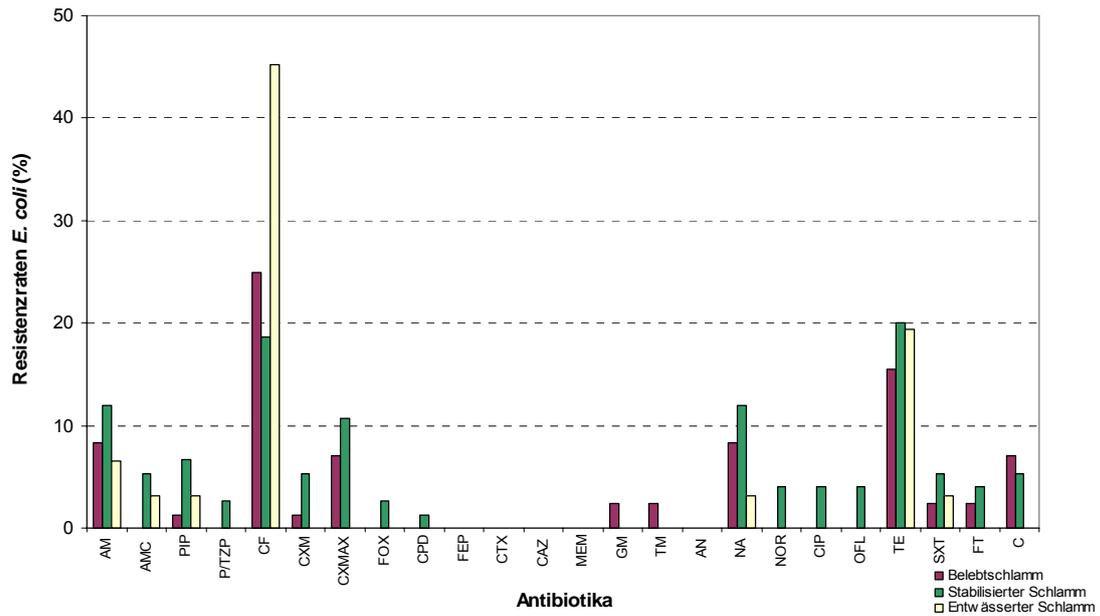


Abbildung 2: Resistenzraten von *E. coli* (%) der Anlage A

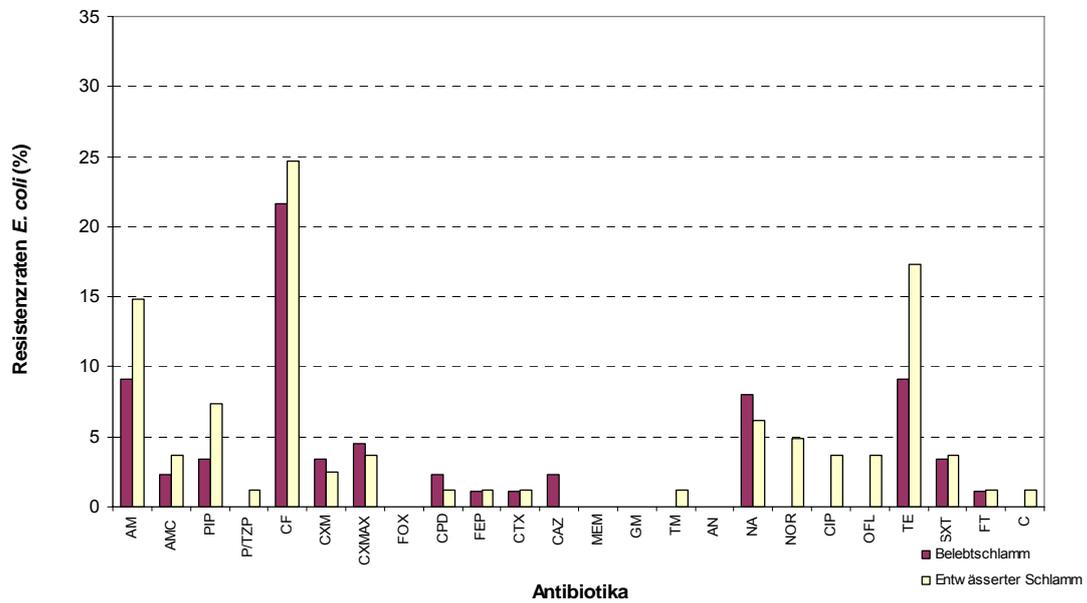


Abbildung 3: Resistenzraten von *E. coli* (%) der Anlage B

Kläranlage C:

Von den vier untersuchten Klärschlammtypen konnte im entwässerten Schlamm ohne Kalkung für die Substanz CF mit 20,5% und im stabilisierten Schlamm für TE mit 23,8% der höchste resistente Anteil an *E. coli* detektiert werden. Von den getesteten Gyrasehemmern erwies sich *E. coli* sehr resistent gegen NA mit 17,8% im entwässerten Schlamm. Im getrockneten Schlamm konnten für CF und NA 11,1% resistente *E. coli* gefunden werden (Tab. 8, Abb. 4).

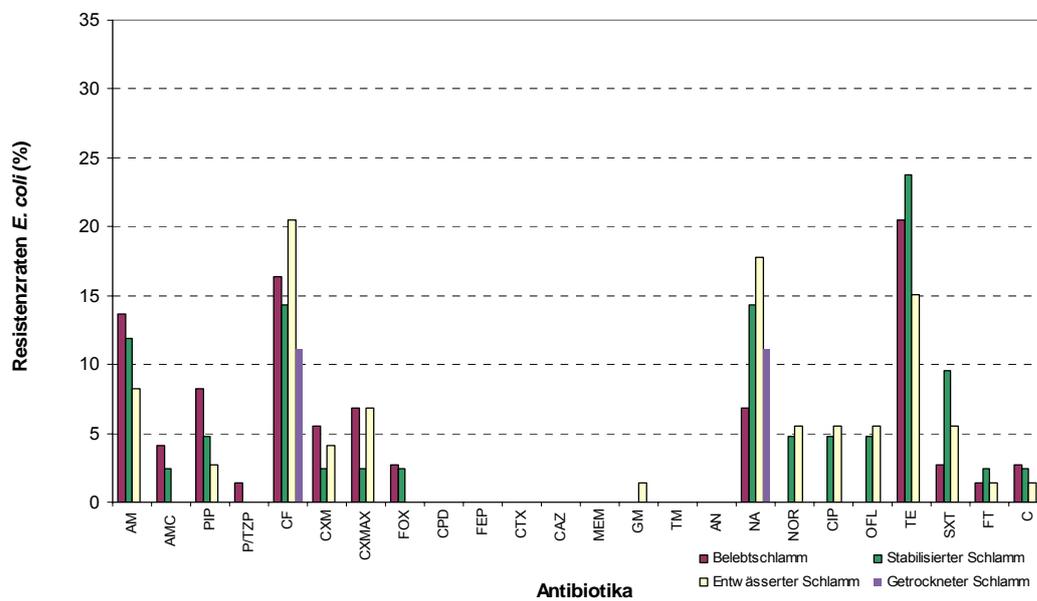


Abbildung 4: Resistenzraten von *E. coli* (%) der Anlage C

Kläranlage D:

Von den zwei untersuchten Klärschlammtypen zeigte sich in der Gruppe der Cephalosporine für CF die höchste Resistenzrate im Belebtschlamm mit 30,4% und für das Antibiotikum TE mit 23,9%. Im entwässerten gekalkten Schlamm wurden keine resistenten *E. coli* nachgewiesen (Tab. 8, Abb. 5).

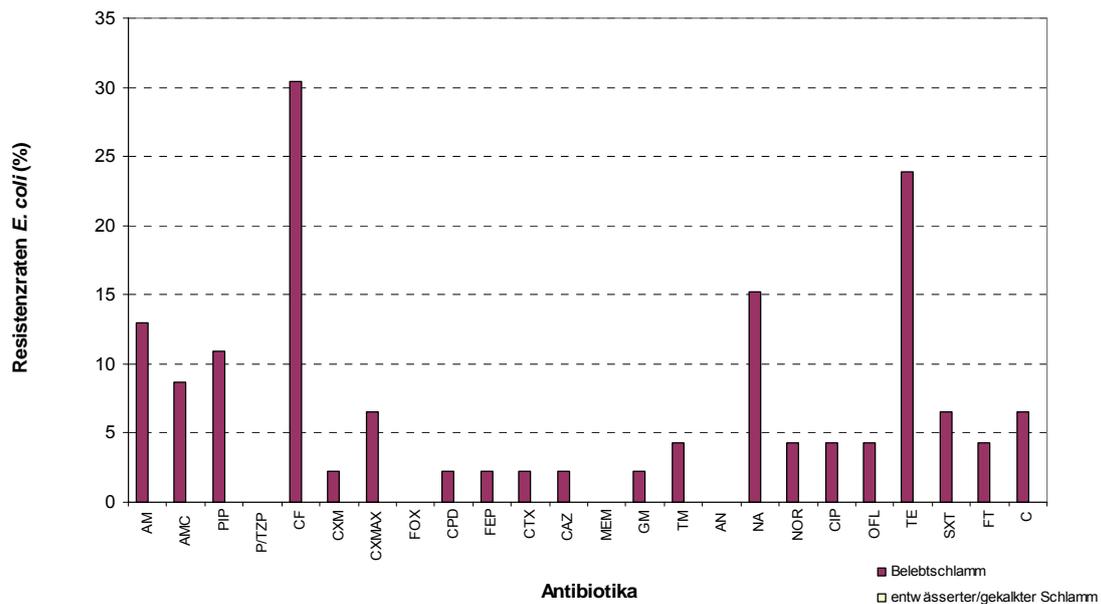


Abbildung 5: Resistenzraten von *E. coli* (%) der Anlage D

Kläranlage E:

Von den zwei untersuchten Klärschlammtypen hatte die Substanz TE den höchsten Anteil an resistenten Stämmen mit 29,3%. Der Anteil der resistenten Stämme betrug im nicht entwässerten, gekalkten Schlamm für das Penicillin AM 22,2% und für den Gyrasehemmer AN 16,7% (Tab. 8, Abb. 6).

