

Herrn Univ.-Prof.Dipl.-Ing.Dr. R. LIEPOLT zum 80. Geburtstag gewidmet.

ÜBER DAS VORKOMMEN VON R⁺-BAKTERIEN IM ABWASSER EINER KLÄR-ANLAGE UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER GENTAMICIN-RESISTENZ

H.-J. DOBBERKAU, E. SCHULZE, W. STELZER

I. Einleitung

In den letzten Jahren hat die Plasmidforschung eine sehr schnelle Entwicklung genommen, nicht zuletzt dadurch, daß Plasmide unentbehrliche "Werkzeuge" der Gentechnik geworden sind. In der Medizin haben Plasmide vor allem durch die Vermittlung der bakteriellen Chemotherapeutikaresistenz Bedeutung erlangt (ANDERSON, 1968, RICHMOND, 1972, TSCHÄPE und RISCHE, 1974) Heute ist bekannt, daß Plasmide nicht nur Antibiotikaresistenz vermitteln können, sondern eine Vielzahl nichtessentieller Zellfunktionen realisieren (SHERRATT, 1982) Von besonderer Bedeutung sind dabei plasmidbedingte Virulenzeigenschaften (FALKOW, 1975).

Plasmide sind definiert als extrachromosomale Erbträger der Bakterienzelle, die sich unabhängig vom Bakterienchromosom replizieren (CLOWES, 1972) Mit den Plasmiden verfügen die Bakterien über einen Genreservepool für Sonderleistungen (TSCHÄPE und RISCHE, 1974), wodurch sie sich schnell veränderten Umweltbedingungen anpassen können (SHERRATT, 1982)

Eine der bedeutendsten Eigenschaften der Plasmide ist ihre Übertragbarkeit auf andere Bakterienzellen. Dies geschieht durch Konjugation oder durch Bakteriophagen (Trans-

duktion) Selektion und Plasmidtransfer sind deshalb die wesentlichsten Faktoren der Verbreitung von plasmidtragenden Bakterien in der Umwelt.

Seit den sechziger Jahren zeigt der Anteil gesunder Personen, die in ihrer Fäkalflora antibiotikaresistente Bakterien tragen, eine steigende Tendenz (TSCHÄPE und RISCHE, 1973). Aufgrund dieser Situation wurde wiederholt empfohlen, daß für die Einschätzung der Resistenzsituation in der Bevölkerung eine regelmäßige Kontrolle der Fäkalflora gesunder Personen erfolgen sollte (WHO, 1983).

Die Fäkalflora der Tiere ist insbesondere durch den massiven Einsatz von Chemotherapeutika für nutritive, prophylaktische und therapeutische Zwecke als ein ganz wesentliches Reservoir für antibiotikaresistente Bakterien anzusehen (MONAGHAN et al., 1981, LAFONT et al., 1981).

Die Verbreitung der antibiotikaresistenten Bakterien der Fäkalien erfolgt dann vor allem durch Abwasser und abwasserbelastetes Oberflächenwasser (RISCHE et al., 1977).

Die ersten bekannt gewordenen Wasseruntersuchungen über das Vorkommen von antibiotikaresistenten Bakterien wurden von SMITH (1970, 1971) durchgeführt. SMITH fand in den britischen Flüssen mehr als 10^3 R⁺-Koliiforme/ml. Einige Wasserproben enthielten mehr als 10 chloramphenicolresistente Koliiforme/ml, deren Resistenz auf *S. typhi* übertragbar war. An Badestränden wurden mehr als 100 R⁺-Koliiforme/100 ml nachgewiesen.

Der Begriff R⁺-Bakterien wird in der Literatur nicht einheitlich definiert. Einige Autoren betrachten die Gesamtheit der erfaßten antibiotikaresistenten Bakterien als

R⁺-Bakterien, andere dagegen berücksichtigen nur die R(Resistenz)-plasmidtragenden Bakterien als R⁺-Bakterien. Die in der Literatur angegebenen Methoden zum Nachweis von R⁺-Bakterien im Wasser zeigen ebenfalls beträchtliche Unterschiede, so daß die ermittelten Daten nicht unmittelbar vergleichbar sind. Darüber hinaus wird von den einzelnen Autoren ein ganz unterschiedliches Chemotherapeutika-Spektrum geprüft, wodurch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erschwert wird.

