

## Antibiotika, Resistenzen und Bakterien in Kläranlagen. **Materialien 72**



## **Antibiotika, Resistenzen und Bakterien in Kläranlagen**

Eine Literaturstudie zu Eigenschaften und Vorkommen von Antibiotika, Bakterien und antibiotikaresistenten Bakterien, insbesondere im Abwasser und in Kläranlagen, sowie zu bekannten und möglichen Verfahren zu Detektion, Quantifizierung und unschädlicher Entsorgung

Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen, Essen 2006

## IMPRESSUM

Herausgeber: Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen (LUA NRW)  
Wallneyer Straße 6 • D-45133 Essen  
Telefon (02 01) 79 95-0  
Telefax (02 01) 79 95-14 46  
Email: [poststelle@lua.nrw.de](mailto:poststelle@lua.nrw.de)

Autor: Dr. Wolfgang Eichler

Bildnachweis: Public Domain aus Wikipedia.org

ISSN: 0947-5206 Materialien

Informations-  
dienste: Aktuelle Umweltdaten aus NRW sowie Informationen  
zu Umweltthemen (Wasser, Boden, Luft, Abfall, Altlasten,  
Anlagen/Umwelttechnik, Lärm/Erschütterungen, Radioaktivität,  
Licht/Elektrosmog, Gentechnik, Stoffdaten) unter

- [www.landesumweltamt.nrw.de](http://www.landesumweltamt.nrw.de)

Aktuelle Luftqualitätswerte zusätzlich im

- Telefonansagedienst (02 01) 1 97 00
- WDR-Videotext Tafeln 177 bis 179

Bereitschafts-  
dienst: Nachrichtenbereitschaftszentrale des LUA NRW  
(24-Std.-Dienst): Telefon (02 01) 71 44 88

Nachdruck – auch auszugsweise – ist nur unter Quellenangaben und Überlassung von Beleg-  
exemplaren nach vorheriger Zustimmung des Herausgebers gestattet. Die Verwendung für  
Werbezwecke ist grundsätzlich untersagt.

# Inhalt

<b>Impressum</b> .....	<b>2</b>
<b>1 Einführung</b> .....	<b>5</b>
<b>2 Antibiotika</b> .....	<b>7</b>
2.1 Humanmedizinisch bedeutsame Antibiotika .....	7
2.2 Tierarzneimittel und Futtermittelzusatzstoffe mit antibiotischer Wirksamkeit .....	7
2.3 In der Gentechnik bedeutsame Antibiotika.....	8
2.4 Messung von Antibiotika in Abwässern und in der aquatischen Umwelt: .....	9
2.4.1 Messung von Antibiotika in Abwässern und Kläranlagen.....	9
2.4.2 Messung von Antibiotika in der aquatischen Umwelt .....	11
2.5 Nachweis- und Messverfahren für Antibiotika im Abwasser .....	12
2.6 Wirkungen von Antibiotika in Kläranlagen und in der aquatischen Umwelt.....	17
<b>3 Bakterien</b> .....	<b>19</b>
3.1 Bakterienspezies mit besonderem Gefährdungspotential für den Menschen .....	19
3.2 Identifizierung (taxonomische Zuordnung) von Bakterienspezies .....	22
3.3 Isolierung, Identifizierung und Quantifizierung von Bakterien aus Umweltproben..	30
3.4 Überlebensfähigkeit (Persistenz) von Bakterien in der Umwelt.....	35
3.5 Genübertragung bei Bakterien .....	36
<b>4 Antibiotikaresistenz von Bakterien</b> .....	<b>41</b>
4.1 Definitionen zur Resistenz .....	41
4.2 Genetische Grundlagen der Antibiotikaresistenz in Bakterien .....	42
4.2.1 Verschiedene Resistenztypen: Primäre und sekundäre Resistenzen.....	42
4.2.2 Übertragbarkeit von Resistenzgenen und die Übertragungsmechanismen.....	46
4.2.3 Spezifität von Resistenzgenen und Sequenzinformationen .....	49
4.2.4 Stabilität von Resistenzgenen unter nichtselektiven Bedingungen.....	50
4.3 Kreuzreaktion von Antibiotika bei der Resistenzinduktion.....	54
4.4 Kombination von Antibiotikaresistenzen mit anderen bedeutenden Funktionen .....	54
4.5 Antibiotikakonzentrationen, die von resistenten Stämmen toleriert werden .....	55
4.6 Die für die Humantherapie bedeutendsten antibiotikaresistenten Bakterien .....	56
4.7 Nachweis von antibiotikaresistenten Bakterien in Abwasser und Kläranlagen.....	62
4.7.1 Verfahren zum Nachweis von Antibiotikaresistenzen.....	62
4.7.2 Veröffentlichte Befunde zu antibiotikaresistenten Bakterien in Kläranlagen.....	65
4.8 Identifizierung des Resistenzmechanismus antibiotikaresistenter Bakterien .....	69
<b>5 Genübertragung im Abwasser</b> .....	<b>73</b>
5.1 Modellversuche zur Genübertragung zwischen Bakterien in Kläranlagen.....	73
<b>6 Verhinderung des Austritts von Antibiotikaresistenzgenen und resistenten Bakterien in die Umwelt</b> .....	<b>75</b>
6.1 Getestete und etablierte Verfahren - Stand von Wissenschaft und Technik- .....	75
6.2 Verfahren, die für diesen Zweck bisher nicht eingesetzt wurden .....	78
<b>7 Ausblick: Wo besteht noch Klärungsbedarf?</b> .....	<b>81</b>
7.1 Verbesserte Datengrundlage über das Vorkommen von Antibiotika im Abwasser, in der Kläranlage und in der Einleitung in den Vorfluter .....	81
7.2 Verbesserte Datengrundlage über das Vorkommen pathogener Bakterien im Abwasserpfad.....	81

7.3	Verbesserte Datengrundlage über das Vorkommen antibiotikaresistenter Bakterien im Abwasserpfad.....	82
7.4	Entwicklung von Verfahren zur Beseitigung von Antibiotika und Bakterien aus Krankenhausabwasser .....	83
7.5	Entwicklung von Verfahren zur Beseitigung von (antibiotikaresistenten) Bakterien aus Kläranlagenabläufen .....	83
<b>8</b>	<b>Strukturen der wichtigsten zitierten Antibiotika.....</b>	<b>85</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>93</b>
<b>10</b>	<b>Definitionen.....</b>	<b>97</b>
<b>11</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>101</b>

# 1 Einführung

So überlebensnotwendig Arzneimittel im Falle einer Erkrankung auch sind, so störend, ja sogar gefährlich können sie für den Menschen sein, wenn sie ohne Indikation und möglicherweise gar dauernd mit Lebensmitteln und/oder Trinkwasser aus der Umwelt aufgenommen werden. Dies ist offensichtlich bei endokrin wirksamen Substanzen mit ihrer unmittelbaren Wirkung auf den Menschen. Im Falle von Antibiotika kommt erschwerend hinzu, dass sie indirekt wirken können, indem sie in der Umwelt die Erreger von Krankheiten, wie pathogene Bakterien, zu deren Abwehr sie eigentlich gedacht sind, resistent gegen die Therapie machen können, noch ehe diese Mikroorganismen im Menschen eine zu therapierende Erkrankung hervorgerufen haben.

Der wichtigste Eintragspfad von pharmakologisch wirksamen Substanzen in die Umwelt ist das Abwasser, wie zahlreiche Untersuchungen gezeigt haben: ([Friedrich, H. et al. \(2005\)](#), [Pinnekamp, J. & Ivashechkin, P. 2005](#), [Salomon, M. 2005](#), [Alexy, R. & Kümmerer, K. 2005](#), [Fahlenkamp, H. et al. 2004](#), [BLAC 2003](#), [Heberer, T. 2002](#), [Jørgensen, S.E. & Halling-Sørensen, B. 2000](#), [Daughton, C.G. & Ternes, T.A. 1999](#)). Daran kann in vielen Fällen auch die Behandlung des Abwassers in Kläranlagen nur wenig ändern.

Die Forderung der 7. Novelle des Arzneimittelgesetzes (AMG) von 1998 (§ 22), die Zulassung wirksamer Medikamente von ihrer Umweltunschädlichkeit abhängig zu machen, wird zu Recht durch die Güterabwägung relativiert: Schutz / Rettung von Gesundheit und Leben von Menschen gegen mögliche höhere Kosten für den Schutz der Umwelt. Die Zulassung eines Arzneimittels kann aufgrund von Risiken für die Umwelt nicht versagt werden. Diese Gewichtung ist für die Nutzen/Risiko-Abwägung im Arzneimittelrecht charakteristisch ([Hart, D. 2005](#)). Wenn also der Eintrag möglicherweise schwer abbaubarer Arzneimittel in die Umwelt nicht verhindert werden kann, ist es notwendig geeignete Maßnahmen zu ihrer Beseitigung zu entwickeln und anzuwenden, bevor es zu einer Gefährdung des Menschen und der Natur kommen kann.

Das trifft sinngemäß auch auf antibiotikaresistente Bakterien zu, die im Patienten zwangsläufig immer dann entstehen, wenn Antibiotika eingesetzt werden und die, insbesondere aus der Darmflora, mit dem Abwasser in die Umwelt gelangen.

Bereits in ([UBA 1997](#)) wurde die Ansicht vertreten: "Kläranlagen wirken als Sammelpunkte für antibiotikaresistente Bakterien der mitunter großen Abwassereinzugsgebiete und sorgen zugleich für deren beständigen Nachschub in die Umwelt."

Um im Sinne einer Risikoabschätzung einen Überblick zu erhalten, was derzeit der Stand der Wissenschaft auf dem Gebiet der Antibiotika in der Umwelt, insbesondere auf dem Abwasserpfad, und der antibiotikaresistenten Bakterien ist, wurde eine Literaturrecherche durchgeführt, deren Ergebnis hier vorgestellt wird.

Speziell wurde der Schwerpunkt der Recherchen auf die Mechanismen der Entstehung von Antibiotikaresistenzen, ihre Funktionsweise und ihren genetischen Hintergrund, die Übertragbarkeit von Resistenzgenen zwischen Bakterien sowie ihre genetische Stabilität in den Bakterien gelegt. Auch verschiedene Strategien zum Nachweis von Antibiotikaresistenz in Bakterien wurden berücksichtigt.

## 2 Antibiotika

### 2.1 Humanmedizinisch bedeutsame Antibiotika

Mit einem Kostenanteil am gesamten Apothekenetat von 20 bis 30% gehören Antibiotika in der Klinik zu den meist verwendeten Arzneimitteln. Bei mehr als 30% aller Krankenhauspatienten werden Antibiotika eingesetzt (Wallmann, J. (1999) . Gegenwärtig sind in Krankenhäusern meist 30 - 40 verschiedene Antibiotika gelistet ([Witte, W. et al. 2004](#)).

Die gemäß ([Bendt, T. et al. 2002](#)) 1998/1999 in Deutschland am häufigsten verschriebenen Antibiotika sind in Tabelle 1 aufgelistet.

**Tabelle 1:** Häufigst verschriebene Antibiotika 1988/1999 in Deutschland

Phenoxymethylpenicillin	Amoxicillin
Doxycyclin	Trimethoprim/Sulfamethoxazol
Erythromycin	Roxithromycin
Clarithromycin	Azithromycin
Clindamycin	Cefaclor
Ciprofloxacin	Ofloxacin

Besondere Bedeutung kommt dabei wegen seines ungünstigen Sorptions- und Abbauverhaltens in der Umwelt dem Sulfonamid-Antibiotikum Sulfamethoxazol zu ([Bergmann, A. et al. 2003](#)).

Mit großer Bedeutung als Reserveantibiotika werden eingesetzt Amikacin ([ZKBS 1999](#)), Vancomycin und Teicoplanin ([Williams, D.H. 1999](#), [Walsh, C. 1999](#), [Ge, M. et al. 1999](#)), Streptogramine ([Trolldenier, H. 1998](#)) sowie Carbapeneme.

Interessant ist ein Befund von ([Färber, H. 2002](#)), dass Krankenhausärzte und niedergelassene Ärzte bei der Verordnung unterschiedliche Spektren von Antibiotika bevorzugen, was nicht allein mit dem höheren Resistenzstatus der Krankenhauskeime zu erklären ist.

### 2.2 Tierarzneimittel und Futtermittelzusatzstoffe mit antibiotischer Wirksamkeit

Bei allen vom EG-Recht in "Antibiotika", "Kokzidiostatika und andere Arzneimittel" und "Wachstumsförderer" (= "Leistungsförderer") kategorisierten Stoffen handelt es sich im engen oder weiteren Sinn um Antibiotika, die zum Teil gleich oder ähnlich auch in der Tier- oder Humanmedizin angewendet werden oder wurden ([BLAC 2003](#), [FMV 2002](#)).

Bei der Verwendung als Arzneimittel werden die Antibiotika nicht nur als Therapeutika, sondern auch für rein prophylaktische Maßnahmen wie z.B. die sogenannte Aufstallungsprophylaxe (mit sogenannten "Antibiotikacocktails") oder das Bruteidipping eingesetzt und auch für metaphylaktische Maßnahmen, also die Bestandsbehandlung bei nur einem oder wenigen erkrankten Tieren ([Helmuth, R. 1999](#)).



1997 und 1999 wurde den antibiotisch wirksamen Zusatzstoffen Avoparcin, Zink-Bacitracin, Virginiamycin, Spiramycin und Tylosinphosphat sowie den Leistungsförderern Carbadox und Olaquinox die Zulassung entzogen.

Weiterhin verwendet werden durften bis 01.01.2006 die Leistungsförderer Avilamycin bei Truthühnern, Flavophospholipol und Monensin-Natrium bei Mastrindern bzw. als Kokzidiostatikum auch bei Geflügel, sowie Salinomycin-Natrium als Kokzidiostatikum.

Die in Anlage 3 der Futtermittelverordnung gelisteten Kokzidiostatika Amprolium, Ethopab, Decoquinat, Halofuginon, Lasalocid, Meticlorpindol, Methylbenzoquat, Narasin, Nicarbazin und Robenidin bleiben weiterhin zugelassen ([BLAC 2003](#), [FMV 2002](#)).

Die in der Aquakultur, d.h. in Fischzuchtanstalten, eingesetzten Antibiotika, z.B. Oxytetracyclin, Trimethoprim, Sulfonamide, Flumequin, Oxolinsäure, Furazolidon und Florfenicol ([Alexy, R. & Kümmerer, K. 2005](#), [Silicato, S. et al. 2005](#)), werden in dieser Literaturstudie nicht berücksichtigt, weil sie nicht auf dem Abwasserpfad, sondern direkt in die Oberflächengewässer gelangen. Das bedeutet nicht, dass die Antibiotika aus diesem Anwendungsbereich kein Problem für die Umwelt darstellen, denn es gelangen z.B. 95% der in Fischzuchtanstalten verabreichten Mengen an Oxytetracyclin unmittelbar in die Umwelt ([Rose, P.E. & Pedersen, J.A. 2005](#)).

## 2.3 In der Gentechnik bedeutsame Antibiotika

Wichtige Beiträge zum Verständnis von Funktion und Wirkungsweise von Antibiotikaresistenzen wurden durch die Verwendung von Resistenzgenen als Selektionsmarker in der Gentechnik seit den 1970er Jahren erhalten.

Nach der Stellungnahme der ZKBS "zur Biologischen Sicherheit von Antibiotika-Resistenzgenen im Genom gentechnisch veränderter Pflanzen" ([ZKBS 1999](#)) sind die in Tabelle 2 gelisteten als die wichtigsten für die Selektion eingesetzten Antibiotika zu nennen.

**Tabelle 2:** Wichtigste für die Selektion eingesetzten Antibiotika in der Gentechnik

Aminoglycosid-Antibiotika:	Kanamycin/Neomycin, Hygromycin, Streptomycin, Spectinomycin, (Amikacin)
β-Lactam-Antibiotika:	Ampicillin, Penicillin G, (Amoxicillin/Tazobactam)
Chloramphenicol	
Tetracycline:	Tetracyclin und Derivate

Daneben sind nach den Katalogen der Hersteller/Vertreiber noch folgende Antibiotika zur Selektion mit entsprechenden Resistenzgenen transformierter Zellen in der Anwendung:

**Tabelle 3:** Weitere Antibiotika zur Selektion in der Gentechnik nach den Katalogen der Hersteller/Vertreiber

Aminoglycosid-Antibiotika:	Geneticin (G418), Gentamicin
Nucleosid-Antibiotika:	Blasticidin S, Puromycin
Makrolid-Antibiotika:	Erythromycin
Glycopeptid-Antibiotika:	Bleomycin-Derivate, z.B. Zeocin

Wenngleich es keine Regelung gibt, die eine anderweitige Entsorgung antibiotikahaltiger Zellkulturüberstände aus Genlaboren und gentechnischen Produktionseinrichtungen vorschreibt, und deshalb diese Flüssigkeiten mit dem Abwasser entsorgt werden, leistet diese Quelle nur einen quantitativ geringfügigen Beitrag zur Antibiotikabelastung des Abwassers.

## 2.4 Messung von Antibiotika in Abwässern und in der aquatischen Umwelt:

### 2.4.1 Messung von Antibiotika in Abwässern und Kläranlagen

Bereits im Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben "Untersuchungen zum Eintrag und zur Elimination von gefährlichen Stoffen in kommunalen Kläranlagen" vom März 2004 ([MUNLV NRW 2004](#)) wurden kommunale Kläranlagen als wichtigste Quellen des Eintrags von Arzneistoffen, u.a. Antibiotika, in die aquatische Umwelt identifiziert ([MUNLV NRW 2004](#) Abschnitt 1.2, S. 23). Dabei blieb aber die Frage nach ihrer Bedeutung für die Entwicklung und Verbreitung der Antibiotikaresistenzen in Bakterien unberücksichtigt.

In der Tabelle in Abschnitt 6.1.13 des Berichtes (MUNLV NRW 2004) werden einige Messergebnisse zu nachgewiesenen Antibiotika in Abläufen kommunaler Kläranlagen in Deutschland gegeben. Doch beschränkt sich die Untersuchung auf einige Makrolid-, Sulfonamid-, Tetracyclin- und Penicillin-Antibiotika sowie Chloramphenicol. Nicht erfasst wurden einige bedeutende Gruppen von Antibiotika wie sie in Tabelle 4 ([Gräfe, U. 1992](#)) genannt sind:

**Tabelle 4:** Nicht erfasste Gruppen von Antibiotika

Aminoglycosid-Antibiotika	z.B. Streptomycin
Glycopeptid-Antibiotika	z.B. die Vancomyningruppe
Benzochinon-/Aziridin-Antibiotika	z.B. Mitomycin
makrozyklische Lacton-/Lactam-Antibiotika	z.B. Blasticidin, Zytochalsin, Brefeldin
Makrolactam-Antibiotika	z.B. Ansamycine
Fluorochinolone	z.B. Ciprofloxacin, Norfloxacin u.a. "Floxacine"

Umfangreicher ist eine Untersuchung des Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit der Universität Bonn im Auftrag des Landesumweltamtes NRW "Untersuchung von Krankenhausabwässern eines Universitätsklinikums, von kommunalem Abwasser sowie von Oberflächenwasser und Uferfiltraten auf Rückstände ausgewählter Antibiotika" ([Färber, H. et al. 2001](#)), in der neben  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, Tetracyclinen, Sulfonamiden und Makrolid-Antibiotika auch Fluorochinolone und das Glycopeptid-Antibiotikum Vancomycin unter-

sucht wurden. Obwohl aus einer dem Bericht beigefügten Graphik hervorgeht, dass im Klinikum auch Aminoglycosid-Antibiotika (Neomycin-Sulfat) verabreicht wurden, wurden diese nicht im Abwasser untersucht.

Interessant ist auch, dass diese Gruppe unterschiedliche Muster des Antibiotikaeinsatzes in der Klinik und in der häuslichen Anwendung feststellen konnte: Unter den 500 kg der von der Klinikumsapotheke im Jahr 2000 an die verschiedenen Kliniken abgegebenen Antibiotika waren die mengenmäßig bedeutendsten Piperacillin, Ampicillin, Cefuroxim, Sulfamethoxazol, Ciprofloxacin und Clindamycin. Zur gleichen Zeit waren die häufigsten, durch niedergelassene Ärzte verordneten Antibiotika (ohne Mengenangabe) Phenoxymethylpenicillin, Amoxicillin, Doxycyclin, Sulfamethoxazol, Erythromycin, Roxithromycin und Clarithromycin (jeweils in der Reihenfolge absteigender Menge) ([Färber, H. 2002](#)).

Bei der Quantifizierung von Antibiotika in der Kläranlage ist zu beachten, dass durch Acetylierung oder Phosphorylierung inaktivierte Antibiotika in Gülle oder Belebtschlamm wieder zum aktiven Antibiotikum regeneriert werden können (z.B. 48 Stunden bei 17-22°C), dass also die für die Selektion einer Resistenz wirksame Antibiotikakonzentration tatsächlich höher sein kann als die gemessene ([Feuerpfeil, I. et al. 1999](#)). Will man also die für die Selektion effektive Antibiotikakonzentration ermitteln, empfiehlt es sich auch die Menge regenerierbarer Antibiotikaderivate zu bestimmen.

Für die Sicherung der Proben von der Probenahme bis zur Analyse ist zu beachten, dass die spontane Abbaugeschwindigkeit von Antibiotika in Oberflächenwasser geringer ist als in Abwasser und hier wieder geringer als in Belebtschlamm und dass der Abbau durch die Anwesenheit von Sauerstoff in jedem dieser Medien nochmals beschleunigt wird. Unterhalb der toxischen Konzentrationen wird die Halbwertszeit der Biodegradation für ein bestimmtes Medium nur durch die Art des Antibiotikums und nicht durch seine Ausgangskonzentration bestimmt ([Ingerslev, F. et al. 2001](#)). Untersucht wurden die Antibiotika Metronidazol, Olaquinox, Oxytetracyclin und Tylosin.

In den Experimenten von ([Kümmerer, K. et al. 2000](#)) konnte für Ciprofloxacin, Ofloxacin und Metronidazol bei Konzentrationen, wie sie für Klinikabwasser zu erwarten sind, und die unter der durchschnittlichen MHK von Krankheitserregern liegen, im "Closed Bottle Test" (OECD 301 D) bei Ausgangszellichten von 1000-10000 Zellen/ml über 40 Tage kein signifikanter Abbau nachgewiesen werden.

Mit dem gleichen Testsystem (Ausgangszellichten von 10-1000 Zellen/ml) wurde die aerobe Biodegradation von 18 klinisch bedeutenden Antibiotika untersucht ([Alexy, R. et al. 2004](#)): Nur Benzylpenicillin (Penicillin G) wurde in 28 Tagen signifikant (27% und in 40 Tagen zu 35% ([Al-Ahmad, A. et al. 1999](#))) abgebaut, für alle übrigen Antibiotika (Amoxicillin, Ceftriaxon, Cefuroxim, Chlortetracyclin, Clarithromycin, Clindamycin, Erythromycin, Gentamicin, Imipenem, Metronidazol, Monensin, Nystatin, Ofloxacin, Sulfamethoxazol, Tetracyclin, Trimethoprim und Vancomycin) war kein Abbau nachweisbar.

Aus diesen Befunden und dem Ergebnis eines Wachstumshemmtests (CFU monitoring) mit *Pseudomonas putida*, der mit Sulfamethoxazol die höchste Toxizität zeigte und mit Ciprofloxacin und Meropenem schwache aber signifikante Effekte, schlossen die Autoren ([Al-Ahmad, A. et al. 1999](#)), dass ins kommunale Abwasser abgegebene Antibiotika die biologischen Prozesse in der Kläranlage beeinflussen können und dass sie beim Persistieren in der Umwelt zur zunehmenden Resistenz pathogener Bakterien beitragen können.

## 2.4.2 Messung von Antibiotika in der aquatischen Umwelt

Bei einer systematischen Untersuchung von Flüssen in den USA konnten mittels Festphasenextraktion (SPE = solid phase extraction), LC/MS-ESI(+) (Flüssigchromatographie / Massenspektrometrie mit positiver Ionen-Elektrospray-Analyse) und SIM (selektiertes Ionen-Monitoring) 22 verschiedene Antibiotika in ~50% aller gesammelten Proben nachgewiesen werden ([Kolpin, D.W. et al. 2002](#)) (jeweils maximale gemessene Konzentration in µg/l), siehe Tabelle 5.

**Tabelle 5:** Antibiotikagehalte in Flüssen der USA

Antibiotikum	µg/l	Antibiotikum	µg/l	Antibiotikum	µg/l
Chlortetracyclin	0,69	Oxytetracyclin	0,34	Sulfamethoxazol	1,9
Ciprofloxacin	0,03	Roxithromycin	0,18	Tetracyclin	0,11
Erythromycin-H <sub>2</sub> O	1,7	Sulfadimethoxin	0,06	Trimethoprim	0,71
Lincomycin	0,73	Sulfamethazin	0,22	Tylosin	0,28
Norfloxacin	0,12	Sulfamethizol	0,13		

Die Analysenmethoden für Tetracycline und Sulfonamid-Antibiotika wurden in ([Lindsey, M.E. et al. 2001](#)) detailliert beschrieben.

Dagegen wurden in einer deutschen Studie (siehe Tabelle 6), in der Proben aus Oberflächengewässern mit Proben aus Kläranlagenausflüssen verglichen wurden ([Hirsch, R. et al. 1999](#)), in den Oberflächengewässern nur wenige Antibiotika in Konzentrationen über der Bestimmungsgrenze von 20 ng/l gefunden (maximale Konzentration in µg/l):

**Tabelle 6:** Antibiotika in deutschen Oberflächengewässern

Antibiotikum	µg/l	Antibiotikum	µg/l	Antibiotikum	µg/l
Chloramphenicol	0,06	Clarithromycin	0,26	Sulfamethoxazol	0,48
Erythromycin-H <sub>2</sub> O	1,7	Roxithromycin	0,56	Trimethoprim	0,20

Die gleichen Antibiotika dominierten auch die Kläranlagenabflüsse.

Bei Untersuchungen in der Schweiz wurde festgestellt, dass die Fluorochinolonantibiotika Ciprofloxacin und Norfloxacin in Kläranlagen zu 80-90% eliminiert werden, allerdings nicht durch Abbau, sondern durch Adsorption, so dass die Gehalte in Klärschlamm 2-3 mg/kg erreichten; im Vorfluter wurden Konzentrationen bis zu 19 ng/l gemessen. Clarithromycin als wichtigstes Makrolid-Antibiotikum wurde in Kläranlagenausläufen im Konzentrationsbereich von 0,06 bis 0,33 µg/l gefunden ([Giger, W. et al. 2003a](#), [Giger, W. et al. 2003b](#), [Golet, E.M. et al. 2003](#)). Als Hauptquelle des Eintrags wurde hier übrigens das Abwasser einer großen Universitätsklinik mit Konzentrationen von Ciprofloxacin zwischen 3 und 87 µg/l nachgewiesen ([Hartmann, A. et al. 1998](#)).

Ein Überblick über die Quantifizierung von Antibiotika in Kläranlagenabläufen und/oder in Oberflächengewässern findet sich in ([Alexy, R. 2003](#), [Alexy, R. & Kümmerer, K. 2005](#)).

## 2.5 Nachweis- und Messverfahren für Antibiotika im Abwasser

Standardisierte Wirkungstests haben sich zur Bestimmung der Aktivität von Antibiotika in Umweltproben als ungeeignet erwiesen ([Kümmerer, K. et al. 2004](#)). Daher ist man zu ihrer Analyse auf klassische physikalisch-/chemische Verfahren angewiesen:

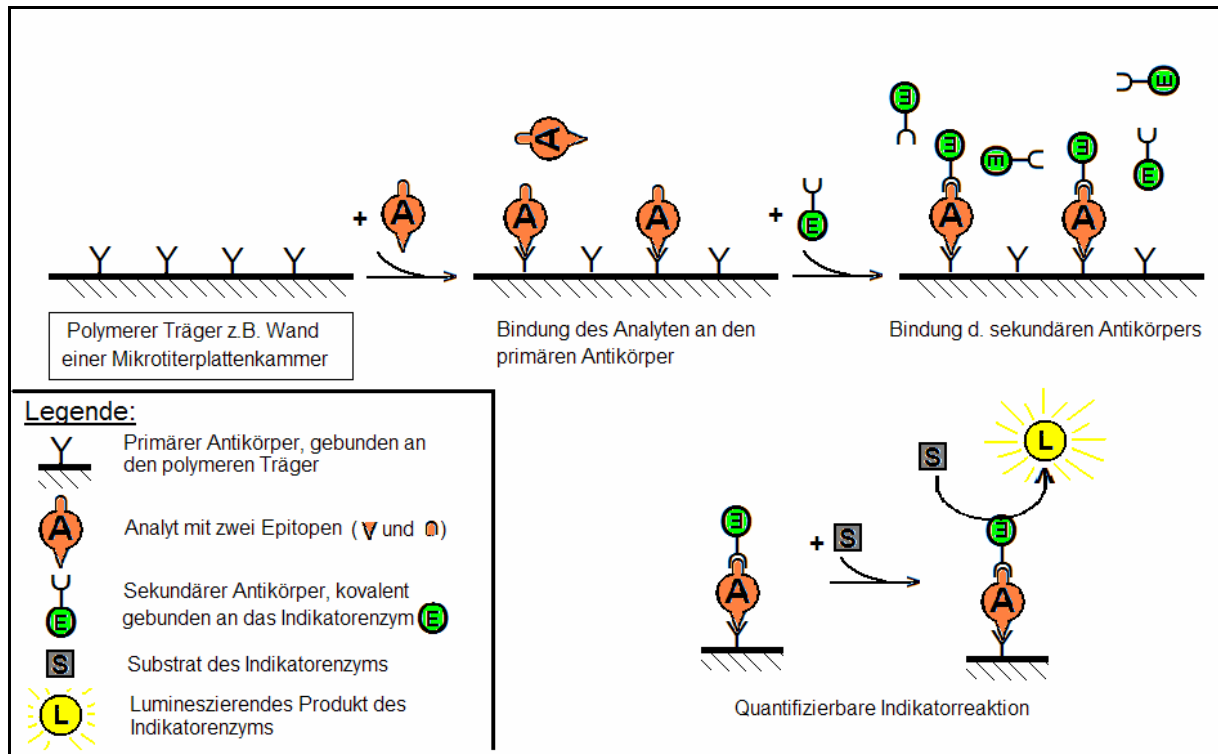
Einige wenige Antibiotika lassen sich mit relativ einfachen Geräten empfindlich nachweisen und quantifizieren. So wurden Fluorochinolone in städtischem Abwasser in Konzentrationen bis zu 45 ng/l mittels Festphasenextraktion (SPE) und RP-HPLC mit Fluoreszenzdetektion erfasst ([Golet, E.M. et al. 2001](#), [Golet, E.M. et al. 2002](#)), ebenso wie Oxytetracyclin in ([Silicato, S. et al. 2005](#)) bis zu 0,5 µg/l in einer Aquakultur. Für andere Antibiotika und niedrigere Konzentrationen sind erheblich aufwendigere Verfahren erforderlich.

An der Universität Bonn wurde ein HPLC-MS/MS-Verfahren entwickelt, das auch in einem von NRW in Auftrag gegebenen Forschungsvorhaben eingesetzt wurde ([Färber, H. et al. 2001](#)). Die Nachweisgrenzen lagen bei 0,5-25 ng/l, die Wiederfindungsraten lagen bei 62-65% für die Wirkstoffe Clindamycin, Spiramycin und Ofloxacin, für alle anderen untersuchten Antibiotika bei 70-110% ([Färber, H. 2002](#)).

In einer Untersuchung zu Pharmaka im Grundwasser ([Sacher, F. et al. 2001](#)) wurde GC MS/MS bzw. HPLC-MS/MS nach SPE eingesetzt und es wurden für eine Vielzahl von Antibiotika, hauptsächlich Sulfonamide, Makrolide und Penicilline, Bestimmungsgrenzen zwischen 3,5 und 21 ng/l ermittelt.

Eine neuere sehr gut dokumentierte Untersuchung ([Göbel, A. et al. 2004](#)), bei der verschiedene Makrolid- und Sulfonamid-Antibiotika in Proben aus einer Kläranlage (nach der mechanischen Reinigung, nach der biologischen Reinigungsstufe und nach der Sandfiltration) mittels HPLC-MS/MS nach SPE analysiert wurden, berichtete über Wiederfindungsraten  $\geq 80\%$  (außer Trimethoprim mit 30-47%) und Messunsicherheiten zwischen 2 und 18%. Dabei waren die Wiederfindungsraten für Sulfonamide mit 91-108% (MW = 100, SD = 0,9-10%) höher als für die Makrolide 78-124% (MW = 91%, SD = 1,0-10%). Die gemessenen Konzentrationen lagen vor der Belebung zwischen 22 ng/l für Roxithromycin und 1450 ng/l für Sulfamethoxazol, nach der Sandfiltration aber noch bei 10 ng/l für Roxithromycin und 423 ng/l für Sulfamethoxazol. Von den in messbarer Konzentration vorhandenen Antibiotika wurde also keins in der Kläranlage vollständig eliminiert.

Mit einer Immunoassay-Schnellmethode konnte ein Antibiotikum (Sulfadimidin) im Bereich von 1 bis 2 mg/kg nachgewiesen werden ([Christian, T. et al. 2003](#)). Es sollte geprüft werden, ob sich immunologische Methoden nach entsprechender Probenvorbereitung (mit Aufkonzentrierung) auch für andere Antibiotika und in den in Wasserproben zu erwartenden Konzentrationen entwickeln bzw. einsetzen lassen. Da bereits durch in vitro-Evolution z.B. ([McCafferty, J. et al. 1990](#), [He, M. & Taussig, M.J. 2002](#), [Knappik, A. 2006](#)) spezifische Antikörper mit einer  $K_d$  von  $5 \times 10^{-14}$  mol/l (50 fM) erhalten wurden ([Tuerk, C. & Gold, L. 1990](#)), ist die Entwicklung von ELISA (= enzyme-linked immuno-sorbent assay)-Tests oder eines Bio-Chips ([Morhard, F. et al. 2000](#)) zur Detektion bzw. Quantifizierung von Antibiotika prinzipiell denkbar.



**Abbildung 1:** Funktionsprinzip der ELISA-Tests

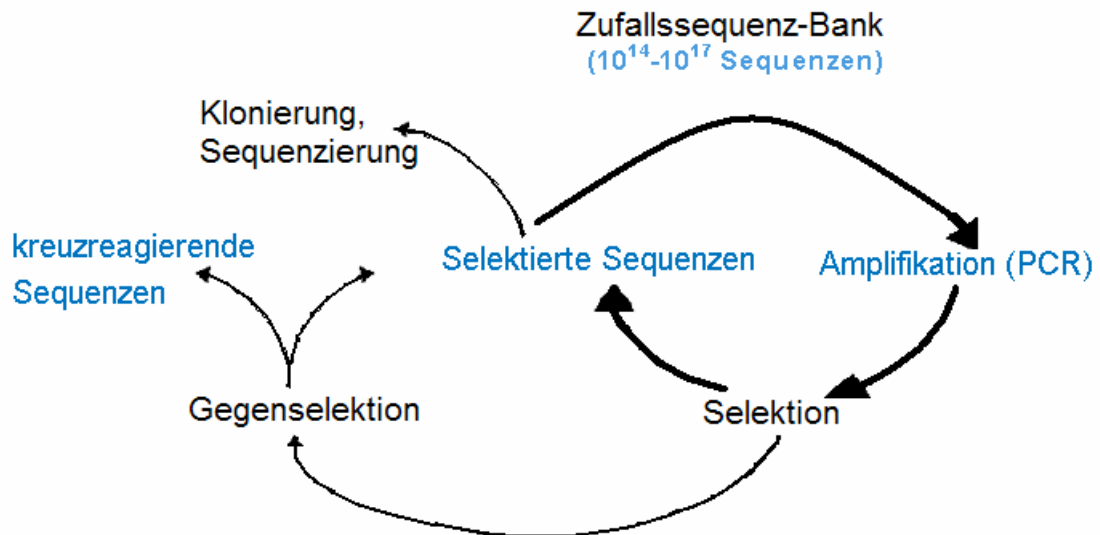
Statt Antikörpern könnte man für die Antibiotikaanalytik auch durch in vitro-Evolution z.B. mittels "Phage-Display", ([Knappik, A. 2006](#)) optimierte Bindeproteine ( z. B. bakterielle Penicillin-Bindeproteine – PBPs ) einsetzen oder "Aptamere".

Aptamere sind einzelsträngige RNA oder DNA Oligonukleotide, die auf Grund ihrer Raumstruktur bestimmte Zielmoleküle spezifisch erkennen und an sie binden ([Tuerk, C. & Gold, L. 1990](#), [Ellington, A.D. & Szostak, J.W. 1990](#), [Hermann, T. & Patel, D.J. 2000](#)). Aptamere können noch spezifischer sein als Monoklonale Antikörper. Es wurden Aptamere mit picomolarer Affinität publiziert. Ihre diskriminatorische Kapazität übertrifft häufig die von Antikörpern; so ist die Bindungsaffinität eines gegen Theophyllin selektierten Aptamers zu seinem Liganden 10.000 mal größer als zu dem strukturell nahe verwandten Coffein ([Jenison, R.D. et al. 1994](#)). Aptamere werden überwiegend für diagnostische Zwecke eingesetzt, weil sie oft für einen Einsatz in vivo zu instabil sind. Sie werden mittels der SELEX Methode (= Systematische Evolution von Liganden durch EXponentielle Anreicherung) gewonnen. Biologisch schwerer abbaubare Derivate können durch klassische chemische Synthese hergestellt werden. Da bereits hochspezifische Aptamere gegen Antibiotika mit nanomolaren  $K_d$ s erzeugt wurden (Tobramycin 9-12 nM, Neomycin B 115 nM ([Ellington, A.D. & Szostak, J.W. 1992](#), [Hermann, T. & Patel, D.J. 2000](#), [Jiang, L. et al. 1997](#), [Jiang, L. & Patel, D. J. 1998](#), [Jiang, L. et al. 1999](#))) und da bereits Aptamer-basierte Biosensoren erprobt wurden ([Kleijung, F. et al. 1998](#), [Bruno, J.G. & Kiel, J.L. 1999](#), [Homann, M. & Göringer, H.-U. 1999](#)), könnten nach dem Stand der Technik hochempfindliche Antibiotika-Biosensoren auf der Grundlage von Aptameren durchaus entwickelt werden.

Die Entwicklungs- und Herstellungskosten für Biosensoren auf Aptamerbasis werden in der Literatur als erheblich niedriger eingeschätzt als die auf Proteinbasis (z.B. Antikörper).

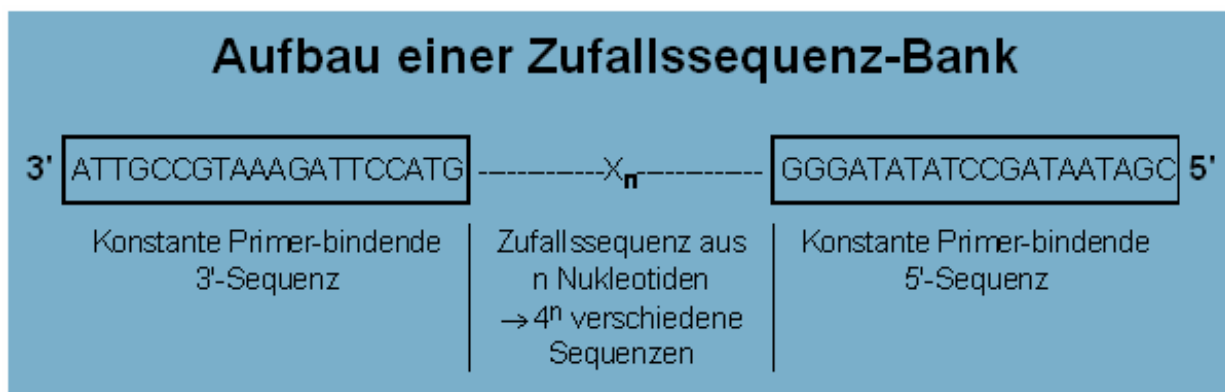
Zur möglichen Nutzung solcher Biosensoren für die Quantifizierung von Pharmaka und endokrinen Disruptoren im Abwasser wird derzeit eine weitere Literaturstudie erstellt.

## SELEX-Verfahren



**Abbildung 2:** Selex-Verfahren zur Gewinnung von DNA-Aptameren

Einzelstrang-DNA-basierte Aptamere sind gemäß ([Ellington, A.D. & Szostak, J.W. 1992](#)) wegen ihrer höheren Stabilität bei gleicher Spezifität besser geeignet als RNA-basierte Aptamere



**Abbildung 3:** Schema zum Aufbau einer Zufallssequenz-Bank für die Aptamer-Erzeugung

Eine Zufallssequenz aus:

- n = 25 Nukleotiden ergibt eine Oligonukleotid-Bank aus ca.  $10^{15}$  Sequenzen,
- n = 50 Nukleotiden ergibt eine Oligonukleotid-Bank aus ca.  $10^{30}$  Sequenzen,
- n = 75 Nukleotiden ergibt eine Oligonukleotid-Bank aus ca.  $10^{45}$  Sequenzen,
- n = 100 Nukleotiden ergibt eine Oligonukleotid-Bank aus ca.  $10^{60}$  Sequenzen.

Ein Mol eines 25mers wiegt ca. 7,5 kg (entsprechend rund  $10^{23}$  Molekülen), d.h. um statistisch 1 Molekül von jeder möglichen Variante zu haben, benötigt man 75 µg Oligonukleotid.

Für eine 50-fache statistische Deckung benötigt man 3,75 mg Oligonukleotid.

Für einfache statistische Deckung benötigt man (nach Abzug der Primer)

- beim 40mer 120 kg,
- beim 50mer  $1,5 \times 10^8$  kg und
- beim 100mer  $3 \times 10^{38}$  kg.

Nachteil langer Zufallssequenzen:

Je länger die Zufallssequenz, desto kleiner ist der Ausschnitt der möglichen Sequenzen, der von einer Probe im mg-Maßstab repräsentiert wird.

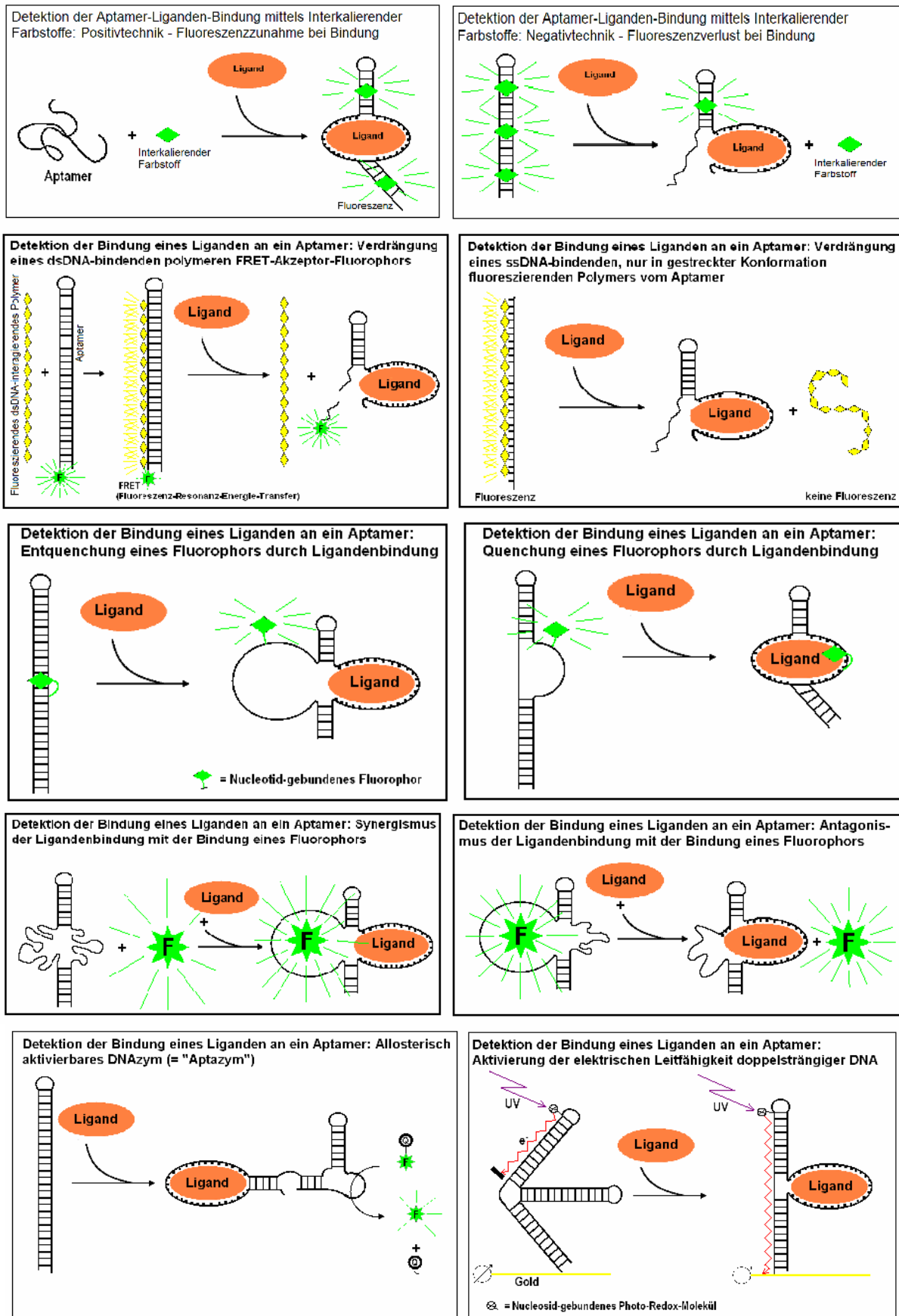
Vorteil langer Zufallssequenzen:

Ein einziges 100mer enthält bereits 75 verschiedene 25mer Sequenzen bzw. 50 verschiedene 50mer Sequenzen.

Das kann das Selektionsverfahren beschleunigen.

Die nachfolgende Abbildung zeigt eine Auswahl möglicher Verfahren zum Nachweis der spezifischen Bindung eines Liganden an das Aptamer:





**Abbildungen 4:** Verfahren zum Nachweis der spezifischen Bindung eines Liganden an das Aptamer

Alternativ könnte die Bindung des Liganden an das Aptamer auch mit einem Quarzresonator-Sensor detektiert werden ([Balck, A. 2006](#), [Balck A. et al. 2006](#)).

## 2.6 Wirkungen von Antibiotika in Kläranlagen und in der aquatischen Umwelt

In einem vom Umweltbundesamt in Auftrag gegebenen Forschungsprojekt wurden Abbau und Toxizität von Antibiotika sowie ihre Wirkung auf die biologischen Prozesse in der Kläranlage und mögliche Einflüsse auf die Reinigungsleistung der Kläranlage untersucht aber auch ihre Freisetzung aus der Kläranlage in die Umwelt ([UBA 2005](#)). Als Ergebnis dieser Studie, deren Schwerpunkt wohl in der Methodenentwicklung lag, wurde festgehalten, dass die Funktion von Kläranlagen auch bei Spitzenlast nicht beeinträchtigt wird, dass aber der größte Teil der Antibiotika bei der Passage durch die Kläranlage nicht abgebaut wird, so dass eine Beeinträchtigung der Umwelt durch die Antibiotika möglich ist.

Ein etwas abweichendes Ergebnis wurde von ([Dokianakis, S.N. et al. 2004](#)) publiziert, die im Belebtschlamm eine Beeinträchtigung der Nitrifikation, speziell der Oxidation von Nitrit zu Nitrat, durch Sulfamethoxazol feststellten. Allerdings trat dieser Effekt erst bei sehr hohen, in Kläranlagen nicht zu erwartenden, Konzentrationen > 2 mg/l auf.

Bei der Untersuchung von Abwasser einer großen Universitätsklinik zeigte sich, dass die mittels umuC-Test nachgewiesene genotoxische Wirkung entgegen den Erwartungen nicht auf antineoplastische Arzneimittel (Zytostatika) zurückzuführen ist, sondern auf das in Konzentrationen von 3 bis 87 µg/l bestimmte Fluorochinolonantibiotikum Ciprofloxacin ([Hartmann, A. et al. 1998](#)). Wenn Fluorochinolonantibiotika umuC aktivieren können, bedeutet das, dass sie auch über das SOS-System die Mutationsrate, die Genübertragungsrate und die Rekombinationsrate erhöhen können und somit die Resistenzentstehung fördern.

Ein wichtiges, häufig nicht berücksichtigtes Ziel von Antibiotika in der Umwelt sind die Blaualgen oder Cyanobakterien, die durch ihre Sauerstoffproduktion eine wichtige Funktion bei der Reinhaltung der Oberflächengewässer erfüllen. Den Einfluss von Antibiotika, die teils in der Humanmedizin, teils in der Veterinärmedizin eingesetzt werden, auf diese Organismengruppe und auf die eukaryoten Grünalgen untersuchte ([Halling-Sørensen, B. 2000](#)). Dabei zeigte sich, dass die Blaualge *Microcystis aeruginosa* sehr empfindlich auf die meisten Antibiotika reagierte, während deren Toxizität für die Grünalge *Selenastrum capricornutum* um ca. zwei Größenordnungen geringer war. In dieser Veröffentlichung wurden auch EC<sub>50</sub>-Werte für *M. aeruginosa* aus früheren Arbeiten referiert.