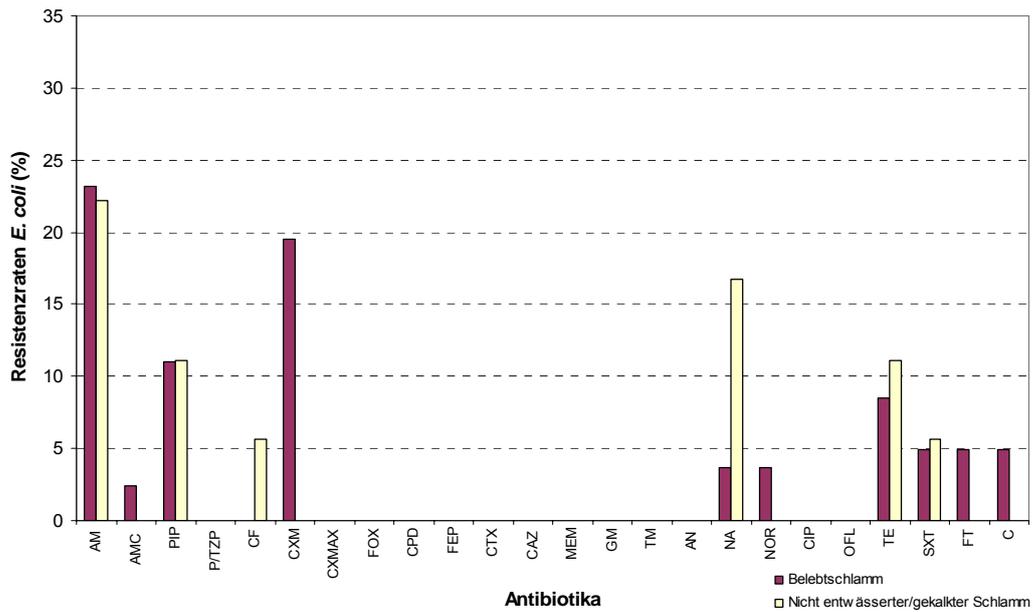


Abbildung 6: Resistenzraten von *E. coli* (%) der Anlage E

Tabelle 7: Resistenzraten von *E. coli* aus Klärschlamm nach Kläranlagen

		Resistenzraten der <i>E. coli</i> Isolate aus Klärschlamm [%]				
		KLÄRANLAGE				
SUB-STRAT-GRUPPE	ANTIBIOTIKUM	A [n=190]	B [n=169]	C [n=197]	D [n=52]	E [n=100]
Penicilline	AM	9,5	11,6	10,7	11,5	23,0
	AMC	2,6	3,0	2,0	7,7	2,0
	PIP	3,7	5,3	5,1	9,6	11,0
	P/TZP	1,1	0,6	0,5	0	0
Cephalosporine	CF	25,8	23,1	17,3	26,9	17,0
	CXM	2,6	3,0	4,1	1,9	0
	CXMAX	7,4	4,1	5,6	5,8	0
	FOX	1,1	0	1,5	0	0
	CPD	0,5	1,8	0	1,9	0
	FEP	0	1,2	0	1,9	0
	CTX	0	1,2	0	1,9	0
CAZ	0	1,2	0	1,9	0	
Carbapeneme	MEM	0	0	0	0	0
Aminoglycoside	GM	1,1	0	0,5	1,9	3,0
	TM	1,1	0,6	0	3,8	3,0
	AN	0	0	0	0	0
Gyrasehemmer	NA	8,9	7,1	12,7	13,5	10,0
	NOR	1,6	2,4	3,0	3,8	4,0
	CIP	1,6	1,8	3,0	3,8	4,0
	OFL	1,6	1,8	3,0	3,8	4,0
Andere	TE	17,9	13,0	18,3	21,2	26,0
	SXT	3,7	3,6	5,1	5,8	16,0
	FT	2,6	1,2	1,5	3,8	2,0
	C	5,3	0,6	2,0	5,8	4,0

AM= Ampicillin; AMC= Amoxicillin+Clavulansäure; PIP= Piperacillin; P/TZP= Piperacillin+Tazobactam; CF= Cefalothin; CXM= Cefuroxim; CXMAX= Cefuroxim-Axetil; FOX= Cefoxitin; CPD= Cefpodoxime; FEP= Cefepim; CTX= Cefotaxim; CAZ= Ceftazidim; MEM= Meropenem; GM= Gentamicin; TM= Tobramycin; AN= Amikacin; NA= Nalidixinsäure; NOR= Norfloxacin; CIP= Ciprofloxacin; OFL= Ofloxacin; TE= Tetracyclin; SXT= Sulfamethoxazol/Trimethoprim; FT= Nitrofurantoin; C= Chloramphenicol
resistent: „intermediär + resistent“ wurde in dieser Gruppe zusammengefasst betrachtet

Tabelle 8: Resistenzraten von *E. coli* aus Klärschlamm nach Klärschlammtyp und Kläranlage getrennt

		Resistenzraten der <i>E. coli</i> Isolate aus Klärschlamm [%]											
KLÄR-ANLAGE	A			B		C				D		E	
	1 [n=84]	2 [n=75]	3 [n=31]	1 [n=88]	3 [n=81]	1 [n=73]	2 [n=42]	3 [n=73]	4 [n=9]	1 [n=47]	6 [n=6]	1 [n=82]	5 [n=18]
<i>Penicilline</i>													
AM	8,3	12,0	6,5	9,1	14,8	13,7	11,9	8,2	0	13,0	0	23,2	22,2
AMC	0	5,3	3,2	2,3	3,7	4,1	2,4	0	0	8,7	0	2,4	0
PIP	1,2	6,7	3,2	3,4	7,4	8,2	4,8	2,7	0	10,9	0	11,0	11,1
P/TZP	0	2,7	0	0	1,2	1,4	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cephalosporine</i>													
CF	25,0	18,7	45,2	21,6	24,7	16,4	14,3	20,5	11,1	30,4	0	19,5	5,6
CXM	1,2	5,3	0	3,4	2,5	5,5	2,4	4,1	0	2,2	0	0	0
CXMAX	7,1	10,7	0	4,5	3,7	6,8	2,4	6,8	0	6,5	0	0	0
FOX	0	2,7	0	0	0	2,7	2,4	0	0	0	0	0	0
CPD	0	1,3	0	2,3	1,2	0	0	0	0	2,2	0	0	0
FEP	0	0	0	1,1	1,2	0	0	0	0	2,2	0	0	0
CTX	0	0	0	1,1	1,2	0	0	0	0	2,2	0	0	0
CAZ	0	0	0	2,3	0	0	0	0	0	2,2	0	0	0
<i>Carbapeneme</i>													
MEM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aminoglycoside</i>													
GM	2,4	0	0	0	0	0	0	1,4	0	2,2	0	3,7	0
TM	2,4	0	0	0	1,2	0	0	0	0	4,3	0	3,7	0
AN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Gyrasehemmer</i>													
NA	8,3	12,0	3,2	8,0	6,2	6,8	14,3	17,8	11,1	15,2	0	8,5	16,7
NOR	0	4,0	0	0	4,9	0	4,8	5,5	0	4,3	0	4,9	0
CIP	0	4,0	0	0	3,7	0	4,8	5,5	0	4,3	0	4,9	0
OFL	0	4,0	0	0	3,7	0	4,8	5,5	0	4,3	0	4,9	0
TE	15,5	20,0	19,4	9,1	17,3	20,5	23,8	15,1	0	23,9	0	29,3	11,1
SXT	2,4	5,3	3,2	3,4	3,7	2,7	9,5	5,5	0	6,5	0	18,3	5,6
FT	2,4	4,0	0	1,1	1,2	1,4	2,4	1,4	0	4,3	0	2,4	0
C	7,1	5,3	0	0	1,2	2,7	2,4	1,4	0	6,5	0	4,9	0

Schlammtyp: 1= Belebtschlamm; 2= Stabilisierter Schlamm; 3= Entwässerter Schlamm; 4= Getrockneter Schlamm; 5= Nicht entwässerter/gekalkter Schlamm; 6= Entwässerter/gekalkter Schlamm

AM= Ampicillin; AMC= Amoxicillin+Clavulansäure; PIP= Piperacillin; P/TZP= Piperacillin+Tazobactam; CF= Cefalothin; CXM= Cefuroxim; CXMAX= Cefuroxim-Axetil; FOX= Cefoxitin; CPD= Cefpodoxime; FEP= Cefepim; CTX= Cefotaxim; CAZ= Ceftazidim; MEM= Meropenem; GM= Gentamicin; TM= Tobramycin; AN= Amikacin; NA= Nalidixinsäure; NOR= Norfloxacin; CIP= Ciprofloxacin; OFL= Ofloxacin; TE= Tetracyclin; SXT= Sulfamethoxazol/Trimethoprim; FT= Nitrofurantoin; C= Chloramphenicol

resistent: „intermediär + resistent“ wurde in dieser Gruppe zusammengefasst betrachtet

4.2.5 Regressionsmodell zur Beschreibung des Resistenzverhaltens

Betrachtet man das Resistenzverhalten der Antibiotika mit einem multiplen Regressionsmodell für die 5 Kläranlagen, so ergeben sich für die Antibiotika AM, CXMAX, GM, TM, SXT und C signifikante Unterschiede hinsichtlich des Anlagenstandortes. Für das Antibiotikum CF zeigt sich im Modell ein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Klärschlammtyp. Das Antibiotikum AN wurde in diesen Modellen nicht berücksichtigt, da ausschließlich sensible Reaktionen vorlagen (Tab. 9).