Bis auf wenige Ausnahmen beziehen sich die bisher bekannten Wasseruntersuchungen auf die koliformen Bakterien. Trotz der enormen Unterschiede in den einzelnen Gewässern zeigen die Literaturbefunde, daß im Abwasser und abwasserbelasteten Oberflächenwasser etwa 1 - 10 % der koliformen Bakterien Tc-resistent sind. Chloramphenicolresistente Koliforme sind um etwa eine Zehnerpotenz seltener nachweisbar (meist < 5 %) Häufig werden Ap-, Su- und Sm-resistente Koliforme gefunden, während gentamicinresistente Koliforme nur selten (meist < 0,1 %) nachweisbar sind. R⁺-Bakterien können in allen Wasserarten, auch im Trinkwasser, nachgewiesen werden. In Krankenhausabwässern werden aufgrund des herrschenden Antibiotikadruckes deutlich höhere R⁺-Bakteriengehalte beobachtet als im kommunalen Abwasser (LINTON et al., 1974)

Einige Autoren unterstreichen (GRABOW et al., 1976, BELL et al., 1980), daß R⁺-Bakterien im Verlaufe der Abwasserreinigung in geringerem Umfang eliminiert werden können. Dieses Verhalten kann sowohl durch eine erhöhte Umweltresistenz von R⁺-Bakterien als auch durch einen möglichen R-Plasmid-Transfer im Abwasser verursacht sein (GRABOW und MIDDENDORFF, 1973)

Die gefundenen Unterschiede liegen unter 5 % und sind aufgrund der geringen Probenanzahl nicht als signifikant anzusehen, zumal sich die ermittelten Zunahmen nicht auf alle R⁺-Bakterien beziehen.

In Modelluntersuchungen mit Abwasser wurden bisher keine Unterschiede in der Überlebensfähigkeit zwischen antibiotikaresistenten und empfindlichen koliformen Bakterien gefunden (GRABOW et al., 1976)

Ein R-Plasmid-Transfer ist im Abwasser, Sediment sowie auf Pflanzenmaterial prinzipiell möglich (TALBOT et al., 1980, STEWART und KODITSCHKEK, 1980, MACH und GRIMES, 1982, ALTHERR und KASWECK, 1982), jedoch liegen die Transfer-Raten meist niedriger als 10^{-4} so daß die Verbreitung von R-Plasmiden durch konjugative Übertragung als ein seltenes Ereignis aufzufassen ist. R⁺-Bakterien werden deshalb in erster Linie durch Selektion und Vermehrungsprozesse in der Umwelt verbreitet (TALBOT et al., 1980)

2. Untersuchungsmethoden

Die Untersuchungen beginnen generell mit der Isolierung von R⁺-Bakterien. Hierfür sollten nach Möglichkeit keine Anreicherungsverfahren Verwendung finden, da während des Anreicherungsprozesses eine konjugative Übertragung (Transfer) von Plasmiden nicht auszuschließen ist. Dem direkten Ausplattieren der Wasserproben auf feste Nährmedien mit Chemotherapeutikazusatz ist der Vorzug zu geben.

Für den Nachweis antibiotikaresistenter koliformer Bakterien wird der Endoagar mit entsprechenden Antibiotikazusätzen verwendet (Tab. 1) Leider eignet sich der Endonährboden nicht für alle Antibiotika.

Für die Erfassung anderer Bakteriengruppen besteht prinzipiell die Möglichkeit mit festen Selektivmedien zu arbeiten, die vor ihrer Verwendung hinsichtlich ihrer "Verträglichkeit" gegenüber den zu testenden Antibiotika geprüft werden müssen, worauf jedoch im Rahmen dieser Untersuchungen nicht zurückgegriffen wurde.

Für die Untersuchung von Oberflächenwasser werden 0,1 ml der Wasserprobe bzw. 0,1 ml aus entsprechenden Verdünnungsstufen sowohl auf antibiotikahaltigem Resistenzagar (Endoagar) als auch auf antibiotikafreiem Resistenzagar ausgespatelt. Die Selektion erfolgt durch den Zusatz von Tetracyclin (Tc), Chloramphenicol (Cm), Kanamycin (Km) und Gentamicin (Gm). Die Platten enthalten jeweils nur ein Antibiotikum. Werden bei der Aussaat von 0,1 ml Probenvolumen keine Kolonien nachgewiesen, müssen 1 ml Probenvolumen geflutet bzw. größere Wassermengen über Membranfilter filtriert werden. Nach der Filtration werden die Membranfilter blasenfrei auf dem Resistenzagar aufgelegt.