**Tabelle 7:** EC<sub>50</sub>-Werte von Antibiotika für Blau- und Grünalgen

	<i>M. aeruginosa</i>	<i>S. capricornutum</i>
Antibiotikum	EC <sub>50</sub> mg/l	mg/l
Benzylpenicillin (Penicillin G)	0,006	>> 100 (NOEC)
Tetracyclin	0,09	2,2
Chlortetracyclin	0,05	3,1
Streptomycin	0,007	0,133
Spiramycin	0,005	2,3
Tylosin	0,034	1,38
Tiamulin	0,003	0,165
Olaquinox	5,1	40
Oxytetracyclin	0,207*	---
Sulfadiazin	0,135*	---
Ciprofloxacin	0,005*	---
Flumequin	0,159*	---
Oxolinsäure	0,18*	---
Sarafloxacin	<0,015*	---

Dass nicht nur die Antibiotika selbst, sondern auch ihre Abbauprodukte Auswirkungen auf die Bakterien in Kläranlagen haben können, wurde von ([Halling-Sørensen, B. et al. 2002](#)) gezeigt: Die wichtigsten Abbauprodukte von Tetracyclin, Chlortetracyclin und Oxytetracyclin, die in wässriger Lösung unter dem Einfluss von Umwelteinflüssen, wie pH-Werten, chelatbildenden Metallionen und Licht, entstehen können, z.B. 5a,6-Anhydrotetracyclin, 5a,6-Anhydrochlortetracyclin und verschiedene Epi-Formen, hatten z.T. das selbe toxische Potential gegenüber Bakterien aus Klärschlamm und gegenüber Tetracyclin-sensitiven Bodenbakterien wie die Ausgangstetracycline. Die beiden 5a,6-Anhydrotetracycline wirkten sogar stark bakteriostatisch auf Tetracyclin-resistente Bakterien, was zu der Vermutung Anlass gab, dass ihre Wirkungsweise eine andere ist als die der Tetracycline.

### 3 Bakterien

#### 3.1 Bakterienspezies mit besonderem Gefährdungspotential für den Menschen

1. Bakterienarten, die typisch für klinische Infektionskrankheiten und Krankenhausinfektionen sind, sind beispielhaft in der Tabelle 8 aufgeführt:

**Tabelle 8:** Typische Keime für klinische Infektionskrankheiten und Krankenhausinfektionen

Gattung	Art (Stamm / Pathovar / Serovarietät)
<i>Acinetobacter</i>	spp. (z.B. <i>baumannii</i> )
<i>Enterobacter</i>	<i>aerogenes</i>
<i>Haemophilus</i>	<i>influenzae</i>
<i>Legionella</i>	spp(z.B. <i>pneumophila</i> ).
<i>Mycoplasma</i>	<i>genitalium</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>

([Hübner, I. et al. 1992b](#), [Mrázek, J. & Karlin, S. 1996](#), [Witte, W. & Klare, I. 1999](#), [De Gheldre, Y. et al. 1997](#), [Towner, K.J. 1997](#), [Kohnen, W. et al. 2004](#))

2. Als Ursachen von Lebensmittel-Infektionen und -Intoxikationen sowie Zoonosen wurden von ([Sinell, H.-J. 1994](#), [Klare, I. et al. 1995a](#)) und ([Tschäpe, H. 2000](#)) die bedeutendsten bakteriellen Erreger benannt, die in Tabelle 9 aufgelistet sind:

**Tabelle 9:** Bedeutendste Erreger bei Lebensmittel-Infektionen

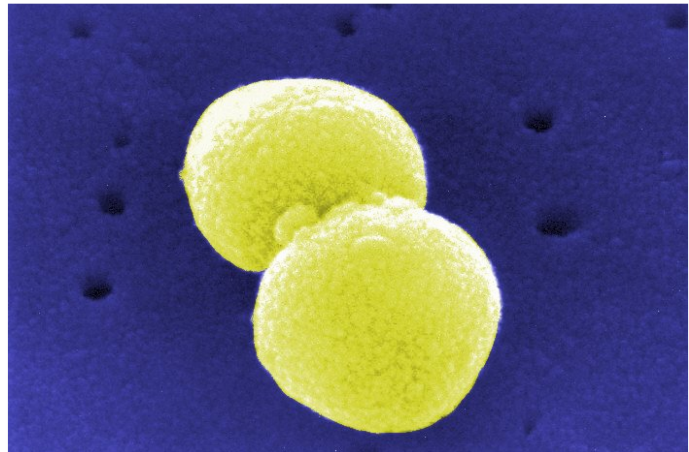
Gattung	Art (Stamm / Pathovar / Serovarietät)
<i>Aeromonas</i>	<i>caviae, hydrophila, punctata, salmonicida</i>
<i>Bacillus</i>	<i>cereus</i>
<i>Brucella</i>	<i>melitensis</i>
<i>Campylobacter</i>	<i>coli, fetus, jejuni, sputorum</i>
<i>Clostridium</i>	<i>botulinum, perfringens</i>
<i>Coxiella</i>	<i>burnetii</i>
<i>Edwardsiella</i>	<i>tarda</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>faecium, faecalis</i>
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i> (z.B. EPEC, EHEC)
<i>Helicobacter</i>	<i>pylori</i>
<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>
<i>Mycobacterium</i>	<i>bovis, tuberculosis</i>
<i>Plesiomonas</i>	<i>shigelloides</i>
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (z.B. Serovarietäten Typhimurium, Paratyphi, Enteritidis, Typhi)
<i>Shigella</i>	<i>dysenteriae, flexneri</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>equi</i> subsp. <i>zooepidemicus, pyogenes,</i>
<i>Vibrio</i>	<i>parahaemolyticus</i>
<i>Yersinia</i>	<i>enterocolitica, pseudotuberculosis, pestis</i>

3. In einer Literaturstudie ([Mathys, W. 1998](#)) für das MUNLV NRW wurden im Abschnitt 2 einige für den Abwasserbereich relevante Bakterien beschrieben; die darin angegebenen Literaturzitate werden hier nicht noch einmal wiederholt.

Gemäß neuerer Publikationen ([Kohnen, W. et al. 2004](#), [Bergmann, A. et al. 2003](#), [Witte, W. & Mielke, M. 2003](#), [Bendt, T. et al. 2002](#), [Feuerpfeil, I. & Schulze, E. 1992](#), [Stelzer, W. & Ziegert, E. 1988](#)) wurden im Zu- und Abfluss von Kläranlagen u.a. bereits folgende potenziell pathogenen Bakterienspezies nachgewiesen:

*Acinetobacter* spp.,  
*Aeromonas* spp.,  
*Campylobacter* spp.,  
*Clostridium* spp.,  
*Coliforme*,  
*Enterococcus* sp.  
(z.B. *faecium*, *faecalis*),  
*Escherichia coli*,  
*Klebsiella* spp.,  
*Pseudomonas aeruginosa* und  
*Salmonella* spp..

***Streptococcus pneumoniae* im Raster-Scanning  
Mikroskop** (Public-Domain-Bild aus Wikipedia.org)

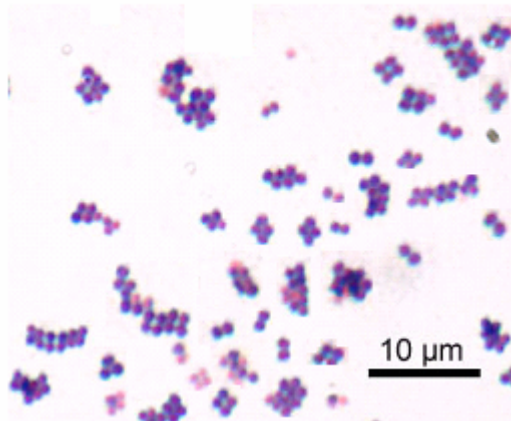


**Abbildung 5:** Raster-Scanning-Mikroskopiebild von *Streptococcus pneumoniae*

Das Vorkommen pathogener Bakterien in Umweltmedien, z.B. dem Abwasser, hängt entscheidend von ihrer Lebensweise ab. So sind als "Stoffwechselfarasiten" lebende obligat intrazelluläre Bakterien, wie z.B. *Chlamydia*, *Rickettsia* und *Coxiella* spp., mit Sicherheit nicht im Abwasser lebensfähig.

***Staphylococcus aureus*  
(Gram-Färbung)**

(Public-Domain-Bild aus Wikipedia.org)



**Abbildung 6:** *Staphylococcus aureus*  
(Gram-Färbung)

Doch schon bei den fakultativ intrazellulären Bakterien ist die Gruppe der "professionell intrazellulären Bakterien" wie *Listeria*, *Salmonella*, *Shigella* und *Yersinia* spp. im Abwasser hinreichend stabil und erst recht die "nichtprofessionell intrazellulären Bakterien", zu denen z.B. enteropathogene *E. coli* (EPEC), *Enterococcus* und *Neisseria* spp. sowie *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pyogenes* gehören, die in der Regel extrazellulär lokalisiert sind und nur in Ausnahmefällen mit sehr geringer Invasionseffizienz in ihre Wirtszellen einwandern ([Dersch, P. 2002](#)).

Hinweise auf die Überlebensfähigkeit einer Bakterienspezies im Abwasser bzw. in der Kläranlage kann man ihren Ansprüchen bezüglich Temperatur, pH-Bereich, aw-Wert (Wasseraktivität: 0 = absolut trocken, 1 = reines Wasser) und Mineralien-/Salzgehalt (z.B. bei *Vibrio* spp.) sowie ihrer Empfindlichkeit gegen Detergenzien entnehmen ([Sieffert, M. & Stolle, A. 2002](#)).

***Streptococcus pyogenes***  
**(Lichtmikroskopie)**  
(Public-Domain-Bild aus Wikipedia.org)



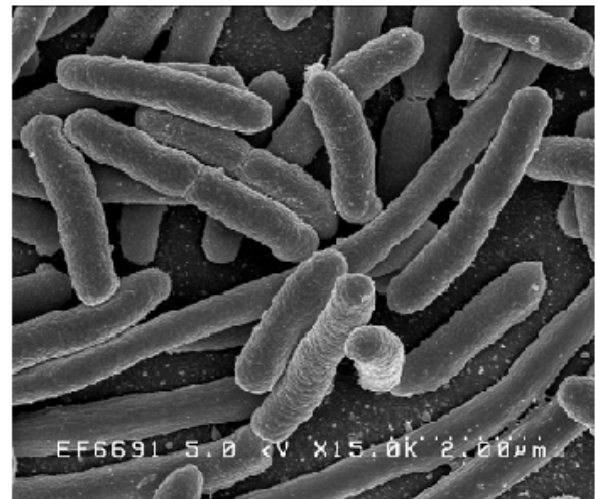
**Abbildung 7:** Ansicht von *Streptococcus pyogenes* im Lichtmikroskop

### 3.2 Identifizierung (taxonomische Zuordnung) von Bakterienspezies

#### Morphologisch-metabolische Taxonomie:

Da der Nachweis von pathogenen Erregern mit Kulturverfahren nur sehr aufwendig zu vollziehen ist ([Sieffert, M. & Stolle, A. 2002](#)), wurden im (Trink-)Wasserbereich routinemäßig als sogenannte Indikatororganismen, beschränkt auf einige wenige Stoffwechselmerkmale, Coliforme Bakterien und *E. coli* nachgewiesen, da deren Anwesenheit in Trinkwasser auch die Kontamination mit unerwünschten oder gar krankheitserregenden Bakterien statistisch wahrscheinlich macht ([Obst, U. 1994](#), [DIN 38 411 K5 1983](#), [DIN 38 411 K6-2 1992](#)).

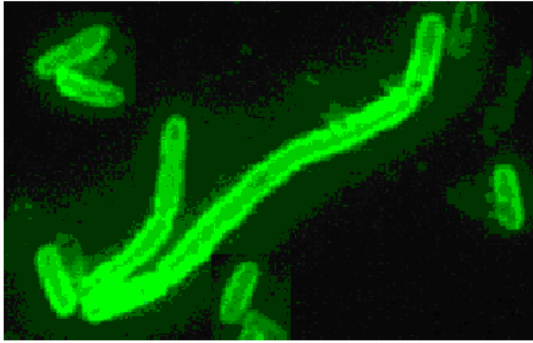
***Escherichia coli* (Raster-Scanning-Mikroskop)**  
Public-Domain-Bild aus Wikipedia.org



**Abbildung 8:** Ansicht von *Escheria coli* im Raster-Scanning-Mikroskop

Neben den auf Kultivierung der Bakterien beruhenden Nachweisen wurden auch Schnelltests entwickelt, die auf spezifischer Enzymausstattung der Spezies beruhen ([Frahm, E. et al. 1992](#)).

*Yersinia pestis* (Lichtmikroskopie, Fluoreszenzfärbung)  
Public-Domain-Bild aus Wikipedia.org

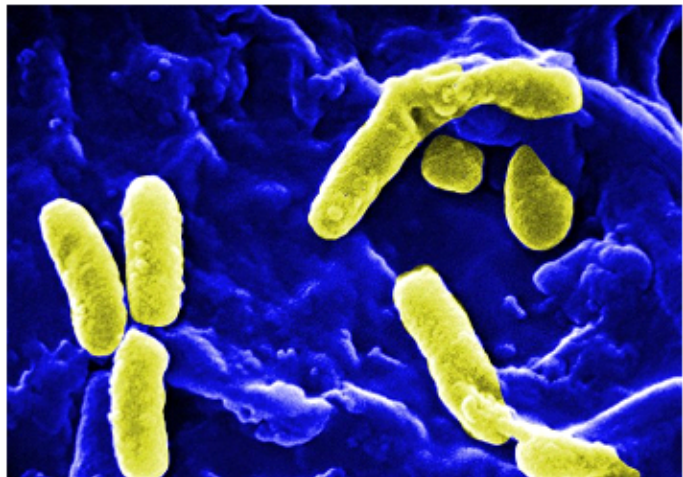


**Abbildung 9:** Ansicht von *Yersinia pestis* im Lichtmikroskop nach Fluoreszenzfärbung

Die Umsetzung einer Kohlenstoffquelle führt zur irreversiblen Reduktion einer farblosen Vorstufe zu einem Tetrazolium-Farbstoff, der photometrisch detektiert werden kann. Die Musterverteilung der positiven Felder in der 95-Loch-Mikrotiterplatte kann mittels automatisiertem "Microplate reader" gelesen und mit einem Computerprogramm einer bestimmten Spezies zugeordnet werden ([Bochner, B.R. 1989](#), [Bochner, B.R. 1993](#)). Zum wissenschaftlichen Hintergrund und zur methodischen Vorgehensweise siehe ([Kämpfer, P. & Dott, W. 1989](#)). Dieses System des "Metabolic Fingerprint" ist nicht für Massentests geeignet.

Seit 1993 ist ein Testsystem für die Identifizierung von in Monokultur vorliegenden Bakterien im Handel, welches mittels Musterbildung in 95-Loch-Mikrotiterplatten aufgrund der Nutzung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen die Zuordnung zu einer von 569 Gram-negativen Spezies bzw. zu einer von 225 Gram-positiven Spezies ermöglicht.

*Pseudomonas aeruginosa*  
im Raster-Scanning Mikroskop  
(Public-Domain-Bild aus Wikipedia.org)



**Abbildung 10:** Ansicht von *Pseudomonas aeruginosa* im Raster-Scanning Mikroskop

### Immunologische Taxonomie:

Die immunologischen Verfahren basieren auf der Erkennung spezifischer molekularer Strukturen (Antigene, Epitope) auf der Bakterienoberfläche oder innerhalb der Bakterienzelle. Zum Nachweis werden für eine bestimmte Bakterienspezies spezifische Mono- oder Polyklonale Antikörper an einem polymeren Träger immobilisiert, um damit die gebundenen Zellen aus der Mischpopulation anzureichern, und/oder kovalent an ein Fluorophor (bei zu erwartender hoher Zielzellendichte, FLISA) oder ein Enzym (für den empfindlicheren ELISA) gebunden, um damit die Bakterienzellen zu quantifizieren.



Die ersten im Wasserbereich eingesetzten immunologischen Nachweisverfahren waren ein photometrisch auswertbarer ELISA-Test für *Enterobacteriaceae*, der die Quantifizierung innerhalb 24 Stunden (einschließlich Flüssiganreicherung über Nacht) erlaubte ([Hübner, I. et al. 1992a](#)), und ein visuell auswertbarer Colony-Dot-Blot-Test für *Legionel-aceae*, der nur eine Abschätzung der Quantität erlaubte und eine dreitägige Bebrütung auf festen Nährböden erforderte ([Hübner, I. et al. 1992b](#)). Auch ein antikörperbasiertes Array-System (BioChip) zur Detektion unmarkierter Bakterienzellen mittels Lichtbrechung ist in der Entwicklung (Detektionslimit 106 Zellen/ml)([Morhard, F. et al. 2000](#)).

Zum mikrobiologisch-immunologischen Enterobakteriennachweis gibt es seit 1993 eine DIN-Vornorm ([DIN V 38 411 Teil 9 1993](#)).

Auch toxinbildende Stämme (z.B. Shigatoxin bildende EHEC) lassen sich durch verfügbare ELISA-Tests identifizieren ([Fruth, A. et al. 2000](#)).

Bei der Firma BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, sind die in der Tabelle 10 gelisteten Antikörper erhältlich.

Tabelle 10: Antikörperangebot der Firma BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln

<i>Brucella sp.</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella enterica</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Clostridium botulinum (Toxin)</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Coxiella burnetii</i>	<i>Legionella sp.</i>	<i>Streptococcus spp.</i>
<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

Die Firma Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg, bietet Antikörper gegen *Yersinia enterocolitica* Serogruppen O:3 und O:9 an.

Von der Firma Oxoid sind ebenfalls zahlreiche Antiseren für die Identifizierung von Bakterien erhältlich:

*Bordetella parapertussis* (Seren für die Identifizierung von *Bordetella*-Kulturen durch Platten-Agglutination)

*Brucella abortus*, *Brucella melitensis* (Seren für die Identifizierung von *Brucella*-Kulturen durch Röhren-Agglutinationstest)

*E. coli* Polyvalent 2 (Typen O26, O55, O111, O119, O126), *E. coli* Polyvalent 3 (Typen O86, O114, O125, O127, O128), *E. coli* Polyvalent 4 (Typen O44, O112, O124, O142), *E. coli* Typ O111 : K58 (B4), *E. coli* Typ O112 : K66 (B11), *E. coli* Typ O114 : K90 (B), *E. coli* Typ O119 : K69 (B14), *E. coli* Typ O124 : K72 (B17), *E. coli* Typ O125 : K70 (B15), *E. coli* Typ O126 : K71 (B16), *E. coli* Typ O127 : K63 (B8), *E. coli* Typ O128 : K67 (B12), *E. coli* Typ O142 : K86 (B), *E. coli* Typ O18c : K77 (B21), *E. coli* Typ O26 : K60 (B6), *E. coli* Typ O44 : K74 (L), *E. coli* Typ O55 : K59 (B5), *E. coli* Typ O86 : K61 (B7) (Agglutinierende Seren für die serologische Identifizierung von *E. coli* Serotypen durch Platten- oder Röhren-Agglutinationstests)

*Haemophilus influenzae* Typ a, Typ b, Typ c, Typ d, Typ e, Typ f (Agglutinierende Seren für die Identifizierung von *H. influenzae* durch schnelle Platten-Agglutinationstests und CIE-Verfahren)

*Neisseria meningitidis* Gruppen A, B, C, D, W135, X, X-Z, Y, Z und *Neisseria meningitidis* Polyvalent Gruppen A-D (Agglutinierende Seren für die Identifizierung von *N. meningitidis* durch schnelle Platten-Agglutinationstests und CIE-Verfahren)

Proteus OX19, Proteus OX2, Proteus OXK (Agglutinierende Seren für gefärbte *Proteus* Suspensionen in Röhren-Agglutinationstests)

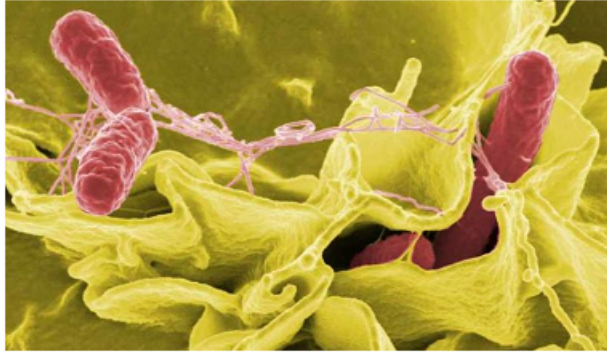
*Salmonella* flagellare H-Antigene: H (1, 2), H (1, 5), H (1, 6), H (1, 7), H (a), H (b), H (c), H (d), H (E) Polyvalent für eh, enx, enz15, H (eh), H (enx), H (enz15), H (f, g), H (G) Polyvalent für gm, gp, fg, gq, gst, fgt, gms, gmt, gt, gmq, gpu, H (gm), H (gp), H (gq), H (gst), H (k), H (L) Polyvalent für lv, lw, lz13, lz28, H (L) Polyvalent für lv, lw, lz13, lz28, lz38, H (lv), H (lw), H (mt), H (r), H (y), H (z), H (z10), H (z27), H (z29), H (z36), H (z38), H (z4, z23), H (z6), H Polyvalent Phase 2 (1, 2, 5, 6, 7), H Polyvalent Phasen 1 & 2, H Rapid Diagnostic 1 (b, d, E, r), H Rapid Diagnostic 2 (b, E, k, L), H Rapid Diagnostic 3 (d, E, G, k), O Factor 10 (Gruppe E1), O Factor 11 (Gruppe F), O Factor 13, 22 (Gruppe G), O Factor 14 (Gruppe H), O Factor 15 (Gruppe E2), O Factor 16 (Gruppe I), O Factor 17 (Gruppe J), O Factor 18 (Gruppe K), O Factor 19 (Gruppe E4), O Factor 2 (Gruppe A), O Factor 20 (Gruppe C2), O Factor 21 (Gruppe L), O Factor 27 (Gruppe B), O Factor 28 (Gruppe M), O Factor 30 (Gruppe N), O Factor 35 (Gruppe O), O Factor 38 (Gruppe P), O Factor 39 (Gruppe Q), O Factor 4 (Gruppe B), O Factor 40 (Gruppe R), O Factor 41 (Gruppe S), O Factor 5 (Gruppe B), O Factor 6,7 (Gruppe C1), O Factor 8 (Gruppe C2), O Factor 9 (Gruppe D), O Factors 3,10,15,19 (Gruppe E), O Polyvalent (Gruppen A - G), O Polyvalent (Gruppen A - S), O/Vi (Agglutinierende Seren für die serologische Identifizierung von *Salmonella*-Stämmen anhand der flagellaren H-Antigene in Platten- oder Röhren-Agglutinationstests)

*Shigella boydii* Polyvalent 1 (1 to 6), Polyvalent 2 (7 to 11), Polyvalent 3 (12 to 15); *Shigella dysenteriae* Polyvalent (1-10); *Shigella flexneri* Polyvalent (1 to 6, X & Y); *Shigella sonnei* Phasen 1 & 2; Alkaescens-Dispar (Agglutinierende Seren für die Identifizierung von *Shigella*-Kulturen durch schnelle Platten-Agglutinationstests)

*Vibrio cholerae* Inaba, *Vibrio cholerae* Ogawa, *Vibrio cholerae* Polyvalent (Agglutinierende Seren für die Identifizierung von *Vibrio cholerae* durch Platten- oder Röhren-Agglutinationstests).

Daneben sind noch einige Immunologische Latex-Agglutinationskits für die Identifikation kultivierter Bakterien (*Campylobacter*, *E. coli*, *Legionella*, *Streptococcus*, Pneumokokken) verfügbar.

***Salmonella* sp.  
im Raster-Scanning-Mikroskop**  
(Public-Domain-Bild aus Wikipedia.org)



**Abbildung 11:** Ansicht *Salmonella* sp. im Raster-Scanning Mikroskop

***Legionella pneumophila* in  
Lungenfibroblasten (Transmissions-  
Elektronenmikroskop)**  
(Public-Domain-Bild aus Wikipedia.org)



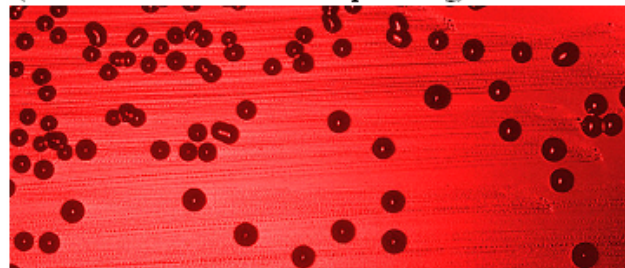
**Abbildung 12:** Ansicht *Legionella pneumophila* in Lungenfibroblasten im Transmissions-Elektronenmikroskop

DNA-basierte Taxonomie:

Die ersten Versuche, Spezieszuordnungen mit Hilfe des Homologiegrades der genomischen DNA vorzunehmen, nutzten die DNA-DNA-Hybridisierung. Die gereinigte DNA aus einem zu charakterisierenden Isolat wird mit der DNA eines charakterisierten Standard-Stammes hybridisiert und die "Schmelzkurve", d.h. der Verlauf der Lichtabsorption bei 260 nm in Abhängigkeit von der Temperatur, bestimmt. Je höher die Schmelztemperatur, desto höher der Homologiegrad beider DNA-Sequenzen, desto näher die Verwandtschaft des Isolates zum Standardstamm. Damit wurde z.B. die Gattung *Acinetobacter* in 19 "genomische Spezies" eingeteilt mit DNA-Homologie-Werten zwischen den Spezies von 67 bis 78 % (Tjernberg, I. & Ursing, J. 1989, Towner, K.J. 1997). Auf der Grundlage dieser Erfahrungen wurden Biotypisierungen verschiedener Isolate von *A. baumannii* mittels Antibiotika-Sensitivität und Ganzzell-Proteinanalyse mit Biotypisierungen mittels "pulsed-field" Gelelektrophorese

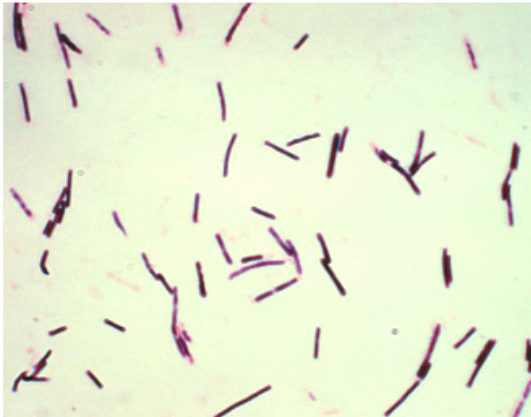
(PFGE (Cole, S.T. & Saint Girons, I. 1994)) der chromosomalen DNA und PCR mit Zufallsprimern (Marcos, M.A. et al. 1995) verglichen. Teils wurden auch die DNA-Sequenzen von Genen, z.B. den für Gyrasen kodierenden *gyrB* Genen (Yamamoto, S. & Harayama, S. 1996), für die phylogenetische Analyse von *Acinetobacter*-Stämmen eingesetzt.

***Haemophilus influenzae*  
(auf Blutagar, Lichtmikroskopie)**  
(Public-Domain-Bild aus Wikipedia.org)



**Abbildung 13:** Ansicht *Haemophilus influenzae* auf Blutagar im Lichtmikroskop

***Clostridium perfringens***  
**(Lichtmikroskopie, Gram-Färbung)**  
(Public-Domain-Bild aus Wikipedia.org)



**Abbildung 14:** Ansicht *Clostridium perfringens* im Lichtmikroskop nach Gram-Färbung

Aus dem Bandenmuster der Restriktionsfragmente, z.B. im Bereich von 100 bis 400 nt Länge (nt = Nukleotide), kann man aufgrund typischer konservierter Banden die Spezies ermitteln, aus den variablen Fragmenten (bei Vorliegen eines entsprechenden Standards) ggf. den Stamm.

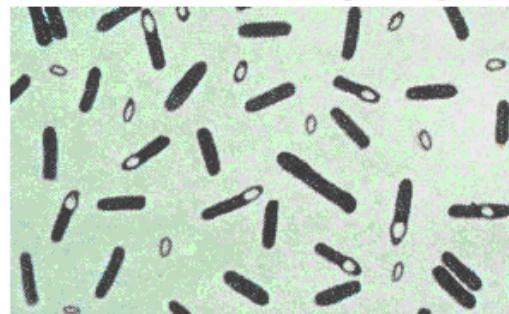
Eine praktische Anwendung der RFEL findet sich in ([van Steenberg, T.J.M. et al. 1995](#)). Hier wurde die Technik zur Differenzierung klinischer Isolate von *Actinobacillus actinomycescomitans*, *Streptococcus pneumoniae* und *Escherichia coli* eingesetzt.

Aus den Elektropherogrammen der Restriktionsfragmente können auch bestimmte Muster durch Hybridisierung mit (radioaktiv oder mit Farbstoff) markierten spezifischen DNA-Sonden hervorgehoben werden, z.B. beim "Ribotyping", bei dem die Sonde der 16S rDNA homolog ist ([Stull, T.L. et al. 1988](#)), und beim "BOX-Fingerprinting", bei dem die Sonde gegen ein bestimmtes repetitives Element in der genomischen DNA gerichtet ist ([Hermans, P.W. et al. 1995](#)).

Für die taxonomische Zuordnung von *Pseudomonas aeruginosa*-Stämmen wurde in einer "Makro-Restriktionsanalyse" DNA-Fingerprinting mit DNA-Sonden gegen das *toxA*-Gen und die rDNA angewendet ([Grundmann, H. et al. 1995](#)).

Eine der ersten Methoden, Bakterienspezies anhand der (noch nicht bekannten) DNA-Sequenz im Hochdurchsatzverfahren zu identifizieren und bestimmten Stämmen zuzuordnen, war die RFLP (= Restriction Fragment Length Polymorphism) ([Nowak, A. & Kur, J. 1995](#), [Lazo, G.R. et al. 1987](#)), auch in Kombination mit RFEL (=Restriction Fragment End Labeling) ([van Steenberg, T.J.M. et al. 1995](#)). Bei diesen, zum "Genomic Fingerprinting" ([Forbes, K.J. et al. 1991](#)) zu rechnenden Verfahren wird die genomische DNA der Bakterien möglichst intakt isoliert, mit einer spezifischen Kombination von Restriktionsendonukleasen fragmentiert und die entstandenen Bruchstücke werden mittels Agarose- oder Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt.

***Clostridium botulinum***  
**mit Sporen (Lichtmikroskopie)**  
(Public-Domain-Bild aus Wikipedia.org)



**Abbildung 14:** Ansicht *Clostridium botulinum* mit Sporen im Lichtmikroskop

In ([Hermans, P.W. et al. 1995](#)) wurden verschiedene Verfahren, nämlich Ribotyping, BOX-Fingerprinting, PCR-Fingerprinting, PFGE und RFLP/RFEL miteinander verglichen bezüglich ihrer Eignung zur molekularen Typisierung der Stämme von *Streptococcus pneumoniae*. Prinzipiell waren alle Techniken gut geeignet, wenn auch in Abhängigkeit von den verwendeten Auswertungstechniken (visuell/automatisiert). Als geeignetste für Pneumokokkenstämme wurden die Verfahren BOX-Fingerprinting und RFLP/RFEL eingestuft.

In ([Prevost, G. et al. 1992](#)) wurde für die Typisierung von *Staphylococcus aureus*-Stämmen die PFGE nach Spaltung mit der Restriktionsendonuklease *Sma*I als effektiver eingestuft als Ribotyping.

Moderne Methoden zur Bestimmung der Spezieszugehörigkeit von Bakterien sind die Sequenzierung der 16S rDNA nach PCR-Amplifikation ([Goris, J. et al. 2002](#), [Harmsen, D. & Karch, H. 2004](#), [Kolbert, C.P. & Persing, D.H. 1999](#), [Clarridge, J.E. III 2004](#), [Fredricks, D.N. & Relman, D.A. 1996](#)), zusätzlich für Zweifelsfälle die Sequenzierung charakteristischer Abschnitte der *hsp60*-Gene ([Place, R. B. et al. 2002](#)) oder das "Repetitive element genomic fingerprinting" ([Goris, J. et al. 2002](#)). Derzeit sind über 75000 16S rDNA Sequenzen bakterieller Spezies in öffentlich zugänglichen Sequenzdatenbanken gespeichert und werden für die taxonomische Nutzung aufbereitet ([DeSantis, T.Z. et al. 2003](#), [Ludwig, W. et al. 2004](#)).

Nur in wenigen Fällen wird die auf den 16S rDNA Sequenzen beruhende phylogenetische Zuordnung durch Rekombinationsereignisse in den ribosomalen Genregionen gestört ([Sneath, P.H.A. 1993](#)). Zur Taxonomie unterhalb der Speziesebene (z.B. Zuordnung zu Subspezies) oder zur Differenzierung von nahe verwandten Bakterien, die mit den klassischen Methoden nicht zu unterscheiden wären, sind die "tRNA intergenic length polymorphism"-Untersuchung der tRNA-Spacer-Regionen ([Storms, V. et al. 2002](#), [Ehrenstein, B. et al. 1996](#)), das Polymorphismen-Muster der 16S-23S rDNA Spacer-Region ([Towner, K.J. 1997](#), [Nowak, A. et al. 1995](#), [Welsh, J. & McClelland, M. 1991](#)) bzw. der 23S-5S rDNA Spacer-Region ([Schouls, L.M. et al. 1999](#), [Rijpkema, S.G. et al. 1995](#), [Jensen, M.A. et al. 1993](#)), das "DNA-Amplifikations-Fingerprinting" ([Tichy, H.V. 1992](#), [van Belkum, A. 1994](#)) und die Detektion von "Pathogenitätsinseln" ([Hacker, J. et al. 1997](#)), etablierte Methoden, die auch für eine Automatisierung tauglich sind.

Am empfindlichsten in der Auflösung für die phylogenetische Zuordnung, aber auch am aufwendigsten und damit am teuersten, ist das MLST (= Multi Locus Sequence Typing), bei dem mehrere "Housekeeping-Gene" mittels PCR amplifiziert, automatisch mittels Kapillarelektrophorese sequenziert und durch Abgleich mit Sequenz-Datenbanken zugeordnet werden ([Applied Biosystems, 2005](#)). Doch prinzipiell erlauben derzeit neu entwickelte Technologien die vollständige Sequenzierung bakterieller Genome mit einem Aufwand, der nur unwesentlich größer ist als noch vor wenigen Jahren die Gewinnung der Sequenzen weniger ausgewählter Gene. So erlaubt die sog. "454 Sequenzier-Technologie" die Sequenzierung einer Probe sofort ([Margulies, M. et al. 2005](#)), ohne zeit- und kostenintensive Klonierung, welche die Voraussetzung für die klassische Sanger-Sequenzierung ist.

Das Prinzip der 454-Technologie in Kürze: Die DNA wird isoliert und durch Scheren in kleine Fragmente von ca. 300 – 500 bp zerlegt. Die Enden der Fragmente werden enzymatisch geglättet und mit kleinen Adaptersequenzen für die Primerbindung bei der PCR versehen. Die Adapter tragen außerdem am 5'-Ende ein Biotinmolekül für die Immobilisierung an Streptavidin-beschichteten Kügelchen. Die DNA-Fragmente werden zu Einzelsträngen "geschmol-

zen" und durch "limitierende Verdünnung" (erheblich mehr Kügelchen als DNA-Fragmente) wird erreicht, dass an jedem biotinbeschichteten Kügelchen maximal ein einzelsträngiges DNA-Fragment fixiert wird. Jedes Kügelchen wird einzeln in eine Mikroreaktorkammer überführt und das gebundene DNA-Fragment mittels PCR (wieder mit einem biotinylierten Primer, so dass die identischen Kopien des Ausgangsfragmentes ebenfalls an das Kügelchen binden) klonal vermehrt. Nach abschließender Denaturierung und Entfernung der (nicht biotinylierten) komplementären DNA-Einzelstränge wird die Sequenz des amplifizierten DNA-Fragmentes mittels "Pyrosequencing"-Technologie ermittelt, wobei an polymere Träger gebundene Enzyme eingesetzt werden. Die Mikroreaktorkammern, in denen die Sequenzierungsreaktionen ablaufen, haben ein Volumen in der Größenordnung von Picolitern und sind in Arrays zu 680.000 oder 1,2 Millionen Kammern auf einem Objektträger so angeordnet, dass alle Sequenzierreaktionen gleichzeitig optisch ausgewertet werden können. Die Assemblierung der Teilsequenzen zur Totalsequenz besorgt ein Hochleistungscomputer. Theoretisch kann mit dieser Methode ein vollständiges bakterielles Genom in der Größenordnung von 2 Megabasen in nur 4 Tagen mit einer 10-fachen Abdeckung sequenziert werden.

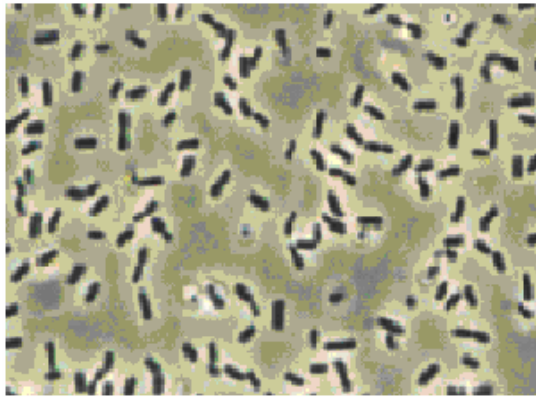
Wenn es auch derzeit eher unwahrscheinlich ist, dass die Ganzgenom-Sequenzierung in der Routineanalytik von Bakterien eingesetzt wird, erlaubt sie doch die Etablierung einer "Ganzgenom-Phylogenie der Prokaryonten". Aus den angehäuften Genomsequenzen kann man mittels geeigneter statistischer Werkzeuge, z.B. GBDP (= Genome Blast Distance Phylogeny) oder "Verknüpfungs-Ungleichgewicht" (linkage disequilibrium), die molekularen Unterscheidungsmerkmale phylogenetischer Einheiten (Gattungen, Arten, Stämme, Klone) definieren ([Henz, S.R. et al. 2005](#), [Haubold, B. et al. 1998](#)) und diese Merkmale für Schnelltests auf der Grundlage von PCR und/oder Hybridisierungen (z.B. Biosensoren) nutzen.

Zu den hochauflösenden PCR-basierten DNA-Fingerprinting-Methoden gehören auch AFLP (= Amplification Fragment Length Polymorphism) ([Janssen, P. et al. 1996](#), [Janssen, P. & Dijkshoorn, L. 1996](#), [Vos, P. et al. 1995](#)), RAPD (= Random Amplified Polymorphic DNA) ([Micheli, M.R. et al. 1994](#)) und ARDRA (= Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) ([Vanechoutte, M. et al. 1992](#), [Towner, K.J. 1997](#)). Eine Modifikation der AFLP, welche die einfachsten und flexibelsten Amplifikationsbedingungen und die kürzesten Primer (z.B. das Octamer GTAACGCC) benutzt aber dabei die höchste Auflösung bietet, ist das DAF (= DNA Amplifikations Fingerprinting) ([Bassam, B.J. et al. 1992](#)).

Mittels AFLP wurden bereits Stämme von *Legionella pneumophila* ([Valsangiacomo, C. et al. 1995](#)), *Mycobacterium tuberculosis* ([Haas, W.H. et al. 1993](#)) sowie *Helicobacter* spp. ([Linton, D. et al. 1994](#)) taxonomisch differenziert, mit DAF klinische Isolate von *Streptococcus uberis*, *Klebsiella pneumoniae* und *Escherichia coli* ([Bassam, B.J. et al. 1992](#)).

***Bacillus subtilis* (Lichtmikroskopie)**

Public-Domain-Bild aus Wikipedia.org



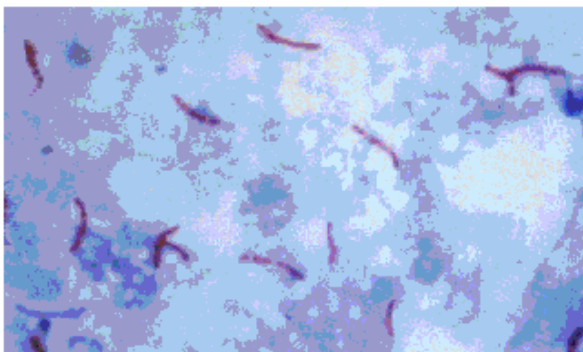
**Abbildung 15:** Ansicht *Bacillus subtilis* im Lichtmikroskop

Bei der Differenzierung von Subspezies bzw. Stämmen anhand der repräsentativen DNA-Sequenzen ist es sehr hilfreich, dass – während sich zwei Menschen maximal in 0,05% ihrer Genomsequenz voneinander unterscheiden - *Escherichia coli*-Stämme in der Genomsequenz um bis zu 5% differieren ([Morell, V. 1997a](#)). Die Identifizierung von Spezies oder Stämmen aufgrund der DNA-Sequenzen ist einfacher und zuverlässiger als die phänotypische Identifizierung ([Towner, K.J. 1997](#)).

Da die taxonomische Differenzierung hierbei auf bekannten (sub-)speziesspezifischen DNA-Sequenzen beruht, lassen sich diese Merkmale auch für die Anwendung von DNA-Sonden ([Tschäpe, H. et al. 1993](#)), z.B. für FISH (= Fluoreszenz in-situ Hybridisierung) in Verbindung

***Mycobacterium tuberculosis* (Lichtmikroskopie, Ziehl-Neelsen-Färbung)**

Public-Domain-Bild aus Wikipedia.org



**Abbildung 16:** Ansicht *Mycobacterium tuberculosis* im Lichtmikroskop nach Ziehl-Neelsen-Färbung

mit FACS (= Fluoreszenz-assistiertes/-aktiviertes Cell-Sorting), für Blot-Hybridisierungsverfahren (z.B. Reverse-Line-Blot-Hybridization ([Schouls, L.M. et al. 1999](#), [Kaufhold, A. et al. 1994](#))) oder für eine Array-Technologie (DNA-Chip, DNA-Microarrays ([Müller, H.-J. & Röder, T. 2004](#), [Meier, H. et al. 2004](#))), nutzen. So wurde bereits für die vergleichende Taxonomie von Stämmen aus dem Speziesskreis *Mycobacterium tuberculosis* und *M. bovis*, insbesondere die BCG-Vakzinen, ein Ganzgenom-DNA Microarray eingesetzt ([Behr, M.A. et al. 1999](#)).

### 3.3 Isolierung, Identifizierung und Quantifizierung von Bakterien aus Umweltproben

Die klassischen phänotypischen in vivo- und in vitro-Tests beruhen zwar auf jahrzehntelanger Erfahrung, sind aber sehr Material- (Kosten-) und Zeit-aufwendig. Damit sind sie nur wenig für Hochdurchsatzuntersuchungen geeignet. Pathotypen lassen sich mit diesen Verfahren nur unvollständig differenzieren; das Vorhandensein von Antibiotikaresistenz lässt sich zwar phänotypisch nachweisen, sofern aber mehrere unterschiedliche Mechanismen zum gleichen

Resistenzphänotyp führen können, lässt sich der Resistenzmechanismus damit nicht identifizieren.

Deshalb wurde schon früh der Versuch unternommen, virulenzassoziierte Gensonden zum Nachweis des pathogenen Potentials von *E. coli* zu nutzen ([Hacker, J. et al. 1991](#), [Bohnert, M.G. et al. 1988](#), [Hacker, J. 1990](#)).

Um für eine Spezies / Subspezies oder ein Serovar spezifische Gensonden zu erzeugen kann die "Genomische Subtraktion" ([Lan, R. & Reeves, P.R. 1996](#)) eingesetzt werden.

Auch mit Hilfe monoklonaler Antikörper ([Winter, G. & Milstein, C. 1991](#)), die spezifisch für eine bestimmte Spezies oder einen Stamm von Bakterien sind, lassen sich die Bakterien aus einer Mischpopulation anreichern, identifizieren und/oder quantifizieren. Damit sind für zuverlässige Hochdurchsatzanalysen von Bakterien, z.B. aus Abwasser, Belebtschlamm oder Abfluss von Kläranlagen, folgende Verfahren verfügbar:

1. Identifizierung und Quantifizierung einer bestimmten Spezies in einer Mischpopulation (z.B. Umweltprobe) ohne vorherige Anreicherung und ohne Kultivierung: Hierzu können entweder ELISA-Tests angewendet werden ([EU-Commission 1992](#), [Morgan, J.A.W. et al. 1989](#)) oder Markierung der Zielorganismen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern und Quantifizierung mittels Durchflusszytometrie (= Flow Cytometry / FACS) ([EU-Commission 1992](#), [Saunders, J.R. et al. 1990](#)). Im letzteren Fall sind die antikörpermarkierten Bakterien noch lebensfähig und können nach der Anreicherung weiter charakterisiert (z.B. in Kultur genommen) werden, für den ELISA-Test ist dagegen eine vorherige Fixierung notwendig.

Als Schnellmethode kommt auch ein Biosensor auf Grundlage eines mit speziesspezifischen Antikörpern beschichteten Silicium-Chips (Biochip) mit Lichtbrechungs-Detektor ([St. John, P.M. et al. 1998](#)) in Frage.

2. Immunologische Isolierung von Zellen einer bestimmten Spezies zur weiteren Charakterisierung: Durch Zugabe von magnetischen Partikeln (Magnet-Beads), die mit spezifischen Antikörpern beschichtet sind, lassen sich die gewünschten Zellen leicht aus der Mischpopulation anreichern und bei wiederholter Anwendung sogar reinigen. Die erhaltenen Zellen lassen sich weiter kultivieren und z.B. nach ihrer Antibiotikaresistenz differenzieren. Zur endgültigen Identifizierung/Quantifizierung lässt sich eine der unter 1. und 3. genannten Techniken einsetzen ([EU-Commission 1992](#), [Saunders, J.R. et al. 1990](#)).
3. Molekularbiologische Identifizierung und Quantifizierung einer bestimmten Spezies in einer Mischpopulation oder Identifizierung eines bereits kultivierten Stammes: Hierzu werden die Zellen fixiert, permeabilisiert und nach Anwendung einer 16S rDNA spezifischen fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonde (FISH) mikroskopisch ([Weißmann, H. & Beimfohr, C. 2004](#)) oder mittels Durchflusszytometrie / FACS quantifiziert ([EU-Commission 1992](#), [Amann, R.I. et al. 1990](#)).

Eine Modifikation dieser Methode bedient sich immobilisierter DNA-Sonden (z.B. auf einem Chip), mit denen die aus den lysierten Bakterien gewonnene fragmentierte und/oder PCR-amplifizierte und fluoreszenzmarkierte DNA hybridisiert und danach quantifiziert wird ([Chandler, D.P. et al. 2003](#), [DeSantis, T.Z. et al. 2003](#)).



4. Quantifizierung mittels Real-Time-PCR: Ein weiteres auf Kenntnis der DNA-Sequenz basierendes Verfahren zur Identifizierung und Quantifizierung der Zellen einer bestimmten Spezies in einer Probe ist die "real-time PCR", die bei hoher Probendurchsatzrate die gleichzeitige Quantifizierung mehrerer Spezies pro Probe in Echtzeit erlaubt. Ausgangsmaterial dafür kann die isolierte DNA oder sogar das Roh-Lysat der Zellen sein.

### Funktionsprinzip der PCR

Das Prinzip der PCR wurde 1983 entwickelt ([Saiki, R.K. et al. 1985](#)), wofür Kary B. Mullis 1993 den Nobelpreis für Chemie erhielt.

Das Verfahren der PCR basiert darauf, dass die DNA erhitzt ("geschmolzen") wird und beim Abkühlen ein für die interessierende DNA-Sequenz komplementäres kurzes DNA-Fragment ("Primer"), das im Überschuss zugegeben wurde, mit ihr hybridisiert. Eine zugesetzte hitzestabile DNA-Polymerase verlängert den Primer mit Hilfe ebenfalls zugesetzter Nucleosidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP, TTP) zu einer komplementären Kopie der ursprünglichen DNA-Matrix. Das Produkt wird wieder geschmolzen und die neu gebildeten DNA-Abschnitte hybridisieren mit einem Primer, der komplementär zur Gegenrichtung ist (reverse Primer), und die DNA-Polymerase verlängert den Primer wieder. Die Temperaturzyklen, die abwechselnd Schmelzen der doppelsträngigen DNA und Kopieren der Einzelstränge zum komplementären Doppelstrang bewirken, werden bis zu 50 Mal wiederholt, wobei es jedes Mal zu einer Verdopplung der von den Primern begrenzten

Bereiche kommt. Dadurch wird das von den Primern eingeschlossene DNA-Fragment selektiv exponentiell amplifiziert ( $2^n$  mit  $n =$  Zahl der Zyklen).