Tabelle 9: Standort- und Klärschlammtypspezifische Resistenzwahrscheinlichkeiten in Prozent

Antibiotikum	Anlagenstandort	Klärschlammtyp
Penicilline		
AM	1,7	28,1
AMC	45,5	68,0
PIP	7,6	65,7
P/TZP	86,5	86,0
Cephalosporine		
CF	19,0	4,7
CXM	14,1	72,0
CXMAX	1,2	39,9
FOX	30,2	17,7
CPD	13,6	98,7
FEP	16,0	84,5
CTX	12,7	92,1
CAZ	16,0	39,9
Carbapeneme		
MEM	41,9	93,7
Aminoglycoside		
GM	5,3	34,1
TM	2,2	24,4
Gyrasehemmer		
NA	39,5	60,8
NOR	73,7	27,7
CIP	65,0	36,8
OFL	65,0	36,8
TE	8,9	15,6
SXT	0,2	65,2
FT	66,9	61,9
C	4,4	23,3

Signifikante Resistenzwahrscheinlichkeiten liegen bei $\leq 5\%$.

AM= Ampicillin; AMC= Amoxicillin+Clavulansäure; PIP= Piperacillin; P/TZP= Piperacillin+Tazobactam; CF= Cefalothin; CXM= Cefuroxim; CXMAX= Cefuroxim-Axetil; FOX= Cefoxitin; CPD= Cefpodoxime; FEP= Cefepim; CTX= Cefotaxim; CAZ= Ceftazidim; MEM= Meropenem; GM= Gentamicin; TM= Tobramycin; AN= Amikacin; NA= Nalidixinsäure; NOR= Norfloxacin; CIP= Ciprofloxacin; OFL= Ofloxacin; TE= Tetracyclin; SXT= Sulfamethoxazol/Trimethoprim; FT= Nitrofurantoin; C= Chloramphenicol

4.3 ESBL-Nachweis in Klärschlammproben

Von den 110 untersuchten Klärschlammproben konnten in 76 (69,1%) Proben ESBL-positive *E.coli*-Stämme nachgewiesen werden. Aus diesen 76 ESBL-positiven Klärschlammproben wurden von den Screeningplatten insgesamt 95 ESBL positive *E. coli*-Stämme isoliert.

Bezogen auf die unterschiedlichen Klärschlammtypen konnten ESBL-positive Proben in 36 von 42 Belebtschlammproben, in 13 von 17 stabilisierten Klärschlämmen, in 24 von 33 entwässerten Schlämmen und in 3 von 9 nicht entwässerten/gekalkten Schlämmen nachgewiesen werden (Tab. 10).

Tabelle 10: ESBL-Nachweis in Klärschlammproben

Klärschlammtyp	n= Anzahl der untersuchten Klärschlamm-Proben	n= ESBL-positive Klärschlamm-Proben (%)
Belebung	42	20 (85,7)
stabilisiert	17	13 (76,5)
entwässert	33	24 (72,7)
nicht entwässert	9	3 (33,3)
getrocknet	9	0
Gesamt	110	76 (69,1)

Insgesamt wurde die Bestimmung der Beta-Lactamase-Gruppen bei 50 der 95 isolierten Stämme durchgeführt. Es konnten bei diesen ESBL *E. coli* Stämmen drei unterschiedliche Gruppen (CTX-M, TEM und SHV) von bla Genen nachgewiesen werden. Von den untersuchten 50 ESBL *E. coli* Stämmen trugen 44 ein CTX-M Gen, (CTX-M-1, CTX-M-3 oder CTX-M-15). 22 dieser Stämme trugen darüber hinaus auch das TEM-1 Gen, welches selbst (im Gegensatz zu den meisten TEM Genen) keine ESBL Beta-Lactamase ist.

Bei einem Stamm konnte ein SHV-15 Gen nachgewiesen werden und bei 5 Stämmen wurde kein PCR Produkt für eine der untersuchten Gruppen gefunden.

5 DISKUSSION

5.1 Vergleich der Keimkonzentrationen (KBE/g)

In der vorliegenden Studie sollte unter anderem die Abnahme der Keimzahl von *E. coli* Bakterien im Verlauf der Klärschlammbehandlung kommunaler Kläranlagen untersucht werden. Es sollten durch die quantitative Erfassung von *E. coli* und coliformen Keimen die unterschiedlichen Verfahren der Kläranlagen verglichen werden, bei welchen durch Einhaltung der richtigen Prozessbedingungen eine Entseuchung des Klärschlammes sichergestellt wird. In den Anlagen A, B und C erfolgt die Entwässerung des Klärschlammes ohne Zugabe von Kalk. Hier konnte zwischen Belebtschlamm und entwässerten Schlamm keine signifikante Reduktion der Keimkonzentration von *E. coli* festgestellt werden. In Anlage A konnten *E. coli* im Belebtschlamm mit einem Median von $5,0 \times 10^3$ KBE/g ermittelt werden. Im stabilisierten Schlamm konnte, bedingt durch den Wasserentzug, ein Anstieg der *E. coli* Bakterien auf $7,8 \times 10^3$ KBE/g (Median) Schlamm verzeichnet werden. Im entwässerten Klärschlamm konnte eine Reduktion um eine log-Stufe der *E. coli* auf $4,0 \times 10^2$ KBE/g (Median) Schlamm verzeichnet werden. In den Anlagen B und C konnte nur eine 2 bzw. 1,5 fache *E. coli* Keimreduktion vom Belebtschlamm zum entwässerten Schlamm beobachtet werden. In Anlage C erfolgt eine Entseuchung des Klärschlammes durch einen abschließenden thermophilen Trocknungsschritt, bei welchem der entwässerte Klärschlamm auf eine Trockensubstanz von ca. 90% gebracht wird. Wie zu erwarten, konnten keine *E. coli* pro Gramm getrockneten Klärschlamm (Median) in der Anlage C gefunden werden. Die ermittelten Maximalwerte für *E. coli* von $3,6 \times 10^2$ KBE/g getrocknetem Schlamm lassen sich durch eine einmalige Entnahme des angesammelten getrockneten Schlammes im äußeren Bereich des Abführrohres erklären, da in diesem Bereich eine Rekontamination des hygienisierten Klärschlammes erfolgen kann. Diese Rekontamination scheint keine Auswirkungen auf das Endprodukt zu haben. In Anlage D wird der stabilisierte Klärschlamm vor der Entwässerung mit Kalkmilch vermischt. Dadurch wird eine Entseuchung des entwässerten Klärschlammes erreicht. Im Belebtschlamm der Anlage D konnten von den

E. coli $3,8 \times 10^3$ KBE/g (Median) Schlamm nachgewiesen werden, während im gekalkten/entwässerten Schlamm keine *E. coli* gefunden wurden.

In der Anlage E wird dem stabilisierten Klärschlamm ebenfalls Kalkmilch zugesetzt, hier erfolgt aber keine Entwässerung des Schlammes. In der Anlage E konnte eine Reduktion der *E. coli* Bakterien von $1,6 \times 10^4$ KBE/g Belebtschlamm (Median) auf 0 KBE/g flüssigen/gekalkten (Median) Schlamm festgestellt werden. Die biologische Stabilisierung führt bekannterweise zu einer Verminderung der Geruchsentwicklung und zu einer Homogenisierung des Materials. Durch die Zugabe von Kalk erfolgt in erster Linie eine Verfestigung des Materials. Gleichermaßen wird, wie die Untersuchungen zeigen, eine effektive Reduktion der Keime im Klärschlamm herbeigeführt (Bina et al., 2004; Strauch et al., 1999).

5.2 Resistenzsituation von *E. coli*

Aus der Literatur ist bekannt, dass urbanes Abwasser zum Teil einen hohen Gehalt an antibiotikaresistenten Keimen aufweist (Kümmerer et al., 2009, 2004; Goni-Urriza et al., 2000; Halling-Sorensen et al., 1998; Fernandez-Astorga et al., 1992).

Die Resistenzraten von *E. coli* im Abwasser und Klärschlamm stehen in direktem Zusammenhang mit der Resistenzsituation im klinischen Bereich. Im Resistenzbericht 2009 wurden die Resistenzdaten für *E. coli* und anderen wichtigen Bakterien aus Probenmaterial des Universitätsklinikums Graz, privaten und öffentlichen steirischen Krankenanstalten sowie niedergelassenen ÄrztInnen und FachärztInnen erhoben (Feierl u. Buzina, 2010). Im klinischen Bereich hat sich die Resistenzlage 2009 für die meisten Substanzgruppen im Vergleich zum Jahr 2000 erhöht. Die höchsten Raten wurden für die Antibiotika CF (21,6%), SXT (13,7%) und TE (20,1%) ermittelt (Anhang Tabelle I).

Vergleicht man die Resistenzraten der Substanzgruppen aus dem klinischen Bereich mit jenen aus dem Abwasser bzw. Klärschlamm der Kläranlagen, so zeigen sich auch hier hohe Raten im entwässerten Schlamm für CF von 20,5% bis zu 45,2% und für TE von 15,1% bis 19,4%. Für die Substanz SXT konnten

im entwässerten Klärschlamm bis zu 5,5% resistente *E. coli* gefunden werden, die eine um das 2,5 fache niedrigere Resistenzrate als die *E. coli* aus dem klinischen Bereich aufwiesen.