Es empfiehlt sich, diese Erstanätze 48 h bei 37 °C zu bebrüten. Nach der Bebrütungszeit werden die geeignetsten Platten (10 - 100 Kolonien/Platte) ausgewählt und die Koloniezahlen mittels Stereomikroskop ermittelt. Aus den mittleren Koloniezahlen der Platten mit Antibiotikazusatz und den mittleren Koloniezahlen der Resistenzagarplatten ohne Antibiotikazusatz wird der Resistenzquotient (Anteil antibiotikaresistenter Bakterien in %) berechnet. Diese Werte ermöglichen eine Gesamteinschätzung der Resistenzsituation. Von den ausgewerteten Platten werden dann entsprechend der vorhandenen Untersuchungskapazität einige Kolonien in Nährbouillon (5 h, 37 °C) abgeimpft und das Antibiotogramm ermittelt. Für die Resistenzbestimmung werden

das L 4-Medium (SIFIN, Berlin-Weißensee) bzw. der MÜLLER-HINTON-Agar mit den in der Tabelle 1 angegebenen Antibiotikakonzentrationen verwendet. Je Resistenzplatte können bis zu 10 Stämme gleichzeitig geprüft werden. Die Bebrütung erfolgt 24 h bei 37 °C. Resistente Stämme wachsen, empfindliche nicht. Wachsen nur wenige Kolonien (< 5), sind diese, zumindest jedoch eine, abzupfen und erneut zu prüfen. Diese Technik bietet gegenüber anderen Resistenzbestimmungsmethoden den Vorteil, daß aufgrund der Art des Wachstums Mischkulturen erkannt werden können. Von den Resistenzplatten wird dann von jedem Stamm eine Einzelkolonie in Nährbouillon abgeimpft und die biochemische Typisierung ("Bunte Reihe") durchgeführt, so daß schließlich als Ergebnis die Bakterienart und das dazugehörige Antibiotogramm vorliegen.

Der R-Plasmid-Transfer erfolgte nach LÁSZLO und MILCH (1980). Die Isolierung von Plasmid-DNS wurde nach der Vorschrift von KADO und LIU (1981) durchgeführt.

Tab. 1:

Antibiotikazusatz in µg/ml zu den Nährböden: Endoagar, L 4-Agar und MÜLLER-HINTON-Agar

	Endoagar	L 4-Agar bzw. MÜLLER-HINTON-Agar
Tetracyclin	20	20
Chloramphenicol	30	30
Kanamycin	50	50
Gentamicin	10	20

3. Ergebnisse

Untersucht wurde eine Kläranlage mit einer täglich anfallenden Abwassermenge von etwa 30.000 m³. Ihr fließen neben Haushaltsabwässern vor allem Schlachthofabwässer und Industrieabwässer zu. An Reinigungsstufen sind vorhanden: Grobrechen, Sandfang, Absetzbecken, Belebtschlammbecken mit Kreiselbelüftern und Nachklärung (Absetzbecken). Untersucht wurde das Rohabwasser nach dem Sandfang, der Ablauf der Belebungsbecken und der Ablauf der Nachklärung.

Bezüglich der bakteriologischen Kriterien werden die Koloniezahl im Mittel um 91 %, die Anzahl der koliformen Bakterien um 77 % reduziert.

3.1. Das Vorkommen von antibiotikaresistenten Koliformen im Abwasser der Kläranlage

Im Rohabwasser waren im Mittel 0,23 % der Gesamtkoliformen Tc-resistent, 0,1 % Cm-resistent, 0,63 % Km-resistent und 0,0002 % Gm-resistent. Für die Einzeluntersuchungen wurden gleichermaßen beträchtliche Unterschiede gefunden (Tab.2). Im Belebtschlamm und im Ablauf der Kläranlage konnte keine signifikante Erhöhung der Resistenzquotienten (% der Gesamtkoliformen in Tab. 2) beobachtet werden. Gentamicinresistente wurden nur selten isoliert. Die mittleren Resistenzquotienten lagen in allen Fällen unter 1 %. Mit dem Direktansatz durch Ausspateln (0,1 ml) oder Fluten (1 ml) der Wasserproben des Kläranlagenablaufes auf Endoagarplatten mit Antibiotikazusatz waren keine gentamicinresistenten Koliforme nachweisbar. Erst nach Anreicherung der Wasserproben (100, 10 und 1 ml) des Kläranlagenablaufes in gentamicinhaltiger Laktosebouillon 24 h, 37 °C, 20 µg Gm/ml konnten auch aus dem Ablauf gentamicinresistente Koliforme angezüchtet werden.