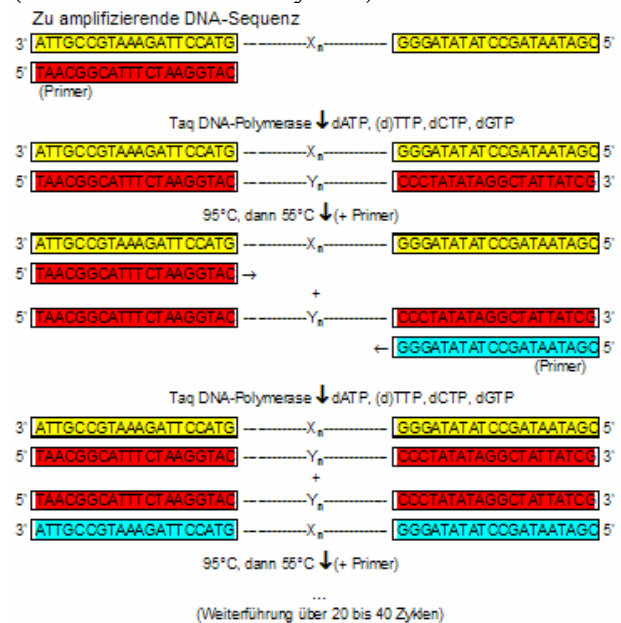
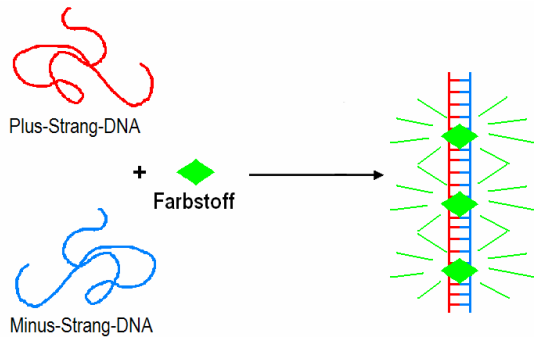


Abbildung 17: Funktionsprinzip der PCR

Für die Detektion und Quantifizierung der amplifizierten Sequenzen gibt es drei grundsätzliche Verfahren, die sich durch die Quantifizierungs-Sonden unterscheiden:

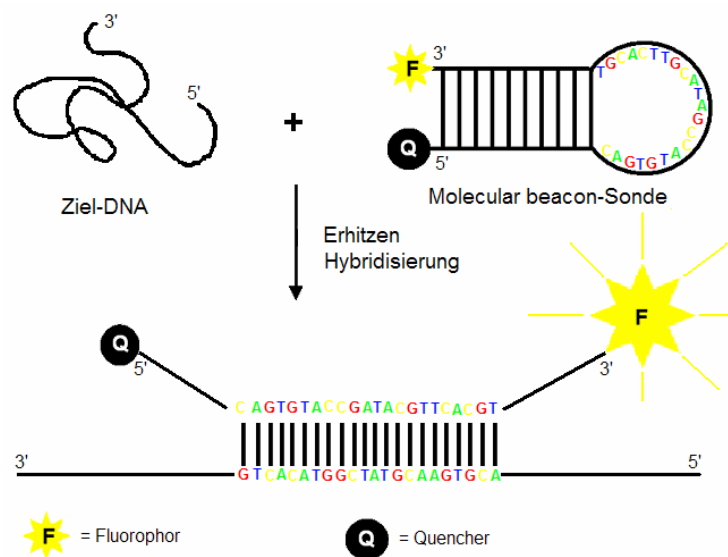


**Abbildung 18:** Detektion mit interkalierenden Fluorophoren

Beim ersten Verfahren erfolgt die Amplifikation mit unmarkierten Primern in Gegenwart eines nur nach Interkalation in eine DNA-Doppelhelix fluoreszierenden Farbstoffes (Ethidiumbromid oder weniger toxische Farbstoffe). Die Fluoreszenz ist der durch PCR gebildeten Menge an DNA-Doppelstrang proportional. Die Methode ist nicht sehr spezifisch und nicht sehr empfindlich.

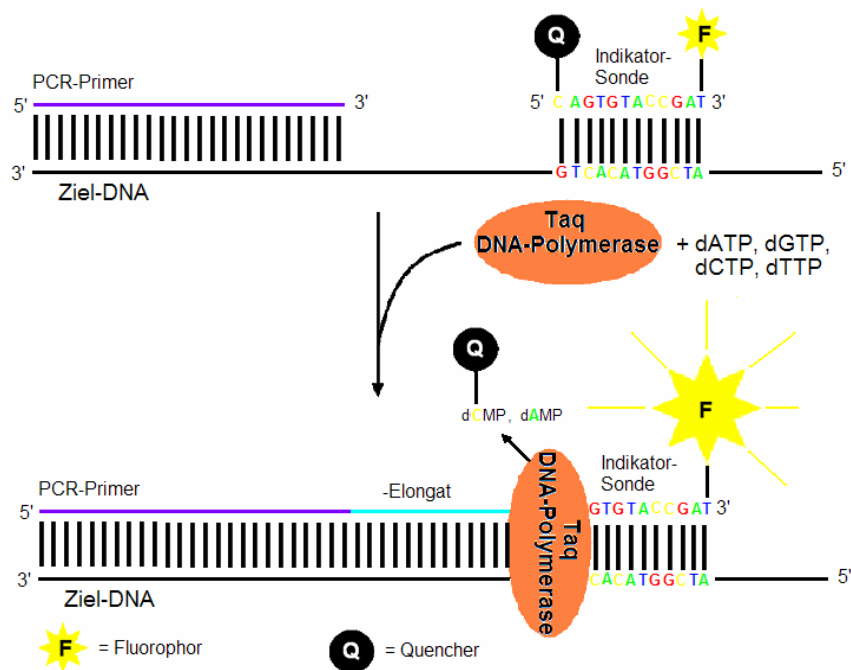
Beim zweiten Verfahren wird zur Quantifizierung der PCR-Produkte eine DNA-Sonde verwendet, die an einer Sequenz im Amplifikat komplementäres kürzeres (bis 50 nt) DNA-Einzelstrangfragment, das von zwei zueinander komplementären kurzen DNA-Sequenzen (ca. 10 nt) flankiert wird. Durch Hybridisierung dieser beiden Endstücke bildet das dazwischenliegende DNA-Stück eine Schleife. Das eine Ende des DNA-Konstruktes trägt ein Fluorophor, das andere Ende einen "Quencher", d.h. ein Molekül, das die Fluoreszenz des Fluorophors löschen kann. Damit fluoresziert das Konstrukt in dieser "stem-loop"-Konformation nicht, weil Fluorophor und Quencher dicht beieinander liegen. Beim Erhitzen während der PCR wird die Schleife linearisiert und hybridisiert mit dem PCR-Produkt. Dabei wird die Distanz zwischen Fluorophor und Quencher so groß, dass der

Quencher nicht mehr wirken kann und eine Fluoreszenz messbar wird, die der Menge an PCR-Produkt proportional ist ("molecular beacon"-Verfahren). Da die der Matrix-DNA nicht komplementären, Fluorophor und Quencher tragenden Enden der Sonde von der Matrix wegragen, wird die Sonde beim nächsten Polymerisationsschritt durch die DNA-Polymerase von der Matrix verdrängt, bildet wieder die Schleife und stellt die Fluoreszenz ein. Damit ist der relevante Messpunkt der maximalen Fluoreszenz nur kurz verfügbar.



**Abbildung 19:** Detektion nach dem „molecular beacon“-Verfahren - reversibel

Beim dritten Verfahren besteht die Sonde nur aus einem kurzen (ca. 10-25 nt, die Größenordnung wie die PCR-Primer), einer spezifischen Sequenz im Amplifikat komplementären DNA-Fragment, das an zwei Nukleotiden im geeigneten Abstand ein Fluorophor-Quencher-Paar trägt. Daher ist keine Fluoreszenz detektierbar. Nach dem Schmelzen der Matrix-DNA bindet die Sonde an deren komplementäre Sequenz und bildet ein Hindernis für die den Primer verlängernde DNA-Polymerase.



**Abbildung 20:** Detektion nach dem „molekular beacon“-Verfahren - irreversibel

Da beide Enden der Sonde fest an der Matrix anliegen, wird sie nicht verdrängt, sondern von der Exonukleaseaktivität der Polymerase abgebaut. Dabei werden Fluorophor und Quencher irreversibel voneinander getrennt und die Fluoreszenz wird detektierbar ("molecular beacon"-Verfahren). Die Fluoreszenz nimmt von Zyklus zu Zyklus der PCR exponentiell zu und die Steilheit dieser Zunahme erlaubt die Berechnung der Menge an ursprünglich vorhandener Ziel-DNA.

Die PCR-Verfahren erlauben eine simultane Untersuchung von bis zu 96 Proben. In jeder Probe müssen mindestens 100 Zellen der untersuchten Bakterienart vorhanden sein. Eine "Real-Time" PCR-Analyse dauert in der Größenordnung von etwa einer Stunde.

Targets der PCR können entweder speziesspezifische 16S rDNA-Sequenzen ([Sachse, K. & Hotzel, H. 1997](#)) oder Sequenzen metabolischer Gene ([Lick, S. & Heller, K.J. 1997](#)) sein oder, wenn speziell auf pathogene Stämme untersucht wird, bestimmte Virulenzfaktoren ([Finlay, B.B. 1999](#), [Mahajan-Miklos, S. et al. 1999](#)). Zur Aufklärung von Mechanismen und Übertragungswegen können auch Sequenzen aus Antibiotikaresistenzgenen beprobt werden.

Ein Verfahren des Nachweises von *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* in Lebensmitteln nach § 35 LMBG durch quantitative PCR-Verfahren wurde bereits durch einen Ringversuch geprüft. Das Verfahren wurde im Rahmen einer amtlichen Empfehlung detailliert beschrieben ([AG MMM 2000](#)).

Zunehmend wird die PCR zu einer zeit- und kostengünstigeren Alternative zu den ELISA-Tests, z.B. für Shigatoxin bildende EHEC ([Fruth, A. et al. 2000](#)).

Im klinischen Bereich wird die Real-Time PCR bereits häufig zur Quantifizierung von *Helicobacter pylori* und zur Detektion von Mutantenstämmen mit Antibiotikaresistenz (z.B. Clarithromycin) in Biopsieproben von Gastritis-Patienten eingesetzt ([Kist, M. et al. 2005](#), [Lascols, C. et al. 2003](#), [Oleastro, M. et al. 2003](#), [Matsumura, M. et al. 2001](#)).

Inzwischen gibt es neben einer DIN-Norm (DIN 58967), welche die Anwendung der PCR regelt, auch ein Handbuch der DGHM zu Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik ([Roth, A. et al. 1997](#)).

### 3.4 Überlebensfähigkeit (Persistenz) von Bakterien in der Umwelt

Für *E. coli*, die als Marker multiple Antibiotikaresistenzgene trugen, wurde experimentell ein Überleben im Boden von 13 Jahren nachgewiesen ([Sjogren, R.E. 1995](#)). Dabei wanderten die Bakterien nur in tiefere Bodenlagen und wurden bei Erreichen des Grundwassers (1,06 m tief) durch dessen Fluss verbreitet.

Dieser Bakterienstamm, der gegen Ampicillin, Cloxicillin, Erythromycin, Kanamycin, und Tetracyclin resistent war, war aus einem Oberflächengewässer isoliert worden, das regelmäßigen Zufluss aus einer großen Kläranlage erhält. Während zweijähriger Kultur im Labor in Abwesenheit von Antibiotika war kein Verlust an Antibiotikaresistenz festzustellen.

Zum Überdauern humanpathogener Bakterien im Wasser wurden von ([Burger, G. 1990](#)) Literaturdaten zusammengestellt:

**Tabelle 11:** Überlebensdauer humanpathogener Bakterien im Wasser

Bakterienspezies	Überlebensdauer (Tage)
<i>Salmonella enterica Typhi</i>	183
<i>Shigella dysenteriae</i>	93
<i>Vibrio cholerae</i>	92
<i>Yersinia enterocolitica</i>	300
<i>Campylobacter fetus</i>	21
<i>Leptospira interrogans</i>	60

Auch dieser Autor weist darauf hin, dass bei der Sedimentation an Sinkstoffe adsorbierte Bakterien zwar aus dem fließenden Wasser entfernt werden, oft aber im Sediment durch dessen Schutzwirkung länger überleben bzw. überdauern als im Wasserkörper. Weil diese Sedimente als Reservoir für pathogene Bakterien dienen können, erfordere die nötige Expositionsprophylaxe, die Gewässer so wenig wie möglich mit Erregern übertragbarer Krankheiten zu belasten ([Burger, G. 1990](#)).

In einer für das MUNLV NRW erstellten Literaturstudie ([Mathys, W. 1998](#)) wurden für verschiedene Bakterienspezies (*Brucella* spp., *Campylobacter* spp., Coliforme, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, fäkale *Streptokokken*, *Klebsiella* spp., *Leptospira* spp., *Mycobacterium* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio cholerae* und *Yersinia* spp.) Literaturwerte für ihre Persistenz in Umweltmedien, z.B. Boden, Flusswasser, Abwasser, Klärgrube, Kläranlagenablauf, Klärschlamm, Gülle und Fäzes, zusammengetragen.

Die Ergebnisse werden in ([Mathys, W. 1998](#)) wie folgt zusammengefasst:

- Bakterien überleben bis zu mehreren Monaten in Fäzes, Abwasser, Schlamm und Boden und gelangen über den Abwasserpfad in die Umwelt.
- Die Persistenz in der Umwelt hängt sowohl von der Bakterienart als auch von physikalischen Einflussgrößen, insbesondere von der Umgebungstemperatur und der Feuchte, ab. Bei niedrigen Temperaturen (<12°C) ist die Persistenz erheblich höher als bei höheren Temperaturen.
- In konventionellen zweistufigen Kläranlagen werden pathogene Bakterien um 2-3 log-Stufen reduziert. Einige Arten, wie z.B. *Salmonella*, werden schon innerhalb der Sedimentati-

onsstufe in nennenswertem Maße eliminiert, wenig resistente Arten wie *H. pylori*, *Shigella* oder *Campylobacter* sterben innerhalb der ersten Aufbereitungsschritte in erheblichem Umfang ab.

### 3.5 Genübertragung bei Bakterien

Die zunehmende Zahl vollständig sequenzierter Bakteriengenome zeigt immer eindrucksvoller, dass die gesamte Geschichte der Mikroorganismen eine Geschichte der Genübertragungen ist: von Individuum zu Individuum in einer Population, zwischen Stämmen einer Spezies, von Spezies zu Spezies, von Gattung zu Gattung, von Gram-positiven zu Gram-negativen Bakterien und umgekehrt sowie zwischen den Reichen der Archaea und der Eubakterien ([Nelson, K.E. et al. 1999](#)). So schlussfolgern bereits ([Pal, C. et al. 2005](#)): "Die meisten Veränderungen im metabolischen Netzwerk von *Escherichia coli* in den vergangenen 100 Millionen Jahren sind auf horizontalen Gentransfer zurückzuführen, mit einem nur geringen Beitrag von Genduplikationen. ... Horizontal übertragene Gene werden in die Peripherie des Netzwerks integriert, während die zentralen Bereiche evolutionär stabil bleiben. Gene, die physiologisch gekoppelte Reaktionen kodieren, werden oft gemeinsam übertragen häufig sogar als Operons."

Konjugative Übertragung genetischer Informationen mittels Plasmiden ist bereits lange bekannt ([Ippen-Ihler, K. 1989](#), [Miller, R.V. 1998](#), [Lorenz, M.G. & Wackernagel, W. 1993](#), [Trevors, J.T. & Berg, G. 1989](#), [Trevors, J.T. et al. 1987](#), [Stotzky, G. & Babich, H. 1986](#)) und wird in der Gentechnik regelmäßig technisch genutzt ([Winnacker, E.-L. 1987](#)). Dieser Übertragungsweg setzt nicht unbedingt nahe Verwandtschaft der Konjugationspartner voraus: Obwohl sich beide Gruppen im Mechanismus der Konjugation grundlegend unterscheiden, wurde selbst Konjugation mit Transfer von Plasmiden zwischen Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien bereits beobachtet ([Schäfer, A. et al. 1990](#), [Brown, J.S. et al. 2001](#)).

Auch die Rolle von Bakteriophagen in der Genübertragung (Transduktion), z.B. von Pathogenitätsinseln Gram-negativer Bakterien ([Brown, J.S. et al. 2001](#), [Cheetham, B.F. & Katz, M.E. 1995](#)), wird seit langem untersucht und ergibt immer wieder neue Befunde ([Karaolis, D.K.R. et al. 1999](#), [Miller, R.V. 1998](#), [Lorenz, M.G. & Wackernagel, W. 1993](#), [Hacker, J. & Kaper, J.B. 2000](#)). Das Auftreten von lysogenen, d.h. fest ins Bakterienchromosom integrierten Phagen variiert sehr stark zwischen den Bakterienspezies: Während es z.B. für *Pseudomonas putida* sehr ungewöhnlich ist trägt das Genom fast jeder *Pseudomonas aeruginosa* Zelle mindestens einen lysogenen Phagen; manche *Escherichia coli*-Stämme sind "polylysogenisch", das bedeutet, dass bis zu 30% ihrer Gesamt-DNA tatsächlich Prophagen-DNA ist ([Stotzky, G. & Babich, H. 1986](#)).

Eine besondere Bedeutung für die Genübertragung in der Umwelt spielt die Transformation, also die Aufnahme freier DNA in Zellen ([Lorenz, M.G. & Wackernagel, W. 1994](#), [Miller, R.V. 1998](#)), ([Stotzky, G. & Babich, H. 1986](#)). Früher hielt man die "natürliche Kompetenz", die Voraussetzung für Aufnahme und Nutzung von DNA aus der Umwelt (ausgeprägt z.B. in *Bacillus subtilis* und *Streptococcus pneumoniae* ([Stotzky, G. & Babich, H. 1986](#))), für selten ([Lorenz, M.G. & Wackernagel, W. 1993](#)). Es hat sich aber gezeigt, dass in jeder Bakterienpopulation sog. Mutatoren in einer Häufigkeit von > 0,1 % (häufig zwischen 1 und 5 – 6 %) vorhanden sind. Das ergibt bei Bakteriendichten von bis zu 10<sup>12</sup> pro ml erhebliche Zahlen. Mutatoren zeichnen sich durch Defekte im sog. "Mismatch-Repair" System aus (z.B. ein de-

fektes *mutS* Allel bei *E. coli*), das eigentlich für die getreue Kopie der DNA-Stränge bei der Replikation verantwortlich ist. Auch mutierte *mutL* und/oder *uvrD* Allele sind charakteristisch für einen Mutator-Genotyp ([Sniegowski, P.D. et al. 1997](#)). Die Defekte bewirken aber neben der Erhöhung der Mutationsrate auch eine verstärkte Rekombinationsrate und damit den Einbau fremder DNA-Fragmente, auch von genetisch sehr entfernten Spezies, durch homologe oder illegitime Rekombination ([LeClerc, J.E. et al. 1996](#)).

Dass sich natürliche Kompetenz nicht nur auf Mutator-Stämme beschränkt, wird dadurch deutlich, dass manche Bakteriengattungen spezielle Abwehrmechanismen gegen die Expression von DNA-Abschnitten entwickelt haben, die zu sehr von den "Normen des eigenen Genoms", z.B. im GC-Gehalt abweichen. So bindet in *Salmonella* das Protein H-NS (= Histon-ähnliches Nucleoid-strukturierendes Protein) an DNA-Sequenzen mit einem GC-Gehalt, der niedriger ist als der durchschnittliche des *Salmonella*-Genoms, kompaktiert sie und verhindert so ihre Transkription ([Navarre, W.W. et al. 2006](#)). Diesem als "Xenogenes Silencing" bezeichneten Prozess kommt besondere Bedeutung zu, wenn man bedenkt, dass der mittlere GC-Gehalt der Genome in Abhängigkeit von der Gattung zwischen 25% und 75% variieren kann. Er zeigt aber auch, dass die Kontrolle auf der Ebene der Aufnahme fremder DNA und Integration ins Genom relativ gering sein muss, wenn für die Abwehr möglicher Gefahren durch ihre Expression hochwirksame Mechanismen evolviert wurden.

In jüngster Zeit hat man bei Bakterienarten, die bisher als nicht natürlich kompetent galten, weil man unter standardisierten Versuchsbedingungen keinerlei Transformation und Rekombination detektieren konnte, eine "induzierbare Kompetenz" gefunden. Bei *Vibrio cholerae* müssen drei induzierende Faktoren zusammenkommen:

- 1) unmittelbarer Kontakt mit Chitin oder mit durch Fragmentierung von Chitin entstandenen Oligosacchariden ([Kirn, T.J. et al. 2005](#));
- 2) Nährstoffmangel oder vergleichbare andere Stressbedingungen;
- 3) eine ausreichend große Bakterienpopulation, so dass das "Quorum Sensing" ([Miller, M.B. & Bassler, B.L. 2001](#), [Miller, M.B. et al. 2002](#), [Xavier, K.B. & Bassler, B.L. 2005](#), [Camilli, A. & Bassler, B.L. 2006](#)) aktiviert wird. Das Chitin alleine genügt schon zur Induktion von Typ 4-Pili (Pseudopili), die eine notwendige Voraussetzung zur Fähigkeit sind, DNA aufzunehmen. Die Induktorkombination deutet darauf hin, dass der Sinn der Transformation im Gewinn von Diversität und damit einer möglichen Erhöhung der Fitness liegt ([Bartlett, D.H. & Azam, F. 2005](#), [Meibom, K. et al. 2005](#)).

Von ganz besonderer Bedeutung sind neueste Befunde ([Prudhomme, M. et al. 2006](#)), dass Kompetenz ("genetische Transformierbarkeit") in *Streptococcus pneumoniae*, welches nicht über ein SOS-ähnliches System verfügt, durch Antibiotikastress induziert werden kann. Wirksam waren hierbei die Aminoglycosid-Antibiotika Kanamycin (30 µg/ml) und Streptomycin (6,25 µg/ml), die Fluorochinolon-Antibiotika Norfloxacin (10 µg/ml), Levofloxacin und Moxifloxacin sowie Mitomycin C (25 ng/ml); unwirksam waren hingegen Novobiocin, Tetracyclin, Erythromycin, Rifampicin, Vancomycin sowie die β-Lactamantibiotika Ampicillin und Cefotaxim. Da gleichzeitig mit der Kompetenz auch die Fähigkeit induziert wird, nicht kompetente Zellen der gleichen Spezies zu töten ("Fratrizid" oder "Sobrinizid"), wird auch ein Pool verwandter DNA geschaffen, aus dem die kompetenten Zellen schöpfen können.

Eine zentrale Rolle spielt auch bei dieser stressinduzierten Kompetenz wie bei dem zitierten Vibrio-Beispiel ein ins Medium sezerniertes Peptid, CSP (= Kompetenz-stimulierendes Peptid), welches allerdings von den Autoren ([Prudhomme, M. et al. 2006](#)) nicht als "Quorum Sensing" eingestuft wird, sondern als "Alarmon" bezeichnet.

Eine Arbeitsvorschrift, mit der sich die natürliche Transformation im wässrigen Medium, auch in der Umwelt, untersuchen lässt, wurde von ([Paul, J.H. & Williams, H.G. 2004](#)) entwickelt.

Neben der natürlichen Kompetenz, bei der nackte DNA ohne Rücksicht auf ihre Herkunft (also auch heterospezifische DNA) aufgenommen und ggf. integriert wird, ist schon länger bekannt, dass einige Bakterienspezies, z.B. aus den Gattungen *Haemophilus* und *Neisseria*, mit hoher Effektivität homospezifische DNA, also DNA aus der eigenen Art, aufnehmen und ins Genom inkorporieren ([Stotzky, G. & Babich, H. 1986](#)).

Die vollständige Sequenzierung des Genoms von *Haemophilus influenzae* hat gezeigt, dass gleichmäßig über das Genom verteilt 1465 Kopien einer hoch konservierten 9 bp (bp = Basenpaare) Sequenz, eingebettet in eine Konsensus-Sequenz von 29 bp, als "Inverted Repeats" oder "Dyaden" aufzufinden sind. Diese als USS (= Uptake Signal Sequence) bezeichneten Sequenzen sowie 14 ähnliche, als IDS (= Intergenic Dyad Sequence) bezeichnete Sequenzen auf extrazellulären DNA-Fragmenten führen zu deren verstärkter Aufnahme und Integration ins Chromosom mittels homologer Rekombination durch *Haemophilus influenzae* und das entfernt verwandte Bakterium *Neisseria meningitidis*, welches über ganz ähnliche Erkennungssequenzen verfügt. Dieses System der erleichterten Transformation / Rekombination, das inzwischen auch in zahlreichen anderen Bakterienspezies entdeckt wurde, ist wahrscheinlich der Hauptgrund der Verbreitung von durch Mutatoren generierten neuen Genen in der gesamten Nicht-Mutator-Population ([Mrázek, J. & Karlin, S. 1996](#), [Smith, H.O. et al. 1995](#), [Dubnau, D. 1999](#)).

Für die homologe Rekombination in *Bacillus*-Arten sind die Ansprüche an die Sequenzen etwas geringer; es müssen nur sowohl am 3'- als auch am 5'-Ende eines transformierten DNA-Fragmentes zu einer chromosomalen oder Plasmid-Sequenz exakt komplementäre Sequenzen vorhanden sein. Wie lang diese Sequenzen sein müssen, hängt von ihrem GC-Gehalt ab – je niedriger, desto länger. Bei hohem GC-Gehalt genügen 20 bp mit einem "Mismatch" als "invasive Enden" ([Majewski, J. & Cohan, F.M. 1999](#)).

Dass der horizontale Gentransfer nicht nur über Artgrenzen, sondern sogar über die Grenzen der Reiche von Eubakterien, Archaeobakterien und Eukaryonten hinweg in der Evolution eine durchaus häufige und bedeutende Rolle spielte, zeigte die Analyse von Genen, die für metabolische Enzyme (z.B. Glutaminsynthetasen und Superoxiddismutasen) kodieren: Der Sequenzvergleich ergab unerwartete Sequenzverwandtschaften, die nicht mit der phylogenetischen Verwandtschaft der Organismen zur Deckung zu bringen waren ([Smith, M.W. et al. 1992](#)).

Ein extremes Beispiel der Genübertragung berichteten ([Cordes, M.H.J. & Binford, G.J. 2006](#)), die bei der Sequenzierung der Spinnengiftgene aus der Gattung *Loxosceles* feststellten, dass es im ganzen Tierreich keine vergleichbaren Sequenzen gibt, dass aber homologe Gene in pathogenen Stämmen aus der Bakteriengattung *Corynebacterium* bereits bekannt waren. Hier erfolgte offensichtlich ein Gentransfer aus einem Bakterium auf einen höheren Eukaryonten.

Wegen des hohen Grades an lateralem Gentransfer halten es viele Taxonomen für unmöglich, phylogenetische Bäume aus anderen Sequenzdaten als denen der rDNA zu konstruieren ([Pennisi, E. 1999](#)).





## 4 Antibiotikaresistenz von Bakterien

### 4.1 Definitionen zur Resistenz

Im klinischen Sinne gilt ein bakterieller Infektionserreger dann als resistent gegen ein antibakterielles Chemotherapeutikum, wenn dessen Konzentration am Infektionsort nicht ausreicht, um seine Vermehrung zu hemmen (bakteriostatisch) oder ihn abzutöten (bakterizid). Diese Definition schließt mehrere Komponenten ein: Die minimale Hemmkonzentration (MHK, d.i. die geringste Konzentration des Wirkstoffes, welche in vitro das Wachstum eines Erregers hemmt), die Pharmakokinetik der Substanz und das klinische Ergebnis. Häufig werden Erregerstämme aufgrund dieser Definition außer in die Kategorien "sensitiv" und "resistent" auch in die Kategorie "intermediär" eingeordnet. ([Witte, W. & Klare, I. 1999](#))

Für die Charakterisierung im Labor gelten Keime dann als resistent, wenn ihre MHK höher liegt als ein maximal erreichbarer (für den Wirt nicht toxischer) Serum- oder Gewebespiegel. ([Färber, H. et al. 2001](#), [DIN 58940 Teil 4 1995](#))

Die minimale bakterizide Konzentration (MBK, d.i. die geringste Konzentration des Wirkstoffes, welche in vitro einen Erreger abtötet) liegt höher als die MHK. ([Färber, H. et al. 2001](#))

Man unterscheidet zwischen primärer (= natürlicher) Resistenz, bei der alle Isolate einer Spezies oder eines Stammes resistent gegenüber dem Wirkstoff sind (z.B. alle *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme gegenüber Benzylpenicillin) und sekundärer (= erworbener) Resistenz, die während der Anwendung des Wirkstoffes durch Spontanmutation mit nachfolgender Selektion (ggf. in evolutiven Zyklen) entsteht. ([Färber, H. et al. 2001](#))

Von der Antibiotika-Resistenz zu unterscheiden ist die Antibiotika-Toleranz: Während resistente Bakterien gegenüber dem Antibiotikum unempfindlich sind und sich auch in seiner Gegenwart weiter vermehren, stellen die antibiotikatoleranten (persistenten) Bakterien in Gegenwart des Antibiotikums das Wachstum ein, bleiben aber am Leben ([Levin, B.R. 2004](#), [Balaban, N.Q. et al. 2004](#), [Miller, C. et al. 2004](#)). Nach Absinken der Konzentration des Antibiotikums unter die MHK können die Bakterien das Wachstum wieder aufnehmen. Antibiotika-Toleranz, die wohl als Vorstufe bei der Entwicklung einer Resistenz zu betrachten ist, ist sehr schwer nachzuweisen: Bei konventionellen in vitro-Tests erscheinen tolerante Stämme mangels Koloniebildung als antibiotikasensitiv ([Gilmore, M.S. & Hoch, J.A. 1999](#), [Novak, R. et al. 1999](#)).

## 4.2 Genetische Grundlagen der Antibiotikaresistenz in Bakterien

### 4.2.1 Verschiedene Resistenztypen: Primäre und sekundäre Resistenzen

Das Resistenzverhalten eines Bakteriums gegenüber Antibiotika ist genetisch determiniert. Zum Überblick siehe ([Davies, J. 1996b](#), [Davies, J.B. 1997](#)).

Im Fall der primären (intrinsischen) Resistenz kann entweder das Zielmolekül des Antibiotikums in der Zelle fehlen, d.h. es wird im Genom nicht kodiert oder nur in einer Form, die von dem Antibiotikum nicht beeinflusst wird. Es kann auch die Expression eines Transportvehikels fehlen, welches für den Transport des Antibiotikums in die Zelle notwendig ist (geringpermeable Membran ([Nikaido, H. 1994](#)), fehlendes Porin ([Witte, W. & Mielke, M. 2003](#)), so dass das eigentliche, gegen das Antibiotikum tatsächlich empfindliche Zielmolekül nicht mit dem Antibiotikum in Kontakt treten kann. Auch gibt es Fälle, in denen konstitutiv ein hochaktives Transportsystem existiert, welches eingedrungene Antibiotika aus der Zelle eliminiert, bevor sie mit dem Zielmolekül in Kontakt treten können (Nikaido, H. 1994). Ein gut untersuchtes Beispiel für geringe Membranpermeabilität als Resistenzmechanismus ist die Cephalosporinresistenz von *Acinetobacter calcoaceticus* ([Sato, K. & Nakae, T. 1991](#)) und ein Beispiel für effektive Efflux-Pumpen als Resistenzmechanismus ist die intrinsische Resistenz von *Pseudomonas aeruginosa* gegen Tetracycline, Chloramphenicol und Norfloxacin ([Li, X.-Z. et al. 1994](#)). Grundlage für den letzteren Effekt ist aber eine ohnehin schon sehr geringe Permeabilität der äußeren Membran von *Pseudomonas aeruginosa* ([Angus, B.L. et al. 1982](#)), [Yoshimura, F. & Nikaido, H. 1982](#)). Eine andere sehr gut untersuchte Efflux-Pumpe aus der Familie der "Small Multidrug Resistance" Transporter ist EmrE aus der inneren Membran von *E. coli*, die von einem "Protonen-Antiport" angetrieben wird ([Pornillos, O. et al. 2005](#)).

Schließlich, wie bei Biofilmen von *Pseudomonas aeruginosa* ([O'Toole, G.A. 2002](#), [Drenkard, E. & Ausubel, F.M. 2002](#)), können komplexe phänotypische Umorganisationen zu einer bisher nicht näher charakterisierten Resistenz gegen mehrere verschiedene Antibiotika führen. Einerseits können diese Zellen unter geeigneten Bedingungen zum antibiotikasensitiven Phänotyp revertieren, andererseits können sie unter dem Schutz der erhöhten MHK und MBK durch Mutationen auch dauerhaft resistente Genotypen generieren. Da *P. aeruginosa* konstitutiv eine hochaktive Effluxpumpe exprimiert, steht der Biofilm-Phänotyp wahrscheinlich im Zusammenhang mit einer Umorganisation der Membran mit Senkung der Permeabilität ([Nikaido, H. 1994](#)). Diese Umorganisation kann auch durch subinhibitorische Konzentrationen von Aminoglycosid-Antibiotika induziert werden ([Hoffman, L.R. et al. 2005](#)). Vielleicht ist eine Anreicherung des Biofilm-Phänotyps verantwortlich für die in ([Bendt, T. et al. 2002](#)) gefundene hohe Mehrfachresistenz.

Während die meisten Isolate von *Enterobacteriaceae*, von *Haemophilus influenzae*, *Branhamella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus* spp. und *Streptococcus* spp. natürlich sensitiv gegen Chinolonantibiotika sind, sind die Isolate von *Gardnerella vaginalis* und der *Bacteroides fragilis*-Gruppe gegen diese Substanzen natürlich resistent ([King, A. & Phillips, I. 1986](#)).

Besonders schwerwiegend sind die in neuerer Zeit zunehmend auftretenden Infektionen mit den gegen viele Antibiotika natürlich resistenten Erregern *Clostridium difficile* und *C. sordellii* ([Couzin, J. 2006](#)). Dabei ist besonders schwerwiegend, dass der natürliche Darmbewohner

*C. difficile* speziell Krankenhauspatienten nach einer Antibiotikatherapie infiziert mit einer Mortalitätsrate, die von 2000 bis 2004 von 1% auf 7% zugenommen hat.

Im Fall der sekundären Resistenz können individuelle Zellen, die durch spontane Mutation eine Resistenz im Sinne der für die primäre Resistenz beschriebenen Mechanismen erworben haben, durch die Anwesenheit des Antibiotikums selektiert werden. Diese Resistenzbildung erfolgt am häufigsten bei Antibiotikakonzentrationen unterhalb der MHK.

Welche Faktoren für die Entstehung von Mutationen, die zur Antibiotikaresistenz führen, relevant sind, wurde bereits von ([Martinez, J.L. & Baquero, F. 2000](#)) in einem Review-Artikel sehr übersichtlich zusammengefasst.

In Bakterienpopulationen besonders hoher Zelldichte oder unter dem Einfluss anderer Stressfaktoren treten verstärkt sog. Mutatorzellen auf. Das sind Zellen, die aufgrund von Mutationen in DNA-Polymerase-Genen die Fähigkeit zum fehlerfreien Kopieren des Genoms vor der Zellteilung verloren haben und die deshalb Genome mit multiplen Mutationen produzieren ([LeClerc, J.E. et al. 1996](#)). Sofern dabei eine Antibiotikaresistenz entsteht, kann das - trotz der vielen Nachteile eines instabilen Genoms für das Individuum – zum Überlebensvorteil für die Population werden ([Blazquez, J. 2003](#)). Entweder kann der Mutator durch Rückmutation zum Nicht-Mutator "geheilt" werden oder die Zelle stirbt aufgrund der angehäuften schädlichen Mutationen und ein die Antibiotikaresistenz tragendes DNA-Fragment wird von einer anderen (kompetenten) Zelle aufgenommen und genutzt ([Bridges, B.A. 1997](#), [Moxon, E.R. & Thaler, D.S. 1997](#), [Sniegowski, P.D. et al. 1997](#), [Taddei, F. et al. 1997](#), [Matic, I. et al. 1996](#)).

Zur Entwicklung von Resistenz gegen manche Antibiotika, z.B. Makrolid-Wirkstoffe, Chinolone und Aminoglycoside, genügt fallweise eine einzige Mutation (sog. Einschritt-/one step-Resistenz oder Streptomycintyp). Die Entwicklung von Resistenz gegen andere Antibiotika, z.B.  $\beta$ -Lactame, Tetracycline, Fluoroxazole oder Sulfonamide, erfolgt iterativ in Stufen nach mehrfachen Mutationen (sog. Mehrschritt-/Multistep-Resistenz oder Penicillintyp).

Generell lässt sich sagen, dass das Entstehen eines neuen Resistenzgens, z.B. aus einem Gen für ein metabolisches ("housekeeping") Enzym (z.B. eine Glycosyl-Kinase oder Acetyltransferase), viel mehr Mutationsschritte erfordert als die Anpassung eines vorhandenen Resistenzgens an ein strukturell verändertes Antibiotikum. Im letzteren Fall genügt beispielsweise eine einzige Punktmutation in einem bestehenden  $\beta$ -Lactamase-Gen um die  $\beta$ -Lactamase zur Spaltung eines vorher noch unzugänglichen Penicillinderivates zu befähigen oder unempfindlich gegen einen  $\beta$ -Lactamase-Inhibitor zu machen ([Davies, J. 1994](#), [Witte, W. & Mielke, M. 2003](#)).

In zwei Übersichtsartikeln werden die verschiedenen existierenden  $\beta$ -Lactamasen einerseits funktionell klassifiziert ([Bush, K. et al. 1995](#)) und andererseits sehr ausführlich bezüglich Mechanismus (Serin-Hydrolase oder Metalloenzym), Substratspezifität, Hemmbarkeit und Klassifizierung dargestellt sowie ihre Evolution in Struktur und Wirkung seit der Einführung des Penicillins als erstem  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum 1940 beschrieben ([Medeiros, A.A. 1997](#)). Wie  $\beta$ -Lactamasen aus anderen hydrolytischen Enzymen entstanden sein könnten, wurde in Laborversuchen nachvollzogen ([Tawfik, D.S. 2006](#), [Park, H.-S. et al. 2006](#)): In das Gen der Glyoxalase II, eines metabolischen Enzyms, das zur  $\alpha\beta/\beta\alpha$ -Metallohydrolase-Superfamilie gehört, wurden mittels Rekombination für Peptid-Zufallssequenzen kodierende DNA-Fragmente inseriert und einer in vitro-Evolution mit Mutationen (durch fehlerbehaftete Repli-

kation), Deletionen und Selektionszyklen unterworfen. Erhalten wurde schließlich ein Enzym mit unverändertem  $Zn^{2+}$ -bindendem katalytischen Zentrum aber veränderter Substratbindungsregion, die es zur Spaltung von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika befähigt. Dieses künstliche Enzym hatte nur 25% Sequenzidentität mit der natürlich vorkommenden  $\beta$ -Lactamase IMP-1, die zur gleichen Metallohydrolase-Familie gehört, erreicht aber trotz der kurzen Evolutionsdauer schon ca. 1% ihrer Aktivität. Expression dieser künstlichen  $\beta$ -Lactamase in *E. coli* erhöht deren MHK für Cefotaxim um den Faktor 100 ([Park, H.-S. et al. 2006](#)).

Prinzipiell ist es auch möglich, dass ein Enzym durch eine relativ geringfügige Mutation eine völlig neue Substrat- und Wirksamkeit erhält ([Ritz, D. et al. 2001](#)). Ein solcher Mechanismus wurde aber für das Entstehen von Antibiotikaresistenzen bisher noch nicht beschrieben. Ein Schritt in diese Richtung ist jedoch eine Adaptation einer vorhandenen Nebenaktivität eines Enzyms, wie dies in ([Rather, P.N. et al. 1993](#), [Rather, P.N. et al. 1997](#)) beschrieben wurde: Das Gram-negative Darmbakterium *Providencia stuartii* besitzt eine 2'-N-Acetyltransferase, die zur Acetylierung des Peptidoglycans beim Zellwandaufbau dient. Mit relativ geringer Nebenaktivität kann das Enzym auch als AAC(2')-Ia die Aminoglycosid-Antibiotika Gentamicin, Tobramycin und Netilmicin in 2'-Position acetylieren. Bei normaler Expression des Enzyms ist die Aktivität nicht resistenzrelevant, nur bei Überexpression. Zu dieser Überexpression kann es kommen, wenn ein von den Bakterien ins Medium abgegebener AR (= Acetyltransferase reprimierender)-Faktor, ein kleines Peptid, das die Expression des Enzyms hemmt, nicht mehr gebildet wird. Hier kann eine Aminoglycosid-Antibiotikaresistenz durch Mutation des Regulators oder dessen Zielsequenz im Promotor eines konstitutiv vorhandenen Gens generiert werden.

Manchmal genügt auch die Mutation in einem für die Wirkung des Antibiotikums erforderlichen Kofaktor der Zielzelle um Resistenz gegen das Antibiotikum zu bewirken, wie z.B. die Resistenz von *Streptococcus pneumoniae* gegen das Eisen-abhängige Antibiotikum Streptonigrin durch Inaktivierung eines Eisentransportproteins ([Brown, J.S. et al. 2001](#)).

Nicht immer beruht eine Antibiotikaresistenz auf einer einfachen, leicht durchschaubaren Kausalität: Bei der Untersuchung eines klinischen Isolates von *Enterobacter cloacae* mit Carbapenem-Resistenz stellte sich heraus, dass nicht allein dieser Stamm die für den Abbau des Antibiotikums verantwortliche Cephalosporinase exprimiert, sondern auch der Carbapenem-sensitive Stamm, aus dem sich die Resistenzmutante entwickelt hatte, und eine ebenfalls Carbapenem-sensitive Revertante. Das Enzym war in allen drei Stämmen etwa gleich aktiv. Weitergehende genetische Analyse zeigte, dass sich der resistente Stamm nur dadurch von den beiden anderen Stämmen unterschied, dass er ein in der äußeren Membran lokalisiertes 38 kDa-Protein, das in ([Raimondi, A. et al. 1991](#)) als unspezifisches Porin identifiziert wurde, nicht exprimiert. Weitere Versuche zeigten, dass die von dem Porin abhängige Permeabilität der Membran für das Antibiotikum die MHK für Carbapeneme bestimmte, wahrscheinlich, weil die intrazelluläre Aktivität der Cephalosporinase einfach zu niedrig war ([Lee, E.H. et al. 1991](#)). Ganz ähnlich verhält es sich auch mit der Carbapenem-Resistenz von *Enterobacter aerogenes*, die auch auf der Kombination reduzierter Antibiotikaaufnahme mit für sich allein unzureichendem enzymatischem Abbau beruht ([De Champs, C. et al. 1993](#), [Touvelekis, L.S. et al. 1992](#)).

Schwierig wird es auch mit der Zuordnung, wenn es gegen ein bestimmtes Antibiotikum mehrere grundverschiedene Resistenzmechanismen und für jeden davon noch mehrere in Frage kommende Resistenzgene gibt. So wurden für die Tetracyclinresistenz drei unterschiedliche Mechanismen identifiziert ([Roberts, M.C. 1994](#)):

- 1) energieabhängige Effluxpumpen in der Cytoplasmamembran (Tet A, B, C, D, E, G, H);
- 2) Schutz der bakteriellen Ribosomen durch die Expression tetracyclinunempfindlicher Elongationsfaktoren (Tet M, O, Q, S);
- 3) Expression eines Enzyms, welches das Tetracyclin chemisch (oxidativ) verändert (Tet X).

Zur Systematik der Bezeichnung siehe ([Levy, S.B. et al. 1989](#)).

**Tabelle 12:** Übersicht über verschiedene Resistenzmechanismen:

Resistenzmechanismus	Angriffsort <sup>1</sup>	Beispiel/(Ref.):
Reduzierte Aufnahme in die Zelle	AB	Verlust eines Porins ( <a href="#">Raimondi, A. et al. 1991</a> )
Schnelles Auspumpen	AB	Tetracyclin-Effluxpumpen ( <a href="#">Li, X.-Z. et al. 1994</a> )
Segregation des Antibiotikums	AB	Fusidinsäure ( <a href="#">Davies, J. 1994</a> )
Überexpression eines Scavenger <sup>2</sup>	AB	Bleomycin-Immunitätsprotein
Verlust der Sensitivität des ZM	ZM	Gyrasemutation / Chinolone ( <a href="#">Kreuzer, K.N. &amp; Cozzarelli, N.R. 1979</a> )
Verlust eines Cofaktors <sup>3</sup>	AB / ZM	Streptonigrinresistenz ( <a href="#">Brown, J.S. et al. 2001</a> )
Überexpression des ZM	ZM	Sulfonamidresistenz ( <a href="#">Davies, J. 1994</a> )
Spaltung des AB	AB	$\beta$ -Lactamasen
Chemische Modifikation des AB	AB	Aminoglycosid-Phosphotransferasen
Metabolischer Bypass <sup>4</sup>	(ZM / AB)	Sulfonamidresistenz ( <a href="#">Davies, J. 1994</a> )

<sup>1</sup> Angriffsort: AB (= Antibiotikum) oder ZM (= Zielmolekül);

<sup>2</sup> Scavenger = Molekül, welches das AB ohne schädliche Wirkungen mit höherer Affinität und / oder höherer Kapazität bindet als das ZM;

<sup>3</sup> Cofaktor = Faktor in der Zielzelle, der für die Aktivierung des AB oder für die Affinität des ZM zum AB notwendig ist;

<sup>4</sup> Metabolischer Bypass = Eröffnen eines alternativen, vom ZM unabhängigen Stoffwechselweges, der insensitiv ist gegen das AB.

So vielfältig die Mechanismen der Antibiotikaresistenz bei verschiedenen Antibiotika und bei verschiedenen Bakterienarten auch sind, so wurden doch bereits mathematische Modelle für die Entwicklung einer Resistenz im Verlauf einer Antibiotikabehandlung eines infizierten Wirtsorganismus erstellt ([Lipsitch, M. & Levin, B.R. 1997](#)).

Statt der Erlangung der Antibiotikaresistenz durch Mutation kann die sekundäre Resistenz auch durch Genübertragung mittels spezifischen Vehikeln wie Plasmiden, Phagen oder Transposonen oder unspezifisch durch Aufnahme freier DNA erworben werden (s.u.) ([Levy, S.B. 1998](#), [Stotzky, G. & Babich, H. 1986](#)). Die Übertragung von DNA-Sequenzen innerhalb einer oder zwischen Spezies, der sog. laterale (oder horizontale) Gentransfer, ist ein häufig vorkommender Prozess, der eine erhebliche Rolle bei der Evolution bakterieller Spezies spielt ([Ochman, H. et al. 2000](#), [Nelson, K.E. et al. 1999](#)).

Zur Bestimmung der Antibiotikaresistenz in Bakterienisolaten genügt bezüglich der primären (natürlichen) Resistenz die Speziesbestimmung. Bezüglich der sekundären (erworbenen) Resistenz ist entweder ein Wachstumsversuch mit Hemmtest oder eine molekularbiologische Identifizierung der Resistenzgene erforderlich. Einen Überblick über die Methoden der Resistenzbestimmung in Krankenhausproben, die sich prinzipiell nicht grundlegend von denen der Resistenzbestimmung in Umweltproben unterscheiden, gibt ([Witte, W. et al. 2004](#)).

#### 4.2.2 Übertragbarkeit von Resistenzgenen und die Übertragungsmechanismen

Als Faustregel kann man sagen, dass eine durch Mutation des chromosomal verankerten Zielgens erworbene Antibiotikaresistenz (z.B. Mutation einer Gyrase, die zur Chinolonresistenz führt ([Waters, B. & Davies, J. 1997](#), [Yoshida, H. et al. 1988](#))) nicht so häufig horizontal (d.h. von einer taxonomischen Einheit auf eine andere) übertragen wird wie eine plasmidkodierte Resistenz, die durch physikalische oder chemische Elimination (Pumpe oder Modifikation/Degradation) des Antibiotikums wirkt ([Davies, J.B. 1997](#)). Diese Unterscheidung ist aber nur eine Regel, kein Dogma.

Sowohl eine Mobilisierung mutierter chromosomaler Gene in Plasmide durch Transposonen, lysogene Phagen oder nach Zellyse und Aufnahme des resistenztragenden DNA-Fragmentes durch ein natürlich kompetentes Bakterium mit Integration in ein dort bereits vorhandenes Plasmid wurde schon beobachtet als auch der umgekehrte Weg, nämlich die Integration eines plasmidkodierten Resistenzgens (oder einer ganzen "Resistenzkassette") in das Chromosom, hier in den meisten Fällen vermittelt durch die Resistenzgene einschließende Transposonsequenzen.

Auf jeden Fall ist es aber wahrscheinlich, dass die Antibiotika-Resistenzgene ihre hohe Effizienz durch ihre Passage durch eine ganze Kaskade von Wirtsbakterien erworben haben, unterstützt durch die Mutagenität der (retro-)transposonvermittelten reversen Transkription ([Davies, J.B. 1997](#)).

Derzeit ist die herrschende Meinung, dass viele übertragbare Antibiotika-Resistenzgene, die für ein Enzym zur kovalenten Modifikation des Antibiotikums kodieren, ursprünglich aus den das betreffende Antibiotikum produzierenden Mikroorganismen stammten, wo sie dem Selbstschutz gegen das toxische Produkt dienten ([Krügel, H. 1997](#)). Dies wird einerseits durch die bekannte Neigung dieser Organismen zum Gentransfer ([Wiener, P. et al. 1998](#)) gestützt und andererseits durch Sequenzdaten, die einen hohen Grad der Homologie zwischen Resistenzgenen der Antibiotika-Produzenten und übertragbaren Resistenzgenen ergaben ([Benveniste, R. & Davies, J. 1973](#)). Bei der Analyse des "Resistoms" (d.h. die Summe aller Resistenzgene in einer bakteriellen Population) in Bodenproben wurden Resistenzen gegen nahezu alle bekannten Antibiotika gefunden ([D'Costa, V.M. et al. 2006](#)). Bei den diese Gene tragenden Bakterien handelte es sich ausschließlich um Arten der Gattung *Streptomyces*, die als Produzenten einer Vielzahl von natürlichen Antibiotika wohl bekannt sind. Wie die Übertragung der Resistenzgene auf Organismen erfolgt, die eigentlich Ziel des "Kampfstoffes" sind, ist noch nicht geklärt ([Davies, J. 1994](#), [Davies, J.B. 1997](#)). Neben der zufälligen Übertragung im natürlichen Lebensraum der Antibiotika-Produzenten wird diskutiert, dass dies durch Kontamination der klinisch eingesetzten Antibiotikapräparationen mit DNA aus dem Produzentenstamm erfolgen konnte ([Heier, H. 1983](#)). Gegen einen hohen Stellenwert der Übertragung im natürlichen Lebensraum spricht, dass bei vor Beginn der "Antibiotika-Ära"

1945 asservierten Bakterien bisher keinerlei Antibiotikaresistenzgene gefunden wurden ([Tomasz, A. 2006](#)).