Es konnte auch festgestellt werden, dass für einige Substanzen wie CF, TE, NA und SXT beim Durchlaufen der Klärschlammbehandlungsstufen ein Anstieg der Resistenzraten zu erkennen war. In den Anlagen, die ihre Klärschlämme durch Kalkzugabe oder durch Trocknung hygienisierten, konnten im Vergleich zu den anderen Anlagen geringe bis keine Resistenzraten von *E. coli* festgestellt werden, da durch die Hygienisierung die Keimkonzentrationen von *E. coli* sehr stark reduziert wurden.

Vergleicht man Anlage A, die Klärschlamm landwirtschaftlich verwertet und Anlage B, die Klärschlamm der Deponierung zuführt, so zeigt sich, dass die entwässerten Schlämme der Anlage B häufiger Resistenzen gegen Cephalosporine und Gyrasehemmer aufwiesen.

Der Vergleich von Klärschlamm und Gülle in Bezug auf vorhandene Antibiotikaresistenzen von *E. coli* wird in einer Studie von Hölzel et al. (2010) diskutiert. Isolierte *E. coli* aus der Gülle zeigten signifikant höhere Resistenzraten für zwei Aminoglycoside, einem Tetracyclin, Chloramphenicol und Trimethoprim/Sulfamethoxazol. Im Klärschlamm wurden höhere Resistenzraten für Piperacillin/Tazobactam und Cefalosporinen ermittelt. Grundsätzlich gilt Gülle als hygienisch unbedenklich solange im Bestand keine anzeigepflichtigen Seuchen (z.B. Brucellose, Maul- und Klauenseuche, Schweinepest etc.) auftreten. Wird der Klärschlamm nach entsprechenden Hygienisierungsmaßnahmen als seuchenhygienisch unbedenklich eingestuft, kann eine landwirtschaftliche Verwertung erfolgen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass insbesondere durch Kalkung und Entwässerung des Klärschlammes eine völlige Reduktion der untersuchten *E. coli* und coliformen Erreger und damit auch eine Reduktion der resistenten Mikroorganismen stattfindet.

5.3 ESBL-Nachweis

In Bezug auf die Resistenzsituation im medizinischen und auch im kommunalen Bereich stellen in letzter Zeit die Zunahme der ESBL produzierenden Erreger ein besonderes Problem dar. Die Verbreitung von ESBL beim Menschen ist international unterschiedlich. Hohe Prävalenzen mit bis 55% der *Klebsiella pneumoniae* und 10% der *E. coli* produzieren ESBL werden aus Südamerika berichtet (Gales et al., 2002).

Die Prävalenz beträgt in Frankreich, Italien und Portugal 20–30%, in Skandinavien, Spanien, den Niederlanden und Deutschland ist sie deutlich niedriger und in Österreich liegt sie mit 5–10% im europäischen Mittelfeld (EARSS, 2008).

Insgesamt sind die ESBL-Inzidenzen jedoch weltweit steigend. Risikofaktoren sind lange Spitalsaufenthalte, Aufenthalte auf einer Intensivstation, schwere Grunderkrankung, Intubation, Harnwegs- oder Gefäßkatheterisation und wiederholte Antibiotikagabe, besonders von Cephalosporinen der dritten oder vierten Generation. Auch im ambulanten Bereich ist ESBL mittlerweile ein relevantes Problem aufgrund häufiger Verordnungen von Chinolonen und 3.-Generations-Cephalosporinen im niedergelassenen Bereich.

Für die Identifikation ESBL positiver Stämme sollten bei Resistenzuntersuchungen immer ESBL-Screening-Nährmedien mitgeführt werden, da nur mit diesem zusätzlichen Schritt eine sichere Identifikation möglich ist.

In unseren Untersuchungen konnten wir bei drei von 14 Stämmen mit einem CTX-M-Gen auch weitere Gene nachweisen. Dass ESBL vermittelnde Plasmide mehr als ein β Lactamase-Gen (wie CTX-M und TEM) tragen können ist in der Literatur beschrieben (Woodford et al., 2009) und könnte für high level β -Lactamase-Resistenzphänotypen verantwortlich sein (Kiratisin et al., 2008).

Die TEM β -Lactamasen sind schon relativ lang als ESBL bildende Gruppe von β Lactamasen bekannt. Über 100 unterschiedliche TEM Derivate sind zurzeit bekannt, viele davon sind ESBLs. CTX-M basiertes ESBL ist im letzten Jahrzehnt zur dominanten Gruppe unter den ESBL Genfamilien weltweit geworden (mit Ausnahme von Nordamerika) und hat die früher am häufigsten vorkommenden Typen aus der Gruppe der TEM und SHV β -Lactamasen verdrängt. (Livermore et al., 2007). Ein Trend, der auch in den letzten Jahren in

Europa zu beobachten ist (Eisner et al., 2006; Paterson u. Bonomo, 2005). Auch in der hier vorliegenden Studie stellten die CTX-M β -Lactamasen die größte Gruppe der gefundenen plasmidcodierten β -Lactamase-Gene dar. Innerhalb dieser 44 Stämme kommen nur 3 unterschiedliche Gene vor (CTX-M-1, CTX-M-3 und CTX-M-15), wobei das weltweit häufigste vorkommende CTX-M-15 auch in den *E.coli* aus den Klärschlammproben dominiert (Pitout u. Laupland, 2008). In einem Klon wurde ein SHV-15 ESBL Gen nachgewiesen.

Aus der Gruppe der TEM Beta Lactamasen wurde kein einziges ESBL bildendes Gen gefunden. Sehr wohl aber TEM-1, welches eine der weit verbreitetsten Beta Lactamasen in gramnegativen Organismen ist und auch häufig mit ESBL vermittelnden Genen vorkommt (Bradford, 2001). Alle 3 CTX-M Gene wurden sowohl mit als auch ohne Gegenwart von TEM-1 beobachtet. Der einzige Stamm mit SHV-15 enthielt hingegen kein TEM-1.

Leider fehlen in Österreich Daten über Verbreitung der ESBL Gene im Humanbereich, so dass kein direkter Vergleich mit den Klärschlammproben gezogen werden kann.

ESBL-produzierende Enterobacteriaceae werden auch immer zahlreicher in Umweltproben gefunden. Mesa et al. (2006) fanden sie in zahlreichen Umweltproben aus Tierstallungen (Schweine, Hühner und Hasen) und konnten diese Erreger auch aus 5 Klärschlammproben isolieren.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass ESBL-produzierende *E. coli* im Klärschlamm ubiquitär vorkommen und dieser ein wichtiges Reservoir für diese Erreger in der Umwelt darstellt. Eine weitere Verbreitung ist vor allem aus jenen Kläranlagen zu erwarten, die lediglich eine Entwässerung ohne nachfolgende Kalkbehandlung durchführen und diese Klärschlämme einer landwirtschaftlichen Verwertung zuführen.

Die Übertragung antibiotikaresistenter Bakterien auf den Menschen könnte dann z.B. über die pflanzliche Nahrung erfolgen, wenn z.B. Belebtschlamm auf die Felder ausgebracht wird (Corpet, 1988; Wegener, 2003).

5.4 Zusammenfassende Bewertung

Neben der aeroben Schlammstabilisierung, der anaeroben Schlammfäulung und der Kalkung von Klärschlamm werden noch weitere Verfahren zur Behandlung von Klärschlamm eingesetzt. Die Kalkung von Klärschlamm stellt eine kosteneffektive Alternative zur anaeroben und aeroben Stabilisierung dar.

In der Steiermark darf grundsätzlich die Aufbringung von Klärschlamm auf geeignete landwirtschaftliche Böden nur dann erfolgen, wenn der Klärschlamm als „seuchenhygienisch unbedenklich“ eingestuft wurde. In Bezug auf die mikrobiologische Qualität ist im Untersuchungsgebiet (Steiermark) Klärschlamm seuchenhygienisch unbedenklich, wenn in 1 g Schlamm nicht mehr als 100 *E. coli* nachweisbar sind, 1 g Schlamm frei von Salmonellen ist und keine ansteckungsfähigen Wurmeier vorhanden sind. Erst dann wird die Ausbringung des Klärschlammes auf landwirtschaftliche Nutzflächen genehmigt.

Mit der vorliegenden Studie sollte zusätzlich der Faktor der Resistenzentwicklung bzw. die Zunahme von resistenten Erregern in der Umwelt berücksichtigt werden.

- Die vorliegenden Klärschlammuntersuchungen ergaben, dass durch Kalkbehandlung und Entwässerung des Klärschlammes eine Reduktion der untersuchten *E. coli* und coliformen Erreger und damit auch eine Reduktion der resistenten Mikroorganismen stattfindet.
- In nicht entwässertem/gekalktem Klärschlamm konnten unterschiedliche Mengen an resistenten *E. coli*-Stämmen nachgewiesen werden. Sollten Klärschlämme nach Anwendung dieses Verfahrens einer landwirtschaftlichen Verwertung zugeführt werden, müssen die entsprechenden Kalkungsparameter (Kalkhydratsuspension/m³ Klärschlamm, pH-Wert Verschiebung >12, Inkubationsdauer) überprüft werden, um eine effektive Keimreduktion zu erzielen.