Tab. 2:

Das Vorkommen von antibiotikaresistenten Koliformen im Rohabwasser, im Belebtschlamm und im Ablauf einer Kläranlage (Mittelwerte aus 7 Einzeluntersuchungen)

Entnahmestelle	% der Gesamt- koliformen mit Tc-Resistenz	% der Gesamt- koliformen mit Cm-Resistenz	% der Gesamt- koliformen mit Km-Resistenz	% der Gesamt- koliformen mit Gm-Resistenz
Rohabwasser	0,23 (0,06- 5,4)*	0,1 (0-6,5)	0,63 (0,08-17,0)	0,0002 (0-0,0008)
Belebtschlamm	0,23 (0,08- 4,0)	0,08 (0,02-1,9)	0,29 (0,1 7,5)	0,009 (0-0,53)
Ablauf	0,66 (0,02-17,2)	0,23 (0,006-4,2)	0,45 (0,02-17,0)	

* Die Werte in den Klammern geben die prozentuale Schwankungsbreite der Resistenzquotienten an.

Aus den ermittelten Resistenzquotienten der Abwasseruntersuchungen kann abgeleitet werden, daß im Mittel etwa 1 % der koliformen Bakterien antibiotikaresistent sind (bezogen auf die geprüften Antibiotika Tc, Cm, Km und Gm), wobei am häufigsten tetracyclin- und kanamycinresistente Koliforme nachgewiesen wurden.

3.2. Resistenztypen und Bakterienspezies (Koliforme)

Von den antibiotikahaltigen Endoagarplatten wurden einige antibiotikaresistente Kolonien ausgewählt, der Resistenztyp und die Bakterienspezies erfaßt.

Unter den abgeimpften antibiotikaresistenten koliformen Kolonien erwies sich 82,4 % als *E. coli*. Andere koliforme Bakterien (*Enterobacter*, *Citrobacter* und *Klebsiella*) wurden verhältnismäßig selten isoliert (Tab. 3). Nach DUFOUR (1977) gehören mehr als 80 % der koliformen Bakterien der Darmflora des Menschen und warmblütiger Tiere zu *E. coli*. In den von uns durchgeführten Stuhluntersuchungen gesunder Personen konnten 98,0 % der antibiotikaresistenten Koliformen als *E. coli* bestätigt werden. Das überwiegende Vorkommen von *E. coli* kennzeichnet insbesondere kommunale Abwässer mit frischen fäkalen Verunreinigungen. Die resistenten *E. coli*-Stämme konnten 40 verschiedenen Resistenzmustern zugeordnet werden (Tab. 3). Von den 169 Stämmen waren 14,7 % einfachresistent und 85,3 % mehrfachresistent. Am häufigsten wurden die Resistenztypen Tc Sm Cm Su Ap Km (15,3 %), Tc (14,7 %), Tc Sm Su Ap (8,8 %), Tc Sm Cm Su Ap Km Tp (8,3 %) und Tc Sm Su Km (4,7 %) isoliert. Die isolierten *Enterobacter*-, *Klebsiella* und *Citrobacter*-Stämme waren alle gegenüber zwei oder mehr Antibiotika resistent.

Tab. 3:

Vorkommen und Resistenz von koliformen Bakterien im Abwasser einer Kläranlage

Spezies	Anzahl	%	Anzahl der Resistenz	Einfach-resistenz %	Mehrfach-resistenz %
<i>E. coli</i>	169	82,4	40	14,7*	85,3
<i>Enterobacter agglomerans</i>	18	8,8	9		100,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	4,9	9		100,0
<i>K. oxytoca</i>	3	1,4	3		100,0
<i>K. ozaenae</i>	1	0,5	1		100,0
<i>Citrobacter freundii</i>	4	2,0	3		100,0

* ausschließlich Tc-Einfachresistenz

Die Ergebnisse zur Antibiotikaresistenz von *E. coli* im Abwasser zeigen eine weitgehende Übereinstimmung mit den gleichzeitig durchgeführten Stuhluntersuchungen, in denen gleichermaßen am häufigsten Tetracyclineinfachresistenz (23,7 %) und der Resistenztyp Tc Cm Cm Su Ap Km (13,4 %) nachgewiesen wurden.

Es muß darauf hingewiesen werden, daß die Rangfolge der ermittelten Resistenzmuster nur annähernd den realen Resistenzverhältnissen entspricht, da eine willkürliche Auswahl der auf den antibiotikahaltigen Endoagarplatten gewachsenen laktosepositiven Kolonien (Koliforme) erfolgte. Die quantitativen Verhältnisse, die sich aus den Resistenzquotienten ergeben, wurden nicht berücksichtigt.