Die Übertragung von Resistenzgenen zwischen Bakterien kann erfolgen durch (vgl. hierzu auch Abschnitt 3.5 "Genübertragung bei Bakterien"):

- Konjugation (Übertragung von Plasmiden, die ein oder mehrere Resistenzgene tragen, z.B. mittels Pili) ([Heier, H. 1983](#));
- Transduktion mittels Bakteriophagen (Viren, die sich – ohne die Bakterienzelle "lytisch" zu zerstören – "lysogen" ins Bakterienchromosom integrieren können und bei einem späteren Übergang in den lytischen Zyklus DNA-Fragmente der Wirtszelle, z.B. Resistenzgene, mitnehmen und im Genom der nächsten Wirtszelle integrieren können oder in deren leerer Hülle rein zufällig ein DNA-Fragment der Wirtszelle statt der Phagen DNA verpackt und so in die nächste Wirtszelle eingeschleust wird). Dieser Weg scheint besondere Bedeutung für die Übertragung von Antibiotika-Resistenzgenen auf Stämme von *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pyogenes* zu haben. Hierbei können sowohl speziesspezifische Bakteriophagen, z. B. der "Staphylophage" S1, als auch speziesspezifische oder gar gattungsübergreifend wirksame temperente Phagen, z. B. der Phage P1, beteiligt sein. Der letztgenannte Phage P1 kann durch sein breites Wirtsspektrum Antibiotikaresistenzen beliebig zwischen den Spezies *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Enterobacter liquefaciens*, *Citrobacter freundii*, *Erwinia amylovora* und anderen hin und her transportieren ([Stotzky, G. & Babich, H. 1986](#));
- Konjugative Übertragung in Abwesenheit von Plasmiden (Transposon vermittelte Übertragung chromosomal lokalisierter Resistenzgene) ([Noble, W.C. et al. 1992](#)): Transposonen ("egoistische Gene") können DNA-Fragmente nach ähnlichen Mechanismen übertragen wie Phagen ([Ochman, H. et al. 2000](#)). Da die transposonvermittelte Resistenzgenübertragung unter Stressbedingungen (Aktivierung der SOS-Gene) besonders effektiv ist ([Beaber, J.B. et al. 2004](#)), ist sie unter den Bedingungen in der Kläranlage als sicher anzunehmen.
- Transformation (Aufnahme freier DNA aus dem Medium) mit Integration in das Chromosom oder ein Plasmid aufgrund homologer oder illegitimer Rekombination wurde in der letzten Zeit als häufiger Mechanismus der (Resistenz-)Genübertragung erkannt. ([Davies, J. 1994](#))
- Nachdem kürzlich in Stämmen von *Streptomyces coelicolor* und *Streptomyces lividans* DNA Polymerase und Topoisomerase mit der Aktivität reverser Transkriptasen entdeckt wurden ([Bao, K. & Cohen, S.N. 2004](#)), wodurch erstmals gezeigt wurde, dass auch Bakterien wie Eukaryonten und deren Retroviren den Weg der Transkription rückwärts gehen können indem sie eine RNA-Sequenz in eine DNA-Sequenz zurückübersetzen, ist nicht mehr auszuschließen, dass auch RNAs zur horizontalen Übertragung von Resistenzgenen zwischen Bakterienspezies beitragen können.

Die überwiegende Mehrheit der übertragbaren Antibiotikaresistenz-Determinanten in pathogenen Bakterien findet sich auf Plasmiden, die ihre Verbreitung in der Bakterienpopulation durch Konjugation oder Transformation gestatten ([Davies, J. 1996b](#), [Petrocheilou, V. et al. 1976](#), [Marshall, B. et al. 1981](#), [Levy, S.B. et al. 1976](#), [Smith, H.W. 1969](#), [Anderson, J.D. et al.](#)



1973, [Anderson, E.S. 1975](#), [Williams, P.H. 1977](#)). Dies wurde auch in einem Übersichtsartikel ([Witte, W. 1999](#)) für Gram-positive humanpathogene Bakterienspezies deutlich aufgezeigt: Für den Protagonisten dieser Gruppe, *Staphylococcus aureus* sind die Resistenzen gegen Penicilline und alle anderen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, Aminoglycoside, Makrolide, Lincosamine, Streptogramine A und B, Tetracycline, Fusidinsäure, Chinolone (Efflux-vermittelte Resistenz), Mupirocin und Trimethoprim plasmidkodiert. Nur die Resistenzen gegen Rifampicin, Chinolone (Mutation des Zielmoleküls) und Glycopeptide sind chromosomal lokalisiert.

Die Bedeutung der Plasmide für die Verbreitung der Methicillinresistenz (*mecA*) wird deutlich, wenn man die Zunahme der MRSA (= methicillinresistente **S. aureus**) in Deutschland betrachtet: Von 1,7% aller nosokomialen Infektionen in 1990 auf 8,4% in 1995 ([Witte, W. 1999](#)).

In einer kürzlich veröffentlichten Übersicht ([Tomasz, A. 2006](#)) wurde für die Multiresistenz in MRSA gezeigt, dass von 18 vorhandenen Antibiotikaresistenzen 14 durch Genübertragung von anderen Organismen akquiriert wurden, während nur 4 durch adaptive Prozesse entstanden sind: Neben den Mutationen der Zielmoleküle für Ciprofloxacin und Rifampin der "molekulare Bypass" der Trimethoprim/Sulfonamid-Hemmung und die Vancomycintoleranz mit "intermediärer" MHK der VISA. In die übertragbare Gruppe gehört auch die "echte", durch *vanA* bewirkte Vancomycin-Resistenz, neben Resistenzgenen gegen Penicillin, Streptomycin, Tetracyclin, Methicillin, Oxacillin, Cephalothin, Cephotoxim, Imipenem, Chloramphenicol, Clindamycin, Erythromycin, Gentamicin und Teichoplanin.

Während in *S. aureus*-Isolaten aus 1930 noch keines der genannten Resistenzgene nachweisbar ist, kann man in späteren Isolaten ab 1945 Penicillinresistenz, ab 1948 Streptomycinresistenz, ab 1950 Tetracyclinresistenz und ab 1961 Methicillinresistenz nachweisen. Alle übrigen genannten Resistenzen sind bereits 1994 manifest bis auf die Vancomycin-Resistenz, von der intermediäre (VISA-)Stämme erst ab 1997 und *vanA*-Stämme ab 2002 isoliert wurden ([Tomasz, A. 2006](#)).

Wie Genotyp-Analysen an multiresistenten MRSA aus Klinikisolaten zeigten, gehören die meisten zu pandemischen MRSA-Klonen, die i.d.R. ihren Ursprung in Krankenhäusern haben. Einige Isolate aber, die durch ein relativ begrenztes Resistenzspektrum und besonders schnelles Wachstum gekennzeichnet waren, legten durch eine hohe Diversität des genetischen Hintergrundes die Vermutung nahe, dass sie außerhalb Kliniken durch Übertragung von das *mecA*-Gen enthaltenden Resistenzgenkassetten (SCC*mec* = Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*) entstanden sind ([Aires de Sousa, M. & de Lencastre, H. 2003](#), [Aires de Sousa, M. & de Lencastre, H. 2004](#), [Aires de Sousa, M. et al. 2005](#)).

Ein natürliches Reservoir der Resistenz- (R-) Plasmide ist ihr häufiges Vorkommen in apathogenen bzw. avirulenten oder opportunistischen (bzw. bedingt pathogenen) Keimen ([Heier, H. 1983](#), [Roberts, M.C. 1994](#)). Dies ist bei der Bewertung von Kläranlagenabflüssen zu beachten.

### 4.2.3 Spezifität von Resistenzgenen und Sequenzinformationen

In den meisten Fällen ist ein Resistenzgen spezifisch für ein ganz bestimmtes Antibiotikum oder für ein bestimmtes gemeinsames Strukturmerkmal einer Gruppe von Antibiotika (Kreuzresistenz). Nur bei den Efflux-Pumpen kommt es vor, dass sie gegen mehrere strukturell nicht näher verwandte Antibiotika schützen können ([Lewis, K. 1994](#)).

Bei den übertragbaren Antibiotikaresistenzen wurden folgende Mechanismen identifiziert ([Davies, J. 1994](#)) [typische Beispiele eines betroffener Antibiotika in eckigen Klammern]:

- Reduzierte Aufnahme in die Zelle [Chloramphenicol ([Angus, B.L. et al. 1982](#))],
- aktiver Transport / Efflux aus der Zelle [Tetracycline ([Li, X.-Z. et al. 1994](#))],
- Modifikation der Zielstruktur (Protein oder Nukleinsäure) in der Zelle um die Bindung des Antibiotikums zu verringern oder zu eliminieren [ $\beta$ -Lactame, Erythromycin/Clarithromycin ([Oleastro, M. et al. 2003](#)), Lincomycin ([Spratt, B.G. 1994](#)), Chinolone ([Kreuzer, K.N. & Cozzarelli, N.R. 1979](#))],
- Inaktivierung des Antibiotikums durch enzymatische Veränderung in Form von Hydrolyse [ $\beta$ -Lactame ([Witte, W. & Mielke, M. 2003](#)), Erythromycin] oder Derivatisierung [Aminoglycoside ([Shaw, K.J. et al. 1993](#)), Chloramphenicol, Fosfomycin, Lincomycin],
- Abfangen des Antibiotikums durch Bindung an ein Protein [Segregation:  $\beta$ -Lactame ([Witte, W. & Mielke, M. 2003](#)), Fusidinsäure ([Bennett, A.D. & Shaw, W.V. 1983](#))],
- Bindung eines spezifischen Immunitätsproteins an das Antibiotikum [Bleomycin],
- "Metabolischer Bypass" der inhibierten Reaktion [Sulfonamide, Trimethoprim] und
- Überproduktion des Zielmoleküls des Antibiotikums ("Titration" [Sulfonamide, Trimethoprim].

Die in dem Übersichtsartikel ([Medeiros, A.A. 1997](#)) beschriebenen verschiedenen  $\beta$ -Lactamase-Typen wurden bereits bezüglich Struktur, Funktion und Mechanismus sowie Substratspezifität und Hemmbarkeit in zahlreichen darin zitierten Publikationen untersucht. Besonders interessant sind dabei die Metallo- $\beta$ -Lactamasen, die phylogenetisch weit entfernt sind von allen anderen zu den Serin-Hydrolasen gehörenden funktions- und strukturhomologen  $\beta$ -Lactamasen.

Metallo- $\beta$ -Lactamasen mit erheblicher Sequenzhomologie wurden in einer Vielzahl unterschiedlichster Bakterienarten wie z.B. *Serratia marcescens*, *Bacillus cereus*, *Bacteroides fragilis*, *Aeromonas hydrophilia* und *Xanthomonas maltophilia* gefunden ([Livermore, D.M. 1992](#)). Aus der Inaktivierung durch Komplexbildner, der Hemmung durch  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$  sowie drei Histidinresten und einem Cysteinrest, die aufgrund ihrer Anordnung in der Aminosäuresequenz auf ein  $\text{Zn}^{2+}$ -Bindemotiv hinweisen, lässt sich schließen, dass im aktiven Zentrum ein Zinkion eine bedeutende Rolle spielt. Metallo- $\beta$ -Lactamasen vermitteln Resistenz gegen ein breites Spektrum von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika und auch Carbapenemen ([Osane, E. et al. 1994](#)) und werden in den Enterobakteriazeen von Genen kodiert, die auf ei-

nem ins Chromosom integrierten konjugativen Transposon liegen. Sie sind unempfindlich gegen  $\beta$ -Lactamasehemmer wie Clavulansäure und Sulbactam, weil ihnen der durch diese Inhibitoren kovalent blockierte Serinrest im aktiven Zentrum fehlt ([Nordmann, P. et al. 1994](#)).

Besonders interessant ist die übertragbare Resistenz von Bakterien gegen das Steroidantibiotikum Fusidinsäure, die durch eine andere Resistenzdeterminante, die Chloramphenicol-Acetyltransferase Typ I (CATI), bewirkt wird: Dieses durch das plasmidübertragbare Transposon Tn9 kodierte Enzym bindet die mit seinem Substrat strukturell nicht näher verwandte Fusidinsäure mit hoher Affinität und sehr hoher Spezifität, ohne sie chemisch zu verändern. Durch diese Segregation wird die intrazelluläre Konzentration unter die Hemmschwelle gesenkt ([Bennett, A.D. & Shaw, W.V. 1983](#)).

Von zahlreichen Resistenzgenen, insbesondere wenn sie als Selektionsmarker in der Gentechnik von Interesse sind, liegen die vollständigen Sequenzdaten bereits vor (z.B. ([Trieu-Cuot, P. & Courvalin, P. 1983](#), [Beck, F. et al. 1982](#), [Oka, A. et al. 1981](#), [Burdett, V. et al. 1982](#), [Mac Laughlin, J.R. et al. 1981](#), [Jacobs, C. 1997](#), [Sutcliffe, J.G. 1979](#), [Blochlinger, K. & Diggelmann, H. 1984](#), [Gritz, L. & Davies, L. 1983](#))), zum Teil wurden von Resistenzgenen aufgrund der Gensequenzen phylogenetische Stammbäume erstellt ([Lewis, K. 1994](#)).

Darüber hinaus wurden speziell von plasmidkodierten Resistenzgenen aus Umweltproben (Belebtschlamm aus Kläranlagen) umfassende Sequenzdaten erhoben ([Dröge, M. et al. 1999](#), [Dröge, M. et al. 2000](#), [Tauch, A. et al. 2000](#), [Tauch, A. et al. 2003](#), [Tennstedt, T. et al. 2003](#), [Schlüter, A. et al. 2003](#), [Szcepanowski, R. et al. 2004](#), [Heuer, H. et al. 2004](#)), z.T. wurden sogar die vollständigen Plasmide sequenziert.

In den *Enterobacteriaceae* wurde der Erwerb von Resistenzen durch "Gen-Kassetten-Integron"-Prozesse, die vor allem die Entstehung von Mehrfachresistenzen befördern, gut charakterisiert: "Kassetten", die nichts anderes darstellen als aufgereihete offene Leserahmen von Resistenzgenen, werden bevorzugt durch Rekombination in spezifische Expressionsmodule in Plasmiden integriert, wobei "tandem arrays" (= perlenkettenartige Aufreihung von Genen in einem abgegrenzten Bereich des Plasmides) von Resistenzgenen entstehen ([Hall, R.M. 1997](#), [Ochman, H. et al. 2000](#)). Mehr als 40 solcher Kassetten und drei unterscheidbare Klassen von Integrons wurden bereits in pathogenen Bakterien identifiziert ([Recchia, G.D. & Hall, R.M. 1995](#), [Hall, R.M. 1997](#)). Die Integron/Integrase-Systeme und die dadurch entstehenden Resistenz-Inseln wurden bereits sehr intensiv untersucht, z.B. in *Vibrio cholerae* ([Mazel, D. et al. 1998](#)).

Bemerkenswert ist außerdem die Promiskuität (= extrem weiter Wirtsbereich über die Art- und Gattungsschranken hinweg ([Thomas, C.M. 1989](#))) dieser bakteriellen Resistenzplasmide, für die oft auch konjugative Transposition über Grenzen hinweg nachgewiesen wurde, die man früher als absolute Barrieren des Genaustauschs zwischen Bakterien eingeschätzt hatte ([Davies, J. 1996](#)).

#### 4.2.4 Stabilität von Resistenzgenen unter nichtselektiven Bedingungen

Zwar haben Bakterienstämme ohne Plasmid in Abwesenheit des Antibiotikums einen geringfügigen Wettbewerbsvorteil gegenüber den Bakterien, die das Plasmid gerade erst aufgenommen haben; doch adaptiert sich der genetische Hintergrund des Plasmid-Wirtes bald und

kann die zusätzliche Belastung ("costs of resistance") durch das Plasmid kompensieren. Die in dieser Weise mutierten Wirte zeigen daraufhin auch in Abwesenheit des Antibiotikums erhöhte Fitness gegenüber den Zellen, aus denen das Plasmid wieder eliminiert wurde ([Davies, J. 1996b](#), [Bouma, J.E. & Lenski, R.E. 1988](#), [Schrag, S.J. et al. 1997](#), [Schrag, S.J. & Perrot, V. 1996](#), [Levin, B.R. et al. 1997](#)), ja sogar gegenüber dem Wildtyp-Stamm vor dem Erwerb der Resistenz ([Schrag, S.J. et al. 1997](#)). In einem in ([Morell, V. 1997b](#)) berichteten Experiment war die Resistenz auch nach 10 Jahren antibiotikafreier Kultur (20.000 Generationen) noch nachweisbar, eine rpsL Streptomycinresistenz persistierte in einem *E. coli* Laborstamm über mehr als 10.000 Generationen Kultivierung in Abwesenheit des Antibiotikums ([Schrag, S.J. et al. 1997](#)).

In einem bereits im Abschnitt 2.4. zitierten Experiment wurde für einen *E. coli*-Stamm, der als Marker Resistenzgene gegen Ampicillin, Cloxicillin, Erythromycin, Kanamycin, und Tetracyclin trug, experimentell ein Überleben im Boden von 13 Jahren nachgewiesen ([Sjogren, R.E. 1995](#)). Dieser ursprünglich aus einem Oberflächengewässer mit regelmäßigem Zufluss aus einer großen Kläranlage isolierte multiresistente Bakterienstamm zeigte weder im Boden noch während zweijähriger Kultur im Labor in Abwesenheit von Antibiotika einen Verlust an Antibiotikaresistenz.

Bei der Untersuchung von wild lebenden Nagetieren, die niemals in Kontakt mit Antibiotika gekommen sein konnten, wurden in allen Fäkalproben antibiotikaresistente Enterobakterien gefunden ([Gilliver, M.A. et al. 1999](#)). Die Autoren schließen aus den Ergebnissen, dass dieses Auffinden von Resistenzen in Populationen, die niemals antibiotikaexponiert waren, für die Verbreitung der Resistenzgene auch in Abwesenheit von Selektionsdruck spricht und dass dadurch die Annahme untergraben wird, Antibiotikaresistenzen würden von alleine verschwinden, wenn nur die Antibiotikabehandlung ausgesetzt wird.

Ist ein Resistenzgen erst einmal entwickelt, ist seine weite Verbreitung schon so gut wie sicher: Zwischen 1983 und 1990 wurde in der DDR Nourseothricin als Wachstumsförderer in der Schweinemast eingesetzt. Dabei entwickelte sich in *E. coli* ein transposon gebundenes Resistenzgen, welches auch ohne Selektionsdruck durch die selten verordneten Streptothricine bereits 1990 in einem breiten Bereich menschlicher Darmbakterien, auch in *Shigella*, nachgewiesen wurde ([Khachatourians, G.G. 1998](#), [Tietze, E. et al. 1990](#)).

Die These, dass Antibiotikaresistenz übertragende Plasmide schon immer natürlich in allen Bakterienpopulationen vertreten waren und somit nicht erst durch den Antibiotikaeinsatz induziert wurden, wird durch Untersuchungen widerlegt, die in zwischen 1917 und 1954 gesammelten und hermetisch verschlossen eingelagerten Enterobakteriaeenstämmen zwar viele konjugative Plasmide finden konnten (24% "Sättigung"), doch darin enthalten kein einziges Antibiotikaresistenzgen ([Hughes, V.M. & Datta, N. 1983](#)). Auch in einer neueren Arbeit ([Tomasz, A. 2006](#)) wurden bei vor Beginn der "Antibiotika-Ära" 1945 asservierten Bakterien bisher keinerlei Antibiotikaresistenzgene gefunden.

Mathematische Modelle auf der Grundlage eingehender experimenteller Untersuchungen haben gezeigt, dass sich durch Mutationen chromosomaler Gene hervorgerufene Resistenzen nicht grundlegend von plasmidkodierten Resistenzen unterscheiden, was die metabolischen Kosten der Resistenz und ihre Kompensation durch adaptive Mutationen betrifft ([Levin, B.R. et al. 1997](#)).

Es gibt Resistenzplasmide, für die etwaige metabolische Kosten unter der Messbarkeitschwelle liegen, so dass eine Langzeitpersistenz des Plasmids in seinem Wirt auch ohne kompensatorische Mutationen zu erwarten ist ([Levin, B.R. et al. 1997](#)).

Andere Resistenzplasmide tragen Gene, die dem Wirt auch in Abwesenheit von Antibiotika einen unmittelbaren metabolischen Nutzen zu bringen scheinen, weil sie nach einer kurzen Adaptationsphase mit reduzierter kompetitiver Fitness dem Wirt eine erhöhte kompetitive Fitness gegenüber dem Wildtyp ohne Plasmid verleihen. Als eines dieser Fitness verleihenden Gene wurde das Tetracyclin-Resistenzgen aus dem Plasmid pACYC184 identifiziert ([Lenski, R.E. et al. 1994](#)).

In Laborexperimenten wurde die Entwicklung von Rifampinresistenz aufgrund Mutationen im RNA Polymerase-Gen *rpoB* in *Escherichia coli* K12 untersucht ([Reynolds, M.G. 2000](#)): Unter 28 unabhängig voneinander erzeugten Rif-Mutanten wurden Fitness-Belastungen pro Generation zwischen 0 und 28% mit einem Median von 6,4% ermittelt. Dabei korrelierte die Fitness-Belastung in keiner Weise mit dem Ausmaß der Resistenz. Nach seriellen Transferkulturen über 200 Generationen – eine Reihe in Gegenwart, eine Reihe in Abwesenheit von Rifampin – wurden Klone isoliert, die in der Fitness den Ausgangsstämmen überlegen waren. In der mit Antibiotikum evolvierten Reihe war neben der Fitness auch die Rifampinresistenz erheblich verbessert.

Kompensatorische Mutationen sind nicht nur auf *E. coli*-Stämme beschränkt: Bei pathogenen Bakterien ist, wie am Beispiel *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium experimentell gezeigt, der Erwerb einer Antibiotikaresistenz (z.B. gegen Streptomycin, Rifampicin oder Nalidixinsäure) durch Mutation chromosomaler Gene, gelegentlich mit einem Verlust der Virulenz verbunden. Doch schon nach wenigen Generationen wurde durch kompensatorische Mutationen die Virulenz ohne Einbuße der Resistenz wiederhergestellt. Die Rückmutation zum antibiotikasensitiven Geno- / Phänotyp ist dagegen ein eher seltener Vorgang ([Björkman, J. et al. 1998](#)).

Auf die großen Ähnlichkeiten, die bezüglich Mutationen oder Erwerb durch horizontalen Gentransfer, die damit verbundenen metabolischen Kosten und deren Begleichung durch kompensatorische Mutationen zwischen Virulenzfaktoren und Antibiotikaresistenzen bestehen, haben ([Martinez, J.L. & Baquero, F. 2002](#)) bereits in einem sehr ausführlichen Review-Artikel hingewiesen.

Kompensatorische Mutationen, die den selektiven Nachteil einer Isoniazidresistenz ausgleichen konnten, wurden auch von *Mycobacterium tuberculosis* und verwandten Spezies (*M. bovis* BCG und *M. smegmatis*) berichtet ([Sherman, D.R. et al. 1996](#), [Heym, B. et al. 1997](#)) ebenso für die Rifampinresistenz von *M. tuberculosis* ([Gagneux, S. et al. 2006](#)).

In *Helicobacter pylori* zeigten in vitro-Experimente bei Rifampin-Exposition eine extrem hohe Mutationsfrequenz, die zur Resistenz führte ([Björkholm, B. et al. 2001](#)). *H. pylori* scheint über einen natürlichen Mutator-Phänotyp zu verfügen, der aber nicht auf denselben Enzymdefekten beruht, wie z.B. bei Enterobakterien. Während die Rifampin-Resistenz nicht mit metabolischen Kosten verbunden zu sein scheint, zeigen in vitro erzeugte Clarithromycin-resistente *Helicobacter pylori* im Tierexperiment (Maus) eine reduzierte Fitness gegenüber dem Wildtyp. In Clarithromycin-resistenten klinischen Isolaten dieser Bakterienart war diese verringerte kompetitive Fähigkeit nicht mehr nachweisbar, was ebenfalls auf kompensatorische Mutationen schließen lässt.

In ([Schrag, S.J. et al. 1997](#)) wird aus den experimentellen Befunden die Schlussfolgerung gezogen, dass die kompensatorischen Mutationen ein "adaptives Tal" errichten, welches die evolvierten resistenten Linien vollständig daran hindert in den antibiotikasensitiven Zustand zurückzukehren.

Aufgrund der mathematischen Modellierung der Transmissionsdynamik der Kolonisierung einer menschlichen Gemeinschaft durch kommensale Bakterien unter dem Einfluss unterschiedlicher Intensitäten des Antibiotikaeinsatzes kommt ([Austin, D.J. et al. 1997](#)), selbst unter der Annahme verminderter reproduktiver Fitness der resistenten Bakterien, zu dem Schluss, dass bei verschiedenen Maßnahmen zur Bekämpfung der resistenten Keime die Abnahmerate im Regelfall viel geringer sein wird als die Entstehungsrate. Jede Anwendung des Antibiotikums wird zu einem erneuten Anstieg resistenter Kommensalen führen. "Eine Rückkehr zu den Tagen voll antibiotikaempfindlicher Pathogene und die Ausrottung der Antibiotikaresistenz ist natürlich unwahrscheinlich." Wenn auch Verminderungen der Resistenzpegel möglich sind, ist doch davon auszugehen, dass, so bald in einer kolonisierten Population Resistenzen etabliert (fixiert) sind, es sehr schwierig werden wird, zur antibiotikaempfindlichen Kolonisation zurückzukehren ([Austin, D.J. et al. 1997](#)).

Die einzige Möglichkeit, eine einmal etablierte Antibiotikaresistenz wieder aus der Welt zu schaffen, wäre eine vollständige Vernichtung aller resistenten Bakterien und der das Resistenzgen tragenden DNA.

"Die Konsequenzen für die Antibiotika-Resistenzbildung bei Mikroorganismen im Sammelablauf von Kliniken und den weiteren Eintrag in die Umwelt sind ... nicht geklärt. Aufgrund der z.T. hohen im Abwasser nachgewiesenen Konzentrationen einiger Wirkstoffe bedarf dieser Pfad weiterer Abklärung unter Einbeziehung mikrobiologischer Untersuchungstechniken." ([Färber, H. et al. 2001](#)). Trotz der bereits fortgeschrittenen weiten Verbreitung der Resistenzgene im Gen-Pool in der Natur ([Feuerpfeil, I. & Stelzer, W. 1992](#)) wird jede Verminderung des weiteren Eintrags von Antibiotikaresistenzgenen in diesen Pool für sinnvoll gehalten, ihre weitere rasende Verbreitung abzubremesen ([Heier, H. 1983](#)).

Aus dem Verlauf der Antibiotikaresistenzentwicklung in Bakterien schloss ([Palumbi, S.R. 2001](#)), dass "Menschen die größte evolutionäre Kraft auf der Welt sind" und dass es dringend geboten ist, wo irgend möglich Mechanismen zu entwickeln, welche die evolutionären Veränderungen abbremsen; damit können wir weitgehend unsere evolutionären Einwirkungen auf die Arten von Lebewesen um uns reduzieren und damit die ökonomischen und sozialen Kosten dieser Evolution senken.

### 4.3 Kreuzreaktion von Antibiotika bei der Resistenzinduktion

Vancomycin, das in Deutschland jährlich im zweistelligen Kilogramm-Maßstab in der Humantherapie eingesetzt wird, und Avoparcin, welches bis zum Verbot 1999 in der tausendfachen Menge als Futterzusatzstoff in der Tierhaltung eingesetzt wurde, sind strukturell eng verwandt, sie verfügen über das gleiche Peptidgerüst. Vancomycinresistente Enterokokken findet man heute weitverbreitet in Tieren und Menschen (Pidcock, L.J.V. 1996, [Leclercq, R. et al. 1988](#)) und ihre Herkunft aus einer Avoparcin-Selektion ist mehr als wahrscheinlich ([Davies, J. 1996](#), [Klare, I. et al. 1995b](#), [Khachatourians, G.G. 1998](#)).

Ähnlich verhält es sich mit den Fluorochinolonen (Fluoroquinolonen), die in der Humantherapie als Breitspektrum-Antibiotika große Bedeutung besitzen, während gleichzeitig Chinolantonantibiotika als Prophylaktikum gegen bakterielle Infektionen in der Geflügelhaltung (Smith, K.E. et al. 1999, [Pidcock, L.J.V. 1995](#)), in Fischzucht-Betrieben und als Wachstumsförderer in der Viehzucht eingesetzt werden ([Davies, J. 1996](#)) und mit den Streptograminen, die bei Multiresistenz Gram-positiver Erreger das Mittel der letzten Wahl bilden, deren Kreuzreaktion erzeugender Vertreter Virginiamycin ebenfalls als Leistungsförderer eingesetzt wird/wurde ([Trolldenier, H. 1998](#)). Die Verwendung von Antibiotika in der Geflügelhaltung hat zur Vermehrung der Infektionen der Menschen mit fluorochinolon-resistenten *Campylobacter jejuni* (Smith, K.E. et al. 1999, [Pidcock, L.J.V. 1995](#)) und *Salmonella* sp. ([Pidcock, L.J.V. 1996](#)) geführt.

Bereits ein Jahr nach Beginn des Einsatzes als Wachstumsförderer in der Viehzucht konnten 1984 zahlreiche unterschiedliche Plasmide mit breitem Wirtsspektrum, die Resistenzgene (Acetyltransferase) gegen Streptothricin trugen, in *E. coli* und anderen Gram-negativen Bakterien identifiziert werden ([Tschäpe, H. et al. 1984](#), [Tietze, E. et al. 1990](#)).

Wie breit die Kreuzreaktion von Resistenzgenen ist, hängt weitgehend von der Art des Antibiotikums ab und ebenso von der Bakterienspezies, in der die Resistenz entwickelt wurde: Während die in den Gram-positiven Staphylokokken gebildeten  $\beta$ -Lactamasen eher ein breites Substratspektrum besitzen, gibt es bei den in *Pseudomonas*-Spezies (wie auch in anderen Gram-negativen Keimen) entstandenen Resistenzen gegen Aminoglycosid-Antibiotika eine Vielzahl von Resistenzmechanismen mit unterschiedlichem engeren Substratspektrum ([Witte, W. et al. 2004](#)).

### 4.4 Kombination von Antibiotikaresistenzen mit anderen bedeutenden Funktionen

Bei Tn21-verwandten Transposons trägt das Integron häufig neben anderen Antibiotikaresistenzgenen ein Sulfonamid-Resistenzgen, dessen Transkription unmittelbar mit einem Resistenzgen gegen quaternäre Ammoniumverbindungen (Desinfektionsmittel) gekoppelt ist. Bakterien, die dieses Integron tragen und Sulfonamid-resistent sind, sind also stets gleichzeitig resistent gegen eine bedeutende Gruppe von Desinfektionsmitteln ([Davies, J. 1994](#)).

Insbesondere in dem in Haushalten immer häufiger beobachteten Einsatz von Desinfektionsmitteln wird eine erhebliche Gefahr der Entstehung von gleichzeitig antibiotika- und desinfektionsmittelresistenten Keimen gesehen ([Levy, S.B. 1998](#)).

## 4.5 Antibiotikakonzentrationen, die von resistenten Stämmen toleriert werden

"Biofilm-" *Pseudomonas aeruginosa* wachsen in Gegenwart von: Kanamycin 200 µg/ml; Amikacin 30 µg/ml; Carbenicillin 300 µg/ml; Gentamicin 30 µg/ml; Tobramycin 10 µg/ml; oder Tetracyclin 150 µg/ml. ([Drenkard, E. & Ausubel, F.M. 2002](#))

Bei *Neisseria meningitidis* mit verringerter Empfindlichkeit gegen Benzylpenicillin ist die MHK >0,16 bis 1,25 mg/l ([Witte, W. & Klare, I. 1999](#)).

Bestimmte Serotypen von *Streptococcus pneumoniae* (19A, 14, 23F) haben hochgradige Resistenz gegen Penicilline entwickelt mit einer MHK von  $\geq 10$  mg/l ([Witte, W. 1999](#)).

Bei *Salmonella typhimurium* Stamm DT 104 mit verringerter Empfindlichkeit gegen Fluorchinolone liegen die MHK mit 0,125 bis 0,25 mg/l noch im empfindlichen Bereich der Laboratoriumsstandards; doch wurde gegenüber solchen Stämmen bereits therapeutisches Versagen dieser Gyrasehemmer berichtet ([Witte, W. & Klare, I. 1999](#)).

Fluorchinolonsensitive *Campylobacter jejuni* und *C. coli*, auch solche die bereits resistent gegen Nalidixinsäure sind, haben eine MHK für Ciprofloxacin von ~0,5 mg/l. Fluorchinolonresistente *Campylobacter* spp. überschreiten die empfohlene "breakpoint"-Konzentration von 1-4 mg/l mit einer MHK von >32 mg/l, z.T. bis zu 64 mg/l. Bei Resistenz von *Campylobacter* spp. gegen Erythromycin ist die MHK  $\geq 32$  mg/l. ([Pidcock, L.J.V. 1995](#))

Für *Enterococcus*-Isolate (überwiegend *E. faecium*) wurden die MHK-"breakpoints" mehrerer Antibiotika gegenüber sensitiven und resistenten Stämmen ermittelt ([Klare, I. et al. 1995a](#)).

**Tabelle 12:** MHK-"breakpoints" mehrerer Antibiotika in µg/ml gegenüber sensitiven und resistenten Stämmen von *Enterococcus* sp.

Antibiotika:	sensitiv (µg/ml)	resistent (µg/ml)	hochgradig resistent (µg/ml)
Ampicillin	$\leq 2$	$\geq 16$	
Ampicillin + Sulbactam	$\leq 2$	$\geq 16$	
Chloramphenicol	$\leq 8$	$\geq 16$	
Ciprofloxacin	$\leq 0,25$	$\geq 2$	
Erythromycin	$\leq 1$	$\geq 8$	
Fusidinsäure	$\leq 2$	$\geq 4$	
Gentamicin	$\leq 1$	$\geq 8$	$\geq 1000$
Glycopeptide	$\leq 4$	$\geq 16$	
Mupirocin	$\leq 2$	$\geq 32$	
Penicillin G	$\leq 0,125$	$\geq 2$	
Rifampicin	$\leq 0,5$	$\geq 1$	
Streptomycin	$\leq 8$	$\geq 32$	$\geq 2000$
Tetracyclin	$\leq 1$	$\geq 8$	
Trimethoprim / Sulfamerazin 1:20	$\leq 4$	$\geq 32$	



In (Witte, W. 1999) werden die Resistenzen verschiedener klinischer Isolate von *Enterococcus* spp. mit Resistenz gegen Vancomycin und Teicoplanin nach den verschiedenen Resistenz-Genotypen aufgeschlüsselt.

**Tabelle 13:** Resistenzen von *Enterococcus* spp. gegen Vancomycin und Teicoplanin

Resistenz-Phänotyp	Resistenz-Genotyp					
	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>vanC-1</i>	<i>vanC-2</i>	<i>vanC-3</i>	<i>vanD</i>
MHC Vancomycin (mg/l)	32-1024	16-1024	2-32	2-32	2-32	64
MHC Teicoplanin (mg/l)	16-512	0,5-1	0,5-1	0,5-1	0,5-1	4
Konjugativer Transfer	ja	teils	nein	nein	nein	nein

Multidrogenresistente *Enterobacter aerogenes*-Isolate aus einem Krankenhausausbuch, für die ein klonaler Ursprung nachgewiesen wurde, entwickelten während der Untersuchung eine Resistenz gegen Imipenem mit einer MHK von 32 µg/ml (De Gheldre, Y. et al. 1997).

#### 4.6 Die für die Humantherapie bedeutendsten antibiotikaresistenten Bakterien

Antibiotikaresistente Bakterien entstehen vermehrt in solchen Bereichen, in denen Antibiotika verstärkt eingesetzt werden, wie in Krankenhäusern. Dort kommt es auch zur Bildung von mehrfach resistenten Bakterien, das heißt Bakterien, die gegenüber mehreren Antibiotika gleichzeitig resistent sind (UBA 1997). Aus diesem Grund ist die Beobachtung und Kontrolle des Resistenzstatus der medizinisch relevanten Bakterienspezies ein wichtiges Anliegen nationaler und internationaler Gesundheitsbehörden.

**Tabelle 14:** Besonders kritische Antibiotikaresistenzen in klinisch bedeutenden Bakterien-spezies nach einer Listung der WHO (Davies, J. 1996b, Trolldenier, H. 1998)

Bakteriengattung/-art	Resistenz gegen die Antibiotika:
<i>Enterobacteriaceae</i>	Aminoglycoside, β-Lactame, Trimethoprim, Vancomycin, Chloramphenicol
<i>Haemophilus influenzae</i>	β-Lactame (Ampicillin), Tetracycline, Chloramphenicol, Trimethoprim + Sulfonamide
<i>Mycobacterium</i> spp.	Aminoglycoside, Isoniazid, Ethambutol, Pyrazinamid, Rifampicin
<i>Neisseria gonorrhoe</i>	β-Lactame (Penicilline), Spectinomycin, Tetracycline
<i>Shigella dysenteriae</i>	Ampicillin, Chloramphenicol, Trimethoprim + Sulfonamide, Tetracycline
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aminoglycoside, β-Lactame, Tetracycline, Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Sulfonamide
<i>Staphylococcus aureus</i>	Chloramphenicol, Rifampicin, Ciprofloxacin, Clindamycin, Erythromycin, β-Lactame (Methicillin), Tetracycline, Trimethoprim
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Chloramphenicol, Penicilline, Erythromycin
<i>Bacteroides</i> spp.	Penicilline, Clindamycin
<i>Enterococcus</i> spp.	Penicilline, Aminoglycoside, Vancomycin, Erythromycin, Tetracycline

Hierzu wurde bei einem Workshop der WHO im Februar 2004 in Wernigerode ([WHO 2005](#)) auf die große Bedeutung der Antibiotikaresistenzen bei Bakterien für die Gesundheit des Menschen weltweit hingewiesen und eine Verbesserung und Weiterentwicklung der diagnostischen (analytischen) Verfahren gefordert.

Nach ([Kresken, M. et al. 1999](#)) ergab eine von 1984 bis 1995 durchgeführte Studie zu Antibiotikaresistenzen in Krankenhausinfektionen, dass bei *Escherichia coli* seit 1984 die Resistenz gegenüber Ampicillin, Cotrimoxazol (= Kombinationspräparat aus Sulfamethoxazol und Trimethoprim) und Gentamicin zunimmt, bei *Pseudomonas aeruginosa* die Resistenz gegenüber Imipenem. Unabhängig von der Spezies nahm die Resistenz gegenüber Fluorochinolonen zu.

In einer in 1990 durchgeführten Studie, deren Ergebnisse in ([Kresken, M. 1995](#)) veröffentlicht wurden, wurde das Resistenzverhalten einer Vielzahl von Spezies (*E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella* spp., *Citrobacter freundii*, *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, Koagulasenegative Staphylokokken, *Enterococcus faecalis*) gegen die wichtigsten in der Humantherapie eingesetzten Antibiotika (Amikacin, Amoxicillin, Ampicillin, Cefazolin, Cefotaxim, Cefoxitin, Ceftazidim, Cefuroxim, Ciprofloxacin, Clindamycin, Cotrimoxazol, Doxycyclin, Erythromycin, Fusidinsäure, Gentamicin, Imipenem, Netilmicin, Penicillin G, Piperacillin, Piperacillin/Tazobactam, Tobramycin) in neun europäischen Ländern untersucht und, auch aufgeschlüsselt nach den Ländern, quantifiziert. In gesonderten Tabellen wurde auch bei Krankenhausisolaten differenziert nach Intensivstation, Allgemeinstation und Ambulanz.

Für die in Deutschland (noch differenziert nach "Deutschland Ost" und "Deutschland West") erfassten Bakterienarten wurden von ([Kresken, M. 1995](#)) folgende Prävalenzen angegeben.

**Tabelle 15:** In Deutschland erfasste Prävalenzen der Antibiotikaresistenzen für verschiedene Bakterienarten

Bakterienart	Antibiotika mit der höchsten Prävalenz der Resistenzen:
<i>Escherichia coli</i>	Ampicillin (16,7 – 28,9%), Doxycyclin (15,8 – 21,4%), Cotrimoxazol (10,8 – 18,6%), Piperacillin (8,5 – 9,2%), Gentamicin (2,2 – 5,0%), Tobramycin (1,8 – 4,2%)
<i>Proteus mirabilis</i>	Doxycyclin (54,5 – 85,4%), Ampicillin (17,2 – 21,2%), Cotrimoxazol (11,9 – 12,1%), Piperacillin (4,6 – 15,2%), Cefazolin (5,3 – 9,1%), Gentamicin (4,0 – 6,1%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	Cefoxitin (83,3 – 86%), Cefazolin (72,2 – 76,5%), Amoxicillin (33,3 – 61,8%), Ampicillin (33,3 – 57,4%), Cefuroxim (22,2 – 46,3%), Cefotaxim (5,6 – 19,1%), Ceftazidim (5,6 – 18,4%), Piperacillin (5,6 – 11,0%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ampicillin (40,6 – 70,2%), Piperacillin (5,9 – 28,1%), Doxycyclin (9,4 – 17,5%), Cotrimoxazol (8,2 – 8,8%), Cefazolin (2,9 – 15,8%), Gentamicin (1,8 – 15,8%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gentamicin (7,1%), Ciprofloxacin (6,6%), Tobramycin (5,0%), Netilmicin (4,5%), Piperacillin (2,8%), Imipenem (2,6%), Amikacin (1,4%)

Bakterienart	Antibiotika mit der höchsten Prävalenz der Resistenzen:
<i>Staphylococcus aureus</i>	Penicillin G (86,8 – 80,7%), Erythromycin (1,7 – 9,1%), Gentamicin (5,9 – 8,2%), Tobramycin (6,7 – 7,6%), Ciprofloxacin (5,4%), Clindamycin (1,7 – 3,6%), Oxacillin (1,6%)
<i>Koagulase-negative Staphylokokken</i>	Penicillin G (53,3 – 67,2%), Tobramycin (18,7 – 39,3%), Cotrimoxazol (30,7 – 35,0%), Erythromycin (9,3 – 32,5%), Gentamicin (12,0 – 31,9%), Ciprofloxacin (2,7 – 25,1%), Clindamycin (5,3 – 20,6%), Doxycyclin (12,0 – 15,8%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Doxycyclin (19,7 – 43,2%), Erythromycin (9,8 – 24,6%), Cotrimoxazol (10,4 – 13,1%), Ciprofloxacin (8,2 – 9,2%)

Von den Oxacillin-resistenten Stämmen von *Staphylococcus aureus* (= MRSA) waren alle mehrfach resistent; und zwar waren gemäß ([Kresken, M. 1995](#))

- alle (100%) resistent gegen Tobramycin,
- 90% gegen Gentamicin,
- jeweils 80% gegen Clindamycin und Erythromycin,
- 70% gegen Ciprofloxacin,
- 50% gegen Amikacin,
- jeweils 40% gegen Doxycyclin und Fusidinsäure,
- jeweils 20% gegen Netilmicin und Rifampicin und
- jeweils 10% gegen Cotrimoxazol und Teicoplanin.

Bereits in 1995 wurden in Deutschland folgende Resistenzraten festgestellt:

Für *Escherichia coli* bei Ampicillin 35,8%, Doxycyclin 33,7%, Cotrimoxazol 22,7%, Amoxicillin/Clavulansäure 16,3% und Piperacillin 15,7%; für *Klebsiella pneumoniae* und *K. oxytoca* (die eine natürliche Resistenz gegenüber Aminopenicillinen besitzen) bei Gentamicin 4,6%, Cotrimoxazol 10,3% und Doxycyclin 16,5% (gering dagegen bei Cefotaxim 1,0%, Imipenem 2,1% und Ciprofloxacin 3,6%); für *Pseudomonas aeruginosa* bei Imipenem 12,7% und Ciprofloxacin 11,9%; für *Staphylococcus aureus* bei Oxacillin 12,9% und für Koagulase-negative Streptokokken bei Oxacillin 55,9%; für *Enterococcus faecalis* bei Vancomycin und Teicoplanin 3,8% und für *Enterococcus faecium* bei Ampicillin 48,7%, Imipenem 73,6% und Ciprofloxacin 73,1%. ([Kresken, M. et al. 1999](#))

Stellt man die in den Jahren 1990 (in Westdeutschland) und 1995 (in Gesamtdeutschland) festgestellten Prävalenzen der Antibiotikaresistenzen verschiedener Bakterienarten gegenüber, wird eine beängstigende Zunahme deutlich.

**Tabelle 16:** Zunahme der Prävalenzen von Antibiotikaresistenzen verschiedener Bakterienarten in Deutschland zwischen 1990 und 1995

Bakterienart	Prävalenz der Resistenzen gegen Antibiotika:	
	in 1990 (Kresken, M. 1995)	in 1995 (Kresken, M. et al. 1999)
<i>Escherichia coli</i>	Ampicillin 16,7 – 28,9%,	Ampicillin 35,8%,
	Doxycyclin 15,8 – 21,4%,	Doxycyclin 33,7%,
	Cotrimoxazol 10,8 – 18,6%,	Cotrimoxazol 22,7%,
	Piperacillin 8,5 – 9,2%,	Piperacillin 15,7%,
	Amoxicillin/Clavulansäure 2,3%	Amoxicillin/Clavulansäure 16,3%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gentamicin 1,8%,	Gentamicin 4,6%,
	Cotrimoxazol 8,2 – 8,8%,	Cotrimoxazol 10,3%,
	Doxycyclin 9,4%	Doxycyclin 16,5%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Imipenem 2,6%,	Imipenem 12,7%,
	Ciprofloxacin 6,6%,	Ciprofloxacin 11,9%
<i>Staphylococcus aureus</i>	Oxacillin 1,6%	Oxacillin 12,9%
<i>Koagulase-negative Staphylokokken</i>	Oxacillin 13,6%	Oxacillin 55,9%
<i>Enterococcus faecalis</i>	Vancomycin 1,6%,	Vancomycin 3,8%,
	Teicoplanin 0,3 – 1,6%	Teicoplanin 3,8%

Vergleichbare Zunahmen wurden von ([Doern, G.V. et al. 2001](#)) beim Vergleich der Resistenzmuster von *Streptococcus pneumoniae* in drei Sammelkampagnen in den USA, 1994-1995, 1997-1998 und 1999-2000 gefunden:

**Tabelle 17:** Prävalenz der Resistenzen von *Streptococcus pneumoniae* gegen Antibiotika

Antibiotikum bzw. Resistenz	1994-1995	1997-1998	1999-2000
Penicilline	23,6%	29,5%	34,2%
Erythromycin	10,3%	19,2%	26,2%
Clindamycin	- - -	5,7%	19,2%
Tetracycline	7,6%	13,2%	16,6%
Trimethoprim-Sulfamethoxazol	26,8%	31,0%	35,9%
Chloramphenicol	4,3%	7,2%	8,3%
Ciprofloxacin	1,2%	1,6%	1,4%
Multiresistenz	9,1%	16,0%	22,4%

Unter den Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Isolaten (MRSA) werden seit 1997 zunehmend auch solche mit verminderter Empfindlichkeit gegen Glycopeptide (sog. Vancomycin-intermediäre *S. aureus*, VISA) und seit 2002 solche mit übertragbarer Vancomycin-Resistenz (vanA-Stämme) aufgefunden. ([Tomasz, A. 2006](#)).

Glycopeptidresistente Enterokokken (= GRE = VRE = Vancomycin-resistente Enterokokken), z.B. *Enterococcus faecium* (Leclercq, R. et al. (1988) (GREF oder VREF), sind bereits zu ca. 60% resistent gegen die bisher wirksame synergistische Antibiotikakombination Penicillin (z.B. Ampicillin) und Aminoglycosid (z.B. Gentamicin oder Streptomycin).

Wahrscheinlich als Konsequenz aus dem Einsatz des Streptograminantibiotikums Virginiamycin als Leistungsförderer in der Tiermast seit 1974 ist auch eine Zunahme der Resistenz

gegen Streptograminantibiotika in Enterokokken zu beobachten. Bisher konnten Streptograminantibiotika bei Infektionen mit glycopeptidresistenten Enterokokken (*Enterococcus faecium* und verwandte Spezies aber nicht *Enterococcus faecalis*, der dagegen natürlich resistent ist) lebensrettend sein ([Leclercq, R. et al. 1988](#)).

Auch das verstärkte Auftreten seit den 1980er Jahren mehrfachresistenter *Salmonella* spp. bei menschlichen Infektionen wird auf die breite Verwendung von Antibiotika in Tierhaltung und Tiermast zurückgeführt ([DuPont, H.L. & Steele, J.H. 1987](#), [Khachatourians, G.G. 1998](#)).

Nach ([Galimand, M. et al. 1998](#)) werden seit 1998 *Neisseria meningitidis*-Stämme mit Resistenz gegen Chloramphenicol isoliert.

Gegen Aminoglycosid-Antibiotika, einschließlich Amikacin, gibt es in *Acinetobacter* spp. mehrere Resistenz vermittelnde Enzyme (verschiedene O-Phosphotransferasen, O-Nucleotidyltransferasen und N-Acetyltransferasen), von denen jedes ein breites Substratspektrum besitzt (hohe Kreuzresistenzrate) und die häufig in Kombination auftreten. Da die DNA-Sequenzen der Resistenzgene bekannt sind, konnte festgestellt werden, dass die meistens Plasmid- oder Transposon-lokalisierten Aminoglycosid-Resistenzgene zwar häufig – überwiegend konjugativ – innerhalb der Gattung *Acinetobacter* übertragen werden, bisher aber nicht auf andere Spezies, z.B. *Escherichia coli* ([Towner, K.J. 1997](#)).

Die Resistenz gegen die als Gyrasehemmer wirkenden Chinolon- (Quinolon-)Antibiotika, z.B. Ciprofloxacin und Nalidixinsäure, wurde bereits in einem breiten Spektrum klinisch relevanter Bakterienarten beobachtet, z.B. in *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. und *Escherichia coli*, die höchste Prävalenz wurde aber bereits in 1991 in *Serratia* spp., *Acinetobacter* spp. und ganz besonders in Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* mit jeweils über 70% beobachtet ([Acar, J.F. et al. 1993](#)).