- Die thermische Trocknung von Klärschlamm stellt ebenfalls ein weitgehend sicheres Verfahren zur Klärschlammhygienisierung dar. Es lässt sich daraus ein seuchenhygienisch unbedenkliches, leicht transportfähiges, granuliertes Endprodukt herstellen.
- Aufgrund der in diesen Untersuchungen beobachteten Resistenzsituationen sollte die Aufbringung von als „seuchenhygienisch unbedenklich“ eingestuftem entwässertem Klärschlamm ohne Kalkbehandlung grundsätzlich hinterfragt werden, da der entwässerte Klärschlamm im Vergleich zum gekalkten/entwässerten Schlamm eine höhere Belastung an resistenten *E. coli* aufweist.
- Ein weiterer Forschungsbedarf besteht im Zusammenhang mit der Frage der Verbreitung von resistenten Mikroorganismen bei der unmittelbaren Einarbeitung von nicht hygienisiertem Klärschlamm in den Boden für Feldfutterpflanzen und auf Ackerland sowie auf Rekultivierungsflächen. [(siehe Anwendungsempfehlungen im ÖWAV-Regelblatt 17 (Kap.3)].
- Inwieweit eine völlige Eliminierung von Fäkalkeimen aus dem Klärschlamm im Zusammenhang mit der Resistenzproblematik eine berechtigte Forderung darstellt, müssen weitere Untersuchungen klären. **Aufgrund der raschen Zunahme von Resistenzen in den letzten Jahren sollte jedoch präventiv die landwirtschaftliche Nutzung von unbehandeltem Klärschlamm generell verboten werden** und neben der thermischen Behandlung jener durch Entwässerung und entsprechender Kalkung der Vorzug gegeben werden.

6 LITERATUR

Arthurson, V. (2008) Proper sanitization of sewage sludge: a critical issue for a sustainable society. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(17), 5267-5275.

Bina, B., Movahedian, H., Kord, I. (2004) The effect of Lime Stabilization on the Microbiological Quality of Sewage Sludge. *Iranian J Env Health Sci Eng* 1, 34-38.

Biomerieux Vitek. (1998) Inc Online Produktinformation, Überarbeitung 06-98, B.

CLSI, (2008) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; M100-S18. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. Eighteenth Informational Supplement, 28(1), 162-163.

Corpet, D.E. (1988) Antibiotic resistance from food. *N. Engl. J. Med.* 318(18), 1206-1207.

Czechowski, F., Marcinkowski, T. (2006) Sewage sludge stabilisation with calcium hydroxide: effect on physicochemical properties and molecular composition. *Water Res.* 40(9), 1895-1905.

EARSS, (2008) European Antimicrobial Resistance Surveillance System; Annual Report: <http://www.rivm.nl/earss>

Eisner, A., Fagan, E.J., Feierl, G., Kessler, H.H., Marth, E., Livermore, D.M., Woodford, N. (2006) Emergence of Enterobacteriaceae isolates producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamase in Austria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(2), 785-787.

Feierl G., Buzina W. (2010) Resistenzbericht 2009. Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin der Medizinischen Universität Graz

Fernandez-Astorga A., Muela A., Cisterna R., Iriberrí J., Barcina I. (1992) Biotic and abiotic factors affecting plasmid transfer in *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Mikrobiol.* 58, 392-398.

Feuerpfeil I., Lopez-Pila J., Schmitz R., Schneider E., Szewzyk R. (1999) Antibiotikaresistente Bakterien und Antibiotika in der Umwelt. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz.* 1/99, 37-50.

Fontaine T.D., Hoadley A.W. (1976) Transferable drug resistance associated with coliforms isolated from hospital and domestic sewage. *Health Lab Sci.* 13, 238-245.

Gales, A.C., Sader, H.S., Jones, R.N., SENTRY Participants Group (Latin America) (2002) Urinary tract infection trends in Latin American hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2000). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 44(3), 289-299.

Grabow W.O.K., Prozesky O.W. (1973) Drug resistance of coliform bacteria in hospital and city sewage. *Antimicrobial Agents and Chemotherapie.* 3, 175-180.

Goni-Urriza M., Capdepuý M., Arpin C., Raymond N., Caumette P., Quentin C. (2000) Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine Enterobacteriaceae and *Aeromonas* spp. *Appl Environ Mikrobiol.* 66, 125-132.

Guardabassi L., Petersen A., Olsen J.E., Dalsgaard A. (1998) Antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. Isolated from sewers receiving waste effluent from a hospital and a pharmaceutical plant. *Appl Environ Mikrobiol.* 64, 3499-3502.

Haas D.U. (1995) Seuchenhygienische Untersuchung von Klärschlamm mittels Nachweis von Salmonellen und fäkalcoliformen Keimen. Diplomarbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Karl Franzens Univ. Graz.

Halling-Sorensen B., Nors-Nielsens, Lanzky P.F., Ingerslev F., Holten-Lützhof H.C., Jorgensen S.E. (1998) Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- a review. *Chemosphere.* 36, 357-393.

Heier H. (1983) Über das Vorkommen von R-Plasmiden in *Escherichia coli* und koliformen Keimen aus Wasser und Abwasser. Teil 1: Einführung und Bedeutung der übertragbaren Chemotherapeutikaresistenz bei gramnegativen Keimen aus Wasser und Abwasser *Acta hydrochim et hydrobiol.* 11, 623-629.

Hölzl C.S., Schwaiger K., Harms K., Küchenhoff H., Kunz A., Meyer K., Müller C., Bauer J. (2010) Sewage sludge and liquid pig manure as possible sources of antibiotic resistant bacteria. *Environment Research* 2010 Mar 18. [Epub ahead of print]

Jepsen, S.E., Krause, M., Gruttner, H. (1997) Reduction of faecal streptococcus and *Salmonella* by selected treatment methods for sludge and organic waste. *Water Sci. Technol.* 36, 203-210.

Kassner, W. (1990) Künftige Entwicklung der Klärschlamm Entsorgung - Szenario 2000. *Korrespondenz Abwasser* 37, 1011- 1020.

Kiratisin, P., Apisarnthanarak, A., Laesripa, C., Saifon, P. (2008) Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52(8), 2818-2824.

Kümmerer, K. (2009) The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use-- present knowledge and future challenges. *J. Environ. Manage.* 90(8), 2354-2366.

Kümmerer, K. (2004) Resistance in the environment. *J. Antimicrob. Chemother.* 54(2), 311-320.

Livermore, D.M.; Canton, R.; Gniadkowski, M.; Nordmann, P.; Rossolini, G.M.; Arlet, G.; Ayala, J.; Coque, T.M.; Kern-Zdanowicz, I.; Luzzaro, F.; Poirel, L.; Woodford, N. (2007) CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* 59(2), 165-174.

Marcinek H., Wirth R., Muscholl-Silberhorn A., Gauer M. (1998) *Enterococcus faecalis* gene transfer under natural conditions in municipal sewage water treatment plants. *Appl Environ Mikrobiol.* 64, 626-632.

Mascher F., Haas D., Stuhlbacher A., Marth E., Pichler-Semmelrock F.P., Köck M., Feierl G. (1996) Abwasserreinigung unter dem Aspekt der Elimination seuchenhygienisch relevanter Mikroorganismen. *Österreichische Wasser- und Abfallwirtschaft. Sonderabdruck aus Jahrgang* 48(11/12), 313-319.

Mesa, R.J., Blanc, V., Blanch, A.R., Cortes, P., Gonzalez, J.J., Lavilla, S., Miro, E., Muniesa, M., Saco, M., Tortola, M.T., Mirelis, B., Coll, P., Lagostera, M., Prats, G., Navarro, F. (2006) Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J. Antimicrob. Chemother.* 58(1), 211-215.

Möller, J., Scholl, W., Schmidt, K. (1988) Ein einfaches, thermisches Verfahren zur Seuchenhygienisierung von Klärschlamm mittels einer neu entwickelten Rottetrommel. Korrespondenz Abwasser 35, 456-461.

Möller, U. (1988) Entseuchung von Klärschlamm - Eine Standortbestimmung 1987, Bochum. Korrespondenz Abwasser 35, 24-30.

Müller, P. (2004) Das Vorkommen antibiotikaresistenter *E. coli* Stämme in Oberflächen und Brunnenwasser. Diplomarbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Karl Franzens Universität Graz

Neubauer, C., Öhlinger, A. (2006) Ist-Stand der Mechanisch-Biologischen Abfallbehandlung in Österreich – Zustandsbericht 2006. Umweltbundesamt GmbH Wien, Rep-0071, 52-59.

Oates, J.A. (1998) Lime and limestone: chemistry and technology, production and use. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany.

Oxid Handbuch. 1993. 5. aktualisierte deutsche Auflage. Verlag R. Meyer.

Paterson, D.L., Bonomo, R.A. (2005) Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin. Microbiol. Rev. 18(4), 657-686.

Perreten, V., Schwarz, F., Cresta, L., Boeglin, M., Dasen, G., Teuber, M. (1997) Antibiotic resistance spread in food. Nature 389(6653), 801-802.

Peschen, N., Matthes, B., Schuster, G., Wolf, P. (1985) Hinweise zur Technik der Nachbehandlung von Klärschlamm mit Feinkalk. Köln, München, Regensburg und Kassel. Korrespondenz Abwasser 32, 1076-1079.

Pitout, J.D.D., Laupland, K.B. (2008) Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. The Lancet Infectious Diseases 8(3), 159-166.

Reinhofer, M., Stuhlbacher, A., (2003) Die Hygienisierung von Klärschlämmen aus Kleinkläranlagen mit Kalk. Joanneum Research, Projekt im Auftrag des Landeshygienikers für Steiermark, Amt der Steiermärkischen Landesregierung

Reinthaler, F.F., Posch, J., Feierl, G., Wust, G., Haas, D., Ruckenbauer, G., Mascher, F., Marth, E. (2003) Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. Water Res. 37(8), 1685-1690.