3.3. Das Vorkommen von Gentamicinplasmiden

Gentamicin gilt als ein Reserveantibiotikum, so daß die Entwicklung der Gentamicinresistenzsituation von besonderem Interesse ist. In den letzten Jahren wurde insbesondere bei klinischen Infektionen eine Zunahme von gentamicinresistenten Erregern beobachtet (DATTA, 1980) Da die Gentamicinresistenz immer mit Mehrfachresistenz gekoppelt ist und in der Regel übertragen werden kann, bedeutet das zunehmende Vorkommen von gentamicinresistenten Erregern ein ernstes hygienisches Risiko. Es wurde bereits erwähnt, daß Abwasseruntersuchungen einen schnellen Überblick über die Resistenzsituation im Einzugsgebiet ermöglichen. Diese Hypothese überprüften wir anhand des Vorkommens von Gentamicinplasmiden im Abwasser der Kläranlage. Für diese Zwecke wurden gentamicinresistente Koliforme isoliert, die Resistenzmuster bestimmt, die Resistenz auf *E. coli* K-12 übertragen und die Plasmidmuster erfaßt. Aus der Literatur sind vergleichbare Untersuchungen bisher nicht bekannt.

Im Zeitraum vom 2. 7 1984 bis 13. 5. 1985 wurden insgesamt 64 gentamicinresistente Koliforme aus dem Abwasser der Kläranlage isoliert. Davon übertrugen 42 Stämme (65,6 %) ihre Resistenz "en bloc" oder teilweise auf *E. coli* K-12. Am häufigsten wurden gentamicinresistente *E. coli* -Stämme isoliert, die zu 76,7 % ihre Resistenz auf *E. coli* K-12 übertrugen. Der Resistenztyp Sm Cm Su Ap Gm konnte an allen Entnahmestellen nachgewiesen werden. Von den gentamicinresistenten *Enterobacter agglomerans* -Stämmen übertrugen 78,9 % ihre Resistenz auf *E. coli* K-12. Der häufigste Resistenztyp Tc Sm Cm Ap Km Gm wurde sowohl im Rohabwasser als auch im Belebtschlamm und im Ablauf der Anlage gefunden.

Unter den gentamicinresistenten Koliformen wurden während des gesamten Untersuchungszeitraumes zwei unterschiedliche Gentamicinplasmide beobachtet; eines von einer Größe von 100 MD, das nur an einem Untersuchungstag in *Enterobacter agglomerans* nachgewiesen wurde und ein Gm-Plasmid von 55 MD, das aus mehreren Spezies (*E. coli*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes*) an mehreren Untersuchungstagen und aus allen Entnahmestellen (Rohabwasser, Belebtschlamm, Kläranlagenablauf) isoliert werden konnte. Darüber hinaus zeigte sich, daß das 55 MD große Gm-Plasmid in Wildstämmen mit unterschiedlichen Plasmidmustern vorkommt (Abb. 1) Innerhalb der *Enterobacter agglomerans*-Stämme ließ sich dieses Plasmid in vier Klonen, unterscheidbar durch die Plasmidmuster, finden (Abb. 1) Gentamicinresistente *E. coli*-Stämme mit dem Plasmidmuster 75, 55, 4,0 MD wurden an verschiedenen Entnahmetagen sowohl im Rohabwasser als auch im Belebtschlamm und im Kläranlagenablauf nachgewiesen. Bis auf eine Ausnahme wurden alle Stämme aus der Anreicherung mit gentamicinhaltiger Laktosebouillon angezüchtet. Von den *Enterobacter agglomerans*-Stämmen war am häufigsten ein Klon mit dem Plasmidmuster 90, 75, 55, 45, 20, 15 MD nachweisbar, der gleichermaßen in den Wasserproben aller Entnahmestellen gefunden wurde. Im Ablauf gelang der Nachweis nur mittels Anreicherung in gentamicinhaltiger Laktosebouillon.

Die Abbildung 2 zeigt ein Beispiel für die Untersuchungsbefunde vom 25. 2. 1985. Die Bahnen a, b und c im Agarosegel charakterisieren die Plasmid-DNS-Banden für die Referenzplasmide mit Molekulargewichten von 26,60 und 4,1 MD. Die Bahn d zeigt das Plasmidmuster für den aus dem Rohabwasser angezüchteten *Enterobacter agglomerans*-Stamm (90, 75, 55, 45, 20, 15 MD) Nach dem Transfer in den plasmidfreien Rezipienten *E. coli* K-12 wird das 55 MD große Gm-Plasmid

sichtbar (Bahn e) Die Bahn f charakterisiert das Plasmidmuster des am gleichen Entnahmetag isolierten gentamicinresistenten *E. coli*-Stammes mit dem Plasmidmuster 75, 55, 4,0 MD. Nach dem Transfer in *E. coli* K-12 wird das 55 MD große Gm-Plasmid sichtbar (Bahn g) Innerhalb des 55 MD großen Gm-Plasmides konnten zwei Genotypen ermittelt werden. Alle Klone mit Trimethoprim- und Gentamicinresistenz erwiesen sich als fin^+ (F-Plasmid), während gentamicinresistente Klone ohne Trimethoprimresistenz als fin^- charakterisiert wurden.