Chinolonresistenz wird in *Acinetobacter* und *Escherichia coli* überwiegend durch Punktmutationen in den Gyrasegenen hervorgerufen, die zu Aminosäureaustauschen in den Gyrasen, den Zielmolekülen der Antibiotika führen und zwar in der Nähe des Tyrosins im aktiven Zentrum: z.B. Ser83Leu und Ala84Pro in GyrA (konservierte Region in den ca. 82% identischen GyrA-Aminosäuresequenzen von *A. baumannii* und *E. coli*; weitere *E. coli* spezifische Mutationen betreffen die Aminosäuren Gly-81 und Gln-106) sowie Ser80Leu und Glu84Lys in ParC (ca. 89% identische Aminosäuresequenzen der ParC-Topoisomerasen von *A. baumannii* und *E. coli*) ([Towner, K.J. 1997](#)).

Während die Mutationen in den Genen der Gyraseuntereinheiten *gyrA* und *gyrB* den bedeutendsten Beitrag zur Chinolonresistenz in *E. coli* leisten ([Nakamura, S. et al. 1989](#), [Ouabdesselam, S. et al. 1995](#), [Vila, J. et al. 1994](#)), ([Yoshida, H. et al. 1991](#), [Yamagishi, J. et al. 1986](#)), sind die Mutationen in dem Topoisomerase IV- Gen *parC* ([Vila, J. et al. 1996](#), [Heisig, P. 1996](#)) nur von sekundärer Bedeutung. Die Hemmung der Topoisomerase IV durch Chinolonantibiotika wird nur in Resistenzmutanten der Gyrase erkennbar durch ein langsames Nachlassen der Replikation, das nicht zum Zelltod, sondern nur zur Bakteriostase führt ([Khodursky, A.B. et al. 1995](#)).

Auch in *Staphylococcus aureus* wurden Mutationen in der GrlA-Untereinheit der DNA-Topoisomerase IV (Ser83Phe/Tyr) als kausal für die Fluorochinolonresistenz identifiziert. Mutationen in der entsprechenden Gyraseuntereinheit GyrA spielten hier aber keine Rolle ([Ferrero, L. et al. 1994](#)).

Obwohl die in *Pseudomonas aeruginosa* vorhandene Resistenz gegen Fluorochinolone hauptsächlich zurückzuführen ist auf die intrinsische Resistenz (auch gegen Tetracycline und Chloramphenicol), bedingt durch eine sehr geringe unspezifische Permeabilität für kleine hydrophile Moleküle in Verbindung mit einer starken Efflux-Pumpe (aktives Efflux-System, kodiert vom mexAB-oprM Operon), wurden in diesem Organismus auch entsprechende Mutationen in der GyrA-Sequenz (83% identisch mit der aus *E. coli*) und in der als GrlA bezeichneten DNA-Topoisomerase identifiziert, die die Mehrzahl der resistenzbedingenden Mutationen trägt ([Towner, K.J. 1997](#)).

Infektionen mit *Campylobacter jejuni* und *C. coli* sind zwei der häufigsten Ursachen von Durchfallerkrankungen des Menschen. Normalerweise ist eine durch *Campylobacter* spp. hervorgerufene Diarrhoe selbstlimitierend und bedarf, sofern der betroffene Patient nicht immunsupprimiert ist und sich die Infektion auf den Darm beschränkt, keiner Antibiotikatherapie. Doch nachdem sich in in vitro-Versuchen gezeigt hatte, dass die 1988 in die Humantherapie eingeführten Fluorchinolone eine exzellente Wirksamkeit (Ciprofloxacin: MHK ~0,5 mg/l) gegen *Campylobacter* (auch solche die bereits resistent gegen Nalidixinsäure sind) haben, wurden sie zunehmend für die Therapie der durch diese Bakterien hervorgerufenen Enteritis eingesetzt. Bereits 1990 waren 11% der klinischen Isolate resistent gegen Fluorchinolone, d.h. sie überschritten die empfohlene "breakpoint"-Konzentration von 1-4 mg/l mit einer MHK von >32 mg/l. Die Resistenz beruht einheitlich auf einer Mutation in der GyrA-Sequenz, die das Threonin an Position 86 der A-Untereinheit der DNA-Gyrase austauscht. Auch die Kombination von Ciprofloxacin mit Erythromycin ist keine unfehlbare Waffe gegen *Campylobacter* spp., weil bereits 1993 ca. 4% aller klinischen Isolate resistent gegen Erythromycin (MHK  $\geq 32$  mg/l) waren und von den chinolon-resistenten Isolaten waren bereits ca. 6 % erythromycinresistent. ([Pidcock, L.J.V. 1995](#))

Mehrfachresistenzen nehmen zu bei Isolaten aus Krankenhausinfektionen mit *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii* ([Witte, W. & Klare, I. 1999](#)). Besonders von *A. baumannii* wurden inzwischen Stämme isoliert, die gegen alle Antibiotika mit Ausnahme von Imipenem resistent sind. Ampicillin und Cephalosporine der 1. und 2. Generation sind gegen *Acinetobacter* spp. fast völlig unwirksam geworden ([Towner, K.J. 1997](#)). Doch Antibiotikaresistenz wirkt quasi autokatalytisch: Je mehr resistente Keime existieren, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass neue entstehen. Nach verstärktem Einsatz von Imipenem gegen Cephalosporin-resistente Klebsiellen traten in einem Krankenhaus schwere Infektionen mit einem Imipenem-resistenten *A. baumannii* -stamm auf ([Go, E.S. et. al. 1994](#)).

Nur in Kombination mit dem  $\beta$ -Lactamase-Inhibitor Sulbactam, der allerdings gegen *Acinetobacter* auch allein bakterizide Aktivität besitzt, ist Ampicillin noch gut wirksam ([Towner, K.J. 1997](#)).

Zahlreiche verschiedene Plasmid- und chromosomalkodierte  $\beta$ -Lactamasen aus *Acinetobacter* spp. wurden bereits bezüglich ihrer Struktur, ihrer Substratspezifität und ihrer Hemmbarkeit durch  $\beta$ -Lactamasehemmer (z.B. Clavulansäure, BRL42715) eingehend charakterisiert ([Towner, K.J. 1997](#)).

Für die Zukunft ist gemäß ([Witte, W. & Klare, I. 1999](#)) wegen ihrer schwerwiegenden Folgen für die Therapierbarkeit die weitere Entwicklung der Glycopeptidresistenz bei Staphylokokken, die Verbreitung der Carbapenemase bei Gram-negativen Bakterien und die Resistenz

gegen neue Chinolone (Gyrasehemmer) bei *Streptococcus pneumoniae* aufmerksam zu beobachten.

Nach § 23 Abs. 1 Infektionsschutzgesetz soll jedes Krankenhaus eine abteilungsspezifische Erreger- und Resistenzstatistik führen ([Witte, W. & Klare, I. 1999](#)). Die vom RKI aufgrund § 4 Abs. 2 Nr. 2 Buchst. b Infektionsschutzgesetz zu erstellende Liste ließe sich als weitere Quelle für die Benennung untersuchungswürdiger Bakterium/Resistenz-Kombinationen nutzen.

## **4.7 Nachweis von antibiotikaresistenten Bakterien in Abwasser und Kläranlagen**

### **4.7.1 Verfahren zum Nachweis von Antibiotikaresistenzen**

Eine sehr ausführliche Beschreibung der klassischen Verfahren zur Isolierung antibiotikaresistenter coliformer Bakterien aus (Klinik-)Abwässern und Oberflächenwässern wurde 1984 veröffentlicht ([Heier, H. & Tschäpe, H. 1984](#)) und zeigte den Zusammenhang zwischen in Kliniken verwendeten Antibiotika und Prävalenz (prozentueller Anteil der Wasserproben an einer Entnahmestelle, aus denen antibiotikaresistente Bakterien isoliert wurden) und Resistenzquotient (Anteil der antibiotikaresistenten Bakterien an der Gesamtpopulation) der antibiotikaresistenten Bakterien im Abwasser: Im Abwasser eines Fachkrankenhauses für Lungenerkrankungen, in dem für die Tuberkulosetherapie überwiegend Tetracycline genutzt wurden, herrschten einfachresistente Keime vor, im Abwasser einer urologischen Klinik, in der mehrere verschiedene Antibiotika eingesetzt wurden, dominierten mehrfachresistente Keime.

In einem neueren Übersichtsartikel aus 2004 findet sich ein Überblick über die Methoden der Resistenzbestimmung in Krankenhausproben, die sich prinzipiell nicht grundlegend von denen der Resistenzbestimmung in Umweltproben unterscheiden.

Als phänotypische Verfahren werden von ([Witte, W. et al. 2004](#)) genannt:

- Der Agardiffusionstest nach DIN 58940,
- der Mikroboullionverdünnungstest (Referenzmethode zur MHK-Ermittlung) und
- der E-Test (Diffusionstest unter Verwendung von MHK-Teststreifen).

Die phänotypischen Verfahren können sehr stark durch äußere Einflüsse wie Temperatur, pH-Wert, Konzentrationen von Salzen, verwendete Nährmedien und/oder Einstellung des Inokulums beeinträchtigt werden.

Nach ([Witte, W. & Klare, I. 1999](#)) spiegeln die invitro-Resistenzbestimmungen die invivo-Verhältnisse nur unzureichend wider, sind aber in unterschiedlichem Ausmaß aussagekräftig für eine Bewertung:

Dilutionsmethoden sind weitgehend reproduzierbar und ihre Ergebnisse sind international vergleichbar.

Der Agardiffusionstest ist weit weniger zuverlässig; bei einigen Substanzgruppen (z.B. Glykopeptide) ist er überhaupt ungeeignet.

Zusätzlich müssen gemäß ([Witte, W. et al. 2004](#)) für einige Spezies/Resistenz-Kombinationen zusätzliche Bestätigungsverfahren angewendet werden:

- Nachweis der Oxacillinresistenz bei MRSA (Methicillin-resistenten *S. aureus*),
- Nachweis der intermediären Glycopeptidempfindlichkeit bei *S. aureus* (GISA),
- Nachweis der Glycopeptidresistenz bei Enterokokken und
- Nachweis der ESBL-Eigenschaft (= Erweiterte-Spektrum- $\beta$ -Lactamasen) bei *Enterobacteriaceae*-Isolaten mit erhöhter MHK für Cephalosporine.

Demgegenüber schneller, teils sogar aussagekräftiger und sicherer im Nachweis sind die genotypischen Verfahren der Resistenzbestimmung, die zwar in der Forschung schon etabliert sind, im klinischen Alltag aber noch nicht zur Routine gehören. Sie werden gezielt dann eingesetzt, wenn die phänotypische Klassifizierung nicht hinreichend aussagekräftig ist; z.B. sind bereits für MRSA, für ESBL und für Glycopeptidresistenz in Enterokokken standardisierte Testkits mit PCR-Primern und Makroarrays für die Detektion im Handel ([Witte, W. et al. 2004](#)).

Für eine eindeutige Klassifizierung von MRSA-Stämmen empfehlen (Aires de Sousa, M. & de Lencastre, H. 2004) eine Kombination von verschiedenen Typisierungsmethoden, nämlich PFGE, Multilocus-Sequenztypisierung und *SCC<sub>mec</sub>* Typisierung.

Von ganz besonderer Bedeutung ist der genotypische Resistenznachweis dann, wenn bei einer Bakterienspezies für ein und dasselbe Antibiotikum mehrere unterschiedliche Resistenzmechanismen vorhanden sind. Ein anschauliches Beispiel dafür sind die Resistenzen gegen Chinolonantibiotika in *Escherichia coli*: Hier wurden einerseits verschiedene Mutationen an den Wirkorten festgestellt, in einer der zwei Untereinheiten der Gyrase, GyrA und GyrB, oder an beiden ([Nakamura, S. et al. 1989](#), [Ouabdesselam, S. et al. 1995](#), [Vila, J. et al. 1994](#), [Yoshida, H. et al. 1991](#), [Yamagishi, J. et al. 1986](#)) oder im Gen *parC*, das für die Topoisomerase IV kodiert ([Vila, J. et al. 1996](#), [Heisig, P. 1996](#), [Khodursky, A.B. et al. 1995](#)), andererseits Mutationen, die zur Senkung der intrazellulären Konzentration des Antibiotikums beitragen, wie die Inaktivierung des für den Einstrom verantwortlichen OmpF-Porins in der äußeren Membran ([Hooper, D.C. et al. 1992](#)), die Veränderung der Lipopolysaccharidstruktur der äußeren Membran (NorC-Mutation, *nalB*, *nalC*) ([Hirai, H. et al. 1986a](#), [Hirai, H. et al. 1986b](#)) auch in Kombination mit einem energieabhängigen, sättigbaren Effluxsystem in der inneren Membran (*MarA*) ([Cohen, S.P. et al. 1988](#), [Hooper, D.C. et al. 1989](#)). Die Unterscheidung der Wirkmechanismen, die der Antibiotikaresistenz zugrunde liegen, ist von Bedeutung, weil die erste Gruppe chinolonspezifisch ist, während die zweite Gruppe pleiotrop ist, also auch Resistenzen gegen andere Antibiotika, z.B. Tetracycline, Chloramphenicol und einige  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, bedingt ([Hooper, D.C. et al. 1992](#), [Cohen, S.P. et al. 1989](#)).

Ein weiteres Beispiel sind die Resistenzen gegen Chloramphenicol, die entweder durch chemische Modifikation des Wirkstoffs oder durch Export bewirkt werden können: Für die chemische Modifikation kommen zwei unterschiedliche Typen von Chloramphenicol-Acetyltransferasen (CATs) in Frage, für den Export entweder Chloramphenicol-spezifische Exporter oder unspezifische "Multidrug-Transporter" ([Schwarz, S. et al. 2004](#)).

Allen genotypischen Verfahren ist gemeinsam, dass hier spezifische, für eine Resistenzeigenschaft ursächliche DNA-Sequenzen mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden und das Amplifikationsprodukt während der Amplifikation (im "Real-



Time-PCR"-Verfahren oder danach durch Hybridisierung mit DNA-Sonden im "Southern-Blot-Verfahren" oder an einem DNA-Chip (Makroarray-Verfahren) quantifiziert wird. In einem Testansatz können, bei entsprechender Wahl der PCR-Primer, entweder ein einziges Resistenzgen oder mehrere gleichzeitig (Multiplex-Verfahren) detektiert werden.

Mit einem "Real-Time-PCR"-Verfahren in Kombination mit mehreren überlappenden "Molecular Beacon" Indikatorsonden wurden bereits verschiedene, zur Rifampin-Resistenz führende Mutationen im *rpoB*-Gen von *Mycobacterium tuberculosis* erfolgreich differenziert ([Piatek, A.S. et al. 1998](#)).

Zur Identifizierung klinischer Isolate wurden DNA Microarrays entwickelt, einmal zur Differenzierung von 17 der bisher bekannten 35 verschiedenen Tetracyclin-Resistenzgene sowie von  $\beta$ -Lactamasegenen in Verbindung mit 16S rDNA Genen zur Speziesbestimmung (*Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Brevundimonas*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Serratia* spp.) ([Call, D.R. et al. 2003](#)), und einmal zur Differenzierung von sechs Resistenzgenen (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *ereA*, *ereB*, *msrA/B*) gegen die Makrolid-Antibiotika Erythromycin, Lincosamid und Streptogramin B (MLS) in Stämmen von *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pyogenes* ([Volokhov, D. et al. 2003](#)). Besonders wird in ([Call, D.R. et al. 2003](#)) darauf hingewiesen, dass die Microarray-Technologie sehr gut geeignet ist, eine sehr große Zahl unterschiedlicher Antibiotika-Resistenzgene zu relativ niedrigen Kosten zu erfassen.

Zur Anwendung dieser Technologie im Umweltbereich wurde vom Lehrstuhl für Genetik der Universität Bielefeld ein Projekt unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Pühler vorgeschlagen, in dem ein schnelles Microarray-System entwickelt werden soll, das gleichzeitig die Erfassung aller relevanten Bakterienspezies und ihrer Resistenzgene in einer Umweltprobe (z.B. Abwasser) erlaubt.

Die Genotypisierung von Bakterienspezies und sogar Stämmen bzw. Pathotypen wird mit der zunehmenden Anzahl vollständig sequenzierter bakterieller Genome ([Doolittle, R.F. 2002](#)) immer einfacher.

In ([Bendinger, B. et al. 2005](#)) werden Vor- und Nachteile der phänotypischen mikrobiologischen und der genotypischen molekularbiologischen Methoden einander gegenübergestellt.

**Tabelle 18:** Gegenüberstellung der phänotypischen mikrobiologischen und der genotypischen molekularbiologischen Methoden –Vergleich der Nachteile

Nachteile der mikrobiologischen Methoden:	Nachteile der molekularbiologischen Methoden
physiologische Faktoren beeinflussen Nachweis und/oder Quantifizierung	freie DNA und DNA aus toten Bakterien werden ggf. auch nachgewiesen
VBNC (= viable but not culturable bacteria) werden nicht erfasst	die Vermehrungsfähigkeit kann i.d.R. nicht beurteilt werden
vorgeschädigte Bakterien werden nicht zuverlässig erfasst	bei Anwesenheit von Inhibitoren, z.B. Huminstoffen, sind interne Kontrollen und Aufreinigung von DNA-Extrakten notwendig
Begleitflora kann zur Verfälschung von Ergebnissen führen	durch die Begleitflora sind Kreuzreaktionen möglich

Nachteile der mikrobiologischen Methoden:	Nachteile der molekularbiologischen Methoden
Nährmedien sind spezifisch für einzelne Bakteriengruppen	Investitionen in Geräte (für PCR und Micro/Makroarray-Auswertung) sind erforderlich
Isolierung der Bakterien aus problematischen Habitaten ist schwierig	bisher gibt es nur wenige standardisierte Verfahren
bei bestimmten Bakterienarten ist der Pathogenitätsnachweis nicht möglich	beschränkt auf kleine konzentrierte Proben volumina
erheblicher Zeitaufwand	

**Tabelle 19:** Gegenüberstellung der phänotypischen mikrobiologischen und der genotypischen molekularbiologischen Methoden – Vergleich der Vorteile

Vorteile der mikrobiologischen Methoden:	Vorteile der molekularbiologischen Methoden
direkter Nachweis der Lebens- und Vermehrungsfähigkeit	hohe Spezifität und Sensitivität, dabei schnell
vergleichbare Ergebnisse über längeren Zeitraum und zwischen verschiedenen Laboren	Nachweis unabhängig vom physiologischen Status
einfach durchführbar, robust und weitgehend reproduzierbar	direkte taxonomische Zuordnung einschließlich Metabotyp und Pathotyp
kostengünstig	Diagnostik ohne kulturelle Anreicherung ist prinzipiell möglich
	Nachweis weitgehend unabhängig von störender Begleitflora

Die Autoren ([Bendinger, B. et al. 2005](#)) vertreten die Ansicht, dass sich, zumindest bei der Risikoabschätzung und unklaren Befunden im Trinkwasserbereich, mikrobiologische und molekularbiologische Methoden sinnvoll ergänzen.

#### 4.7.2 Veröffentlichte Befunde zu antibiotikaresistenten Bakterien in Kläranlagen

In ([UBA 1997](#)) wird eine Einführung in die Problematik gegeben:

*"Antibiotikaresistente Bakterien, die in klinischen oder häuslichen Bereichen der Antibiotikaanwendung entstanden sind, gelangen mit den menschlichen Ausscheidungen ins Abwasser und können dann direkt oder über Kläranlagen als Sammelpunkt in die Oberflächengewässer eingetragen werden.*

*Kläranlagen tragen jedoch nicht nur zur Verbreitung der antibiotikaresistenten Bakterien bei, die in anderen Bereichen entstanden sind. Es gibt darüber hinaus Hinweise, dass es in Kläranlagen, begünstigt durch die hohen Bakterienkonzentrationen, zum Austausch von Antibiotikaresistenzen zwischen verschiedenen Bakterien kommen kann. Dadurch ist es möglich, dass neue Kombinationen von Antibiotikaresistenzen entstehen, oder dass Antibiotikaresistenzen auf Bakterien übertragen werden, die bisher keine Resistenz aufwiesen.*

*Auch diese neu entstandenen antibiotikaresistenten Bakterien würden dann über die Klärwerksabläufe in der Umwelt verbreitet."*

Eine umfassende Untersuchung über das Verhalten antibiotikaresistenter Bakterien in einer Kläranlage wurde erstmals 1976 von einer südafrikanischen Arbeitsgruppe publiziert ([Grabow, W.O.K. et al. 1976](#)). Die Untersuchung beschränkte sich auf Coliforme Bakterien mit übertragbarer und nichtübertragbarer Resistenz gegen Ampicillin, Chloramphenicol, Kanamycin, Streptomycin und/oder Tetracyclin. Gemessen wurde die Keimdichte nach der Primärsedimentation, der Biofiltration, der Sekundärsedimentation, der Chlorung und der abschließenden Sandfiltration. Während die absolute Zahl der Coliformen Bakterien über die Reinigungsschritte abnahm (von  $82,4 \times 10^6/\text{ml}$  nach der primären Sedimentation auf  $12,9 \times 10^3/\text{ml}$  nach der Sandfiltration) blieb der prozentuelle Anteil der antibiotikaresistenten Bakterien an der Gesamtmenge näherungsweise konstant (ca. 35% ampicillinresistente, ca. 1,5% chloramphenicolresistente, ca. 3% kanamycin-/neomycinresistente, ca. 20% streptomycinresistente und ca. 8% tetracyclinresistente). Daneben wurde auch das jeweilige Verhältnis übertragbarer zu nichtübertragbarer Antibiotikaresistenz untersucht sowie das Vorkommen und Verhalten von Bakterien mit mehrfachen (übertragbaren) Antibiotikaresistenzen. Immerhin trugen ca. 10% aller Bakterien Resistenzen gegen alle 5 untersuchten Antibiotika und jeweils ca. 30% gegen 4 und gegen 3 der Antibiotika. Ca. 17% trugen 2 Resistenzen und nur 13% trugen eine einzige Resistenz.

Bemerkenswert war noch, dass die Desinfektion durch Chlorung nicht nennenswert zur Beseitigung antibiotikaresistenter Coliformer Bakterien im Wasser beitrug.

Die Autoren warnen vor der Gefahr der Übertragung (multipler) Antibiotikaresistenzen auf gefährliche Bakterienarten wie *Salmonella* und *Shigella*.

In einer Publikation von 1988 ([Stelzer, W. & Ziegert, E. 1988](#)) wurden die Antibiotikaresistenzen in Coliformen Bakterien in einer vollbiologischen Kläranlage untersucht. Im Rohabwasser wurden insgesamt im Mittel  $10^3$  antibiotikaresistente Coliforme/ml, etwa 1% der Gesamtcoliformen, nachgewiesen und 896 selektierte Stämme nach Spezieszuordnung (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* und *ozaenae*, *K. oxytoca*, *Enterobacter agglomerans*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas* spp.) und Antibiotikaresistenz (Tetracyclin, Chloramphenicol, Kanamycin, Gentamicin) charakterisiert. Während gegen Tetracyclin hauptsächlich Einfachresistenzen festgestellt wurden, wurden Chloramphenicol-, Kanamycin- und Gentamicinresistenzen hauptsächlich oder ausschließlich in Mehrfachresistenzen gefunden. Daneben wurde die konjugative Übertragbarkeit der R-Plasmide nachgewiesen.

Im Abwasser aus einer Tierhaltung (Rinder) wurden entsprechend einer Publikation von 1992 ([Böttcher, I. et al. 1992](#)) gegen Tetracycline, Penicilline, Streptomycine, Neomycin, Sulfonamide und Chloramphenicol antibiotikaresistente Coliforme Bakterien charakterisiert, ihr ursächlicher Zusammenhang mit der Verabreichung von Antibiotika an die Tiere belegt und die konjugative Übertragbarkeit der Resistenzplasmide nachgewiesen.

In einer neueren Publikation von 2002 ([Bendt, T. et al. 2002](#)) wurden die Herkunft und der Verbleib antibiotikaresistenter Keime untersucht. Dabei wurden selektiv die Bakterien *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter agglomerans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Kluyvera* spec., *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii* sowie *Pseudomonas aeruginosa* und ihre Resistenzen gegenüber den Antibiotika Amoxicillin,

Cefazolin, Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Doxycyclin, Kanamycin sowie Trimethoprim/Sulfamethoxazol überprüft.

Beprobt wurden drei Indirekteinleitergruppen (Kliniken, Industrie und Haushalte), der Zulauf (Ablauf Sandfang) und der Gesamtablauf (Ablauf Filtration) des Klärwerkes und als Kontrolle der Rhein (500 m oberhalb der Einleitungsstelle).

Die Untersuchungen ergaben, dass im Mittel 99,9% der Keime aus dem Klärwerkszulauf im Klärwerk eliminiert werden und dass Mehrfachresistenzen nach der biologischen Reinigung nicht zunehmen. Wie bereits in der alten Untersuchung ([Grabow, W.O.K. et al. 1976](#)) festgestellt, ergab sich auch bei dieser ([Bendt, T. et al. 2002](#)), dass die Resistenzspektren der ausgewählten Keime an allen Probenahmestellen vergleichbar waren.

Obwohl Klinikabwässer nur einen Abwasservolumenanteil von < 1% ausmachen, trugen sie einen höheren Anteil (mehrfach) antibiotikaresistenter Bakterien bei als die rein häuslichen Abwässer mit einem typischen Abwasservolumenanteil von 70% und mehr. Auch der Beitrag des Abwassers aus einem fleischverarbeitenden Betrieb erwies sich als erheblich, speziell bezüglich der Antibiotikaresistenz gegen Amoxicillin, Doxycyclin und Cefazolin.

Ob es sich bei dem hohen Anteil an vielfach resistenten *Pseudomonas aeruginosa* Isolaten tatsächlich um genetisch resistente Stämme handelt oder nur um phänotypisch resistente (persistente) Stämme vom "Biofilm-Typ" ([Drenkard, E. & Ausubel, F.M. 2002](#)) müsste noch geklärt werden.

Eine unzureichende Datenlage existiert noch zum Vorhandensein von bestimmten antibiotikaresistenten Bakterien mit hoher klinischer Relevanz im Kläranlagenzu- und Ablauf; gemäß ([Witte, W. & Mielke, M. 2003](#)) betrifft das insbesondere

β-Lactamantibiotikaresistente Bakterien aufgrund β-Lactamasen, speziell ESBL:

*Achromobacter xylosoxidans*, *Acinetobacter* spp. - z.B. *baumannii*, *Alcaligenes* spp., *Citrobacter* spp. - z.B. *youngae*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Serratia marcescens* und *Shigella flexneri*,

β-Lactamantibiotikaresistente Bakterien aufgrund PBP (Penicillinbindeprotein):

*Streptococcus* spp. - z.B. *pneumoniae* - und *Staphylococcus* spp. sowie

β-Lactamantibiotika- speziell Carbapenemresistente Bakterien aufgrund eines fehlenden Außenmembranproteins (OMP) für die Aufnahme von Carbapenemen:

*Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacteriaceae*.

In einem Übersichtsartikel aus 1999 ([Feuerpfeil, I. et al. 1999](#)) werden einige grundsätzliche Gesichtspunkte der Problematik betrachtet (die angegebenen Zahlen und die daraus gezogenen Schlussfolgerungen stimmen mit früheren, in ([UBA 1997](#)) zitierten Untersuchungen des Umweltbundesamtes überein):

Mit dem klinischen und häuslichen Abwasser werden nicht nur Antibiotika (in Mengen, die eine biologische Wirkung entfalten können), sondern auch antibiotikaresistente Bakterien in die Kläranlagen eingebracht und über das geklärte Abwasser in hohen Konzentrationen in die Umwelt (Vorfluter) entlassen, z.B. 10 bis 10<sup>3</sup> antibiotikaresistente Coliforme Bakterien

(ACB) pro ml. Die entsprechenden Mengen im kommunalen Abwasser waren  $10^3$  bis  $10^4$  ACB pro ml, in Krankenhausabwässern  $10^4$  bis  $10^5$  ACB pro ml. Die untersuchten Antibiotikaresistenzen waren dabei gegen Tetracyclin, Chloramphenicol und Kanamycin gerichtet. Die Hochrechnung, dass aus einer gut funktionierenden voll biologischen Kläranlage mit einem täglichen Abwasseranfall von ca.  $30 \times 10^3 \text{ m}^3$  unter diesen Umständen ( $10^3$  ACB/ml) täglich ca.  $3 \times 10^{13}$  ACB in den Vorfluter (Fließgewässer) und damit in die Umwelt gelangen, veranlasste die Autoren zu der Empfehlung, diese Pfade aus Gründen der Vorsorge möglichst zu unterbinden. Die Technik der Abwasserklärung sollte so gestaltet werden, dass eine Exposition des Menschen mit antibiotikaresistenten Bakterien mit modernen Methoden, z.B. der Mikrofiltration, vermieden wird.

Die Autoren weisen auch darauf hin, dass Kläranlagen nicht nur ein Sammelbecken für antibiotikaresistente Bakterien darstellen, sondern dass es auch Hinweise darauf gibt, dass es in Kläranlagen, begünstigt durch die hohe Bakteriendichte, zum Genaustausch und damit zur Übertragung von Resistenzgenen bzw. zur Neukombination von Resistenzgenen kommen kann, speziell unter dem Selektionsdruck vorhandener Antibiotika. ([Feuerpfeil, I. et al. 1999](#))

Zu den biologischen Effekten, die durch subinhibitorische Dosen von Antibiotika hervorgerufen werden können, gehören auch eine Erhöhung der Gentransferrate (Aktivierung des SOS-Systems ([Miller, C. et al. 2004](#))) und die Stimulation von Bakterien zur Bildung von Biofilmen ([Feuerpfeil, I. et al. 1999](#), [Hoffman, L.R. et al. 2005](#)).

Beim Bremer Kolloquium 2004 wurde über ein Kooperationsprojekt der Universität Mainz mit dem Forschungszentrum Karlsruhe und der Firma GeneScan Analytics GmbH, Freiburg, zu Vorkommen und Ausbreitung antibiotikaresistenter Bakterien in der aquatischen Umwelt berichtet ([Kohnen, W. et al. 2004](#)). Dazu wurde das Vorkommen - speziell mehrfach - antibiotikaresistenter Bakterien im Abwasser eines großen Krankenhauses, am Einlass, im Belebtschlammbecken und im Auslauf der dieses Abwasser behandelnden Kläranlage sowie im Vorfluter (Fluss) ufernah stromaufwärts und stromabwärts dieser Einleitstelle qualitativ und quantitativ erfasst. Speziell wurden Resistenzen gegen 12 Antibiotika in Enterokokken (Amoxicillin, Amoxicillin/Clavulansäure, Ciprofloxacin, Cotrimoxazol, Erythromycin, Gentamicin, Imipenem, Linezolid, Synercid, Teicoplanin, Tetracyclin und Vancomycin) und gegen 7 Antibiotika in *Pseudomonas aeruginosa* (Amikacin, Azlocillin, Ceftazidim, Ciprofloxacin, Gentamicin, Imipenem und Piperacillin/Tazobactam) untersucht. Die Antibiotika waren danach ausgewählt worden, dass gegen sie keine natürlichen, sondern nur erworbene Resistenzen auftreten.

Während nur sehr wenige (ca. 2%) Enterokokken ohne jede Antibiotikaresistenz gefunden wurden, waren bei den *Pseudomonas aeruginosa*-Isolaten noch ca. 30% frei von Resistenz gegen eins der 7 Antibiotika.

Im Abwasser der Klinik wurden multiresistente Enterokokken mit maximal 9 Antibiotikaresistenzen (von 12 möglichen) gefunden und multiresistente *Pseudomonas aeruginosa* mit maximal 7 Antibiotikaresistenzen (von 7 möglichen). Mehrfachresistente Keime wurden auch im Kläranlagenauslauf und im Fluss gefunden. Daraus schließen die Autoren, dass "das Abwassersystem eine Quelle für die Ausbreitung von multiresistenten Bakterien" ist.

Die Resistenzverteilungsmuster wurden mit klassischen mikrobiologischen Methoden gewonnen. Da diese aber relativ zeit- und arbeitsaufwendig sind, werden von dem Konsortium

derzeit Verfahren entwickelt, mit denen sich die Resistenzgene mit einem DNA-Chip (Micro-/Makroarray) detektieren lassen.

In einem von der Europäischen Union geförderten Forschungsprojekt ("Biotool") will ein Verbund von Arbeitsgruppen aus Deutschland, Spanien, Dänemark, der Schweiz und der Tschechischen Republik einen Biochip entwickeln, mit dem sich Bakterien in Umweltprouben, z.B. aus kontaminierten Gewässern oder Böden, genotypisch identifizieren lassen. Die Koordination liegt bei der GBF (jetzt: Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, HZI), Braunschweig ([Anonymus 2005](#)). Die bisherigen Vorarbeiten bestätigen die prinzipielle Machbarkeit eines solchen einfachen in situ-Testsystems.

#### **4.8 Identifizierung des Resistenzmechanismus antibiotika-resistenter Bakterien**

Die Aufklärung des Resistenzmechanismus kann dazu beitragen, den Weg zu rekonstruieren, auf dem das Bakterium die Resistenz erworben hat, und die Wahrscheinlichkeit abzuschätzen, mit der die Eigenschaft an andere Organismen weitergegeben wird. So wird ein durch Punktmutation inaktiviertes chromosomales, für ein Porenprotein kodierendes Gen mit weit geringerer Wahrscheinlichkeit weitergegeben als ein auf einem Plasmid oder in einem Integron liegendes Gen, das für eine Effluxpumpe kodiert. In beiden Fällen ist der Resistenzphänotyp die niedrige Antibiotikakonzentration in der Zelle.

Beruhet die Resistenz auf der chemischen Veränderung des Antibiotikums (z. B. hydrolytische Spaltung bei den  $\beta$ -Lactamen, Acetylierung bei Chloramphenicol oder Aminoglycosiden, Phosphorylierung bei Aminoglycosiden), lässt sich der Mechanismus durch Analyse der Metaboliten (z. B. immunologisch wie Acetyl-Chloramphenicol, mittels Dünnschicht-Chromatographie oder mittels HPLC) erschließen.

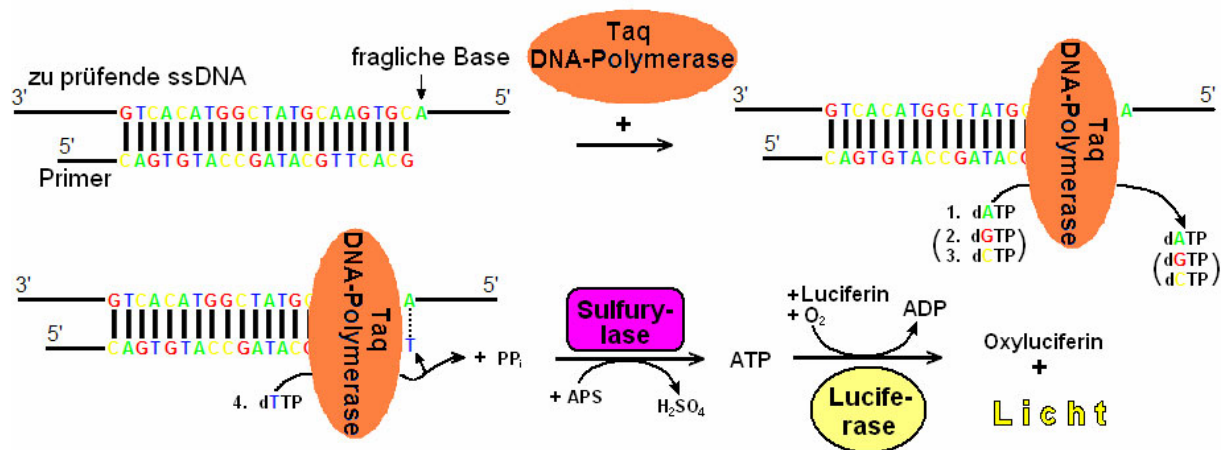
Gibt es mehrere Gene mit grundsätzlich unterschiedlicher Struktur und Historie aber gleicher oder ähnlicher Substratumsetzung, wie z.B. bei den  $\beta$ -Lactamasen ([Witte, W. & Mielke, M. 2003](#)) und Streptothricinacetyltransferasen ([Tschäpe, H. et al. 1993](#), [Tietze, E. et al. 1990](#)), oder werden die Antibiotika nicht enzymatisch verändert (z.B. Bindeprotein oder desensibilisierende Mutation des Zielmoleküls), muss die Identifizierung immunologisch oder molekularbiologisch (z.B. mit Gensonden ([Service, R.F. 1995](#), [Tschäpe, H. et al. 1993](#), [Tietze, E. et al. 1990](#)) oder im schlimmsten Fall durch Sequenzierung) vorgenommen werden. In all den Fällen, in denen eine Identifizierung per Southern-Hybridisierung mit Gensonden möglich ist, könnte auch ein DNA-Chip eingesetzt werden.

Auch der mittels PCR einfach durchzuführende Nachweis relevanter Resistenzgene (und -mechanismen), z.B. *mecA* für die Oxacillinresistenz bei *S. aureus* oder *vanA*, *vanB* für die Glycopeptidresistenz bei Enterokokken hat einen hohen Aussagewert, vor allem für die Interpretation des Ergebnisses in Bezug auf Kreuzresistenz gegen mehrere Vertreter einer Substanzgruppe ([Witte, W. & Klare, I. 1999](#)). Hierfür ist aber ein hoher Kenntnisstand über das jeweilige Resistenzsystem Voraussetzung.

Eine interessante Variante der Identifikation von Antibiotikaresistenz vermittelnden Punktmutationen (z.B. im 23S rRNA-Gen für Makrolidresistenz oder in einem Gyrasegen für Chinolonresistenz) mittels PCR, Gensonden und FRET wurde kürzlich beschrieben ([Kist, M. et al. 2005](#), [Lascols, C. et al. 2003](#)): Die PCR-Amplifikate des möglicherweise die Mutation enthaltenden Genabschnittes werden an einem Ende mit einem Fluorophor markiert und mit einer Gensonde mit Wildtyp-Sequenz hybridisiert, die einen Quencher trägt. Nach dem Entfernen der überschüssigen Sonden wird unter Beobachtung des Fluoreszenzverhaltens eine Schmelzkurvenanalyse des PCR-Produkt/Gensonden Doppelstranges durchgeführt, wobei der "Schmelzpunkt" durch den plötzlichen Anstieg der Fluoreszenz (Trennung des Quenchers vom Fluorophor) angezeigt wird. Der "Mismatch" im Falle einer Punktmutation im PCR-Produkt erniedrigt den Schmelzpunkt und dient somit als Indikator für die Antibiotikaresistenz. Dieses Verfahren übertrifft an Sensitivität sowohl die Kultur- als auch die Histopathologie-Verfahren und stimmt in ca. 98% der Fälle mit der phänotypischen Resistenzbestimmung durch Plattendiffusionstest überein ([Lascols, C. et al. 2003](#)).

In Fällen, in denen die Resistenz auf einer einzigen Punktmutation beruht, kommt für Nachweis und Quantifizierung auch die Technik "Pyrosequencing" in Frage ([Ronaghi, M. et al. 1998](#), [Sinclair, A. et al. 2003](#), [Agah, A. et al. 2004](#), [Ahmadian, A. et al. 2006](#)).

Hierbei handelt es sich um ein sehr empfindliches Echtzeit-Verfahren zur Identifizierung von Polymorphismen in ansonsten hoch konservierten Regionen mittels Biolumineszenz; prinzipiell können damit auch sehr kurze DNA-Sequenzen ( $\leq 10$  nt) sequenziert werden: Die an einem polymeren Träger immobilisierte einzelsträngige Zielsequenz wird mit einem Primer hybridisiert, dessen 3'-Ende unmittelbar an die in der Zielsequenz zu identifizierende Base heranreicht. Danach wird eine Mischung der DNA-Polymerase mit einem einzelnen Desoxyribonucleosidtriphosphat, z.B. dATP, zugegeben. Ist dieses Nucleotid komplementär zu der Base in der Zielsequenz, wird der Primer um ein Nucleotid verlängert und es wird Pyrophosphat (PPi) freigesetzt. Das Pyrophosphat wird, katalysiert durch Sulfurylase, mit APS (= Adenosin-5'-phosphosulfat) quantitativ umgesetzt zu ATP, welches durch Leuchtkäfer-Luciferase mit dem Cosubstrat Luciferin umgesetzt wird und dabei einen biolumineszenten Lichtblitz emittiert. Die mit einem Luminometer gemessene Lichtmenge zeigt die Verlängerung des Primers an. Bleibt die Lumineszenz aus, war das eingesetzte Desoxyribonucleosidtriphosphat nicht komplementär zur Zielsequenz, die Reaktionsmischung wird vollständig aus dem polymeren Träger herausgewaschen und durch eine neue Mischung mit einem anderen Triphosphat, hier dGTP, dCTP oder dTTP, ersetzt. Diese Schritte werden so lange wiederholt, bis Lumineszenz auftritt und die Basenidentität an der fraglichen Stelle anzeigt. Überschüssige Tri- und Diphosphate werden durch das Enzym Apyrase in Monophosphate und anorganisches Phosphat abgebaut.



**Abbildung 21:** Prinzip des Pyrosequencing

Pyrosequencing wurde bereits vielfach zur genetischen Typisierung von Bakterien eingesetzt ([Clarke, S.C. 2005](#), [Ronaghi, M. & Elahi, E. 2002](#), [Balitzki-Korte, B. et al. 2005](#), [Diggle, M.A. & Clarke, S.C. 2004](#), [Tuohy, M.J. et al. 2005](#), [Pai, R. et al. 2005](#)) und auch zur Detektion Antibiotikaresistenz verleihender Mutationen in bakteriellen Genomen ([Sinclair, A. et al. 2003](#), [Zhao, J.R. et al. 2005a](#), [Zhao, J.R. et al. 2005b](#)). Die Methode ist geeignet zur Lösung von einfachen Problemen, z.B. bei der routinemäßigen Analyse reiner Bakterienkulturen, versagt aber systembedingt bei komplexen Mischungen.





## 5 Genübertragung im Abwasser

### 5.1 Modellversuche zur Genübertragung zwischen Bakterien in Kläranlagen

In einem Forschungsprojekt ([Arens, J. et al. 1993](#)) wurde 1993 die Übertragung von Resistenzgenen tragenden Plasmiden von Laborstämmen von *Escherichia coli* (K12-Derivate: HB 101 ohne und S 17-1 mit Transferfunktionen) und *Pseudomonas putida* auf ein plasmidfreies aber Chloramphenicol-resistentes Isolat von *Pseudomonas putida* aus einer Kläranlage in vitro untersucht. Eingesetzt wurden drei Plasmide:

- pBR322 mit Resistenzgenen gegen Ampicillin und Tetracyclin ohne Mobilisierungsfunktionen,
- RP4 mit Resistenzgenen gegen Ampicillin, Carbenicillin, Tetracyclin und Kanamycin/Neomycin und mit Mobilisierungs- und Transferfunktionen sowie
- pKT231 mit Resistenzgenen gegen Kanamycin/Neomycin und Streptomycin und mit Mobilisierungsfunktionen.

Es wurden Filterkonjugationsexperimente auf Agar-Platten sowie Konjugationsexperimente in LB-Medium und in sterilem Klärschlamm durchgeführt.

Filterkonjugationsexperimente: Von *E. coli* HB 101 wurde das konjugative Plasmid RP4 mit einer durchschnittlichen Transferrate von  $5 \times 10^{-4}$  auf *P. putida* übertragen, das mobilisierbare Plasmid pKT231 mit einer Transferrate von  $\leq 10^{-7}$  und das nicht mobilisierbare Plasmid pBR322 überhaupt nicht. Von *E. coli* S 17-1 wurde das mobilisierbare Plasmid pKT231 mit einer Transferrate von  $10^{-3}$  auf *P. putida* übertragen und das nicht mobilisierbare Plasmid pBR322 immer noch mit einer Transferrate von  $10^{-4}$ .

In LB-Medium waren die durchschnittlichen Transferraten vergleichbar mit denen der Filterkonjugationsexperimente. Im sterilen Klärschlamm konnte von *E. coli* HB 101 keinerlei Transfer der Plasmide pBR322 und pKT231 beobachtet werden. Für *E. coli* S 17-1 war die Transferrate für das Plasmid pKT231  $10^{-3}$ , für das Plasmid pBR322 war kein Transfer nachweisbar. Sowohl im LB-Medium als auch im sterilen Klärschlamm war die Transkonjugationsrate vom *P. putida*-Laborstamm auf das *P. putida*-Isolat für das Plasmid pKT231  $10^{-5}$  bis  $10^{-6}$ , pBR322 war nicht übertragbar.

Aus den Ergebnissen wird geschlossen, dass selbst Plasmide ohne Transfer- und Mobilisierungsfunktionen und mit *E. coli* spezifischem Replikationsursprung unter den Bedingungen einer Kläranlage auf eine Vielzahl von Organismen verbreitet und in diesen auch vermehrt werden können. Die sehr geringe Wahrscheinlichkeit von Übertragung und Etablierung wird unter Selektionsdruck, z.B. in Anwesenheit von Antibiotika, mit Sicherheit erheblich größer. ([Arens, J. et al. 1993](#))

Bereits in einer viel früheren Publikation ([Sagik, B.P. et al. 1981](#)) war die Übertragung von Plasmiden, die mit mehreren Antibiotikaresistenzgenen als Selektionsmarker beladen waren, von verschiedenen *E. coli*-Stämmen, darunter auch solchen mit Mobilisierungsfunktion, auf nicht charakterisierte Bakterien in Belebtschlamm und Klärschlamm unter Laborbedingungen

untersucht worden. Da die Versuche bezüglich der Plasmid-Empfänger eine "Black Box" waren und die Selektion auch zu einer erheblichen Vermehrung der im Belebtschlamm bereits vorhandenen "natürlich" resistenten Bakterien ("Rauschen") führte, konnte nur eine Übertragungsrate abgeschätzt werden: Zugabe des Mobilisierungsstammes mit Plasmid führte zu einer 8,1-fachen Zunahme der mehrfachresistenten Bakterien, gleichzeitige Zugabe eines Donorstammes und eines Mobilisierungsstammes führte sogar zu einer 25-fachen Zunahme. Die verwendeten *E. coli*-Laborstämme überlebten nicht dauerhaft in Gegenwart der Klärschlammorganismen.

Gemäß einem Übersichtsartikel ([Lorenz, M.G. & Wackernagel, W. 1993](#)) ist davon auszugehen, dass hohe Zelltitel, das verbreitete Vorkommen von R-Faktoren, das nährstoffreiche Milieu und die Fähigkeit der dort ansässigen Bakterien, als DNA-Empfänger zu agieren ([Gealt, M.A. et al. 1985](#)), gute Voraussetzungen für die konjugative Ausbreitung von Plasmiden in der mikrobiellen Gemeinschaft in Abwasser, Belebtschlamm und Klärschlamm bieten. Bereits 1983 ([Heier, H. 1983](#)) wurde darauf hingewiesen, dass Abwässer mit hoher Populationsdichte ausgezeichnete Medien für die Übertragung von Resistenzplasmiden auch für statistisch unwahrscheinliche Übergänge darstellen.

In einer Kläranlage wurde der Plasmidtransfer zwischen *E. coli*-Umweltisolaten in situ beobachtet ([Altherr, M.R. & Kasweck, K.L. 1982](#)). Solch ein Plasmidtransfer kann eine Häufigkeit von bis zu  $10^5$  Transkonjuganten pro Donorzelle erreichen ([Mach, P.A. & Grimes, D.J. 1982](#)). Ein *Pseudomonas putida* Stamm, der das rekombinante nichtkonjugative Plasmid pD10 mit den klonierten Genen des 3-Chlorobenzoat-Abbauweges enthielt, überlebte in einem Belebtschlamm-Mesokosmos im Labormaßstab. Nach längerer Inkubation wurden Varianten des Stammes isoliert, die nunmehr in der Lage waren, das Plasmid pD10 auf Laborstämme als Empfänger zu übertragen ([McClure, N.C. et al. 1989](#), [McClure, N.C. et al. 1991](#)).

In einer Modellkläranlage (aerobe und anaerobe Behälter mit Belebtschlamm) wurde die Übertragung konjugativer Sex-Pheromon-Plasmide, eines Resistenzplasmides und eines konjugativen Transposons zwischen verschiedenen Stämmen von *Enterococcus faecalis* untersucht. Die Übertragungsraten entsprachen je nach übertragenem DNA-Konstrukt zwischen einem Zehntel und einem Zehntausendstel der unter Laborbedingungen erreichten Raten. Eine Übertragung auf eine andere Bakterienspezies wurde nicht beobachtet. Die Autoren rechneten hoch, dass in einer städtischen Kläranlage der Größe wie der von Regensburg unter natürlichen Bedingungen zwischen  $10^5$  und  $10^8$  Plasmidübertragungen pro 4 Stunden zwischen *Enterococcus faecalis*-Stämmen vorkommen ([Marcinek, H. et al. 1998](#)).

## 6 Verhinderung des Austritts von Antibiotikaresistenzgenen und resistenten Bakterien in die Umwelt

### 6.1 Getestete und etablierte Verfahren - Stand von Wissenschaft und Technik-

Bereits 1992 wurde in ([Dorau, W. 1992](#)) vom Robert-Koch-Institut beklagt:

*"...wurden und werden bis heute Krankheitserreger ohne gezielte Verminderung mit Zustimmung der Behörden, auch der Gesundheitsbehörden, oder wenigstens ohne hörbaren Protest der Ärzteschaft und der Amtsärzte in die Gewässer eingeleitet. Die Feststellung bleibt leider auch dann gültig, wenn Kommunen inzwischen ihre Abwässer in einer den gesetzlichen Anforderungen genügenden (modernen) Kläranlage reinigen. ... Die Abwassertechniker sind zufrieden, wenn sie durch die gesamte Prozedur 80 bis 90% der organischen Substanzen aus dem Abwasser entfernen können. In dieser Größenordnung liegt auch der Abscheidegrad der Kläranlagen für die als Indikator benutzten Enterobakterien. ... Eine Reduzierung um ca. eine Zehnerpotenz, ausgehend von ca.  $10^6$ - $10^7$  Bakterien pro 100 ml, bedeutet für den Hygieniker nichts. Das Infektionsrisiko wird durch eine moderne mechanisch/biologische Abwasserreinigung rechnerisch unbedeutend, praktisch aber nicht verringert. Um ein Abwasser als im hygienischen Sinn ausreichend gereinigt qualifizieren zu können, müssen Keimzahlreduktionen um ca. sechs Zehnerpotenzen erreicht werden. Erst dann sind die Keimzahldichten so gering, dass zumindest bakterielle Infektionen ausgeschlossen werden können."*

Was hier für pathogene Bakterien im Abwasser allgemein gesagt, wird trifft natürlich erst recht auf die pathogenen Bakterien zu, die einer Therapie durch Erwerb von Antibiotikaresistenzen weniger zugänglich sind.