Salyers, A.A. (2002) An overview of the genetic basis of antibiotic resistance in bacteria and its implications for agriculture. Anim. Biotechnol. 13(1), 1-5.

Silva, J., Castillo, G., Callejas, L., Lopez, H., Olmos, J. (2006) Frequency of transferable multiple antibiotic resistance amongst coliform bacteria isolated from a treated sewage effluent in Antofagasta, Chile, Electronic Journal of Biotechnology 5(9), 533-540.

Steiermärkische Klärschlammverordnung 2007 (Verordnung der Steiermärkischen Landesregierung vom 8. Oktober 2007, über die Aufbringung von Klärschlamm auf landwirtschaftlichen Böden) LGBl. Nr. 89/2007 i.d.g.F.

Steiermärkisches landwirtschaftliches Bodenschutzgesetz (Gesetz vom 2. Juni 1987 zum Schutz landwirtschaftlicher Böden), LGBl. Nr. 66/1987 i.d.g.F.

Stelzer W., Ziegert E. (1988) Das Vorkommen von antibiotikaresistenten Koliformen im Abwasser einer Kläranlage. Zentralbl Mikrobiol. 143, 415-423.

Strauch, D. (1999) Improvements of the quality of sludge: microbial aspects, In: A. H. Dirkszawger and P. L. Hermitc (ed.), Sewage sludge treatment and use. Elsevier, London, 160-169.

Strauch, D. (1998) Pathogenic micro-organisms in sludge. Anaerobic digestion and disinfection methods to make sludge usable as fertiliser. *European Water Management* 1(2), 12-26.

Teuber, M. (1999) Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. *Cell Mol. Life Sci.* 56(9-10), 755-763.

Wegener, H. C. (2003) Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Curr. Opin. Microbiol.* 6(5), 439-445.

WHO. (1983) Control of antibiotic-resistant bacteria: Memorandum from a WHO-Meeting. *Bull. WHO.* 61, 423-493.

Wiedemann B. (1992) Aus: Burkhardt F., *Mikrobiologische Diagnostik.* Georg Thieme Verlag.

Witte W., Klare I. (1999) Antibiotikaresistenz bei bakteriellen Infektionserregern. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz.* Springer-Verlag. 42, 8-16.

Woodford, N., Carattoli, A., Karisik, E., Underwood, A., Ellington, M.J., Livermore, D.M. (2009) Complete nucleotide sequences of plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, encoding CTX-M enzymes in three major *Escherichia coli* lineages from the United Kingdom, all belonging to the international O25:H4-ST131 clone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53(10), 4472-4482.

Zhang, X.X., Zhang, T., Fang, H.H. (2009) Antibiotic resistance genes in water environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82(3), 397-414.

7 ANHANG

Klärschlammbehandlungsverfahren

1. Aerobe Schlammstabilisierung

Bei der Schlammstabilisierung sollen die organischen, geruchsbildenden Inhaltsstoffe reduziert werden. Weitere Ziele stellen die Verringerung der Schlammfeststoffe, die Verbesserung der Entwässerbarkeit und die Verminderung von Krankheitserregern dar.

Man unterscheidet die:

- simultane aerobe Schlammstabilisierung
- getrennte aerobe Schlammstabilisierung bei Normaltemperatur
- aerob-thermophile Schlammstabilisierung (ATS)
- aerob-thermophile Schlammstabilisierung mit anschließender Faulung

Simultan aerobe Schlammstabilisierung

Die simultan aerobe Schlammstabilisierung erfolgt gemeinsam mit der biologischen Abwasserreinigung, bei der unter guter Belüftung bzw. Sauerstoffzufuhr Biomasse abgebaut wird. Dabei entsteht eine geringe Menge an Überschussschlamm. Die Mikroorganismen enthalten keine gespeicherten Reservestoffe mehr und die Fäulnisorganismen haben nur geringe Entwicklungsmöglichkeiten. Ein Nachteil dieses Stabilisierungsverfahren liegt in der schlechten Entwässerbarkeit der so behandelten Schlämme.

Getrennte aerobe Schlammstabilisierung

Bei der getrennten aeroben Schlammstabilisierung werden der Primär- und Überschussschlamm einer normal belasteten Kläranlage mehrere Tage lang in einem separaten Stabilisierungsbecken belüftet. In dieser Zeit werden die organischen Stoffe des Schlammes durch aerobe Stoffwechselprozesse abgebaut. Einmal pro Tag wird dabei die Belüftung für wenige Stunden abgestellt, so dass der Schlamm sedimentieren kann.

Die getrennte aerobe Stabilisierung wird nicht häufig angewandt, da sich bei kleineren Anlagen die simultane aerobe Schlammstabilisation durchgesetzt hat. Bei großen Klärwerken hat sich das Verfahren der aerob-thermophilen Stabilisierung (ATS) bewährt.

Aerob-thermophile Schlammstabilisierung (ATS)

Im ATS-Prozess treten bei Sauerstoffzufuhr infolge exothermer mikrobieller Abbau- und Stoffwechselfvorgänge eine Erwärmung (30-38 °C) und eine pH-Werterhöhung auf pH 8 im Klärschlamm auf. Voraussetzung ist die richtige Zufuhr von Sauerstoff, eine gute Wärmedämmung des Reaktionsbehälters und die ausreichende Konzentration der Klärschlammmasse. Die Aufenthaltszeit sollte mindestens 5 Tage betragen, da sonst eine ausreichende Hygienisierung nicht gewährleistet ist (Jepsen et al., 1997).

Aerob-thermophile Schlammbehandlung mit anschließender Faulung

In der ersten Stufe wird der Schlamm durch ausreichende Temperaturen (50-60 °C) entseucht. In der anschließenden zweiten Stufe wird die anaerobe mesophile und thermophile Stabilisierung erreicht. Bei diesem 2-stufigen Verfahren gilt der behandelte Klärschlamm als seuchenhygienisch unbedenklich, wenn das vorgeschriebene Verfahren eingehalten wird. Olsen und Larsen (1987) zeigten, dass eine aerob-thermophile Schlammbehandlung innerhalb von 24 Stunden eine Inaktivierung von Salmonellen und Mykobakterien herbeiführt.

2. Anaerobe Schlammstabilisierung

Anaerobe Schlammstabilisierung (Schlammfaulung)

Die anaerobe Schlammstabilisierung ist unter dem Begriff der Faulung bekannt, und findet in sog. Faulbehältern statt. Der in Form von Kohlehydraten, Proteinen und Fetten vorliegende Energiegehalt des Rohschlammes soll dabei weitgehend unter Luft- bzw. Sauerstoffabschluss abgebaut werden. Dabei setzen die Bakterien die Biomasse im Schlamm zu Faulgas bzw. Methan um.

In der ersten thermophilen Stufe findet der Vorabbau der organischen Substanzen bei ca. 55 °C statt. Die zweite Faulstufe ist hingegen temperaturanfällig, da nur die spezialisierten acetogenen Bakterien und die Methanbakterien tätig sind. Sie fühlen sich im mittleren Temperaturbereich bei 35 °C wohl. In der Praxis werden die Faultürme im mesophilen Bereich (30-38 °C) betrieben.

3. Behandlung von Klärschlamm mit Kalk

Die Behandlung von entwässertem Klärschlamm mit Branntkalk/Feinkalk/CaO und flüssigem Schlamm mit Kalkhydrat/Ca(OH)₂ ist Stand der Technik. Mit diesen beiden Verfahren werden hygienisch einwandfreie, landwirtschaftlich verwertbare Produkte hergestellt. Die Verfahren sind einfach, wenn einige Besonderheiten im Umgang mit den Kalkproduktionen und bei der Vermischung des Schlammes mit Kalk berücksichtigt werden.

Kalk hat gegenüber anderen Chemikalien den Vorzug der Basizität (hoher alkalischer pH-Wert). Diesem chemischen Einfluss des Kalks auf Mikroorganismen muss die hauptsächliche Wirkung der Elimination von Krankheitserregern aus Abwasser und Klärschlamm zugesprochen werden. pH-Werte um 12 und höher führen nicht nur zu einer irreversiblen Hemmung von Enzymsystemen in Mikroorganismen. Die hohe Hydroxid-Alkalität zerstört auch Zellwände und führt zu irreparablen Schäden an den Lebewesen.

Die Behandlung von Klärschlamm mit Kalk (CaO - Branntkalk)

Durch die Zugabe von CaO (Calciumoxid, Branntkalk, Feinkalk oder ungelöschter Kalk) zum entwässerten Klärschlamm erwärmt sich das Kalk-Klärschlammgemisch auf Temperaturen zwischen 55 °C und 70 °C. Der Anfangs pH-Wert des Kalk-Klärschlammgemisches soll $12,5 \pm 0,3$ und die Temperatur des gesamten Gemisches mindestens 55 °C während zwei Stunden betragen.

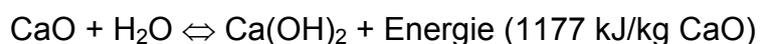
Die Verwendung von Kalk zur Hygienisierung der Klärschlämme ist ein einfaches und kostengünstiges Verfahren. Neben der thermischen

Keimreduktion erfolgt durch die pH-Wert Erhöhung, bei Misch- und Reaktionszeiten von 15 bis 30 Minuten, eine chemische Entseuchung. Bei der Mischung von Kalk und Klärschlamm ist eine Kalkmengenkontrolle erforderlich. Die Zugabemenge von Kalk hängt vom Wassergehalt des Klärschlammes ab, wobei generell eine Entwässerung des Schlammes zu bevorzugen ist. Die Menge des zugeführten Kalkes richtet sich auch nach der vorgesehenen Verwertung des Endproduktes.