Die Untersuchungen zeigen sehr deutlich, daß die Vielzahl der isolierten gentamicinresistenten Koliformen bis auf wenige Ausnahmen nur ein Gm-Plasmid mit der Plasmidformel^{*)} IncOF, DSP(M 13), 55 MD, $\text{fin}^{+/-}$ Cm Sm Su Tp Ap (Tcm) Gm (AAC-3/II) enthalten. Das bedeutet, daß im gesamten Einzugsgebiet der Kläranlage im wesentlichen nur ein Gentamicinplasmidtyp zirkuliert. Im Abwasser wird dieses Plasmid in mehreren Bakterienpezies und Klonen unterschiedlicher Plasmidmuster gefunden. Das trifft teilweise auch für die Rohabwasseruntersuchungen zu. Mit den vorliegenden Untersuchungen kann nicht geklärt werden, ob das 55 MD Gm-Plasmid erst im Abwasser verbreitet, das heißt auf andere Bakterienstämme übertragen wird oder ob mehrere Klone gleichzeitig in der Umwelt zirkulieren. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß schon wenige Abwasseruntersuchungen das Vorkommen und die Verbreitung der Gentamicinresistenz im Einzugsgebiet charakterisieren. In diesem Sinne sind Abwasseruntersuchungen durchaus als ein Frühwarnsystem geeignet, vor allem dann, wenn während des Einsatzes neuer Antibiotika das Auftauchen entsprechend resistenter Bakterienstämme ver-

*) Die Autoren danken Herrn Dr. H. TSCHÄPE, Institut für Experimentelle Epidemiologie Wernigerode, für die Plasmidtypisierung.

folgt wird. Unerwartet hoch zeigte sich die Empfindlichkeit der angewendeten Techniken. Allein die Tatsache, daß die Entnahme kleiner Wasserproben (2,5 l) aus dem vorbeiströmenden Abwasser den Nachweis gleicher Bakterienklone an verschiedenen Entnahmetagen und in allen Stufen der Abwasserreinigungsanlage ermöglichte, unterstreicht die Empfindlichkeit der Methoden. Mit Hilfe dieser Techniken war es erstmals möglich, definierte Bakterienklone in einer Abwasserreinigungsanlage zu verfolgen.

Zusammenfassung

Im Rohabwasser der untersuchten mechanisch-biologischen Kläranlage waren im Mittel 0,2 % der Gesamtkoliformen tetracyclinresistent, 0,1 % chloramphenicolresistent, 0,6 % kanamycinresistent und 0,0002 % gentamicinresistent. In den einzelnen Stufen der Abwasserreinigung wurde keine Erhöhung der Resistenzquotienten (%) festgestellt. Von den abgeimpften antibiotikaresistenten Koliformen gehörten 82,4 % zu *E. coli* 8,8 % zu *Enterobacter* 6,8 % zu *Klebsiella* und 2,0 % zu *Citrobacter* (Tab. 3) Die resistenten *E. coli*-Stämme waren in 85,3 % der Fälle mehrfachresistent. Unter den gentamicinresistenten koliformen Bakterien enthielten bis auf wenige Ausnahmen alle Wildstämme ein 55 MD großes Gentamicinplasmid (Inc OF), das leicht auf *E. coli* K-12 übertragen werden konnte (Abb. 1) Dieses Gentamicinplasmid ließ sich in mehreren durch das Plasmidmuster unterscheidbaren *E. coli* - und *Enterobacter* -Stämmen nachweisen, so daß auf eine massive Ausbreitung im Einzugsgebiet geschlossen werden kann. Mit Hilfe der Plasmidmusteranalyse gelang es, einzelne Bakterienklone im Verlaufe der Abwasserreinigung zu verfolgen. Abwasseruntersuchungen ermöglichen im Sinne eines Frühwarnsystems eine brauchbare Einschätzung der Resistenzsituation im Einzugsgebiet.