Eine mögliche Strategie ist das frühestmögliche Abfangen arzneimittelhaltiger Abwässer am "point of use", also in Kliniken und Praxen, vor der Abgabe an eine Kläranlage ([Bergmann, A. 2004](#)). Urinseparation und gezielte Behandlung von belasteten Teilströmen wurde durch Schaffung der baulichen Voraussetzungen mit einem getrennten Abwassersystem und separierenden Toiletten bereits im "Projekt Lambertsmühle" des MUNLV NRW ([MUNLV NRW 2003a](#)) untersucht.

Für eine Teilstrombehandlung von antibiotika- und zytostatikahaltigen Abwässern nach Feststoffabtrennung und für die Behandlung des Abflusses aus der Kläranlage zur Entfernung von Arzneistoffen, die in konventionellen Kläranlagen nur unzureichend eliminiert werden, gibt es verschiedene etablierte Technologien: Membran(ultra)filtration, Ozonung, UV-Behandlung, "Advanced Oxidation Processes" ( $O_3 + UV$  oder  $O_3/H_2O_2 + UV$ ) und Aktivkohlefiltration ([Bergmann, A. 2004](#)). Mit Ausnahme der Aktivkohlefiltration sind alle diese Verfahren, besonders die oxidativen ([Kohnen, W. et al. 2004](#)), auch zur Entfernung antibiotikaresistenter Keime geeignet.

Mittels Membrantechnologie (Membranbelebung) lassen sich bei Einsatz eines Filters von  $\leq 0,45 \mu m$  Porenweite theoretisch alle Partikel, darunter auch die antibiotikaresistenten Keime, abtrennen ([MUNLV NRW 2003b](#), [Resch, H. 2004](#), [Brepols, C. & Engelhardt, N. 2004](#)). Da diese Nennporenweite aber rein statistisch bedingt ist, ist damit zu rechnen, dass trotzdem

noch zahlreiche Bakterien das Filter durchdringen. Gemäß ([Dorau, W. 1992](#)) ist selbst bei einem Membranfilter von 0,2 µm Porenweite nicht zu erwarten, dass absolute Keimfreiheit erreicht wird (ein einzelner Bericht ([Döpkins, E. 2005](#)) spricht von < 30 fäkalcoliformen Bakterien / 100 ml). Qualitative Untersuchungen am Institut für Allgemeine Zoologie und Genetik der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster bestätigen das, aber quantitative Untersuchungen waren bei den geringen Zellzahlen mangels eines Zellszählgerätes noch nicht möglich. Für freie DNA, die u. U. auch Resistenzgene trägt, ist ein solches Mikrofilter in Übereinstimmung mit den theoretischen Erwartungen voll permeabel.

Kombiniert man die Membranbelegung mit Ozonung des Durchflusses, wird neben der Abtötung entwichener Bakterien auch möglicherweise gefährliche DNA zerstört. Vorteil dieser Kombination ist, dass wegen der Rückhaltung der ozonkonsumierenden Biomasse am Filter die Effektivität der Ozonung erhöht wird. Eventuell lässt sich das System auch durch Verbesserung der Flusseigenschaften noch optimieren.

Zum Stand der Technik der Desinfektion von Abwasser mit UV-Strahlen, wie sie im ATV-Merkblatt 205 empfohlen wird, gibt ([Kolch, A. & Diering, A. 2004](#)) einen Überblick. Einerseits ist das von der UV-Bestrahlung erfasste Erregerspektrum, Viren, Bakterien und eukaryoter Parasiten, als vollständig zu bezeichnen, andererseits ist der Desinfektionserfolg stark von der Abwesenheit suspendierter Feststoffe abhängig, welche die Effektivität der UV-Bestrahlung erheblich mindern können ([Schöler, A. 2004](#)). Empfohlen wird hier, dass die UV-Behandlung erst nach einer Sandfiltration vorgenommen wird, welche die Bakteriendichte um 20 bis 50% und die Schwebstoffe um 75% vermindern kann. Doch auch die UV-Behandlung kann die Keimzahl nicht vollständig reduzieren, es ist immer noch mit bis zu 100 Keimen / 100 ml zu rechnen (gemäß ([Popp, W. et al. 2004](#)) ist der Auflagenwert für Gesamtcoliforme 50/100 ml, für Fäkalcoliforme und Fäkalstreptokokken je 10/100 ml).

Da die Desinfektion mittels UV-Strahlung durch die Schädigung der Erbsubstanz DNA wirkt, ist es sinnvoll, UV-Strahlung in der Nähe des Absorptionsmaximums der DNA bei ca. 260 nm einzusetzen. Daher werden hauptsächlich (Quecksilberdampf-) Niederdruckstrahler eingesetzt, deren Quecksilber-Linie bei 253,7 nm die Voraussetzung erfüllt ([Kolch, A. & Diering, A. 2004](#)). Weil sich diese Lampen durch einen hohen Energieverbrauch bei niedrigem Wirkungsgrad auszeichnen, wurde durch die Fraunhofer Technologie-Entwicklungsgruppe (TEG) Stuttgart, eine "PlasLight" genannte UV-Lichtquelle entwickelt, die das Licht durch Exzimer-Emission eines mit Mikrowellenbestrahlung angeregten Niederdruck-Plasmas mit hoher Effizienz erzeugt. Die Wahl des Exzimers (ein Edelgashalogenid wie KrCl oder ein Halogen wie Cl<sub>2</sub>) bestimmt die emittierte Wellenlänge:

Exzimer	KrCl	KrF	XeI	Cl <sub>2</sub>	XeBr	Br <sub>2</sub>
Wellenlänge (nm)	222	248	253	259	282	289

Die Bestrahlung mit einer Kombination von 222 und 248 nm zeigte für Abwasserbakterien die beste Wirksamkeit ([Flügge, A.P. et al. 2004](#)).

Die Kosten der verschiedenen wirksamen Verfahren zur Abwasserdesinfektion stellen ([Popp, W. et al. 2004](#)) einander gegenüber:

Verfahren:	Membran	UV	Ozonung	Chlorung	Peressigsäure
Kosten (€ / m <sup>3</sup> ):	0,20-0,75	0,03-0,05	0,05-0,18	0,04-0,06	0,03-0,05

Allerdings sind die Einstufungen der sonstigen Vergleichsdaten nicht immer leicht nachvollziehbar; so wird z.B. beim Ozon die Desinfektionswirkung als geringer als die Chlorung bewertet und seine Umweltverträglichkeit als gering eingestuft.

Ein Nachteil des Abfangens resistenter Bakterien direkt im in Kliniken und Praxen anfallenden Abwasser ist, dass die in privaten Haushalten und anderen Abwasserquellen anfallenden nicht unerheblichen Mengen an antibiotikaresistenten Bakterien dadurch nicht erfasst werden und in die Umwelt gelangen. Ein Vorteil ist, dass hier bedeutende gut lokalisierbare Punktquellen vor allem problematisch und/oder mehrfach resistenter pathogener Bakterien eliminiert werden können ([Witte, W. et al. 2004](#), [Höck, M.R.I. et al. 2004](#)). Wegen der hohen Inzidenz mehrfach antibiotikaresistenter Keime in Krankenhäusern werden dort verstärkt solche Antibiotika eingesetzt, gegen die noch keine weit verbreitete Resistenz besteht, z.B. neu eingeführte Antibiotika und Reserveantibiotika. In einer bundesweiten Studie ([Meyer, E. et al. 2004](#)) wurden signifikante Korrelationen zwischen Antibiotikaeinsatz und Resistenzverbreitung auf Intensivstationen nachgewiesen. Werden diese Antibiotika und/oder Bakterien, die gerade dabei sind eine Resistenz dagegen zu entwickeln, ins Abwasser gegeben, kann dadurch die Wirksamkeitsdauer des Medikamentes erheblich verkürzt werden. Bereits in Abschnitt 4.7. wurde darauf hingewiesen, dass Krankenhausabwässer gemäß ([Bendt, T. et al. 2002](#)) nur < 1% der gesamten Abwasservolumenfracht ausmachen, aber einen höheren Anteil (mehrfach) antibiotikaresistenter Bakterien beisteuern als die rein häuslichen Abwässer mit einem typischen Abwasservolumenanteil von 70% und mehr.

Außerdem wurde bereits in dem in Abschnitt 2. zitierten Bericht ([Färber, H. 2002](#)) darauf hingewiesen, dass in Krankenhäusern ein anderes Spektrum von Antibiotika verabreicht wird als von niedergelassenen Ärzten. In Kliniken muss aufgrund der hohen Resistenzbelastung nosokomialer Infektionen häufig auf Reserveantibiotika zurückgegriffen werden. Deren Verlust aufgrund Entstehung und Verbreitung von Resistenzen hätte mangels absehbarer Alternativen katastrophale Folgen.

Ein besonderes Problem wird derzeit mit multiresistenten *Acinetobacter baumannii*-Stämmen beobachtet: Wurden noch vor 20 Jahren nur 1,5% aller in Krankenhäusern auftretenden Pneumonien durch *A. baumannii* verursacht, sind es derzeit 7% mit zunehmender Tendenz; 40% der infizierten Patienten sterben an der Infektion. Das ursprünglich in Boden und Wasser lebende Bakterium, das im Wildtyp nur ein opportunistischer Erreger ist, der vor allem in immunkompromittierten Patienten zur Erkrankung führt, hat mit dem Erwerb der Antibiotikaresistenz erheblich an Virulenz gewonnen. Obwohl es nach wie vor wichtig ist, im Krankenhaus Antibiotika so sparsam wie möglich zu verwenden, um den Selektionsdruck auf die Bakterien so gering wie möglich zu halten, zeigt dies auf die Verbreitung von antibiotikaresistenten *A. baumannii* kaum eine mindernde Wirkung ([Abbott, A. 2005](#)).

Ob die vorgenannten Prozesse der Membranfiltration und Oxidation für die Behandlung der Klärwerkabflüsse bzw. der Krankenhausabwässer aus technischer und wirtschaftlicher Sicht geeignet sind, muss noch geprüft werden.

## 6.2 Verfahren, die für diesen Zweck bisher nicht eingesetzt wurden

### Chemisch/thermische Verfahren:

Für die Abtötung von Zellen und gleichzeitige Zerstörung der DNA in Rückständen aus großvolumiger biotechnologischer Fermentation wurde ein Verfahren entwickelt, das für diesen Zweck als besonders wirksam, umweltfreundlich und gleichzeitig kostengünstig bewertet wurde: Die Behandlung mit 50 mM Zitronensäure (pH 3,0) für 60 min bei 70°C ([Bergemann, K. 1993](#)).

Dieses Verfahren ist wahrscheinlich für den Ablauf einer Kläranlage nicht geeignet wegen der energieaufwendigen Erwärmung, der langen Verweilzeit und des relativ teuren Säuerungsmittels (1993 ca. 100.- DM pro m<sup>3</sup> Inaktivierungsgut). Doch wäre zu prüfen, ob es mit einigen Verbesserungen (z.B. Verwendung von 1M Schwefelsäure zur Einstellung des pH auf 3,0 und dadurch Verkürzung der Haltezeit auf 10 min) zur Behandlung des Abwassers aus Kliniken geeignet ist.

Bei pH 3,0 und 120°C wird die Menge biologisch verwertbarer DNA in einer Minute um 4 Zehnerpotenzen reduziert ([Sanders, E. et al. 1990](#)). Für die thermische Zerstörung von DNA aus biotechnologischen Produktionsanlagen wurden bereits kontinuierlich betriebene Durchflusssysteme entwickelt, die eine mittlere Verweilzeit von 2,75 Minuten bei einer Betriebstemperatur von bis zu 134°C gestatten ([Egyptien, R. et al. 1992](#)).

### Biologische Verfahren:

Für die Entfernung bestimmter gefährlicher Bakterienspezies aus dem Abfluss von Kläranlagen ist auch der Einsatz von für diese Art spezifischen Bakteriophagen denkbar. So wurden beispielsweise Phagen kultiviert, mit denen sich gezielt *Enterococcus faecium* eliminieren lassen ([Biswas, B. et al. 2002](#)). Weitere spezifische Bakteriophagen zur Eliminierung von *E. coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii* (zum therapeutischen Einsatz in vivo) werden in ([Barrow, P.A. & Soothill, J.S. 1997](#)) beschrieben. Vorteile dieses Verfahrens sind die hohe Spezifität und der Verzicht auf aufwendige technische Einrichtungen. Nachteile sind, dass pro Phagentyp nur eine Bakterienspezies abgetötet wird, dass dieses Abtöten wahrscheinlich nicht quantitativ ist und dass die Antibiotikaresistenzgene tragende DNA freigesetzt (vielleicht sogar unspezifisch in Phagenhüllen verpackt) und nicht abgebaut wird, so dass sie für Gentransfer und Rekombination verfügbar bleibt.

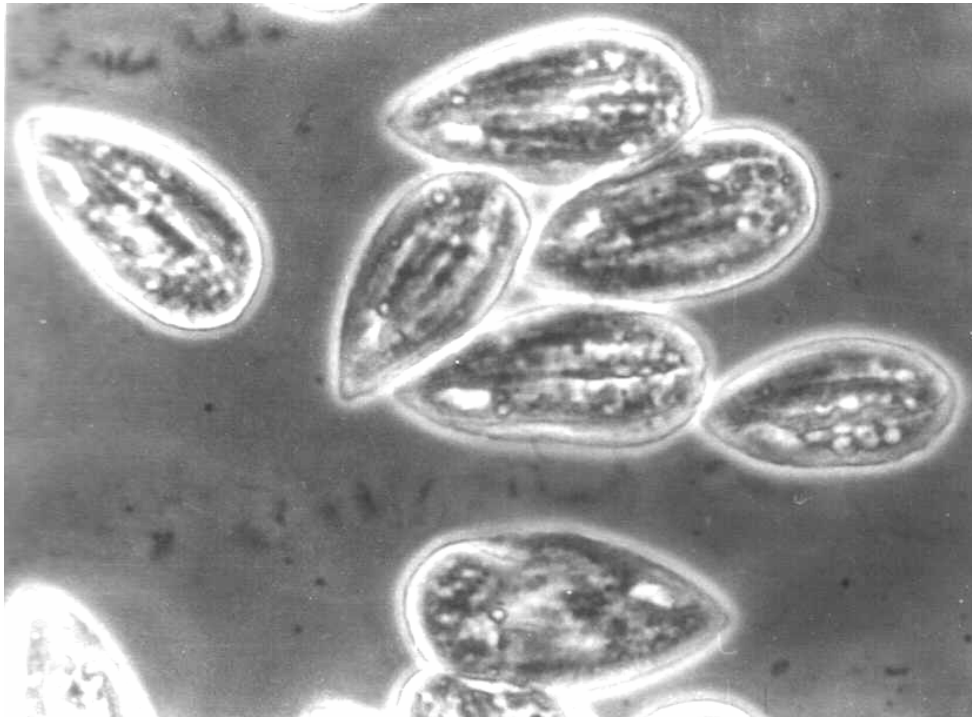
Da die in ([Biswas, B. et al. 2002](#)) eingesetzten Phagen aus dem Belebtschlamm einer Kläranlage gewonnen wurden, wäre es theoretisch ein reizvoller Ansatz, ein Filtrat aus Klärschlamm (Filter von 0,45 µm Porenweite) ohne weitere Behandlung dem separierten Abwasser aus Kliniken zuzusetzen. Dabei müssten für alle relevanten Bakterienspezies wirksame Phagen in hoher Konzentration zugesetzt und der größte Teil der Bakterien damit eliminiert werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass dieses Modell auch praktisch umsetzbar ist, ist aber sehr gering.

Besser geeignet ist dafür wahrscheinlich das Abfangen von Bakterienabfluss mittels Protozoen, z.B. *Tetrahymena*, welche Bakterien in großen Mengen fressen und restlos verdauen ([Nilsson, J.R. 1989](#)). Da diese Ciliaten nicht in der Lage sind die für die DNA- und RNA-Biosynthese benötigten Purin- und Pyrimidin-Basen selbst zu synthetisieren, nehmen sie auch

freie DNA aus dem Medium auf ([Frankel, J. 2000](#)), womit auch diese problematische Substanz am Ausdringen in die Umwelt gehindert wird.

Dass *Tetrahymena pyriformis* in der Lage ist große Viren (Poliomyelitisvirus Typ 1) vollständig aus Wasser zu entfernen, wurde bereits von ([Burger, G. 1990](#)) berichtet. Dass sie darüber hinaus auch beim Fressen von Bakterien unter Laborbedingungen weit weniger selektiv sind als eine andere Protozoenspezies, *Paramecium aurelia* ("Pantoffeltierchen"), wurde von ([Neubacher, E. et al. 2005](#)) gezeigt.

Die Fähigkeit von *Tetrahymena*, aus dem Belebtschlamm stammende Bakterien zu eliminieren, wurde bereits 1969 bestätigt; allerdings kann *Tetrahymena* im Belebtschlamm selbst nicht überleben ([Curds, C.R. & Fey, G.J. 1969](#)). Ob dies im Ablauf der Kläranlage möglich ist, muss noch geprüft werden. Möglicherweise ist hier die Empfindlichkeit von *Tetrahymena* gegen Umweltgifte ([Schultz, T.W. et al. 1990](#)) ein Hindernis für den Einsatz dieses Verfahrens.

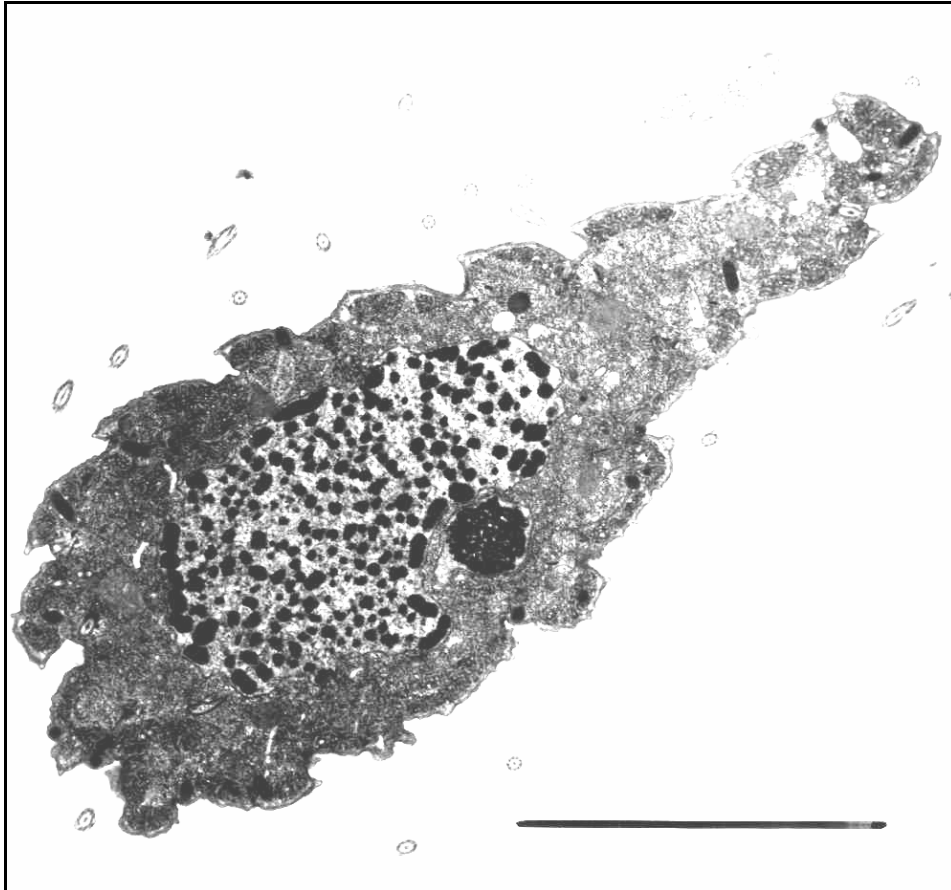


**Abbildung 22:** Lichtmikroskopische Aufnahme von *Tetrahymena thermophila*

Erste Hinweise, dass *Tetrahymena pyriformis* und ein nahe verwandter Ciliat, *Colpidium campylum*, in der Lage sind, im Klärwerkablauf zu überleben und darin Bakterien der dort zu erwartenden Dichte erheblich zu vermindern (bis zu 27% pro Stunde bei einer Ciliatendichte von 10.000/ml) ergab ein im Auftrag des Landesumweltamtes NRW von der Universität Münster durchgeführtes Forschungsprojekt, dessen Ergebnisse bereits veröffentlicht wurden ([Tiedtke, A. et al. 2006](#), [Westermeier, F. et al. 2006](#), [Hillmann, A. et al. 2006](#), [Eichler, W. et al. 2006](#)).

Diese Modelluntersuchungen müssen aber noch unter praxisnäheren Bedingungen verifiziert und durch statistisch tragfähige Verfahren der Zellzahlbestimmung untermauert werden.





**Abbildung 23:** Elektronenmikroskopischer Querschnitt durch *Tetrahymena thermophila* (Messbalken = 5  $\mu\text{m}$ )

## 7 Ausblick: Wo besteht noch Klärungsbedarf?

### 7.1 Verbesserte Datengrundlage über das Vorkommen von Antibiotika im Abwasser, in der Kläranlage und in der Einleitung in den Vorfluter

Die aktuellen Daten über das Vorkommen von Antibiotika im Abwasser und im Ablauf von Kläranlagen sind nur punktuell und allenfalls aus 24-Stunden-Mischproben gemessen. Zur Entscheidung, ob ein Handlungsbedarf gegeben ist, fehlen kontinuierliche Konzentrationsverläufe mit einer Auflösung von  $\leq 1$  Stunde, aus denen insbesondere die für Selektionsereignisse entscheidenden Konzentrationsspitzen ersichtlich sind.

Hierfür wäre ein Echtzeit-Messsystem äußerst hilfreich, welches nicht so zeit-, arbeits- und kostenintensiv ist wie die gegenwärtig üblichen Verfahren der mit (Tandem) MS gekoppelten HPLC oder GC. Dieses könnte auch die problemstofforientierte Steuerung des Klärprozesses (z.B. Zudosierung Pulveraktivkohle oder Ozon bzw.  $H_2O_2$ ) unterstützen.

Es wäre wert zu untersuchen, ob ein Biosensor auf Antikörper- oder Aptamerbasis empfindlich genug ist, die im Abwasser und in den Kläranlagenkompartimenten zu erwartenden Konzentrationen der Antibiotika zu quantifizieren und gleichzeitig stabil genug unter den aggressiven Bedingungen des Abwassers.

Das Vorliegen zuverlässiger Daten zu den Antibiotikakonzentrationen in den Abwässern könnte auch helfen, Aussagen über die Wirkung dieser Antibiotika zu gewinnen. Beispielsweise könnte, wie bereits bei Bodenbakterien erfolgreich angewendet ([Schmitt, H. et al 2006](#)), mit der PICT-Methode ("pollution-induced community tolerance") untersucht werden, ob die Antibiotika in den vorliegenden Konzentrationen zu Verschiebungen in der Artenzusammensetzung von bakteriellen Gemeinschaften hin zu toleranteren Spezies führen.

### 7.2 Verbesserte Datengrundlage über das Vorkommen pathogener Bakterien im Abwasserpfad

Die derzeit gängigen Verfahren zur Identifizierung pathogener Bakterien auf der Grundlage der Kultivierung in diagnostischen Medien sind zu langsam und aufwendig für große Probenzahlen. Allein schon die Ermittlung der Zahl der Bakterien ist mit den gegenwärtig üblichen Verfahren der Bestimmung koloniebildender Einheiten (cfu) sehr unbefriedigend, weil die relativ niedrigen Zellzahlen im Kläranlagenablauf allenfalls eine grobe Abschätzung der Größenordnung erlauben aber keine statistisch tragfähigen Daten liefern. Noch schwieriger ist die Bestimmung der Bakterienzahl im Permeat einer Mikrofiltermembran, die eine extrem große Anzahl Kulturplatten notwendig macht.

Für die Zellzählung im Abfluss der Kläranlage in den Vorfluter wäre ein "Coulter Counter" (Multisizer 3), wie er von der Firma Beckman-Coulter vertrieben wird, mit einer 20  $\mu m$  Messkapillare die optimale Lösung, die auch statistisch einwandfreie Ergebnisse liefern kann.

Für die Identifizierung und Quantifizierung bestimmter Bakterienarten und mehr oder weniger pathogener Stämme wäre nach dem gegenwärtigen Stand von Wissenschaft und Technik ein PCR-basiertes System die Methode der Wahl, wobei noch geprüft werden muss, ob als Detektionsverfahren ein "real-time"-PCR-System oder ein Biosensor (DNA-Chip) besser geeignet ist.

Letztendlich lassen sich die ausgewählten Verfahren auf ihre Leistungsfähigkeit prüfen durch Anwendung auf:

- Krankenhausabwasser,
- Häusliches Abwasser,
- Industrielles Abwasser (z.B. Schlachtbetriebe),
- Kläranlagenzulauf und -ablauf,

und erlauben damit gleichzeitig eine Bilanzierung der Herkunftspfade der wichtigsten pathogenen bakteriellen Keime in den Oberflächengewässern.

### **7.3 Verbesserte Datengrundlage über das Vorkommen antibiotikaresistenter Bakterien im Abwasserpfad**

Was für pathogene Bakterien gilt, trifft in verschärftem Umfang auch auf antibiotikaresistente Bakterien zu. Ist für antibiotikaresistente pathogene Bakterien das Monitoring wegen der unmittelbaren Bedrohung der Therapierbarkeit leicht einsehbar, ist für nicht pathogene Bakterien ihre Funktion als Reservoir der Resistenzgene für die Pathogene der ausschlaggebende Punkt.

Hier liegt die Schwierigkeit nicht allein in einer für die klassischen mikrobiologischen Verfahren eventuell zu geringen Individuenzahl in manchen Abwasserkompartimenten, sondern auch in einer zu geringen Zuverlässigkeit und Uneindeutigkeit ihrer Ergebnisse.

Für die Identifizierung und Quantifizierung bestimmter Resistenzdeterminanten in Bakteriensolaten aus der Umwelt wäre nach dem gegenwärtigen Stand von Wissenschaft und Technik ein PCR-basiertes System die Methode der Wahl, wobei wahrscheinlich hier als Detektionsverfahren ein Biosensor (DNA-Chip) dem "real-time"-PCR-System überlegen sein dürfte.

Letztendlich lassen sich auch hier die ausgewählten Verfahren auf ihre Leistungsfähigkeit prüfen durch Anwendung auf:

- Krankenhausabwasser,
- Häusliches Abwasser,
- Industrielles Abwasser (z.B. Schlachtbetriebe),
- Kläranlagenzulauf und -ablauf,

und erlauben damit gleichzeitig eine Bilanzierung der Herkunfts- und Verbreitungspfade der wichtigsten bakteriellen Antibiotikaresistenzen in den Oberflächengewässern.

Von besonderer Bedeutung ist hier die Verknüpfung von Antibiotikaresistenzen mit den diese tragenden pathogenen Bakterien um den Abwasserpfad als Verbreitungsweg dieser äußerst problematischen Erreger richtig einschätzen zu können. Hierfür wäre eine Biosensor-Kombination (binärer Biosensor), die sowohl die taxonomische Zuordnung als auch die Erfassung der Resistenzgene erreichen kann, eine unschätzbare Hilfe.

## **7.4 Entwicklung von Verfahren zur Beseitigung von Antibiotika und Bakterien aus Krankenhausabwasser**

Derzeit werden im Auftrag des MUNLV NRW mehrere Forschungsprojekte durchgeführt, bei denen physikalische und chemische Verfahren (z.B. Membranen, UV, Ozon/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Aktivkohle) allein und in Kombination auf ihre Eignung zur Beseitigung problematischer Substanzen, darunter auch Antibiotika, aus Krankenhausabwasser geprüft werden. Durch alle diese Verfahren mit Ausnahme der Aktivkohlebehandlung, wird auch die Population an Bakterien, ob pathogen oder harmlos, ob antibiotikasensitiv oder resistent, beeinflusst.

Die vorliegenden Projektanträge haben gezeigt, dass speziell die Analytik der Arzneimittel den größten Kostenanteil ausmacht. Hier wäre ein schnelles Analysesystem, z.B. auf der Grundlage von Biosensoren, eine große Vereinfachung und könnte bei geringeren Kosten mehr zuverlässige Messwerte pro Zeiteinheit liefern.

In den genannten Projekten werden die mikrobiologischen Fragestellungen, überwiegend aus Kostengründen, ausgeklammert, so dass über die Effizienz der Behandlung gegenüber diesem Bereich keine Erkenntnisse gewonnen werden können. Auch diese Lücke könnte durch geeignete Biosensoren geschlossen werden.

## **7.5 Entwicklung von Verfahren zur Beseitigung von (antibiotikaresistenten) Bakterien aus Kläranlagenabläufen**

Auch wenn es gelingen sollte, die Krankenhausabwässer als bedeutende Punktquellen von Antibiotika und antibiotikaresistenten Bakterien durch geeignete Maßnahmen unschädlich zu machen, bleiben immer noch die diffusen Quellen der häuslichen und z.T. industriellen Abwässer.

Hier sollten am Modellsystem, z.B. in der Halbtechnischen Kläranlage Neuss (HTK Neuss), Untersuchungen durchgeführt werden, in denen einerseits die Effektivität der Maßnahmen zu prüfen und andererseits Aufwand und Kosten zu erheben sind, um in Kosten-Nutzen-Rechnungen die Anwendbarkeit in der Praxis beurteilen zu können.

Gegenüber gestellt werden sollten hier:

- Physikalisch/Chemische Verfahren (Membranen, UV, Ozon/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und
- Biologische Verfahren (z.B. der Einsatz von Protozoen nach der Nachklärung).

Während zu den physikalischen und chemischen Verfahren bezüglich des Abbaus von Problemstoffen schon Daten aus mehreren Forschungsprojekten vorliegen, gibt es noch keine systematischen Untersuchungen zu den Auswirkungen auf die Mikrobiologie.

Die biologischen Verfahren lieferten bisher nur in Laborversuchen viel versprechende Ergebnisse. Könnten sie im Technikum verifiziert werden, wären sie eine kostengünstige Alternative zu den vorgenannten Techniken.

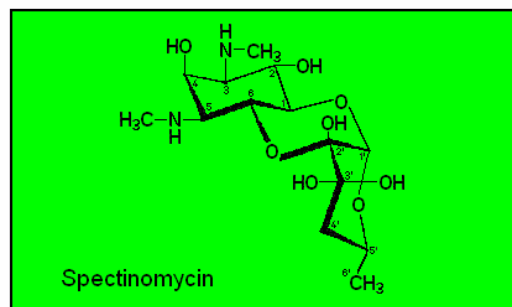
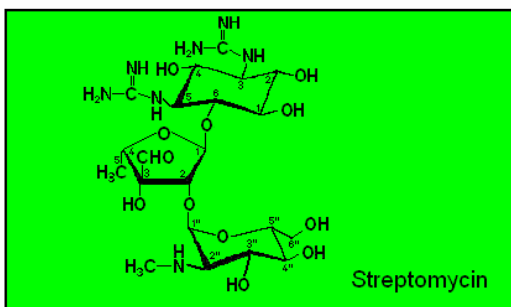
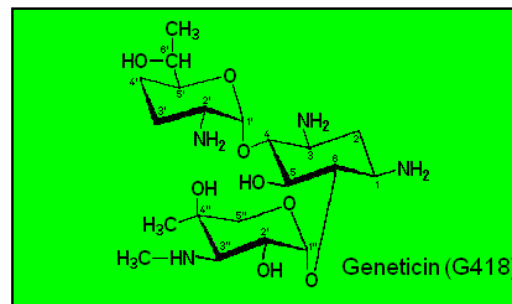
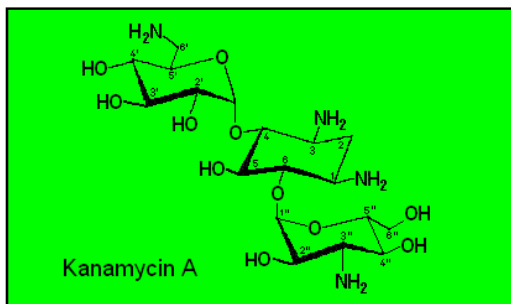
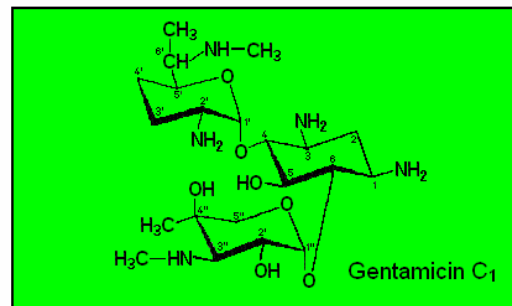
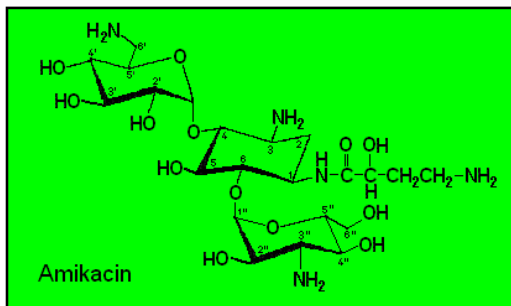
## 8 Strukturen der wichtigsten zitierten Antibiotika

Nachfolgend sind die Strukturen der wichtigsten zitierten Antibiotika (nach [Gräfe, U. 1992](#)) und ([Roth, H.J. & Fenner, H. 1997](#)) als Formelzeichnung dargestellt:

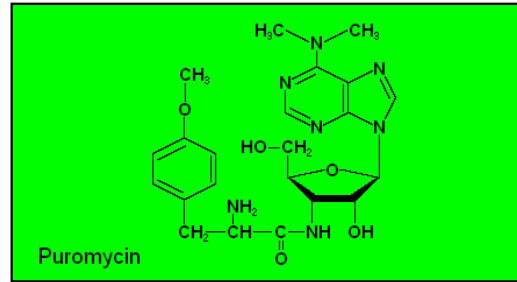
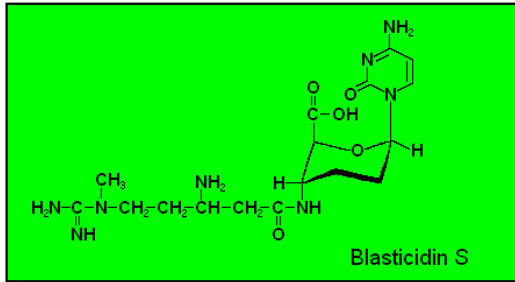
### Farblegende zur Wirkung der Antibiotika

Inhibitoren der bakteriellen Zellwandsynthese
Inhibitoren von Transkription und Replikation
Inhibitoren der Proteinbiosynthese
Inhibitoren von Zellmembranfunktionen
Antimetaboliten

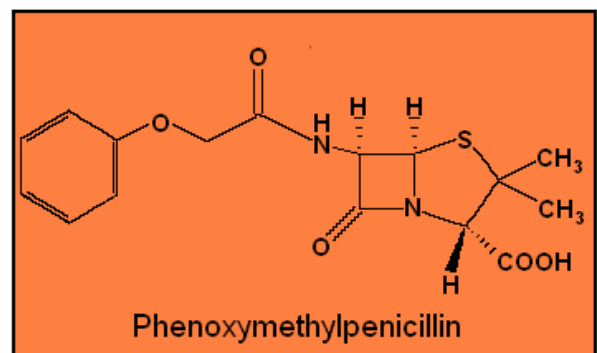
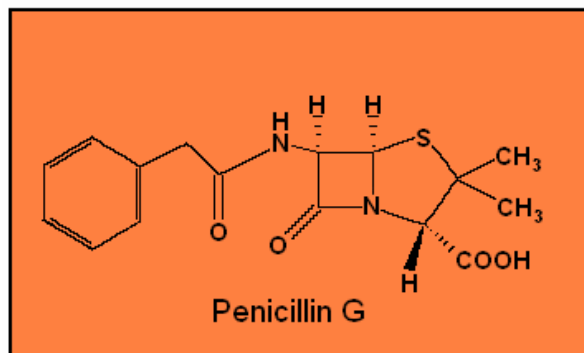
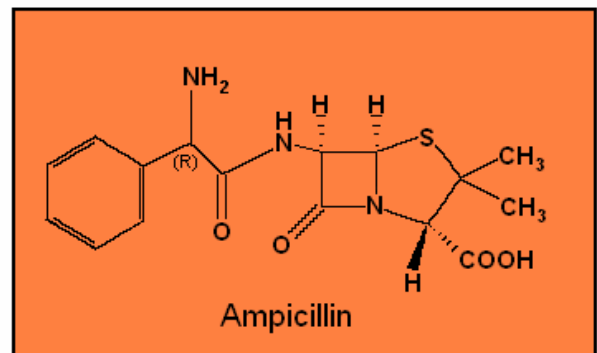
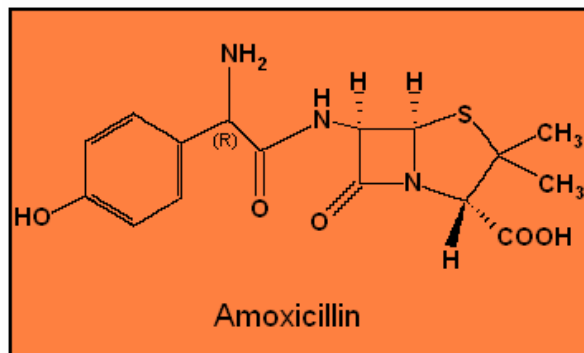
#### Aminoglycosidantibiotika



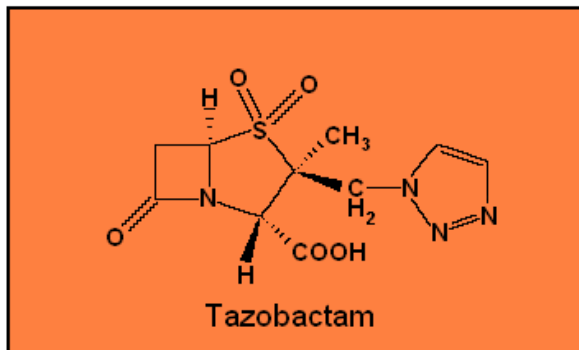
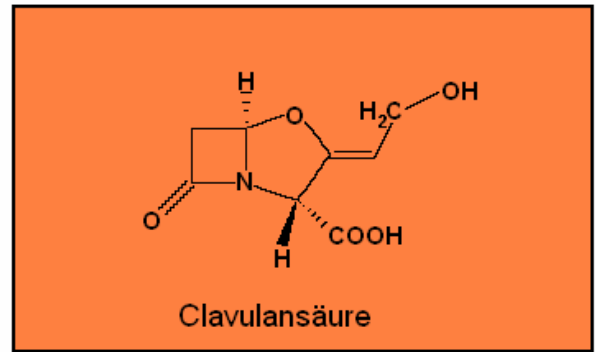
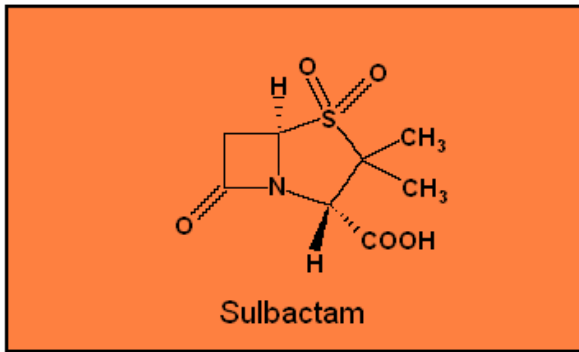
### Nucleosid-Antibiotika



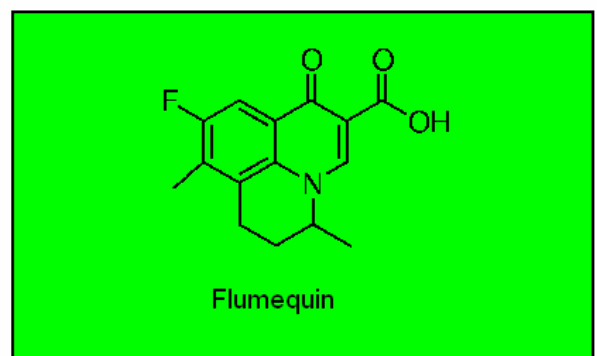
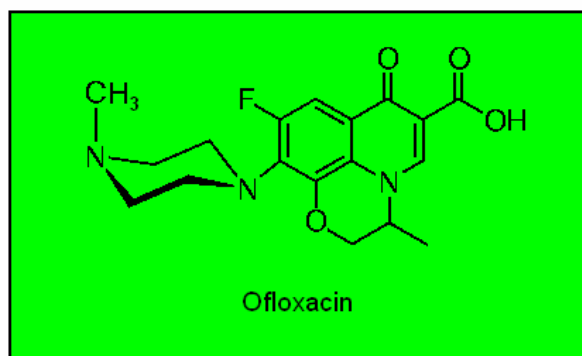
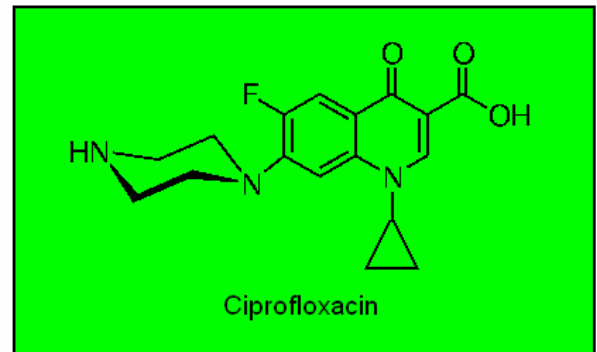
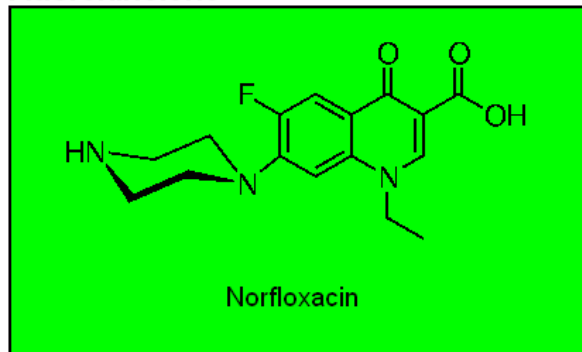
### Penicilline



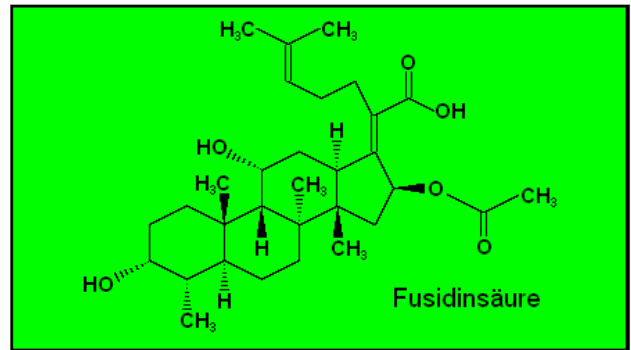
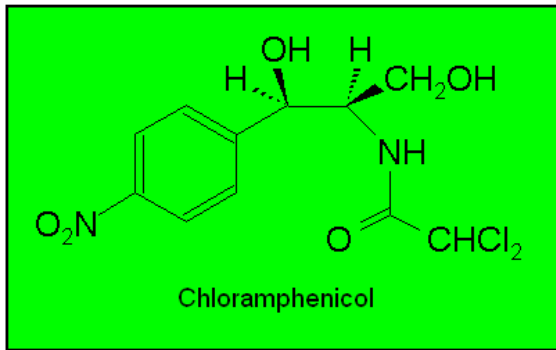
$\beta$ -Lactamasehemmer:



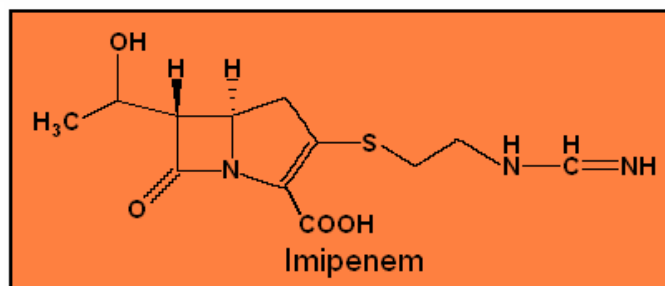
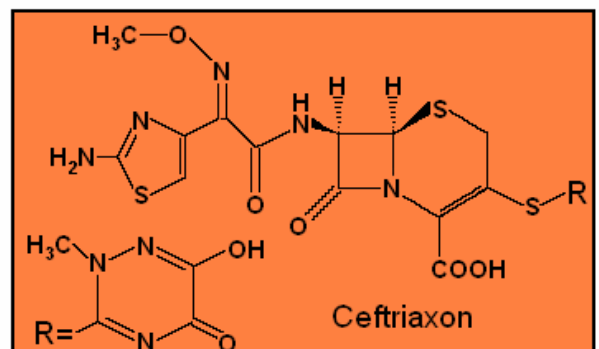
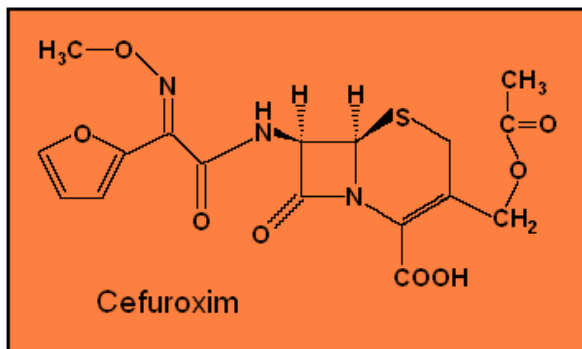
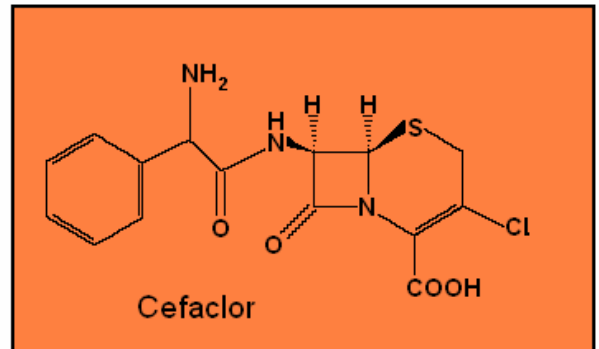
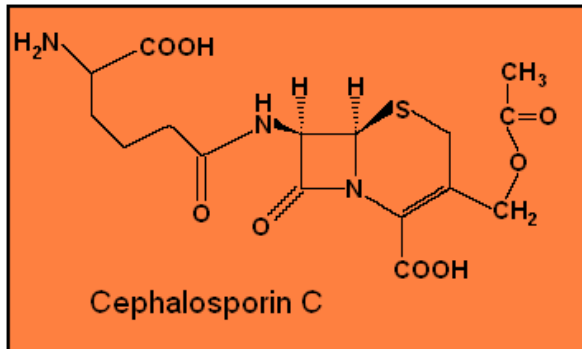
Fluorchinolone



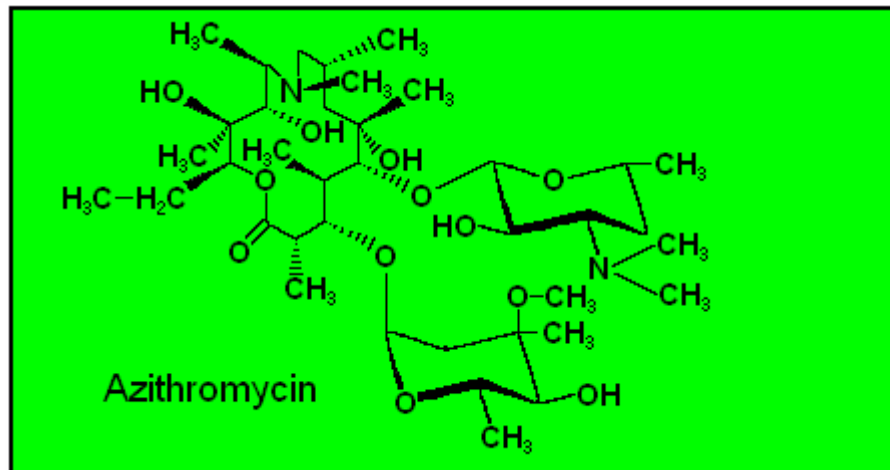
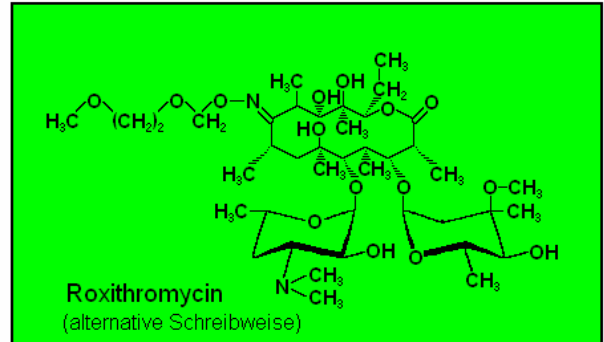
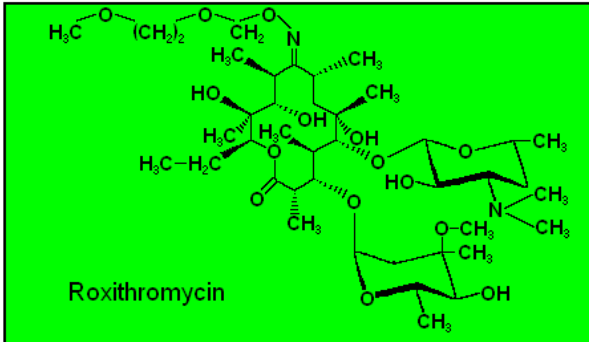
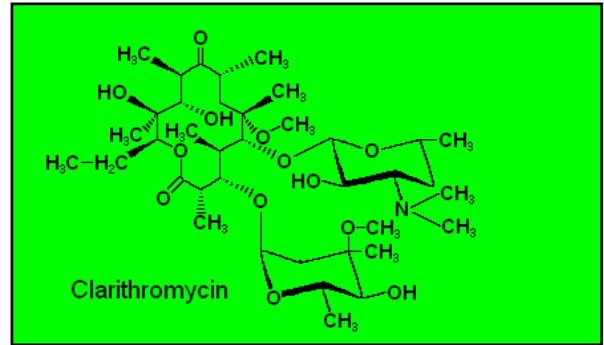
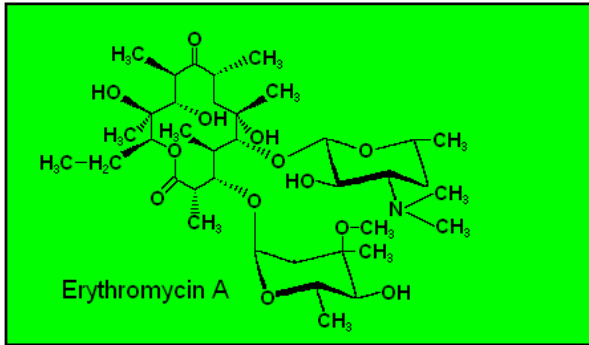