Beim Zusatz von CaO zu entwässertem Klärschlamm erwärmt sich das Kalk-Klärschlammgemisch infolge exothermer Reaktion des Calciumoxids mit dem noch vorhandenen Wasser bei ausreichender Wärmedämmung auf Temperaturen zwischen 55 °C und 70 °C. Gleichzeitig tritt eine pH-Wert Erhöhung ein, und der Trockenrückstandsgehalt (TR) wird erhöht (Strauch, 1998; Oates, 1998).

Verwendet werden soll Weiß-Feinkalk mit mindestens 88% CaO Anteil, um die erforderliche Temperaturerhöhung zu erzielen. In der Praxis haben sich schnellreagierende Feinkalke ($T_{60} < 5\text{min}$, $T_{\text{max}} > 50\text{ °C}$; Prüfverfahren siehe DIN 1060 Baukalk, T3 Abschnitt 10) bewährt (Peschen et al., 1985).

In Deutschland haben Peschen et al. (1985) eine Klärschlamm-Nachbehandlungsanlage mit Branntkalk entwickelt. In dieser Anlage erfolgt eine genaue Dosierung des Feinkalkes. Im Mischer findet die Vermischung des Schlammes mit Feinkalk statt. Nach der Reaktionsgleichung



wird Feinkalk mit Wasser zu Kalkhydrat umgesetzt. Dieses verbindet sich mit reaktionsfähigen Bestandteilen im Schlamm, wie z.B. amorpher Kieselsäure oder Tonerde; hierdurch wird der Schlamm verfestigt. In einer Langzeitreaktion findet dann die Karbonatisierung des noch vorliegenden freien Kalkhydrats mit dem Kohlendioxid aus der Luft statt.

Die Mischungstechnik ist auf den Verwendungszweck des Endproduktes und die dafür erforderliche Konsistenz, wie z.B. pastös oder krümelig, abzustellen. Bei dieser Art der Schlammbehandlung wird der pH-Wert im Mischgut $>12,0$ angehoben. Die Temperaturen können bis auf 100 °C ansteigen. Die

Temperatur im Mischbehälter muss mindestens 55 °C über zwei Stunden in allen Teilen des Materials gehalten werden. Dies erreicht man im Allgemeinen mit 150-200 kg CaO/t entwässertem Schlamm. Der Anfangs-pH-Wert der Mischung muss $12,5 \pm 0,3$ betragen. Sollte dieser nicht erreicht werden, ist nachzukalken. Vor Abgabe zur Verwertung sollte das Gemisch mindestens 3 Monate (Einwirkzeit) gelagert werden (Arbeitsbericht ATV/VKS; Möller et al., 1988).

Die Behandlung von Klärschlamm mit Kalk (Ca(OH)_2 -Kalkhydrat)

Ca(OH)_2 (Kalkhydrat oder gelöschter Kalk) lässt sich in Form von Kalkmilch leichter und homogener einmischen als Ca(OH)_2 in Pulverform. Bei der Flüssig-Entseuchung mit Kalk ist zu beachten, dass eine gleichmäßige pH-Wert Verteilung nur erreicht wird, wenn der Klärschlamm vor der Einbringung in den Behälter homogenisiert wird. Die Kalkdosierung sollte nicht unter 0,2 kg Ca(OH)_2 /kg TR liegen. In Einzelfällen kann der Kalkverbrauch auf 0,4 kg Ca(OH)_2 /kg TR erhöht werden, um den pH-Wert von $12,5 \pm 0,3$ zu erreichen (Arbeitsbericht ATV/VKS; Möller et al., 1988). Der Temperaturanstieg im Schlamm-Kalkgemisch bei gleichzeitiger pH-Wert Anhebung inaktivieren die Krankheitserreger im Klärschlamm. Der hohe pH-Wert ist aber auch für sich allein schon ausreichend, um die Entseuchung des Schlammes herbeizuführen.

In zeit- und materialaufwendigen Laborversuchen wurde von Kassner et al. (1990) das Absterbeverhalten der im Klärschlamm vorkommenden Mikroorganismen nach Kalkzugabe untersucht. Als Testkeime wurden *Salmonellen* gewählt, da sie sich äußerst resistent gegenüber Umwelteinflüssen erwiesen haben, da weiters epidemiologisch ein enger Zusammenhang zwischen Mensch, Tier und Umwelt besteht und sie den Vorteil haben, dass sie sich aus stark verunreinigtem Material wieder reisolieren lassen. Sie sind deshalb als Indikator für die ausreichende Wirkung eines Entseuchungsverfahrens geeignet.

Die Ergebnisse zeigen, dass mit der Kalkbehandlung eine sichere Klärschlamm-Entseuchung möglich ist. In keinem Fall wurde bei den Untersuchungen eine Wiederverkeimung mit *Salmonellen* festgestellt, wenn die

Dosierung im Bereich über 4,5 kg CaO/m³ bzw. 6,0 kg Ca(OH)₂/m³ bei 3% TS im Ausgangsschlamm lag. Auch ein Abfall des pH-Wertes auf etwa 12,0 änderte daran nichts. Aus ähnlichen Erwägungen wie bei der Einwirkzeit sollte jedoch auch der pH-Wert aus Sicherheitsgründen nicht unter 12,5 fallen. Nach den Empfehlungen von Kassner et al. (1990) sollte daher:

1. getrockneter Klärschlamm mit Branntkalk (CaO) und
2. flüssiger Klärschlamm ausschließlich mit Kalkhydrat (Ca(OH)₂) entseucht werden
3. das Kalk-Schlammgemisch sollte mindestens 24 Stunden vor Abgabe an den Verbraucher gelagert werden.
4. der pH-Wert sollte während der gesamten Einwirkzeit von 24 Stunden 12,5 nicht unterschreiten. Falls der pH-Wert unter 12,5 sinkt, sollte eine Nachkalkung erfolgen und vor der landwirtschaftlichen Nutzung eine weitere 24-stündige Einwirkzeit abgewartet werden (Strauch et al., 1998, Bina et al., 2004).

Die Behandlung von entwässertem Klärschlamm mit Branntkalk und flüssigem Schlamm mit Kalkhydrat ist in Österreich bereits weit verbreitet. Mit diesen beiden Verfahren können grundsätzlich hygienisch einwandfreie, landwirtschaftlich verwertbare bzw. gut deponierbare Produkte hergestellt werden.

Eine Untersuchung von Reinhofer und Stuhlbacher (2003) im Auftrag des Landeshygienikers für Steiermark zur Keimreduktion von Klärschlamm mit unterschiedlichen Kalken im Hygienisierungsverfahren zeigte, dass aufgrund der kurzen Einwirkdauer der Einsatz von 1%iger Kalkhydratsuspension (Kalkmilch) zu empfehlen ist. Eine Einwirkdauer von 24 Stunden sei ausreichend für die Reduktion von fäkalcoliformen Keimen (Reinhofer u. Stuhlbacher, 2003). Strauch (1999) konnte nachweisen, dass bei einem stabilen pH-Wert von 10 eine Eliminierung von Salmonellen innerhalb von 24 Stunden erfolgt (weitere Literaturangaben zur Hygienisierung von Klärschlamm siehe Anhang Tabelle II).

In der Steiermark erfolgt in der Praxis vor der Hygienisierung eine Homogenisierung des Klärschlammes. Dem Klärschlamm werden im Durchschnitt 10 kg/m^3 Kalkhydrat beigemischt. Die Verweildauer des gekalkten Schlammes beträgt 24 Stunden. Das Kalkhydrat wird vorher mit Wasser aufgeschlämmt und als Kalkmilch dem flüssigen Klärschlamm zugeführt. Unter optimalen Bedingungen ist unmittelbar nach Kalkzugabe eine pH-Wert Verschiebung von 7 auf >12 und eine Keimreduktion von $> 3\text{Log}$ Stufen zu erwarten.

Zu den beschriebenen Behandlungsverfahren gibt es noch die biologischen Aufbereitungsverfahren der Kompostierung und der Klärschlammvererdung, welche in dieser Studie nicht berücksichtigt wurden.

Tabelle I: Resistenzraten von *E. coli* im klinischen Bereich isoliert aus dem weiblichen Genitaltrakt
(modif. nach Feierl u. Buzina, 2010)

		<i>E. coli</i> Resistenzraten in Prozent			
AB-GRUPPE	ABKÜRZUNG	getestet 2009	Isolate [n]	getestet 2000	Isolate [n]
Penicilline	AMX	27,5	1463	16,4	779
	AMC	4,9	1464	3,9	780
	P/TZP	0,3	1464	0,5	675
Cephalosporine	CF	21,6	1459	10,6	547
	CXMAX	2,6	1464	0,1	778
	FOX	0,2	1461	0,1	779
	FEP	1,4	1464	0	675
	CTX	1,4	1464	0	778
	CAZ	1,4	1464	0	779
Carbapeneme	MEM	0	1464	0	779
Aminoglycoside	GM	2,7	1463	0,1	779
Gyrasehemmer	CIP	4,2	1464	1,2	780
Andere	SXT	13,7	1464	7,3	780
	TE	20,1	1455	18,9	1223 (2006)

AMX= Amoxicillin; AMC= Amoxicillin+Clavulansäure; P/TZP= Piperacillin+Tazobactam; CF= Cefalothin; CXMAX= Cefuroxim/Axetil; FOX= Cefoxitin; FEP= Cefepim; CTX= Cefotaxim; CAZ= Ceftazidim; MEM= Meropenem; GM= Gentamycin; CIP= Ciprofloxacin; SXT= Sulfamethoxazol/Trimethoprim; TE= Tetracyclin