Abb. 1:

Das Vorkommen von Gentamicinplasmiden in aus Abwasser isolierten Koliformen

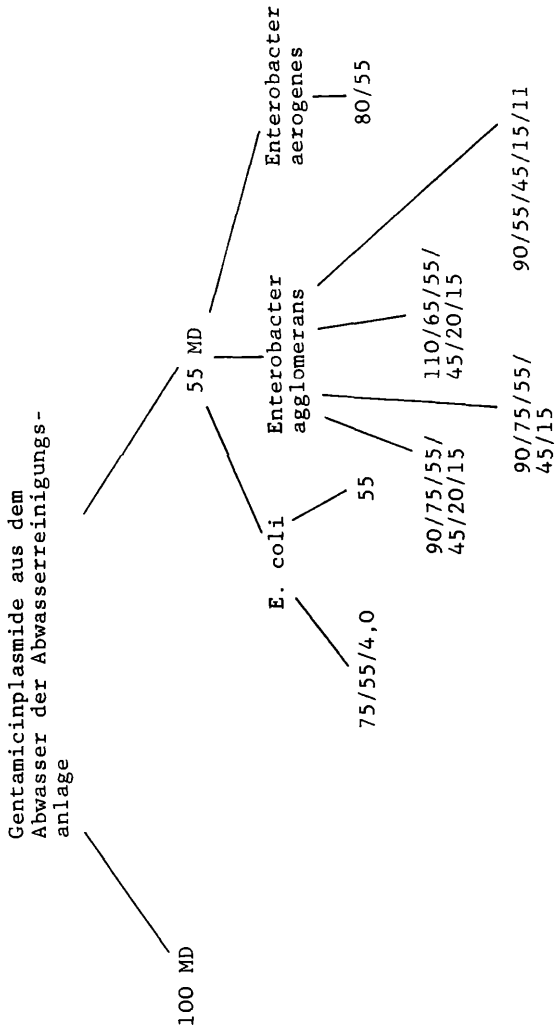
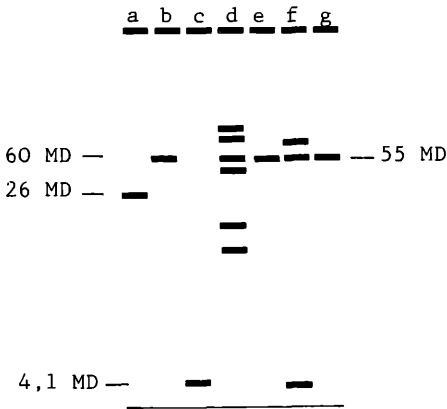


Abb. 2:

Das Vorkommen des 55 MD großen Gm-Plasmides in
Enterobacter agglomerans und E. coli

Bahn a	Referenzplasmide 26 MD, 60 MD, 4,1 MD
Bahn d:	Enterobacter agglomerans (90,75,55,45,20,15) isoliert aus Rohabwasser
Bahn e:	E. coli K-12 R ⁺ (55 Md)
Bahn f:	E. coli (75, 55, 4,0 MD), isoliert aus Beleb- schlamm
Bahn g:	E. coli K-12 R ⁺ (55 MD)



SUMMARY

Occurrence of R⁺-bacteria in the waste water of a sewage treatment plant with special reference to the resistance to Gentamicin.

0,2 % of the total coliforms were tetracyclin-resistant in the sewage of a mechanical-biological treatment plant. 0,1 % were resistant against chloramphenicol, 0,6 % against kanamycin and 0,0002 % against gentamicin. No increased resistance was found in different areas of the plant. Of the isolated antibiotic-resistant coliforms, 84,4 % belonged to *E. coli* 8,8 % were *Enterobacter*, 6,3 % *Klebsiella* and 2,0 % *Citrobacter*. 85,3 % of the resistant *E. coli* strains were multiple-resistant. All wild strains of the gentamicin-resistant coliforms contained a gentamicin-plasmid of 55 MD size (Inc.OF) which can be easily transferred to *E. coli* K-12. This gentamicin-plasmid was established in several *E. coli* and *Enterobacter* strains differentiated by their plasmid pattern. The plasmid must therefore be widely distributed in the catchment area. The analysis of plasmid patterns made it possible to follow various bacterial clones throughout the various stages of sewage treatment. The investigation of sewage water facilitates the estimation of resistance within the catchment area and can therefore be used as an early warning system.

Literatur

ALTHERR, M.R., KASWECK, K.L. (1982): In situ studies with membrane diffusion chambers of antibiotic resistance transfer in *E. coli*. - Applied and Environmental Microbiology 44, 838-843.