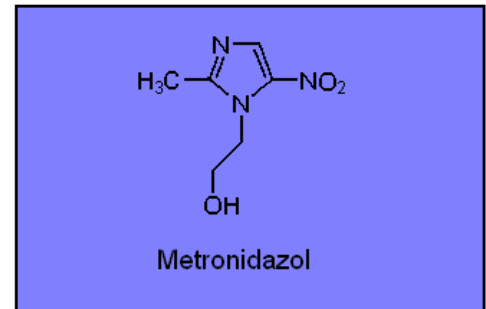
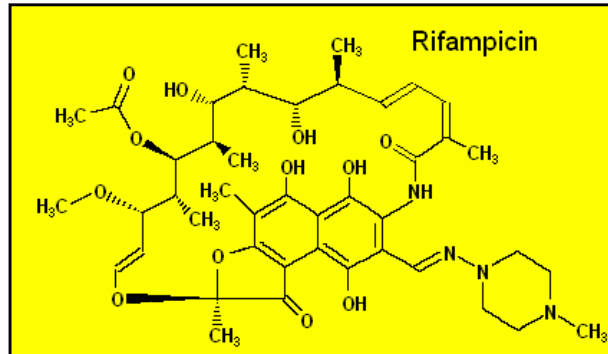
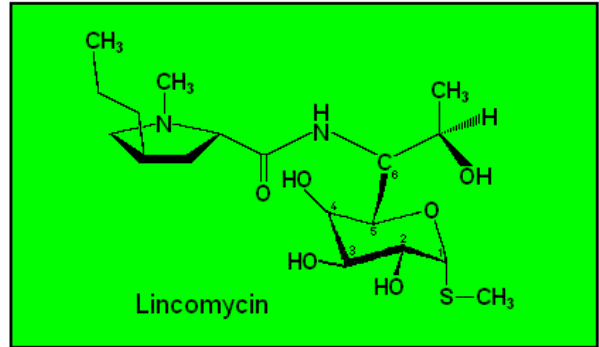
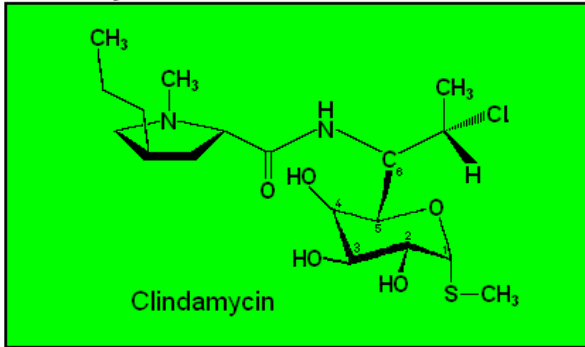
### Cephalosporine



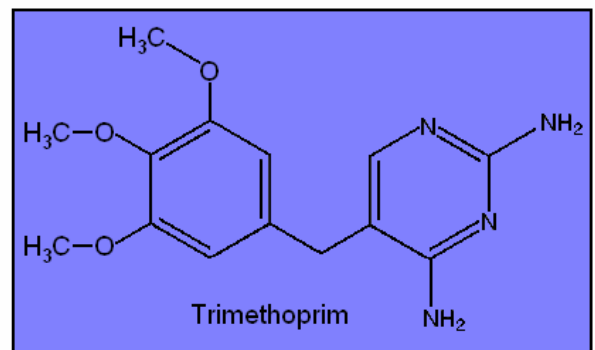
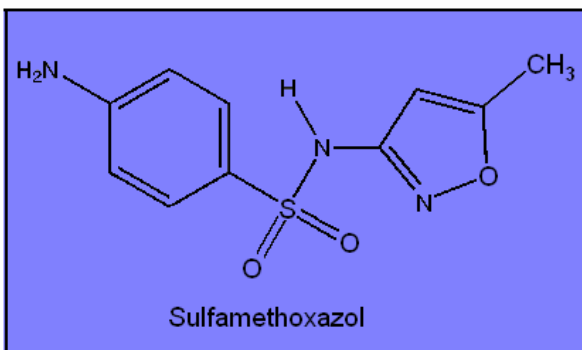
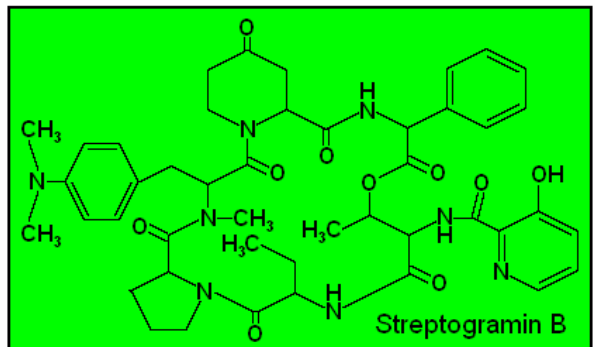
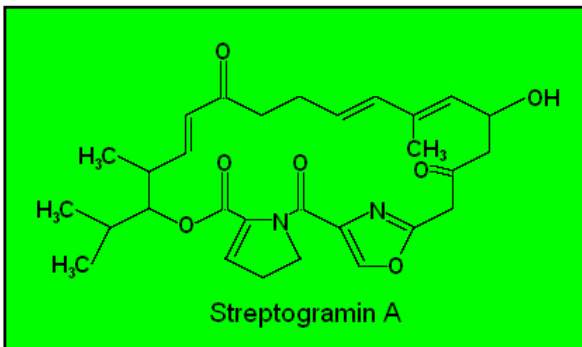
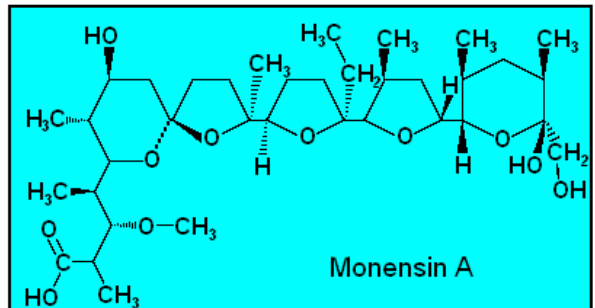
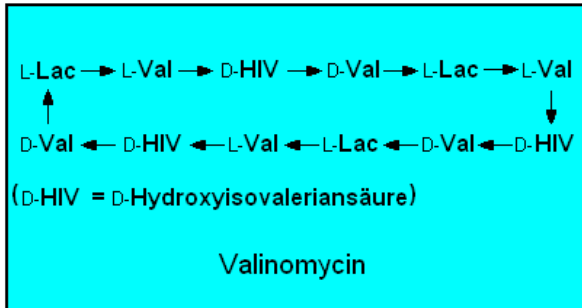
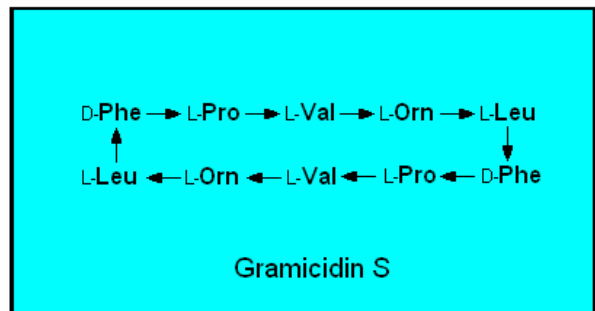
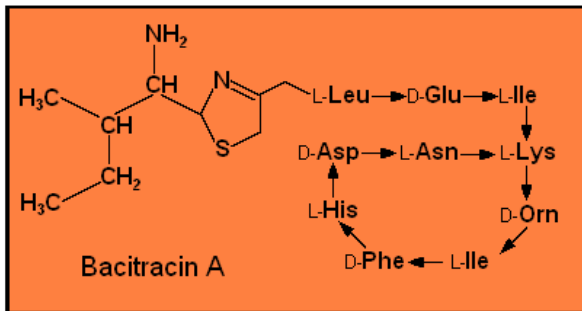
### Polyketid-Antibiotika



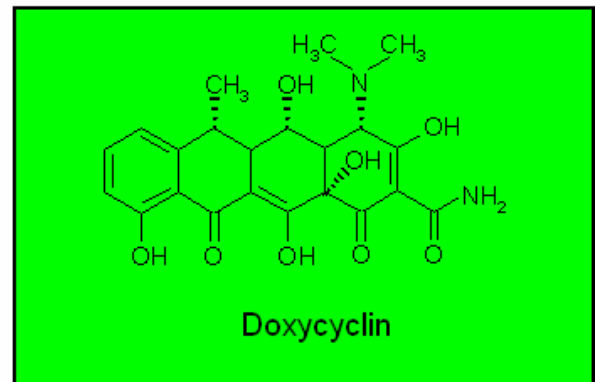
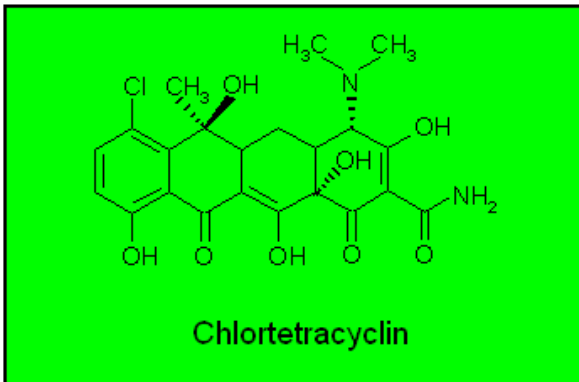
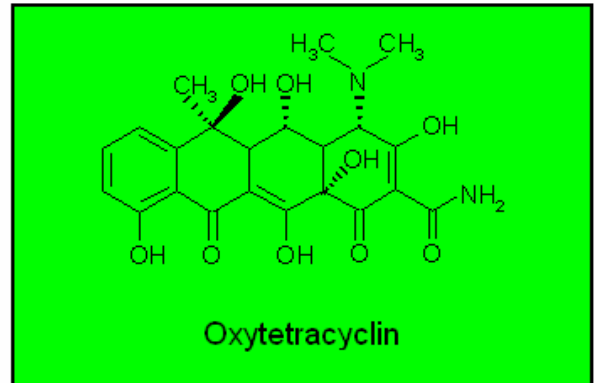
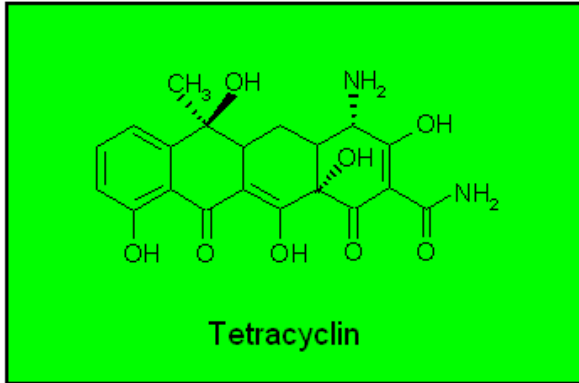
### Lincomycin-Antibiotika



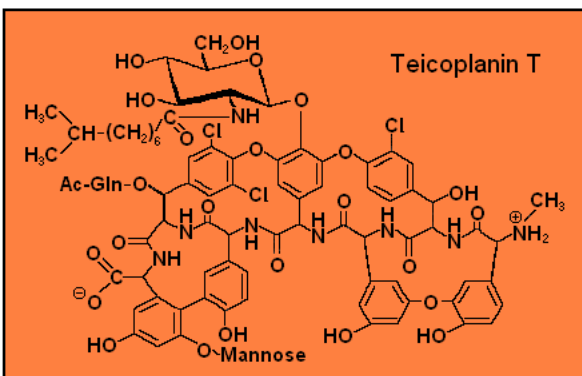
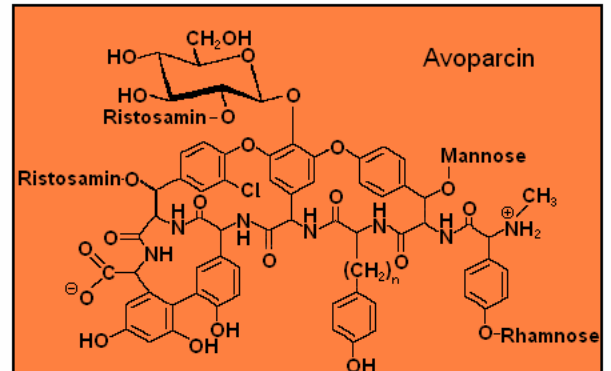
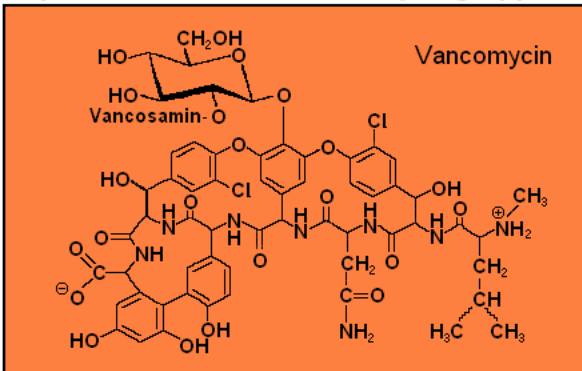
**Peptid- und Polyether-Antibiotika**



## Tetracycline



## Peptidantibiotika der Vancomycingruppe



## 9 Abkürzungen

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
AFLP	(= Amplification Fragment Length Polymorphism) Längenpolymorphismus PCR-amplifizierter DNA-Fragmente
APS	Adenosin-5'-phosphosulfat
ARDRA	(= Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) Restriktionsanalyse PCR-amplifizierter ribosomaler DNA
AR-Faktor	Acetyltransferase reprimierender Faktor
aw-Wert	Wasseraktivität: 0 = absolut trocken, 1 = reines Wasser
bp	Basenpaare; Längenmaß doppelsträngiger DNA- oder RNA-Fragmente
DAF	DNA Amplifikations Fingerprinting, eine Modifikation der AFLP
DNA	(= Deoxyribonucleic Acid) Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
ELISA	"Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay"; ein immunologisches Schnelltestverfahren mit enzymvermittelter Signalverstärkung
EPEC	Enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
ESBL	Erweiterte-Spektrum- $\beta$ (beta-)Lactamasen
FACS	Fluoreszenz-assistiertes Cell-Sorting / Fluoreszenz-aktiviertes Cell-Sorting, ein zur Durchflusszytometrie zu rechnendes Verfahren
FISH	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
FLISA	(=Fluorescent-Linked Immuno-Sorbent Assay), ein immunologisches Schnelltestverfahren mit fluoreszenzmarkiertem Indikatorantikörper
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GC	Gaschromatographie
GC-MS/MS	Gaschromatographie mit nachgeschalteter "tandem"-Massenspektrometrie
GISA	Glycopeptidintermediäre <i>S. aureus</i> (= VISA)
GRE	Glycopeptidresistente Enterokokken (= VRE)
GREF	Glycopeptidresistente <i>Enterococcus faecium</i> (= VREF)
HPLC	(= High Pressure Liquid Chromatography; manchmal auch als "High Performance" LC bezeichnet) Hochdruck-Flüssigchromatographie

HPLC-MS/MS	HPLC mit nachgeschalteter "tandem"-Massenspektrometrie
IDS	(= intergenic dyad sequence) USS-ähnliche DNA-Sequenzen
K <sub>d</sub>	Dissoziationskoeffizient; entspricht der Konzentration eines Liganden, bei der 50% der Bindungsstellen besetzt sind und ist damit ein Maß der Affinität des bindenden Moleküls für den Liganden.
LC/MS-ESI(+)	Flüssigchromatographie (Liquid Chromatography) gekoppelt mit Massenspektrometrie mit positiver Ionen-Elektrospray-Analyse
MBK	minimale bakterizide Konzentration, das ist die geringste Konzentration des Wirkstoffes, welche in vitro einen Erreger abtötet.
MDR	(= Multi-Drug-Resistance) Multidrogenresistenz
MHK	minimale Hemmkonzentration, das ist die geringste Konzentration des Wirkstoffes, welche in vitro das Wachstum eines Erregers hemmt.
MRSA	methicillinresistente Staphylococcus aureus
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
nt	= Nukleotide; Längenmaß einzelsträngiger DNA- oder RNA-Fragmente
PCR	(= Polymerase Chain Reaction) Polymerase Kettenreaktion
PFGE	"Pulsed-Field" Gelelektrophorese
PICT	(="Pollution-Induced Community Tolerance") durch Umweltgifte verursachte Verschiebungen in der Artenzusammensetzung von bakteriellen Gemeinschaften hin zu toleranteren Spezies
RAPD	(= Random Amplified Polymorphic DNA) Polymorphismus nach dem Zufallsprinzip amplifizierter DNA
rDNA	Gene, welche für die rRNAs (ribosomale Ribonukleinsäuren) kodieren
RFEL	(=Restriction Fragment End Labeling) Restriktionsfragment-Endmarkierung
RFLP	(= Restriction Fragment Length Polymorphism) Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNA	(= Ribonucleic Acid) Ribonukleinsäure
RP-HPLC	(= Reversed Phase - High Pressure Liquid Chromatography) Hochdruck Flüssigchromatographie mit hydrophober stationärer Phase
rRNA	(= ribosomal Ribonucleic Acid) ribosomale Ribonukleinsäure(n): 5S, 16S, 23S bei Bakterien
SCC <sub>mec</sub>	(= Staphylococcal Cassette Chromosome <i>mec</i> ) <i>mecA</i> -Gen enthaltende Resistenzgenkassetten in MRSA

SD	(Standard Deviation) Standardabweichung vom Mittelwert
SELEX	= Systematische Evolution von Liganden durch EXponentielle Anreicherung; Verfahren, das zur Herstellung von Aptameren eingesetzt wird.
SIM	(= Selected Ion Monitoring) Monitoring selektierter Ionen bei der Massenspektrometrie
SPE	(= Solid Phase Extraction) Festphasenextraktion
tRNA	(= transfer Ribonucleic Acid) transfer-Ribonukleinsäure
USS	(= uptake signal sequence) spezifische Basenabfolge in einem DNA-Fragment, welche dessen Aufnahme in die Zelle und Inkorporation ins Genom durch Rekombination fördert.
UV	Ultraviolettes Licht
VBNC	(= viable but not culturable) Bakterien: Lebensfähig aber nicht kultivierbar.
VRE	Vancomycinresistente Enterokokken (= GRE)
VREF	Vancomycinresistente <i>Enterococcus faecium</i> (= GREF)
VISA	Vancomycin-intermediäre <i>Staphylococcus aureus</i> (= GISA)
ZKBS	Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (gem. § 4 GenTG)





## 10 Definitionen

<b>Begriff</b>	<b>Definition</b>
Antibiotika	<p>sind nach der von S.A. Waksman 1949 geprägten Definition "niedermolekulare Stoffwechselprodukte (Metabolite) von Mikroorganismen mit einer Molmasse &lt;2000 Da, die in niedrigen Konzentrationen (&lt;&lt;200 µg/ml) das Wachstum anderer Mikroorganismen inhibieren, jedoch auf den Produzenten selbst nicht wirken." Sie bilden eine, hinsichtlich ihrer chemischen Struktur und biologischen Wirkung, heterogene Gruppe von Verbindungen, deren Vertreter heutzutage zu den in der Human- und Veterinärmedizin am meisten angewandten Therapeutika zählen. Nicht zu den Antibiotika gehören nach dieser Definition antibakterielle Enzyme und chemisch hergestellte Desinfektionsmittel ("Biozide"), und ebenso niedermolekulare bioaktive Metaboliten wie Mykotoxine, die toxisch auf höhere Organismen (Säuger) einwirken .</p> <p>Die ursprüngliche Definition musste inzwischen aufgeweitet werden, weil z.B. Peptidantibiotika teilweise erheblich größere Molmassen besitzen und teilsynthetische Derivate und vollsynthetische Analoga verschiedener Antibiotika große Wirksamkeit besitzen, obwohl sie (so) nicht von Mikroorganismen gebildet werden (Gräfe, U. 1992).</p>
Antigen	<p>Molekül, gegen das im Organismus eines Säugetiers spezifische Antikörper gebildet werden können.</p>
DNA-Array	<p>Das Wort "Array" bedeutet Aufstellung, Anordnung in Reihe und Glied (militärisch) aber auch Ausstellung (Schaufenster). Bei einem DNA-Array sind bestimmte DNA-Moleküle, z.B. Gensonden oder Aptamere, geordnet auf einem Trägermaterial (z.B. Quarz, Glas, Silikon, Gold, Plastik) fixiert und zwar in Feldern identischer Moleküle, die i.d.R. schachbrettartig angeordnet sind. Bei Microarrays sind die Felder (auch Punkte oder Spots) sehr klein, so dass auf einem cm<sup>2</sup> bis zu 200.000 von ihnen untergebracht werden können. Bei Makroarrays sind die Felder größer, mit maximal 100 pro cm<sup>2</sup>.</p>
Efflux-Pumpen	<p>In die Cytoplasmamembran integrierte Proteine, welche unter Energieverbrauch (z.B. ATP-Spaltung, Protonen-Antiport oder Kationen-syn- bzw. antiport) Substanzen (z.B. Drogen, insbesondere Antibiotika) aus der Zelle heraustransportieren. So kodieren die Tetracyclin-Resistenzgene vom Tet A-Typ Proteine von ca. 46 kDa mit 12 hydrophoben membran-durchspannenden Regionen, die durch kurze hydrophile Sequenzen separiert werden. Sie sind Antiporter, die für jedes herausgepumpte Tetracyclinmolekül ein Proton einströmen lassen.</p>
Epitop	<p>kleinste strukturelle Einheit eines Antigens, die von einem zugehörigen Antikörper spezifisch erkannt werden kann.</p>
Exzimer (engl.: excimer)	<p>ein Edelgashalogenid wie KrCl oder ein Halogen wie Cl<sub>2</sub>, welches bei Anregung durch Mikrowellenbestrahlung ein Niederdruck-Plasma</p>

bildet und dabei durch Exzimer-Emission mit hoher Effizienz Licht im ultraviolettten Bereich zwischen 222 und 289 nm erzeugt. Die Wahl des Exzimers bestimmt die emittierte Wellenlänge der UV-Lichtquelle.

**Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)** Wichtige Methode zur Quantifizierung von Molekülinteraktionen:

Jedes der beiden zu untersuchenden Makromoleküle ist mit einem Fluorophor markiert, bei denen die Anregungswellenlänge des einen mit der Emissionswellenlänge des anderen übereinstimmt. Sind beide Makromoleküle nicht assoziiert, wird bei Stimulation mit der Anregungswellenlänge des ersten Fluorophors nur Emission bei dessen eigener Wellenlänge beobachtet. Im Falle der Assoziation kommt es zur Resonanz, d.h. in Abhängigkeit von der Nähe der beiden Fluorophore zueinander (Quantenausbeute) und der Anzahl molekularer Interaktionen emittiert das zweite Fluorophor bei seiner spezifischen längeren Wellenlänge.

**Gyrasen, DNA-Gyrasen** Die DNA-spezifische Topoisomerase Typ II wird auch als Gyrase bezeichnet. Werden Gyrasen gehemmt, z.B. durch Chinolonantibiotika, können die Prozesse, die einer DNA-Entdrillung bedürfen, nicht mehr ablaufen und es kommt zum Wachstumsstillstand.

**immunkompromittiert (engl.: immunocompromised)** bezeichnet eine verminderte Aktivität der Immunabwehr, z.B. in einem Patienten unter immunsuppressiver Behandlung oder mit AIDS nach HIV-Infektion aber auch während und nach Infektionen mit Influenza-Viren oder Epstein-Barr-Virus.

**Kokzidiostatika** Antibiotika, die Nutztieren (Wiederkäuer, Pferde, Schweine, Kaninchen, vor allem aber Geflügel) zur Vorbeugung gegen oder Bekämpfung von Infektionen mit einzelligen Parasiten der Darmwand (Protozoa, Apicomplexa, *Eimeriidae*), z.B. *Eimeria* spp., verabreicht werden. *Eimeriidae* werden durch Oozysten aus Kot oral übertragen. In Nutztierbeständen weit verbreitet.

**Leistungsförderer** (auch "Wachstumsförderer") bezeichnet Antibiotika, die in der Tierhaltung als Futtermittelzusatzstoff in subtherapeutischer Dosierung verabreicht werden. Ihre positiven Effekte auf die Gewichtszunahme sind wissenschaftlich nicht geklärt.

**Makroarray (auch Macroarray)** DNA-Arrays (s.d.) oder Protein-Arrays (z.B. Antikörper), mit relativ großen Feldern ("Spots"), so dass nur maximal 100 pro cm<sup>2</sup> untergebracht werden können (Vgl. "Microarray").

**metaphylaktische Behandlung** Maßnahmen in der Tierhaltung und Tiermast: Behandlung des ganzen Bestands mit Antibiotika bei nur einem oder wenigen erkrankten Tieren zur Verhinderung der Ausbreitung.

**Microarray (selten: Mikroarray)** DNA-Arrays (s.d.) oder Protein-Arrays (z.B. Antikörper), mit sehr kleinen Feldern (auch "Punkte" oder "Spots"), so dass auf einem cm<sup>2</sup> bis zu 200.000 von ihnen untergebracht werden können (Vgl. "Makroarray").

- molecular beacon "molekulares Leuchtfeuer": Ein fluorometrisches Verfahren, bei dem in Abwesenheit des zu detektierenden Moleküls das Fluorophor und ein Quencher in engem Kontakt liegen, so dass die Fluoreszenz des Fluorophors unterdrückt wird. In Anwesenheit des Analyten werden Fluorophor und Quencher auf Distanz gebracht und eine Fluoreszenz wird messbar.
- Monoklonale Antikörper Antikörperpräparation, die nur ein einziges Epitop eines bestimmten Antigens erkennt; wird von einem Zellklon gebildet, der durch Amplifikation eines einzigen mittels Hybridoma-Technik immortalisierten antikörperproduzierenden B-Lymphozyten entstanden ist.
- nosokomiale Infektionen Infektionen, die in Krankenhäusern erworben werden.
- Pathogenität krankmachendes Potential eines Mikroorganismus, das vom Vorhandensein einer bestimmten genetischen Ausstattung (Pathogenitätsfaktoren im Genotyp) abhängig ist. Das Ausmaß der Ausprägung der krankmachenden Wirkung (Phänotyp) ist aber von Vorhandensein und Eigenschaften von sog. Virulenzfaktoren abhängig. Ein pathogener Mikroorganismus kann also entweder virulent oder avirulent sein. (s.a. Virulenz).
- PCR-Primer kurzes einzelsträngiges DNA-Fragment bekannter (oder als "random primer" unbekannter) Sequenz, welches aufgrund der Homologie an die mittels PCR zu amplifizierende DNA bindet und den Startpunkt für die DNA-Polymerase bildet. Man benötigt einen Primer für das 3'-Ende des kodierenden DNA-Stranges und einen Primer für das 3'-Ende des antikodierenden DNA-Stranges. Nach der Amplifikation bilden die beiden Primer (und ihre komplementären Kopien) die beiden Enden des amplifizierten DNA-Doppelstranges.
- pleiotrope Resistenzen Resistenzen gegen mehrere unterschiedliche Antibiotika, wie sie z.B. durch unspezifische Effluxpumpen (MDR) bewirkt werden können.
- Prävalenz Prävalenz ist der prozentuelle Anteil der klinischen Isolate bzw. der Wasserproben an einer Entnahmestelle, aus denen antibiotikaresistente Bakterien isoliert wurden ([Heier, H. 1983](#)).
- Reserveantibiotika Antibiotika, die (nur) dann zum Einsatz kommen, wenn der den Patienten infizierende pathogene Keim nicht auf die für ihn normalerweise wirksamen Antibiotika anspricht. Um diese "Waffe der letzten Zuflucht" nicht durch Resistenzentwicklung stumpf werden zu lassen sollten Reserveantibiotika nur dann eingesetzt werden, wenn dies wirklich unumgänglich ist.
- Resistenzquotient Resistenzquotient ist der Anteil der antibiotikaresistenten Bakterien an der Gesamtpopulation (Auszählen der Keimzahlen aus Kulturen mit und ohne Zusatz des entsprechenden Antibiotikums) ([Heier, H. 1983](#)).
- Restriktionsendonuklease Enzym, welches DNA-Doppelstränge in ihrem Inneren spaltet und zwar ausschließlich bei bestimmten Basensequenzen. Diese Erkennungsmotive sind zwischen vier und zehn Basen lang und in der Regel Pa-

lindrome, d.h. ihre Basenfolge auf Strang und Gegenstrang ist identisch. Methylierung einer Base kann die Erkennung der Schnittstelle verhindern.

- stemloop-Konformation      DNA- oder RNA-Einzelstrang, dessen 3'- und 5'-Ende zueinander komplementär sind und durch Hybridisierung einen Doppelstrang (= Stamm / "stem") bildet, während der einzelsträngige Abschnitt dazwischen eine Schleife ("loop") formt.
- Topoisomerase, DNA-Topoisomerase      DNA Doppelstränge liegen in der lebenden Zelle nicht nur in der bekannten Doppelhelix vor, sondern sind zur dichteren Packung noch weiter verdrillt ("Superhelix"). Für alle enzymatischen Arbeiten an dieser DNA, z.B. Replikation, Transkription oder Reparatur, muss sie vorher entdrillt werden; diese Funktion wird von den Topoisomerasen, Enzymen, die DNA-Stränge spalten und wieder ligieren können, erfüllt. Jede Zelle verfügt über mehrere Typen von Topoisomerasen mit unterschiedlichem Aufgabenbereich (Typen I bis IV), darunter auch solche für die Entdrillung von RNA-Doppelsträngen.
- VBNC      (= viable but not culturable) Bakterien in einer Probe, die zwar (noch) lebensfähig / vital sind, sich aber unter den gegebenen Kulturbedingungen nicht vermehren lassen. Häufig befinden sich solche Bakterien in einer Ruhephase, aus der sie spontan wieder erwachen und eine Infektion hervorrufen können.
- Virulenz      Ausprägung der krankmachenden Wirkung (Phänotyp) eines pathogenen Mikroorganismus, die vom Vorhandensein und Eigenschaften einer bestimmten genetischen Ausstattung (sog. Virulenzfaktoren) abhängig ist. Ein pathogener Mikroorganismus kann also entweder virulent oder avirulent sein. (s.a. Pathogenität)
- Wachstumsförderer      siehe "Leistungsförderer"

## 11 Literaturverzeichnis

- Abbott, A. (2005) Abbott, A. (2005) Medics braced for fresh superbug; Nature 436, 758
- Acar, J.F. et al. (1993) Acar, J.F., O'Brien, T.F., Goldstein, F.W. & Jones, R.N. (1993) The epidemiology of bacterial resistance to quinolones; Drugs 45 Suppl. 3, 24-28
- AG MMM (2000) Arbeitsgruppe nach § 35 LMBG "Molekularbiologische Methoden - Mikrobiologie" (2000) Nachweis von *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* in Lebensmitteln durch Amplifizierung spezifischer Gensequenzen mit der Polymerase-Kettenreaktion; Bundesgesundhbl. - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz 43, 816-824
- Agah, A. et al. (2004) Agah, A., Aghajan, M., Mashayekhi, F., Amini, S., Davis, R.W., Plummer, J.D., Ronaghi, M. & Griffin, P.B. (2004) A multienzyme model for pyrosequencing; Nucl. Acids Res. 32, e166 1-15
- Ahmadian, A. et al. (2006) Ahmadian, A., Ehn, M. & Hober, S. (2006) Pyrosequencing: history, biochemistry and future; Clin. Chim. Acta 363, 83-94
- Aires de Sousa, M. & de Lencastre, H. (2003) Aires de Sousa, M. & de Lencastre, H. (2003) Evolution of sporadic isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals and their similarities to isolates of community-acquired MRSA; J. Clin. Microbiol. 41, 3806 - 3815
- Aires de Sousa, M. & de Lencastre, H. (2004) Aires de Sousa, M. & de Lencastre, H. (2004) Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones; FEMS Immunol. Med. Microbiol. 40, 101 - 111
- Aires de Sousa, M. et al. (2005) Aires de Sousa, M., Conceicao, T., Simas, C. & de Lencastre, H. (2005) Comparison of genetic backgrounds of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from Portuguese hospitals and the community; J. Clin. Microbiol. 43, 5150 - 5157
- Al-Ahmad, A. et al. (1999) Al-Ahmad, A., Daschner, F.D. & Kümmerer, K. (1999) Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin G, and sulfomethoxazole and inhibition of waste water bacteria; Arch. Environ. Contam. Toxicol. 37, 158-163
- Alexy, R. (2003) Alexy, R. (2003) Antibiotika in der aquatischen Umwelt: Eintrag, Elimination und Wirkung auf Bakterien; Dissertation (Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg)
- Alexy, R. & Kümmerer, K. (2005) Alexy, R. & Kümmerer, K. (2005) Antibiotika in der Umwelt; KA – Abwasser, Abfall 52, 563-571
- Alexy, R. et al. (2004) Alexy, R., Kümpel, T. & Kümmerer, K. (2004) Assessment of degradation of 18 antibiotics in the closed bottle test; Chemosphere 57, 505-512

Altherr, M.R. & Kasweck, K.L. (1982) Altherr, M.R. & Kasweck, K.L. (1982) In situ studies with membrane diffusion chambers of antibiotic resistance transfer in *Escherichia coli*; *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 838-843

Amann, R.I. et al. (1990) Amann, R.I., Binder, B.J., Olsen, G.J., Sallie, W., Chisolm, R.D. & Stahl, D.A. (1990) Combination of 16S rRNA targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analysis of mixed microbial populations; *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1919-1925

Anderson, E.S. (1975) Anderson, E.S. (1975) Viability of, and transfer of a plasmid from, *E. coli* K12 in the human intestine; *Nature* 255, 502-504

Anderson, J.D. et al. (1973) Anderson, J.D., Gillespie, W.A. & Richmond, M.H. (1973) Chemotherapy and antibiotic-resistance transfer between enterobacteria in the human gastrointestinal tract; *J. Med. Microbiol.* 6, 461-473

Angus, B.L. et al. (1982) Angus, B.L., Carey, A.M., Caron, D.A., Kropinski, A.M.B. & Hancock, R.E.W. (1982) Outer membrane permeability in *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of a wild-type with an antibiotic supersusceptible mutant; *Antimicrob. Agents Chemother.* 21, 299-309

Anonymus (2005) Anonymus (2005) Funding for bacteria sensors; *Euro. Biotech. News* 4, 8

Applied Biosystems (2005) Applied Biosystems (2006) Application Note MLST: A fast, accurate, and automated workflow for Multi Locus Sequence Typing of bacterial isolates; [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)

Arens, J. et al. (1993) Arens, J., Zschocke, C. & Hahn, J. (1993) Zur Abschätzung des Risikopotentials bei der Einleitung gentechnisch veränderter Mikroorganismen in Abwasser; *Korrespondenz Abwasser* 40 (9), 1486-1491

Austin, D.J. et al. (1997) Austin, D.J., Kakehashi, M. & Anderson, R.M. (1997) The transmission dynamics of antibiotic-resistant bacteria: the relationship between resistance in commensal organisms and antibiotic consumption; *Proc. R. Soc. Lond. B* 264, 1629-1638

Balaban, N.Q. et al. (2004) Balaban, N.Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L. & Leibler, S. (2004) Bacterial persistence as a phenotypic switch; *Science* 305, 1622-1625

Balitzki-Korte, B. et al. (2005) Balitzki-Korte, B., Anslinger, K., Bartsch, C. & Rolf, B. (2005) Species identification by means of pyrosequencing the mitochondrial 12S rRNA gene; *Int. J. Legal Med.* 119, 291-294

Balck, A. (2006) Aufbau und Charakterisierung eines Quarzresonator-Sensors zur Quantifizierung von Fermentationsprodukten, Diplomarbeit, Institut für Mikrotechnik, TU Braunschweig

Balck, A. et al. (2006) Balck, A., Michalzik, M., Demming, S. & Büttgenbach, S. (2006) Miniaturisierter Quarzsensor für die Online-Analytik in Flüssigkeiten; *Colloquium Produktionsintegrierte Wasser-/Abwassertechnik - Bremen 2006: Tagungsband C-53-C-71*

- Bao, K. & Cohen, S.N. (2004) Bao, K. & Cohen, S.N. (2004) Reverse transcriptase activity innate to DNA polymerase I and DNA Topoisomerase I proteins of *Streptomyces* telomere complex; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 14361-14366
- Barrow, P.A. & Soothill, J.S. (1997) Barrow, P.A. & Soothill, J.S. (1997) Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential; Trends Microbiol. 5, 268-271
- Bartlett, D.H. & Azam, F. (2005) Bartlett, D.H. & Azam, F. (2005) Chitin, cholera, and competence; Science 310, 1775-1777
- Bassam, B.J. et al. (1992) Bassam, B.J., Caetano-Anollés, G. & Gresshoff, P.M. (1992) DNA amplification fingerprinting of bacteria; Appl. Microbiol. Biotech. 38, 70-76
- Beaber, J.B. et al. (2004) Beaber, J.B., Hochhut, B. & Waldor, M.K. (2004) SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes; Nature 427, 72-74
- Beck, F. et al. (1982) Beck, F., Ludwig, G., Auerswald, E. A., Reiss, B. & Schaller, H. (1982) Nucleotide sequence and exact localisation of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5; Gene 19, 327-336
- Behr, M.A. et al. (1999) Behr, M.A., Wilson, M.A., Gill, W.P., Salamon, H., Schoolnik, G.K., Rane, S. & Small, P.M. (1999) Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray; Science 284, 1520-1523
- Bendinger, B. et al. (2005) Bendinger, B., Botzenhart, K., Feuerpfeil, I., Kohlen, W., Meyer, J., Obst, U., Preuss, G., Schwartz, T., Szewzyk, U., Volkmann, H., Wingender, J. & Zullei-Seibert, N. (2005) Wie sind molekularbiologische Methoden sinnvoll in die Trinkwasseranalytik zu integrieren? Wasser Abwasser 146, 466-469
- Bendt, T. et al. (2002) Bendt, T., Pehl, B., Gehrt, A. & Rolfs, C.-H. (2002) Antibiotikaresistente Keime in einem Klärwerk; KA - Wasserwirtschaft, Abwasser, Abfall 49, 49-56
- Bennett, A.D. & Shaw, W.V. (1983) Bennett, A.D. & Shaw, W.V. (1983) Resistance to fusidic acid in *Escherichia coli* mediated by the type I variant of chloramphenicol acetyltransferase; Biochem. J. 215, 29-38
- Benveniste, R. & Davies, J. (1973) Benveniste, R. & Davies, J. (1973) Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in Actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2276-2280
- Bergemann, K. (1993) Bergemann, K. (1993) Entsorgung von rekombinanten Zellkulturen: Inaktivierung von Zellen und DNA; in Schriftenreihe des Fonds der Chemischen Industrie - Heft 32: Informationsband "Sicherheitsforschung in der Biotechnologie", Frankfurt 1993, 47-59
- Bergmann, A. (2004) Bergmann, A. (2004) Arzneimittelrückstände im Wasser; Umweltmagazin Juni 2004, 40-41



- Bergmann, A. et al. (2003) Bergmann, A., Föhrmann, R., Kistemann, T. & Stalleicken, I. (2003) Hygienische Bewertung: Belastetes Grundwasser durch belastetes Oberflächenwasser; bbr 10/03, 36-45
- Biswas, B. et al. (2002) Biswas, B., Adhya, S., Washart, P., Paul, B., Trostel, A.N., Powell, B., Carlton, R. & Merrill, C.R. (2002) Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*; Infect. Immun. 70, 204-210
- Björkholm, B. et al. (2001) Björkholm, B., Sjölund, M., Falk, P.G., Berg, O.G., Engstrand, L. & Andersson, D.I. (2001) Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 14607 - 14612
- Björkman, J. et al. (1998) Björkman, J., Hughes, D. & Andersson, D.I. (1998) Virulence of antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 3949-3953
- BLAC (2003) Bund/Länderausschuss für Chemikaliensicherheit (BLAC): Arzneimittel in der Umwelt – Auswertung der Untersuchungsergebnisse; Bericht an die 61. Umweltministerkonferenz am 19./20.11.2003 in Hamburg
- Blazquez, J. (2003) Blazquez, J. (2003) Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance; Clin. Infect. Diseases 37, 1201 – 1209
- Blochlinger, K. & Diggelmann, H. (1984) Blochlinger, K. & Diggelmann, H. (1984) Hygromycin B phosphotransferase as a selectable marker for DNA transfer experiments with higher eukaryotic cells; Mol. Cell. Biol. 4, 2929-2931
- Bochner, B.R. (1989) Bochner, B.R. (1989) Sleuthing out bacterial identities; Nature 339, 157-158
- Bochner, B.R. (1993) Bochner, B.R. (1993) Identification of environmental bacteria; Pharmaceutical Manufacturing International 1993
- Bohnert, M.G. et al. (1988) Bohnert, M.G., D'Hauteville, H.M. & Sansonetti, P. (1988) Detection of enteric pathotypes of *Escherichia coli* by hybridization using six DNA-probes; Annal. Inst. Pasteur/Microbiol. 139, 189-202
- Böttcher, I. et al. (1992) Böttcher, I., Stelzer, W. & Lenk, T. (1992) Antibiotikaresistente koliforme Bakterien in Abwasser und Gülle einer Milchviehanlage; Bundesgesundhbl. 35, 65-69
- Bouma, J.E. & Lenski, R.E. (1988) Bouma, J.E. & Lenski, R.E. (1988) Evolution of a bacteria/plasmid association; Nature 335, 351-352
- Brepols, C. & Engelhardt, N. (2004) Brepols, C. & Engelhardt, N. (2004) Erfahrungen mit einer großtechnischen Membranbelebungsanlage; GIT Labor-Fachzeitschrift 48, 927-929
- Bridges, B.A. (1997) Bridges, B.A. (1997) Hypermutation under stress; Nature 387, 557-558

- Brown, J.S. et al. (2001) Brown, J.S., Gilliland, S.M. & Holden, D.W. (2001) A *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity island encoding an ABC transporter involved in iron uptake and virulence; Mol. Biol. 40, 572-585
- Bruno, J.G. & Kiel, J.L. (1999) Bruno, J.G. & Kiel, J.L. (1999) In vitro selection of DNA aptamers to anthrax spores with electrochemiluminescence detection; Biosens. Bioelectronics 14, 457-464
- Burdett, V. et al. (1982) Burdett, V., Inamine, J. & Rajagopalan, S. (1982) Heterogeneity of tetracycline resistance determinants in *Streptococcus*; J. Bacteriol. 149, 995-1004
- Burger, G. (1990) Burger, G. (1990) Zur Inaktivierung von Erregern übertragbarer Krankheiten in Gewässern; Acta hydrochimica et hydrobiologica. Berlin/Ost. 18, 667-671
- Bush, K. et al. (1995) Bush, K., Jacoby, G.A. & Medeiros, A.A. (1995) A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure; Antimicrob. Agents Chemother. 39, 1211-1233
- Call, D.R. et al. (2003) Call, D.R., Bakko, M.K., Krug, M.J. & Roberts, M.C. (2003) Identifying antimicrobial resistance genes with DNA microarrays; Antimicrob. Agents Chemother. 47, 3290-3295
- Camilli, A. & Bassler, B.L. (2006) Camilli, A. & Bassler, B.L. (2006) Bacterial small-molecule signaling pathways; Science 311, 1113-1116
- Chandler, D.P. et al. (2003) Chandler, D.P., Newton, G.J., Small, J.A. & Daly, D.S. (2003) Sequence versus structure for the direct detection of 16S rRNA on planar oligonucleotide microarrays; Appl. Environ. Microbiol. 69, 2950-2958
- Cheetham, B.F. & Katz, M.E. (1995) Cheetham, B.F. & Katz, M.E. (1995) A role for bacteriophages in the evolution and transfer of bacterial virulence determinants; Mol. Microbiol. 18, 201-208
- Christian, T. et al. (2003) Christian, T., Schneider, R.J., Färber, H.A., Skutlarek, D, Meyer, M.T. Goldbach, H.E. (2003) Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters; Acta Hydrochim. Hydrobiol. 31, 36-44
- Clarke, S.C. (2005) Clarke, S.C. (2005) Pyrosequencing: nucleotide sequencing technology with bacterial genotyping applications; Expert Rev. Mol. Diagn. 5, 947-953
- Clarridge, J.E. III (2004) Clarridge, J.E. III (2004) Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases; Clin. Microbiol. Rev. 17, 840-862
- Cohen, S.P. et al. (1988) Cohen, S.P., Hooper, D.C., Wolfson, J.S., Souza, K.S., McMurry, L.M. & Levy, S.B. (1988) Endogenous active efflux of norfloxacin in susceptible *Escherichia coli*; Antimicrob. Agents Chemother. 32, 1187-1191

- Cohen, S.P. et al. (1989) Cohen, S.P., McMurry, L.M., Hooper, D.C., Wolfson, J.S. & Levy, S.B. (1989) Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistant (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to OmpF reduction; *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 1318-1325
- Cole, S.T. & Saint Girons, I. (1994) Cole, S.T. & Saint Girons, I. (1994) Bacterial genomics; *FEMS Microbiol. Rev.* 14, 139-160
- Cordes, M.H.J. & Binford, G.J. (2006) Cordes, M.H.J. & Binford, G.J. (2006) Lateral gene transfer of a dermonecrotic toxin between spiders and bacteria; *Bioinformatics* 22, 264 - 268
- Couzin, J. (2006) Couzin, J. (2006) RU-486-linked deaths open debate about risky bacteria; *Science* 312, 986
- Curds, C.R. & Fey, G.J. (1969) Curds, C.R. & Fey, G.J. (1969) The effect of ciliated protozoa on the fate of *Escherichia coli* in the activated-sludge process; *Water Research* 3, 853-867
- D'Costa, V.M. et al. (2006) D'Costa, V.M., McGrann, K.M., Hughes, D.W. & Wright, G.D. (2006) Sampling the antibiotic Resistome; *Science* 311, 374-377
- Daughton, C.G. & Ternes, T.A. (1999) Daughton, C.G. & Ternes, T.A. (1999) Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ. Health Perspect.* 107 (Supplement 6), 907-938
- Davies, J. (1994) Davies, J. (1994) Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes; *Science* 264, 375-382
- Davies, J. (1996) Davies, J. (1996) Bacteria on the rampage; *Nature* 383, 219-220
- Davies, J. (1996b) Davies, J. (1996) Origins and evolution of antibiotic resistance; *Microbiologia SEM* 12, 9-16
- Davies, J.B. (1997) Davies, J.B. (1997) Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants; (in: *Antibiotic resistance: origins, evolution, selection, and spread*) *Ciba Found. Symp.* 207, 15-27
- De Champs, C. et al. (1993) De Champs, C., Henquell, C., Guelon, D. Sirot, D., Gazuy, N. & Sirot, J. (1993) Clinical and bacteriological study of nosocomial infections due to *Enterobacter aerogenes* resistant to imipenem; *J. Clin. Microbiol.* 31, 123-127
- De Gheldre, Y. et al. (1997) De Gheldre, Y., Maes, N., Rost, F., De Ryck, R., Clevenbergh, P., Vincent, J.L. & Struelens, M.J. (1997) Molecular epidemiology of an outbreak of multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* infections and in vivo emergence of Imipenem resistance; *J. Clin. Microbiol.* 35, 152-160
- Dersch, P. (2002) Dersch, P. (2002) Zelluläre Invasion - Eine bakterielle Überlebensstrategie; *Bundesgesundhbl. - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz* 45, 577-582

- DeSantis, T.Z. et al. (2003) DeSantis, T.Z., Dubosarskiy, I., Murray, S.R. & Anderson, G.L. (2003) Comprehensive aligned sequence construction for automated design of effective probes (CASCADE-P) using 16S rDNA; *Bioinformatics* 19, 1461-1468
- Diggle, M.A. & Clarke, S.C. (2004) Diggle, M.A. & Clarke, S.C. (2004) Genotypic characterization of *Neisseria meningitidis* using pyrosequencing; *Mol. Biotechnol.* 28, 139-145
- DIN 38 411 K5 (1983) Deutsches Institut für Normung e.V. (1983) Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Bestimmung der vermehrungsfähigen Keime mittels Membranfilterverfahren, DIN 38 411 K5, 12. Lieferung, Berlin: Beuth Verlag
- DIN 38 411 K6-2 (1992) Deutsches Institut für Normung e.V. (1992) Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Nachweis von *Escherichia coli* und coliformen Keimen, DIN 38 411 K6-2, 26. Lieferung, Berlin: Beuth Verlag
- DIN 58940 Teil 4 (1995) Deutsches Institut für Normung e.V. (1995) Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika. Grenzwerte von antibakteriellen Wirkstoffen für die Bewertung der minimalen Hemmkonzentration (MHK), DIN 58940 Teil 4, Beiblatt 1, Berlin: Beuth Verlag
- DIN V 38 411 Teil 9 (1993) Deutsches Institut für Normung e.V. (1993) Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung: Bestimmung von Enterobacterial Common Antigen (ECA) zum Nachweis von Lactose-fermentierenden *Enterobacteriaceae*. DIN V 38 411, Teil 9, Berlin: Beuth Verlag
- Doern, G.V. et al. (2001) Doern, G.V., Heilmann, K.P., Huynh, H.K., Rhomberg, P.R., Coffman, S.L. & Brueggemann, A.B. (2001) Antimicrobial resistance among *Streptococcus pneumoniae* in the United States during 1999-2000, including a comparison of resistance rates since 1994-1995; *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1721-1729
- Dokianakis, S.N. et al. (2004) Dokianakis, S.N., Kornaros, M.E. & Lyberatos, G. (2004) On the effect of pharmaceuticals on bacterial nitrite oxidation; *Water Sci. Technol.* 50, 341-346
- Doolittle, R.F. (2002) Doolittle, R.F. (2002) Microbial genomes multiply; *Nature* 416, 697-700
- Döpfens, E. (2005) Döpfens, E. (2005) Membrantechnik in der Abwasserbehandlung – Nachgeschaltete Ultrafiltration in der Kläranlage Hailfingen; *wlb* 11-12/2005, 30-31
- Dorau, W. (1992) Dorau, W. (1992) Membrantechnologie: (Ab-)Wasseraufbereitung, Unterbrechung von Infektketten; *Bundesgesundhbl.* 35, 296-299
- Drenkard, E. & Ausubel, F.M. (2002) Drenkard, E. & Ausubel, F.M. (2002) *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation; *Nature* 416, 740-743

Dröge, M. et al. (1999) Dröge, M., Pühler, A. & Selbitschka, W. (1999) Horizontal gene transfer among bacteria in terrestrial and aquatic habitats as assessed by microcosm and field studies; *Biol. Fertil. Soils* 29, 221-245

Dröge, M. et al. (2000) Dröge, M., Pühler, A. & Selbitschka, W. (2000) Phenotypic and molecular characterization of conjugative antibiotic resistance plasmids isolated from bacterial communities of activated sludge; *Mol. Gen. Genet.* 263, 471-482

Dubnau, D. (1999) Dubnau, D. (1999) DNA uptake in bacteria; *Annu. Rev. Microbiol.* 53, 217-244

DuPont, H.L. & Steele, J.H. (1987) DuPont, H.L. & Steele, J.H. (1987) Use of antimicrobial agents in animal feeds: implications for human health; *Rev. Infect. Dis.* 9, 447-460

Egyptien, R. et al. (1992) Egyptien, R., Sanders, E., Kloss, M. & Pultar, T. (1992) Einsatz einer kontinuierlichen Prozesswasser-Aufbereitungsanlage zur Inaktivierung von rekombinanter DNA; *Chem.-Ing.-Tech.* 64, 96 - 97

Ehrenstein, B. et al. (1996) Ehrenstein, B., Bernards, A.T., Dijkshoorn L., Gerner-Smidt, P., Towner, K.J., Bouvet, P.J.M., Daschner, F.D. & Grundmann, H. (1996) *Acinetobacter* species identification by using tRNA spacer fingerprinting; *J. Clin. Microbiol.* 34, 2414-2420

Eichler, W. et al. (2006) Eichler, W., Hillmann, A., Westermeier, F. & Tiedtke, A. (2006) Beseitigung pathogener und antibiotikaresistenter Bakterien im Abfluss von Kläranlagen mittels Ciliaten – eine Machbarkeitsstudie; *Colloquium Produktionsintegrierte Wasser-/Abwassertechnik - Bremen 2006: Tagungsband B-11-B-32*

Ellington, A.D. & Szostak, J.W. (1990) Ellington, A.D. & Szostak, J.W. (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands; *Nature* 346, 818-822

Ellington, A.D. & Szostak, J.W. (1992) Ellington, A.D. & Szostak, J.W. (1992) Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures; *Nature* 355, 850-852

EU-Commission (1992) The Commission of the European Communities, The US Department of Agriculture - Animal and Plant Health Inspection Service & The US Environmental Protection Agency - Office of Pesticides and Toxic Substances (1992) *Methods for the detection of microorganisms in the environment*

Fahlenkamp, H. et al. (2004) Fahlenkamp, H., Nöthe, T., Ries, T., Hannich, C., Peulen, C., Stock, H.-D., Reupert, R., Danzig, J., Möhle, E., Spittler, M., Rolfs, C.-H., Pehl, B., Schaaf, O. & Poppe, A. (2004) Untersuchungen zum Eintrag und zur Elimination von gefährlichen Stoffen in kommunalen Kläranlagen; *Broschüre des MUNLV NRW, März 2004*

Färber, H. (2002) Färber, H. (2002) Antibiotika im Krankenhausabwasser; *Hyg. Med.* 27, (Suppl.) 35

Färber, H. et al. (2001) Färber, H., Skutlarek, D. & Exner, M. (2001) Abschlussbericht zum Forschungsprojekt "Untersuchung von Krankenhausabwässern eines Universitätsklinikums, von kommunalem Abwasser sowie von Oberflächenwasser und Uferfiltraten auf Rück-

stände ausgewählter Antibiotika" des Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit der Universität Bonn

Ferrero, L. et al. (1994) Ferrero, L., Cameron, B., Manse, B., Lagneaux, D., Crouzet, J., Famechon, A. & Blanche, F. (1994) Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* DNA topoisomerase IV: a primary target of fluoroquinolones; Mol. Microbiol. 13, 641-653

Feuerpfeil, I. & Schulze, E. (1992) Feuerpfeil, I. & Schulze, E. (1992) Krankheitserreger im Trinkwasser; Bundesgesundhbl. 35, 302-304

Feuerpfeil, I. & Stelzer, W. (1992) Feuerpfeil, I. & Stelzer, W. (1992) Das Vorkommen von antibiotikaresistenten koliformen Bakterien in der Darmflora des Menschen; Bundesgesundhbl. 35, 61-65

Feuerpfeil, I. et al. (1999) Feuerpfeil, I., López-Pila, J., Schmidt, R., Schneider, E. & Szewzyk, R. (1999) Antibiotikaresistente Bakterien und Antibiotika in der Umwelt; Bundesgesundhbl. - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz 42, 37-50

Finlay, B.B. (1999) Finlay, B.B. (1999) Bacterial disease in diverse hosts; Cell 96, 315-318

Flügge, A.P. et al. (2004) Flügge, A.P., Kaiser, M. & Blicher, M. (2004) Influence of different UV-light created by a new UV-source based on microwave irradiated plasma on bacteria in real waste water; UV-Karlsruhe 2004 Tagungsband, Paper 6.4, 1-10

FMV (2002) Futtermittelverordnung (FMV) vom 23.November 2000, BGBl. I S. 1605 ff., zuletzt aktualisiert am 25. September 2002, BGBl. I S. 3956 ff.