Tabelle II: Literaturangaben zur Hygienisierung von Klärschlamm

(modif. nach dem Leitfaden für die Praxis zur Hygienisierung von KS aus Kleinkläranlagen;
Landeshygieniker für Steiermark 2003)

Literatur	Branntkalk	Gelöschter Kalk	Kalkmilch	Kalk-Stickstoff
STRAUCH 1981	5kg Kalk je m ³ Faulschlamm und Frischschlamm			
STRAUCH 1981	7kg Kalk/m ³		25kg/m ³ Schlamm (40%ige K.)	10kg/m ³ Schlamm
PESCHEN 1986	150-200kg CaO/t entwässertem Schlamm			
KASSNER 1990	4,5 – 6,0kg CaO/m ³ Schlamm mit 3% TS			
BINNER 1986	0,5kg/kg TS Temp. über 50°C 2h	30kg/m ³ Abwasser	60kg/m ³ Abwasser	20kg/m ³ Abwasser
BISCHOFBERGER 1987	1kg/5-8kg entwässertem Schlamm			
MÖLLER 1988			0,2–0,4 Ca(OH) ² /kg TS	
BOOST 1998	60% Klärschlamm (600g/kg): 40% CaO/Flugasche (44.44 g/kg / 355.56 g/kg) im Verhältnis CaO:Flugasche 1:8			
PFEIFFER 1990	150-200kg/t entwässertem Schlamm		6-15kg/m ³ Nassschlamm	
STRAUCH 1999	600g CaO/kg			
BINA 2004	21,3g/l Frischschlamm			

Bisherige Vorträge im Rahmen von wissenschaftlichen Veranstaltungen

Antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains in Styrian sewage sludge

H. Galler¹, D. Haas¹, A. Melkes¹, G. Zarfel¹, J. Posch¹, G. Feierl¹, I. Winter², E. Marth¹, F.F. Reinthaler¹

¹Institute of Hygiene, Medical University of Graz, Austria

²Department of the Styrian Government Graz, Austria

Background: The resistance of pathogen bacteria against antibiotics is an increasing problem in human and veterinary medicine. Large-scale application of antibiotics leads to a high pollution of both antibiotics and antibiotic resistant bacteria into the environment. The study was designed to identify the effectiveness of different sewage sludge treatment methods, to eliminate bacteria. *Escherichia coli* strains were isolated from sludge samples of five sewage treatment plants in Styria/Austria and their resistance patterns to antibiotics were determined.

Method: For quantitative evaluation the number of colony forming units of *E. coli* prior to and after the different sewage sludge treatment procedures of each waste water treatment plant was investigated. For isolation of *E. coli* Chromocult agar was used. The resistance to 24 antibiotics was determined by using Vitek2 and agar diffusion tests.

Results: A total of 709 *E. coli* strains were isolated from 110 sludge samples. The highest load of *E. coli* was found in stabilized sludge with 9.6×10^4 cfu/g. In activated sludge of the five sewage plants the median values of *E. coli* ranged from 2.6×10^3 to 1.6×10^4 cfu/g. After treatment and sanitization of the sewage sludge, a 3 log₁₀ reduction of *E. coli* was found in plants using thermal treatment or lime stabilization. In activated sludge resistance rates ranged for ampicillin from 8% up to 24%, for cefalothin from 16% up to 25% and for tetracycline from 9% up to 30%. In dehydrated sludge high resistance rates were detected for ampicillin ranged from 6% up to 15%, for cefalothin from 21% up to 45%, for nalidixic acid from 3% up to 17% and for tetracycline from 15% up to 30%.

Conclusions: For sanitization thermal treatment or lime by using Ca(OH)₂ and dehydration of the sludge were effective methods to reduce *E. coli* in sludge. The resistance rates for most antibiotics were significant different according to the sewage plant and the type of the sludge.

Extended-spectrum- β -lactamase (ESBL) and other antibiotic resistance of *Escherichia coli* in Styrian sewage sludge.

G. Zarfel; H. Galler; G. Feierl; D. Haas; A. Melkes; E. Leitner; F. Mascher; L. Masoud; J. Posch; I. Winter; E. Marth; F.F. Reinthaler

¹Institute of Hygiene, Medical University of Graz, Austria

²Department of the Styrian Government of Graz, Austria

Objectives: The widespread use of antibiotics in medicine and agriculture had led to rising numbers of antibiotic resistances pathogenic bacteria. This organism has its reservoir not only in medical facilities, but can also be found in the human community and in the environment. ESBL carrying enterobacteriaceae are among the pathogens with dramatically increasing spread worldwide.

In this study we collected *Escherichia coli* from sewage sludge and determined antibiotic resistance pattern of 24 different antibiotics. Furthermore the genetic background of ESBL *E. coli* strains were investigated and compared to isolates from human urinary tract infection.

Methods: Between February and November 2009 sewage sludge samples from five different sewage treatment plants in the area of Styria were collected. The colony forming units (CFU) of *E. coli* in the samples and the resistance patterns of collected strains were determined.

20 ESBL *E.coli* from sewage sludge were compared to 20 ESBL *E. coli* strains from urinary tract infections, isolated at the Medical University Graz (Austria) in the same time period.

Strains were screened for 6 ESBL gene groups (CTX-M, TEM, SHV, OXA, VEB, GES) by PCR, and genes detected were subsequently sequenced.

Further, strains were phenotypically characterized by the Phene-Plate™ System (DiaTeam, Austria) using PhP-RF microtiter plates 03 R PHP EC *E.coli*.

Results: The CFU per g of *E. coli* ranged from 0 to $9,60 \times 10^4$. The most often occurring resistances were detected for Cefalothin (21.7%), Tetracyclin (18.3%) and Ampicillin (12.6%).

In ESBL *E.coli* from sewage sludge CTX-M 1 was the most common ESBL gene and was present in nine of the 20 strains. CTX-M 15 was identified in six and CTX-M 3 in two strains. In total 17 (85%) sewage sludge strains contained a CTX-M gene. Further, one ESBL *E.coli* from sewage sludge harboured a SHV-15 gene, whereas two isolates had no positive PCR product for any of the tested ESBL gene groups.

All 20 ESBL *E.coli* from urinary tract infection harboured a CTX-M gene; CTX-M 15 was detected in 15 strains and CTX-M 1 in five strains.

Phenotyping of the strains resulted in four different phenotypical clusters (PHPtype clusters) with correlation coefficients higher than 0.95. 25 single strains could not be assigned to any of the clusters. Cluster one was formed by seven strains from urinary tract infection. The other clusters contained strains from both sources.

Conclusions: In the different types of sewage sludge a high prevalence of resistance was found for Cefalothin, Tetracyclin, Ampicillin, same antibiotics has lowest rate of susceptibility in human isolates.

CTX-M genes were the dominant ESBL group in the analyzed samples. All ESBL gene variants present in human urinary tract infection were also present in sewage sludge. Consistently, strains from both sources were assigned together into the same phenotypical clusters.

ECCMID 2010

Comparison of ESBL genes from Extended-spectrum- β -lactamase (ESBL) carrying *Escherichia coli* from sewage sludge and human urinary tract infection

G. Zarfel; G. Feierl; H. Galler; D. Haas; A. Melkes; E. Leitner; F. Mascher; L. Masoud; J. Posch; I. Winter; A. Grisold, E. Marth; F.F. Reinthaler

Objectives: Extended-spectrum- β -lactamase carrying enterobacteriaceae are a growing problem in hospital and community. Beside human reservoir, ESBL carrying enterobacteriaceae can also be found in the environment.

Different groups of β -lactamase genes are the genetic basis of the ESBL mediated resistance.

In this study, ESBL carrying *Escherichia coli* from sewage sludge and human urinary tract infection were investigated for their phenotypes and the occurrence of six different ESBL gene groups.

Methods: A sample of 20 ESBL *E.coli* from sewage sludge collected from five different sewage treatment plants in the area of Styria between January and September 2009 and a sample of 20 ESBL *E.coli* strains from urinary tract infections, isolated at the Medical University Graz (Austria) in the same time period, were analysed.

Strains were screened for 6 ESBL gene groups (CTX-M, TEM, SHV, OXA, VEB, GES) by PCR, and genes detected were subsequently sequenced.

Further, strains were phenotypically characterized by the Phene-Plate™ System (DiaTeam, Austria)

using PhP-RF microtiter plates 03 R PHP EC *E.coli*.

Results: In ESBL *E.coli* from sewage sludge CTX-M 1 was the most common ESBL gene and was present in nine of the 20 strains. CTX-M 15 was identified in six and CTX-M 3 in two strains. A total 17 (85%) sewage sludge strains contained a CTX-M gene. Further, one ESBL *E.coli* from sewage sludge harboured a SHV-15 gene, whereas two isolates had no positive PCR product for any of the tested ESBL gene groups.

All 20 ESBL *E.coli* from urinary tract infection harboured a CTX-M gene; CTX-M 15 was detected in 15 strains and CTX-M 1 in five strains.

40% of all strains (16 strains from both sources) were carrying, in addition to CTX-M, the non ESBL β -lactamase TEM-1.

Phenotyping of the strains resulted in four different phenotypical clusters (PHPtype clusters) with correlation coefficients higher than 0.95. 25 single strains could not be assigned to any of the clusters. Cluster one was formed by seven strains from urinary tract infection. The other clusters contained strains from both sources. The phenotypic data correlated with the PCR results, as within a cluster, all strains harboured the same CTX-M gene.

Conclusions: CTX-M genes were the dominant ESBL group in the analyzed samples. All ESBL gene variants present in human urinary tract infection were also present in sewage sludge. Consistently, strains from both sources were assigned together into the same phenotypical clusters.