- ANDERSON, E.S. (1968): The ecology of transferable drug resistance in the enterobacteria. *Ann Rev Microbiol* 22, 131-180.
- BELL, J.B., MACRAE, W.R., ELLIOT, G.E. (1980) Incidence of R-factors in coliform, fecal coliform, and *Salmonella* populations of the Red River in Canada.- *Applied and Environmental Microbiology* 40, 486-491.
- CLOWES, R.C. (1972): Molecular structure of bacterial plasmids.- *Bacteriological Review* 36, 361.
- DATTA, N., DACEY, S., HUGHES, V., et al. (1980): Distributions of genes for trimethoprim and gentamicin resistance in bacteria and their plasmids in a general hospital.- *J gen Microbiol* 118, 495-508.
- DUFOUR, A.P. (1977): *Escherichia coli*: The fecal coliform. In: *Bacterial indicators/ Health hazards associated with water*.- ASTM/STP 635, 48-58; Eds. Hodley, A.W., Dutka, B.J.
- FALKOW, S. (1975): *Infections multiple drug resistance*.- London: Pion.
- GRABOW, W.O.K., MIDDENDORFF, I.G. (1973) Survival in maturation ponds of coliform bacteria with transferable drug resistance.- *Wat.Res.* Vol.7, 1589-1597
- GRABOW, W.O.K., ZYL, M.von, PROZESKY, O.W. (1976) Behaviour in conventional sewage purification processes of coliform bacteria with transferable or non-transferable drug-resistance.- *Wat.Res.* Vol.10, 717-723.
- KADO, C.J., LIU, S.-T. (1981) Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids.- *J Bact* 145, 1365-1373.
- LAFONT, J.P., GUILLOT, J.F., CHASLUS'DANCLA, E. et al. (1981) Antibiotic-resistant bacteria in animal wastes: a human health hazard?- *Bull Inst Past* 79, 213-231.
- LASZLO, V.G., MILCH, H. (1980): *Salmonella typhi* R-plasmids in Hungary.- *Acta microbiol Ac Sci Hung* 27, 325-332.
- LINTON, K.B., RICHMOND, M.H., BEVAN, R. et al. (1974) Antibiotic resistance and R-factors in coliform bacilli isolated from hospital and domestic sewage.- *J.Med. Microbiol.* 7, 91-103.
- MACH, P.A., GRIMES, D.J. (1982): R-plasmid transfer in a wastewater treatment plant.- *Applied and Environmental Microbiology* 44, 1395-1403.

- MONAGHAN, C., TIERNEY, U., COLLERAN, E. (1981): Antibiotic resistance and R-factors in the fecal coliform flora of urban and rural dogs.- *Antimicrob Chemother* 19, 266-270.
- RICHMOND, M.H. (1972): Some environmental consequences of the use antibiotics.- *J. appl. Bact.* 35, 155-176.
- RISCHE, H., TSCHÄPE, H., HEIER, H. (1977): Role of surface and sewage in the spread of infections drug resistance. WHO-Meeting on surveillance for prevention and control of health hazards due to antibiotic-resistant Enterobacteriaceae. Geneva, 18.-24. Oktober 1977
Draft agenda item 6.3.
- SHERATT, D.J. (1982): The maintenance and propagation of plasmid genes in bacterial populations.- *J gen Microbiol* 128, 655-661.
- SMITH, H.W. (1970): Incidence in river water of *Escherichia coli* containing R-factors.- *Nature* 228, 1286-1288.
(1971): Incidence of R⁺-*Escherichia coli* in coastal bathing waters in Britain.- *Nature* 234, 155-156.
- STEWART, K.R., KODITSCHKEK, L. (1980): Drug-resistance transfer in *Escherichia coli* in New York Bight sediment.- *Marine Pollution Bulletin* 11, 130-133.
- TALBOT, H.W. Jr., YAMAMOTO, D.K., SMITH, M.W. et al. (1980): Antibiotic resistance and its transfer among clinical and nonclinical *Klebsiella* strains in botanical environments.- *Applied and Environmental Microbiology* 39, 97-104.
- TSCHÄPE, H., RISCHE, H. (1974): Ökologie und epidemiologische Bedeutung der infektiösen Chemotherapeutikaresistenz.- *Beitr Hyg Epid* Leipzig, J.A. Barth.
- TSCHÄPE, H., RISCHE, H., STEMPEL, J. (1973) R-Plasmide bei Enterobacteriaceae aus Fluß-, Trink-, und Abwasser.- *Z ges Hyg* 11, 826-829.
- WHO (1983): Control of antibiotic-resistant bacteria memorandum from a WHO-meeting.- *WHO Bull* 61, 423-433.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Wasser und Abwasser](#)

Jahr/Year: 1986

Band/Volume: [1986](#)

Autor(en)/Author(s): Dobberkau H.-J., Schulze E., Stelzer Willibald

Artikel/Article: [Über das Vorkommen von R⁺-Bakterien im Abwasser einer Kläranlage unter besonderer Berücksichtigung der Gentamicin-Resistenz 165-183](#)