Forbes, K.J. et al. (1991) Forbes, K.J., Bruce, K.D., Jordens, J.Z., Ball, A. & Pennington, T.H. (1991) Rapid methods in bacterial DNA fingerprinting; J. Gen. Microbiol. 137, 2051-2058

Frahm, E. et al. (1992) Frahm, E., Hübner, I., Giebel, D. & Obst, U. (1992) Nachweis von *E. coli* und Coliformen in Trinkwasser: Vergleich des Schnelltests Colilert mit der Standardmethode; GWF - Wasser/Abwasser 133, 247-250

Frankel, J. (2000) Frankel, J. (2000) Cell biology of *Tetrahymena thermophila*; in: Asai, D.J. & Forney, J.D. (eds.) Methods in Cell Biology - Vol. 62, Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto; pp. 27-125

Fredricks, D.N. & Relman, D.A. (1996) Fredricks, D.N. & Relman, D.A. (1996) Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates; Clin. Microbiol. Rev. 9, 18-33

Friedrich, H. et al. (2005) Friedrich, H., Ries, T. & Hannich, C.B. (2005) Kommunale Kläranlagen als Eintragspfad für organische Spurenschadstoffe in die aquatische Umwelt; KA – Abwasser, Abfall 52, 279-293

Fruth, A. et al. (2000) Fruth, A., Richter, H., Timm, M., Streckel, W., Klie, H., Prager, R., Reissbrodt, R., Gallien, P., Skiebe, E., Rienäcker, I., Karch, H., Bockemühl, J., Perlberg,

- K.W. & Tschäpe, H. (2000) K.W. & Tschäpe, H. (2000) Zur Verbesserung der gegenwärtigen bakteriologischen Diagnostik von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC); Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz 43, 310-317
- Gagneux, S. et al. (2006) Gagneux, S., Davis Long, C., Small, P.M., Van, T., Schoolnik, G.K. & Bohannon, B.J.M. (2006) The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*; Science 312, 1944-1946
- Galimand, M. et al. (1998) Galimand, M., Gerbaud, G., Guibourdenche, M., Riou, J.-Y. & Courva-lin, P. (1998) High-level Chloramphenicol resistance in *Neisseria meningitidis*; New Eng. J. Med. 339, 868-874
- Ge, M. et al. (1999) Ge, M., Chen, Z., Onishi, H. R., Kohler, J., Silver, L. L., Kerns, R., Fukuzawa, S., Thompson, C. & Kahne, D. (1999) Vancomycin derivatives that inhibit peptidoglycan biosynthesis without binding D-Ala-D-Ala; Science 284, 507-511
- Gealt, M.A. et al. (1985) Gealt, M.A., Chai, M.D., Alpert, K.B. & Boyer, J.C. (1985) Transfer of plasmids pBR322 and pBR325 in wastewater from laboratory strains of *Escherichia coli* to bacteria indigenous to the waste disposal system; Appl. Environ. Microbiol. 49, 836-841
- Giger, W. et al. (2003a) Giger, W., Alder, A.C., Golet, E.M., Kohler, H.-P.E., McArdell, Ch.S., Molnar, E., Pham Ti, N.A. & Siegrist, H. (2003) Antibiotikaspuren auf dem Weg von Spital- und Gemeindeabwasser in die Fließgewässer: Umweltanalytische Untersuchungen über Einträge und Verhalten; in Track, T. & Kreysa, G. (Hrsg.) Spurenstoffe in Gewässern. Pharmazeutische Reststoffe und endokrin wirksame Substanzen. Wiley-VCH pp. 21-33
- Giger, W. et al. (2003b) Giger, W., Alder, A.C., Golet, E.M., Kohler, H.-P.E., McArdell, Ch.S., Molnar, E., Siegrist, H. & Suter, M.J.-F. (2003) Occurrence and fate of antibiotics as trace contaminants in wastewaters, sewage sludges, and surface waters; Chimia 57, 485-491
- Gilliver, M.A. et al. (1999) Gilliver, M.A., Bennett, M., Begon, M., Hazel, S.M. & Hart, C.A. (1999) Antibiotic resistance found in wild rodents; Nature 401, 233-234
- Gilmore, M.S. & Hoch, J.A. (1999) Gilmore, M.S. & Hoch, J.A. (1999) A vancomycin surprise; Nature 399, 524-525
- Go, E.S. et al. (1994) Go, E.S., Urban, C., Burns, J., Mariano, N., Mosinka-Snipas, K., Rahal, J.J., Kreiswirth, B. & Eisner, W. (1994) Clinical and molecular epidemiology of *Acinetobacter infections* sensitive only to polymyxin B and sulbactam; The Lancet 344, 1329-1332
- Göbel, A. et al. (2004) Göbel, A., McArdell, C.S., Suter, M.J.F., & Giger, W. (2004) Trace determination of macrolide and sulfonamide antimicrobials, a human sulfonamide metabolite, and trimethoprim in wastewater using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry; Analytical Chemistry 76, 4756-4764

- Golet, E.M. et al. (2001) Golet, E.M., Alder, A.C., Hartmann, A., Ternes, T.A. & Giger, W. (2001) Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by solidphase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection; *Anal. Chem.* 73, 3632-3638
- Golet, E.M. et al. (2002) Golet, E.M., Alder, A.C. & Giger, W. (2002) Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater of the Glatt valley watershed, Switzerland; *Environ. Sci. Technol.* 36, 3645-3651
- Golet, E.M. et al. (2003) Golet, E.M., Xifra, I., Siegrist, H., Alder, A.C. & Giger, W. (2003) Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil; *Environ. Sci. Technol.* 37, 3243-3249
- Goris, J. et al. (2002) Goris, J., Dejonghe, W., Falsen, E., De Clerck, E., Geeraerts, B., Willemse, A., Top, E.M., Vandamme, P. & De Vos, P. (2002) Diversity of transconjugants that acquired plasmid pJP4 or pEMT1 after inoculation of a donor strain in the A- and B-horizon of an agricultural soil and description of *Burkholderia hospita* sp. nov. and *Burkholderia terricola* sp. nov.; *System. Appl. Microbiol.* 25, 340-352
- Grabow, W.O.K. et al. (1976) Grabow, W.O.K., van Zyl, M. & Prozesky, O.W. (1976) Behaviour in conventional sewage purification processes of coliform bacteria with transferable or non-transferable drug-resistance; *Water Research* 10, 717-723
- Gräfe, U. (1992) Gräfe, U. (1992) *Biochemie der Antibiotika*; Spektrum Akademischer Verlag
- Gritz, L. & Davies, L. (1983) Gritz, L. & Davies, L. (1983) Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*; *Gene* 25, 179-188
- Grundmann, H. et al. (1995) Grundmann, H., Schneider, C., Hartung, D., Daschner, F.D. & Pitt, T.L. (1995) Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas putida*; *J. Clin. Microbiol.* 33, 528-534
- Haas, W.H. et al. (1993) Haas, W.H., Butler, W.R., Woodley, C.L. & Crawford, J.T. (1993) Mixed-linker polymerase chain reaction: a new method for rapid fingerprinting of isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* complex; *J. Clin. Microbiol.* 31, 1293-1298
- Hacker, J. (1990) Hacker, J. (1990) Genetic determinants coding for fimbriae and adhesins of extraintestinal *Escherichia coli*; *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 151, 1-27
- Hacker, J. & Kaper, J.B. (2000) Hacker, J. & Kaper, J.B. (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes; *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 641-679
- Hacker, J. et al. (1991) Hacker, J., Ott, M. & Tschäpe, H. (1991) Das Problem der Pathogenität von *Escherichia coli* und seine Bedeutung für die rekombinante DNA-Technologie; *BIOforum* 14, 150-157



- Hacker, J. et al. (1997) Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, I. & Tschäpe, H. (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution; *Mol. Microbiol.* 28, 1089-1097
- Hall, R.M. (1997) Hall, R.M. (1997) Mobile gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance genes in Gram-negative bacteria; (in: *Antibiotic resistance: origins, evolution, selection, and spread*) Ciba Found. Symp. 207, 192-205
- Halling-Sørensen, B. (2000) Halling-Sørensen, B. (2000) Algal toxicity of antimicrobial agents used in intensive farming; *Chemosphere* 40, 731-739
- Halling-Sørensen, B. et al. (2002) Halling-Sørensen, B., Sengeløv, G. & Tjørnelund, J. (2002) Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 263-271
- Harmsen, D. & Karch, H. (2004) Harmsen, D. & Karch, H. (2004) 16S rDNA for diagnosing pathogens: a living tree; *ASM News* 70, 19-24
- Hart, D. (2005) Hart, D. (2005) Die Nutzen/Risiko-Abwägung im Arzneimittelrecht; *Bundesgesundhbl. Gesundheitsforsch. – Gesundheitsschutz* 48, 204-214
- Hartmann, A. et al. (1998) Hartmann, A., Alder, A.C., Koller, T. & Widmer, R.M. (1998) Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater; *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 377-382
- Haubold, B. et al. (1998) Haubold, B., Travisano, M., Rainey, P.B. & Hudson, R.R. (1998) Detecting linkage disequilibrium in bacterial populations; *Genetics* 150, 1341 - 1348
- He, M. & Taussig, M.J. (2002) He, M. & Taussig, M.J. (2002) Ribosome display: cell-free protein display technology; *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* I, 204-212
- Heberer, T. (2002) Heberer, T. (2002) Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data; *Toxicol. Lett.* 131, 5-17
- Heier, H. (1983) 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. hydrobiol.* 11, 623-629
- Heier, H. & Tschäpe, H. (1984) Heier, H. & Tschäpe, H. (1984) Über das Vorkommen von R-Plasmiden in *Escherichia coli* und koliformen Keimen aus Wasser und Abwasser - Teil 2: Methoden der Isolierung von R+-Bakterien aus Oberflächen- und Abwasser, des Transfers ihrer R-Plasmide sowie die Bestimmung der Resistenzbilder; *Acta hydrochim. hydrobiol.* 12, 47-54
- Heisig, P. (1996) Heisig, P. (1996) Genetic evidence for a role of parC mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*; *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 879-885

- Helmuth, R. (1999) Helmuth, R. (1999) Einsatz antimikrobiell wirksamer Substanzen in der Veterinärmedizin; Bundesgesundhbl. - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz 42, 26-34
- Henz, S.R. et al. (2005) Henz, S.R., Huson, D.H., Auch, A.F., Nieselt-Struwe, K. & Schuster, S.C. (2005) Whole-genome prokaryotic phylogeny; Bioinformatics 21, 2329 - 2335
- Hermann, T. & Patel, D.J. (2000) Hermann, T. & Patel, D.J. (2000) Adaptive recognition by nucleic acid aptamers; Science 287, 820-825
- Hermans, P.W. et al. (1995) Hermans, P.W., Sluijter, M., Hoogenboezem, T., Heersma, H., van Belkum, A. & de Groot, R. (1995) Comparative study of five different DNA fingerprint techniques for molecular typing of *Streptococcus pneumoniae* strains; J. Clin. Microbiol. 33, 1606-1612
- Heuer, H. et al. (2004) Heuer, H., Szecepanowski, R., Schneiker, S., Pühler, A., Top, E.M. & Schlüter, A. (2004) The complete sequences of plasmids pB2 and pB3 provide evidence for a recent ancestor of the IncP-1 $\beta$  group without any accessory genes; Microbiology 150, 3591-3599
- Heym, B. et al. (1997) Heym, B., Stavropoulos, E., Honoré, N., Domenech, P., Saint-Joanis, B., Wilson, T.M., Collins, D.M., Colston, M.J. & Cole, S.T. (1997) Effects of overexpression of the alkyl hydroperoxide reductase AhpC on the virulence and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*; Infect. Immun. 65, 1395-1401
- Hillmann, A. et al. (2006) Hillmann, A., Westermeier, F., Eichler, W. & Tiedtke, A. (2006) Ciliates in the elimination of suspended bacteria from sewage plants: experiments under continuous conditions using 30l fermenters; Poster (P24) bei der 25. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Protozoologie vom 08.03. bis 11.03.2006 in Liebenwalde bei Berlin
- Hirai, H. et al. (1986a) Hirai, H., Aoyama, H., Irikura, T., Iyobe, S. & Mitsuhashi, S. (1986) Differences in susceptibility to quinolones of outer membrane mutants of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*; Antimicrob. Agents Chemother. 29, 535-538
- Hirai, H. et al. (1986b) Hirai, H., Aoyama, H., Suzue, S., Irikura, T., Iyobe, S. & Mitsuhashi, S. (1986) Isolation and characterization of norfloxacin-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12; Antimicrob. Agents Chemother. 30, 248-253
- Hirsch, R. et al. (1999) Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K. & Kratz, K.-L. (1999) Occurrence of antibiotics in the aquatic environment; Sci. Total Environ. 225, 109-118
- Höck, M.R.I. et al. (2004) Höck, M.R.I., Swidsinski, S., Eberspächer, B., Schuster, L., Küchler, R., Grubel, C., Futh, U., Michalski, L., Kegel, M., Seefeld, B., Zill, E., Zuschned, R., Schiller, R., Vogt, K., Stetzelberg, H., Hammer, B., Wilbrandt, B., Weist, K. & Wagner, J. (2004) Bakterielle Erreger von Krankenhausinfektionen mit besonderen Resistenzen und Multiresistenzen - Teil II: Erfassung und Bewertung gem. § 23 Abs. 1 IfSG in einem regionalen Netzwerk; Bundesgesundhbl. Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz 47, 363-368

Hoffman, L.R. et al. (2005) Hoffman, L.R., D'Argenio, D.A., MacCoss, M.J., Zhang, Z., Jones, R.A. & Miller, S.I. (2005) Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation; *Nature* 436, 1171-1175

Homann, M. & Göringer, H.-U. (1999) Homann, M. & Göringer, H.-U. (1999) Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes; *Nucleic Acid Res.* 27, 2006-2014

Hooper, D.C. et al. (1989) Hooper, D.C., Wolfson, J.S., Souza, K.S., Ng, E.Y., McHugh, G.L. & Swartz, M.N. (1989) Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli*: characterization of *nfxB* and *cfxB*, two mutant resistance loci decreasing norfloxacin accumulation; *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 283-290

Hooper, D.C. et al. (1992) Hooper, D.C., Wolfson, J.S., Bozza, M.A. & Ng, E.Y. (1992) Genetics and regulation of outer membrane protein expression by quinolone resistance loci *nfxB*, *nfxC*, and *cfxB*; *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 1151-1154

Hübner, I. et al. (1992a) Hübner, I., Steinmetz, I., Obst, U., Giebel, D. & Bitter-Suermann, D. (1992) Rapid determination of *Enterobacteriaceae* in drinking water by an immunological assay based on a monoclonal antibody against Enterobacterial Common Antigen; *Appl. Env. Micr.* 58, 3187-3191

Hübner, I. et al. (1992b) Hübner, I., Obst, U., Steinmetz, I. & Bitter-Suermann, D. (1992) Microbiological-immunological rapid method to detect *Legionellaceae* in water; *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 20, 205-207

Hughes, V.M. & Datta, N. (1983) Hughes, V.M. & Datta, N. (1983) Conjugative plasmids in bacteria of the "pre-antibiotic" era; *Nature* 302, 725-726

Ingerslev, F. et al. (2001) Ingerslev, F., Toräng, L., Loke, M.-L., Halling-Sørensen, B. & Nyholm, N. (2001) Primary biodegradation of veterinary antibiotics in aerobic and anaerobic surface water simulation systems; *Chemosphere* 44, 865-872

Ippen-Ihler, K. (1989) Ippen-Ihler, K. (1989) Bacterial conjugation; in S.B. Levy & R.V. Miller eds.: *Gene transfer in the environment*. Mc.Graw-Hill Book Co., New York; pp. 33-72

Jacobs, C. (1997) Jacobs, C. (1997) Life in the balance: Cell walls and antibiotic resistance; *Science* 278, 1731-1732

Janssen, P. & Dijkshoorn, L. (1996) Janssen, P. & Dijkshoorn, L. (1996) High resolution DNA fingerprinting of *Acinetobacter* outbreak strains; *FEMS Microbiol. Lett.* 142, 191-194

Janssen, P. et al. (1996) Janssen, P., Coopman, R., Huys, G., Swings, J., Bleeker, M., Vos, P., Zabeau, M. & Kersters, K. (1996) Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy; *Microbiology* 142, 1881-1893

Jenison, R.D. et al. (1994) Jenison, R.D., Gill, S.C., Pardi, A. & Polisky, B. (1994) High-resolution molecular discrimination by RNA; *Science* 263, 1425-1429

- Jensen, M.A. et al. (1993) Jensen, M.A., Webster, J.A. & Straus, N. (1993) Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms; *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 945-952
- Jiang, L. & Patel, D.J. (1998) Jiang, L. & Patel, D.J. (1998) Solution structure of the tobramycin-RNA aptamer complex; *Nature Struct. Biol.* 5, 769-774
- Jiang, L. et al. (1997) Jiang, L., Suri, A.K., Fiala, R. & Patel, D.J. (1997) Saccharide-RNA recognition in an aminoglycoside antibiotic-RNA aptamer complex; *Chem. Biol.* 4, 35-50
- Jiang, L. et al. (1999) Jiang, L., Majumdar, A., Hu, W., Jaishree, T.J., Xu, W. & Patel, D.J. (1999) Saccharide-RNA recognition in a complex formed between neomycin B and an RNA aptamer; *Structure* 7, 817-827
- Jørgensen, S.E. & Halling-Sørensen, B. (2000) Jørgensen, S.E. & Halling-Sørensen, B. (2000) Drugs in the environment; *Chemosphere* 40, 691-699
- Kämpfer, P. & Dott, W. (1989) Kämpfer, P. & Dott, W. (1989) Numerische Identifizierung aquatischer Mikroorganismen mittels automatisierter Methoden am Beispiel von Bakterien aus dem belebten Schlamm; *Zbl. Bakt. Hyg. B* 187, 216-229
- Karaolis, D.K.R. et al. (1999) Karaolis, D.K.R., Somara, S., Maneval, D.R. Jr., Johnson, J.A. & Kaper, J.B. (1999) A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria; *Nature* 399, 375-379
- Kaufhold, A. et al. (1994) Kaufhold, A., Podbielski, A., Baumgarten, G., Blokpoel, M., Top, J. & Schouls, L. (1994) Rapid typing of group A streptococci by the use of DNA amplification and non-radioactive allele-specific oligonucleotide probes; *FEMS Microbiol. Lett.* 119, 19-26
- Khachatourians, G.G. (1998) Khachatourians, G.G. (1998) Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria; *Can. Med. Assoc. J.* 159, 1129-1136
- Khodursky, A.B. et al. (1995) Khodursky, A.B., Zechiedrich, E.L. & Cozzarelli, N.R. (1995) Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 11801-11805
- King, A. & Phillips, I. (1986) King, A. & Phillips, I. (1986) The comparative in vitro activity of eight newer quinolones and nalidixic acid; *J. Antimicrob. Chemother.* 18 Suppl. D, 1-20
- Kirn, T.J. et al. (2005) Kirn, T.J., Jude, B.A. & Taylor, R.K. (2005) A colonization factor links *Vibrio cholerae* environmental survival and human infection; *Nature* 438, 863-866
- Kist, M. et al. (2005) Kist, M., Glocker, E. & Suerbaum, S. (2005) Pathogenese, Diagnostik und Therapie der *Helicobacter pylori*-Infektion; *Bundesgesundhbl. - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz* 48, 669-678

- Klare, I. et al. (1995a) Klare, I., Heier, H., Claus, H., Böhme, G., Marin, S., Seltmann, G., Hakenbeck, R., Antanassova, V. & Witte, W. (1995) *Enterococcus faecium* strains with vanA-mediated high-level glycopeptide resistance isolated from animal foodstuffs and fecal samples of humans in the community; *Microb. Drug Resist.* 1, 265-272
- Klare, I. et al. (1995b) Klare, I., Heier, H., Claus, H., Reissbrodt, R. & Witte, W. (1995) vanA-mediated high-level glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from animal husbandry; *FEMS Microbiol. Lett.* 125, 165-172
- Kleinjung, F. et al. (1998) Kleinjung, F., Klussmann, S., Erdmann, V.A., Scheller, F.W., Fürste, J.P. & Bier, F.F. (1998) High-affinity RNA as a recognition element in a biosensor; *Anal. Chem.* 70, 328-331
- Knappik, A. (2006) Knappik, A. (2006) Neue Technologien im Markt für Forschungssantikörper; *Laborwelt* 7(3), 18 – 22
- Kohnen, W. et al. (2004) Kohnen, W., Schön-Hölz, K., Schwartz, T., Volkmann, H., Rissler, K., Wurz, A., Obst, U. & Jansen, B. (2004) Vorkommen und Ausbreitung der Antibiotikaresistenz in der aquatischen Umwelt; *Colloquium Produktionsintegrierte Wasser-/Abwassertechnik - Bremen 2004: Tagungsband B-51-B-60*
- Kolbert, C.P. & Persing, D.H. (1999) Kolbert, C.P. & Persing, D.H. (1999) Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens; *Curr. Opin. Microbiol.* 2,299-305
- Kolch, A. & Diering, A. (2004) Kolch, A. & Diering, A. (2004) Die Desinfektion von Abwasser mit ultravioletten Strahlen; *Wasser und Abfall* 5, 10-13
- Kolpin, D.W. et al. (2002) Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B. & Buxton, H.T. (2002) Pharmaceuticals, Hormones, and other wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance; *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202-1211
- Kresken, M. (1995) Kresken, M. (1995) Prävalenz der Resistenz bei klinisch wichtigen Bakterienspezies gegenüber älteren und neueren Antibiotika in Europa; *Bundesgesundhbl.* 38, 170-178
- Kresken, M. et al. (1999) Kresken, M., Hafner, D. & von Rosenstiel, N. (1999) Zeitliche Entwicklung der Antibiotikaresistenz bei klinisch wichtigen Bakterienspezies in Mitteleuropa; *Bundesgesundhbl. - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz* 42, 17-25
- Kreuzer, K.N. & Cozzarelli, N.R. (1979) Kreuzer, K.N. & Cozzarelli, N.R. (1979) *Escherichia coli* mutants thermosensitive for deoxyribonucleic acid gyrase subunit A: effects on deoxyribonucleic acid replikation, transcription, and bacteriophage growth; *J. Bacteriol.* 140, 424-435
- Krügel, H. (1997) Krügel, H. (1997) How microorganisms produce and survive antibiotics; *BIOspektrum* 3 (Supplement: "Antibiotic resistance - recent developments and future perspectives"), 38-42

- Kümmerer, K. et al. (2000) Kümmerer, K., Al-Ahmad, A. & Mersch-Sundermann, V. (2000) Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test; *Chemosphere* 40, 701-710
- Kümmerer, K. et al. (2004) Kümmerer, K., Alexy, R., Hüttig, J. & Schöll, A. (2004) Standardized tests fail to assess the effects of antibiotics in environmental bacteria; *Water Res.* 38, 2111-2116
- Lan, R. & Reeves, P.R. (1996) Lan, R. & Reeves, P.R. (1996) Gene transfer is a major factor in bacterial evolution; *Mol. Biol. Evol.* 13, 47-55
- Lascols, C. et al. (2003) Lascols, C., Lamarque, D., Costa, J.-M., Copie-Bergman, C., Le Glaunec, J.-M., Deforges, L., Soussy, C.-J., Petit, J.-C., Delchier, J.-C. & Tankovic, J. (2003) Fast and accurate quantitative detection of *Helicobacter pylori* and identification of clarithromycin resistance mutations in *H. pylori* isolates from gastric biopsy specimens by real-time PCR; *J. Clin. Microbiol.* 41, 4573-4577
- Lazo, G.R. et al. (1987) Lazo, G.R., Roffey, R. & Gabriel, D.W. (1987) Pathovars of *Xanthomonas campestris* are distinguishable by restriction fragment length polymorphism; *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 214-221
- LeClerc, J.E. et al. (1996) LeClerc, J.E., Li, B., Payne, W.L. & Cebula, T.A. (1996) High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella pathogens*; *Science* 274, 1208-1211
- Leclercq, R. et al. (1988) Leclercq, R., Derlot, E., Duval, J. & Courvalin, P. (1988) Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*; *N. Engl. J. Med.* 319, 157-161
- Lee, E.H. et al. (1991) Lee, E.H., Nicolas, M.H., Kitzis, M.D., Pialoux, G., Collatz, E. & Gutmann, L. (1991) Association of two resistance mechanisms in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* with high-level resistance to Imipenem; *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 1093-1098
- Lenski, R.E. et al. (1994) Lenski, R.E., Simpson, S.C. & Nguyen, T.I. (1994) Genetic analysis of a plasmid-encoded, host genotype-specific enhancement of bacterial fitness; *J. Bacteriol.* 176, 3140-3147
- Levin, B.R. (2004) Levin, B.R. (2004) Noninherited resistance to antibiotics; *Science* 305, 1578-1579
- Levin, B.R. et al. (1997) Levin, B.R., Lipsitch, M., Perrot, V., Schrag, S., Antia, R., Simonsen, L., Moore Walker, N. & Stewart, F.M. (1997) The population genetics of antibiotic resistance; *Clin. Infect. Disease* 24 (suppl. 1), S9-S16
- Levy, S.B. (1998) Levy, S.B. (1998) Antibiotikaresistenz: eine globale Herausforderung; *Spektrum der Wissenschaft* 5/98, 34-41

- Levy, S.B. et al. (1976) Levy, S.B., FitzGerald, G.B. & Macone, A.B. (1976) Spread of antibiotic-resistant plasmids from chicken to chicken and from chicken to man; *Nature* 260, 40-42
- Levy, S.B. et al. (1989) Levy, S.B., McMurry, L.M., Burdett, V., Courvalin, P., Hillen, W., Roberts, M.C. & Taylor, D.E. (1989) Nomenclature for tetracycline resistance determinants; *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 1373-1374
- Lewis, K. (1994) Lewis, K. (1994) Multidrug resistance pumps in bacteria: variations on a theme; *TIBS - Trends Biochem. Science* 19, 119-123
- Li, X.-Z. et al. (1994) Li, X.-Z., Livermore, D.M. & Nikaido, H. (1994) Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to Tetracycline, Chloramphenicol, and Norfloxacin; *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 1732-1741
- Lick, S. & Heller, K.J. (1997) Lick, S. & Heller, K.J. (1997) Speziesspezifischer Nachweis von Fermentationsmikroorganismen mittels Gensonden und PCR; in BgVV-Hefte, G.A. Schreiber & K.W. Bögl eds. "Neue Wege der Lebensmittelanalytik: DNA-Analytische Verfahren zur Artendifferenzierung", Berlin 1997, 75-78
- Lindsey, M.E. et al. (2001) Lindsey, M.E., Meyer, M. & Thurman, E.M. (2001) Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/ mass spectrometry; *Anal. Chem.* 73, 4640-4646
- Linton, D. et al. (1994) Linton, D., Clewley, J.P., Burnens, A. Owen, R.J. & Stanley, J. (1994) An intervening sequence (IVS) in the 16S rRNA gene of the eubacterium *Helicobacter canis*; *Nucleic Acids Res.* 22, 1954-1958
- Lipsitch, M. & Levin, B.R. (1997) Lipsitch, M. & Levin, B.R. (1997) The population dynamics of antimicrobial chemotherapy; *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 363-373
- Livermore, D.M. (1992) Livermore, D.M. (1992) Carbapenemases; *J. Antimicrob. Chemother.* 29, 609-616
- Lorenz, M.G. & Wackernagel, W. (1993) Lorenz, M.G. & Wackernagel, W. (1993) Bacterial gene transfer in the environment; in W. Wöhrmann & J. Tomiuk eds. "Assessing risk on gene technology"; Birkhäuser (Boston, Basel, Berlin)
- Lorenz, M.G. & Wackernagel, W. (1994) Lorenz, M.G. & Wackernagel, W. (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment; *Microbiol. Reviews* 58, 563-602
- Ludwig, W. et al. (2004) Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R. et al.\*\* (2004) ARB: a software environment for sequence data; *Nucl. Acids Res.* 32, 1363-1371  
\*\*) = 29 weitere Autoren

- Mac Laughlin, J.R. et al. (1981) Mac Laughlin, J.R., Murray, C.L. & Rabinowitz, C. (1981) Unique features in the ribosome binding site sequence of the Gram-positive *Staphylococcus aureus*  $\beta$ -Lactamase gene; J. Biol. Chem. 256, 11283-11291
- Mach, P.A. & Grimes, D.J. (1982) Mach, P.A. & Grimes, D.J. (1982) R-plasmid transfer in a wastewater treatment plant; Appl. Environ. Microbiol. 44, 1395-1403
- Mahajan-Miklos, S. et al. (1999) Mahajan-Miklos, S., Tan, M.-W., Rahme, L.G. & Ausubel, F.M. (1999) Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa* - *Caenorhabditis elegans* pathogenesis model; Cell 96, 47-56
- Majewski, J. & Cohan, F.M. (1999) Majewski, J. & Cohan, F.M. (1999) DNA Sequence similarity requirements for interspecific recombination in *Bacillus*; Genetics 153, 1526 - 1533
- Marcinek, H. et al. (1998) 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. Microbiol. 64, 626-632
- Marcos, M.A. et al. (1995) Marcos, M.A., Jimenez de Anta, M.T. & Vila, J. (1995) Correlation of six methods for typing nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*; J. Med. Microbiol. 42, 328-335
- Margulies, M. et al. (2005) Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E. (+52 weitere Autoren) & Rothberg, J.M. (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors; Nature 437, 376 - 380
- Marshall, B. et al. (1981) Marshall, B., Schluederberg, S., Tachibana, C. & Levy, S.B. (1981) Survival and transfer in the human gut of poorly mobilizable (pBR322) and of transferable plasmids from the same carrier *E. coli*; Gene 14, 145-154
- Mathys, W. (1998) Mathys, W. (1998) Abschätzung gesundheitlicher Risiken beim Betrieb von Kleinkläranlagen, speziell von Pflanzenkläranlagen – Literaturstudie im Auftrage des Ministers für Umwelt, Raumordnung und Landwirtschaft des Landes Nordrhein-Westfalen
- Matic, I. et al. (1996) Matic, I., Taddei, F. & Radman, M. (1996) Genetic barriers among bacteria; Trends Microbiol. 4, 69-73
- Martinez, J.L. & Baquero, F. (2000) Martinez, J.L. & Baquero, F. (2000) Mutation frequencies and antibiotic resistance; Antimicrob. Agents Chemother. 44, 1771 - 1777
- Martinez, J.L. & Baquero, F. (2002) Martinez, J.L. & Baquero, F. (2002) Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance; Clin. Microbiol. Rev. 15, 647 - 679
- Matsumura, M. et al. (2001) Matsumura, M., Hikiba, Y., Ogura, K., Togo, G., Tsukuda, I., Ushikawa, K., Shiratori, Y. & Omata, M. (2001) Rapid detection of mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* that confers resistance to clarithromycin treatment to the bacterium; J. Clin. Microbiol. 39, 691-695



- Mazel, D. et al. (1998) Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V.A. & Davies, J. (1998) A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome; *Science* 280, 605-608
- McCafferty, J. et al. (1990) McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G. & Chiswell, D.J. (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains; *Nature* 348, 552-554
- McClure, N.C. et al. (1989) McClure, N.C., Weightman, A.J. & Fry, J.C. (1989) Survival of *Pseudomonas putida* UWC1 containing cloned catabolic genes in a model activated-sludge unit; *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2627-2634
- McClure, N.C. et al. (1991) McClure, N.C., Fry, J.C. & Weightman, A.J. (1991) Survival and catabolic activity of natural and genetically engineered bacteria in a laboratory-scale activated-sludge unit; *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 366-373
- Medeiros, A.A. (1997) Medeiros, A.A. (1997) Evolution and dissemination of  $\beta$ -lactamases accelerated by generations of  $\beta$ -lactam antibodies; *Clin. Infect. Disease* 24 (suppl. 1), S19-S45
- Meibom, K. et al. (2005) Meibom, K., Blokesch, M., Dolganov, N.A., Wu, C.-Y. & Schoolnik, G.K. (2005) Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*; *Science* 310, 1824-1827
- Meier, H. et al. (2004) Meier, H., Krause, A., Kräutner, M. & Bode, A. (2004) Development and implementation of a parallel algorithm for the fast design of oligonucleotide probe sets for diagnostic DNA microarrays; *Concurrency Computat.: Pract. Exper.* 16, 873-893
- Meyer, E. et al. (2004) Meyer, E., Jonas, D., Schwab, F., Gastmeier, P., Rüden, H. & Daschner, F.D. (2004) SARI: Surveillance der Antibiotikaaanwendung und bakteriellen Resistenzentwicklung auf deutschen Intensivstationen; *Bundesgesundhbl. Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz* 47, 345-351
- Micheli, M.R. et al. (1994) Micheli, M.R., Bova, R., Pascale, E. & D'Ambrosio, E. (1994) Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method; *Nucleic Acids Res.* 22, 1921-1922
- Miller, C. et al. (2004) Miller, C., Thomsen, L.E., Gaggero, C., Mosseri, R. Ingmer, H. & Cohen, S.N. (2004) SOS response induction by  $\beta$ -lactams and bacterial defense against antibiotic lethality; *Science* 305, 1629-1631
- Miller, M.B. & Bassler, B.L. (2001) Miller, M.B. & Bassler, B.L. (2001) Quorum sensing in bacteria; *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 165-199
- Miller, M.B. et al. (2002) Miller, M.B., Skorupski, K., Lenz, D.H., Taylor, R.K. & Bassler, B.L. (2002) Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*; *Cell* 110, 303-314
- Miller, R.V. (1998) Miller, R.V. (1998) Gentransfer zwischen Bakterien in der Natur; *Spektrum der Wissenschaft* 3/1998, 50-56

- Morell, V. (1997a) Morell, V. (1997) Bacteria diversify through warfare; *Science* 278, 575
- Morell, V. (1997b) Morell, V. (1997) Antibiotic Resistance: Road of No Return; *Science* 278, 575-576
- Morgan, J.A.W. et al. (1989) Morgan, J.A.W., Winstanley, C., Pickup, R.W., Jones, J.G. & Saunders, J.R. (1989) Direct phenotypic and genotypic detection of a recombinant pseudomonad population released into lake water; *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2537-2544
- Morhard, F. et al. (2000) Morhard, F., Pipper, J., Dahint, R. & Grunze, M. (2000) Immobilization of antibodies in micropatterns for cell detection by optical diffraction; *Sens. Actuators B* 70, 232-242
- Moxon, E.R. & Thaler, D.S. (1997) Moxon, E.R. & Thaler, D.S. (1997) The tinkerer's evolving tool-box; *Nature* 387, 659-662
- Mrázek, J. & Karlin, S. (1996) Mrázek, J. & Karlin, S. (1996) A new significant recurrent dyad pairing in *Haemophilus influenzae*; *TIBS - Trends Biochem. Science* 21, 201-202
- Müller, H.-J. & Röder, T. (2004) Müller, H.-J. & Röder, T. (2004) Der Experimentator – Microarrays; Spektrum Akademischer Verlag – Elsevier Verlag München
- MUNLV NRW (2003a) MUNLV NRW (2003) Das Projekt Lambertsmühle: Zukunftsfähiges Abwassermanagement im ländlichen Raum? Düsseldorf: Abschlussbericht
- MUNLV NRW (2003b) MUNLV NRW (2003b) Publikation "Abwasserreinigung mit Membrantechnik - Membraneinsatz im kommunalen und industriellen Bereich"; Herausgeber: MUNLV NRW, Düsseldorf, (2003)
- MUNLV NRW (2004) MUNLV NRW (2004) Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben "Untersuchungen zum Eintrag und zur Elimination von gefährlichen Stoffen in kommunalen Kläranlagen", Herausgeber: MUNLV NRW, Düsseldorf, März 2004.
- Nakamura, S. et al. (1989) Nakamura, S., Nakamura, M., Kojima, T. & Yoshida, H. (1989) *gyrA* and *gyrB* mutations in quinolone-resistant strains of *Escherichia coli*; *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 254-255
- Navarre, W.W. et al. (2006) Navarre, W.W., Porwollik, S., Wang, Y., McClelland, M., Rosen, H., Libby, S.J. & Fang, F.C. (2006) Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*; *Science* 313, 236-238
- Nelson, K.E. et al. (1999) Nelson, K.E., Clayton, R.A., Gill, S.R., Gwinn, M.L. et al. (1999) Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*; *Nature* 399, 323-329
- Neubacher, E. et al. (2005) Neubacher, E., Prast, M. & Berninger, U.-G. (2005) Detection of ingested nitrifying bacteria in food vacuoles of ciliates using FISH; Poster bei der 24. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Protozoologie vom 02.03. bis 05.03.2005 auf Burg Lichtenberg bei Kusel (Tagungsstätte der Universität Kaiserslautern)

- Nikaido, H. (1994) Nikaido, H. (1994) Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux; *Science* 264, 382-388
- Nilsson, J.R. (1989) Nilsson, J.R. (1989) *Tetrahymena* in cytotoxicology: with special reference to effects of heavy metals and selected drugs; *Europ. J. Protozool.* 25, 2-25
- Noble, W.C. et al. (1992) Noble, W.C., Virani, Z. & Cree, R.G.A. (1992) Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*; *FEMS Microbiol. Lett.* 93, S. 195-198
- Nordmann, P. et al. (1994) Nordmann, P., Naas, T. & Labia, R. (1994) New trends in enterobacterial beta-lactamases; *APUA Newsletter* 12 (3), 1-4
- Novak, R. et al. (1999) Novak, R., Henriques, B., Charpentier, E., Normark, S. & Tuomanen, E. (1999) Emergence of vancomycin tolerance in *Streptococcus pneumoniae*; *Nature* 399, 590-593
- Nowak, A. & Kur, J. (1995) Nowak, A. & Kur, J. (1995) Genomic species typing of acinetobacters by polymerase chain reaction amplification of the *recA* gene; *FEMS Microbiol. Lett.* 130, 327-332
- Nowak, A. et al. (1995) Nowak, A., Burkiewicz, A. & Kur, J. (1995) PCR differentiation of seventeen genospecies of *Acinetobacter*; *FEMS Microbiol. Lett.* 126, 181-187
- O'Toole, G.A. (2002) O'Toole, G.A. (2002) A resistance switch; *Nature* 416, 695-696
- Obst, U. (1994) Obst, U. (1994) Biologische Messverfahren in der Wasserüberwachung; *Bundesgesundhbl.* 37, 99-103
- Ochman, H. et al. (2000) Ochman, H., Lawrence, J.G. & Grolsman, E.A. (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation; *Nature* 405, 299-304
- Oka, A. et al. (1981) Oka, A., Sugisaki, H. & Takanami M. (1981) Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon Tn903; *J. Mol. Biol.* 147, 217-226
- Oleastro, M. et al. (2003) Oleastro, M., Ménard, A., Santos, A., Lamouliatte, H., Monteiro, L., Barthélémy, P. & Mégraud, F. (2003) Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*; *J. Clin. Microbiol.* 41, 397-402
- Osane, E. et al. (1994) Osane, E., Arakawa, Y., Wacharotayankun, R., Ohta, M., Horii, T., Ito, H., Yoshimura, F. & Kato, N. (1994) Molecular characterization of an enterobacterial metallo  $\beta$ -Lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance; *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 71-78
- Ouabdesselam, S. et al. (1995) Ouabdesselam, S., Hooper, D.C., Tankovic, J. & Soussy, C.J. (1995) Detection of *gyrA* and *gyrB* mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* by single-strand conformational polymorphism analysis and determination of

levels of resistance conferred by two different *gyrA* mutations; Antimicrob. Agents Chemother. 39, 1667-1670

Pai, R. et al. (2005) Pai, R., Limor, J. & Beall, B. (2005) Use of pyrosequencing to differentiate *Streptococcus pneumoniae* serotypes 6A and 6B; J. Clin. Microbiol. 43, 4820-4822

Pal, C. et al. (2005) Pal, C., Papp, B. & Lercher, M.J. (2005) Adaptive evolution of bacterial metabolic networks by horizontal gene transfer; Nat. Genet. 37, 1372-5

Palumbi, S.R. (2001) Palumbi, S.R. (2001) Humans as the world's greatest evolutionary force; Science 293, 1786 – 1790

Park, H.-S. et al. (2006) Park, H.-S., Nam, S.-H., Lee, J.K., Yoon, C.N., Mannervik, B., Benkovic, S.J. & Kim, H.-S. (2006) Design and evolution of new catalytic activity with an existing protein scaffold; Science 311, 535-538

Paul, J.H. & Williams, H.G. (2004) Paul, J.H. & Williams, H.G. (2004) Natural transformation in aquatic environments; in Molecular Microbial Ecology Manual, Second Edition (Kowalchuk, G.A., de Bruijn, F.J., Head, I.M., Akkermans, A.D. & van Elsas, J.D. eds.) 5.01, 1047-1068

Pennisi, E. (1999) Pennisi, E. (1999) Is it time to uproot the tree of life? Science 284, 1305-1307

Petrocheilou, V. et al. (1976) Petrocheilou, V., Grinsted, J. & Richmond, M.H. (1976) R-plasmid transfer in vivo in the absence of antibiotic selection pressure; Antimicrob. Agents Chemother. 10 (4), 753-761

Piatek, A.S. et al. (1998) Piatek, A.S., Tyagi, S., Pol, A.C., Telenti, A., Miller, L.P., Kramer, F.R. & Alland, D. (1998) Molecular beacon sequence analysis for detecting drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*; Nat. Biotechnol. 16, 359-363

Piddock, L.J.V. (1995) Piddock, L.J.V. (1995) Quinolone resistance and *Campylobacter* spp.; J. Antimicrob. Chemother. 36, 891-898

Piddock, L.J.V. (1996) Piddock, L.J.V. (1996) Does the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and animal husbandry select antibiotic-resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy? J. Antimicrob. Chemother. 38, 1-3

Pinnekamp, J. & Ivashechkin, P. (2005) Pinnekamp, J. & Ivashechkin, P. (2005) Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben: "Literatúrauswertung zum Vorkommen gefährlicher Stoffe im Abwasser und in Gewässern"; Institut für Siedlungswasserwirtschaft der RWTH Aachen

Place, R. B. et al. (2002) Place, R. B., Hiestand, D. Burri, S. & Teuber, M. (2002) *Staphylococcus succinus* subsp. *casei* subsp. nov., a dominant isolate from a surface ripened cheese; System. Appl. Microbiol. 25, 353-359

Popp, W. et al. (2004) Popp, W., Huber, S. & Kexel, S. (2004) Abwasserdesinfektion zur Verbesserung der Badegewässerqualität an der oberen Isar; Wasser und Abfall 5, 14-18

- Pornillos, O. et al. (2005) Pornillos, O., Chen, Y.-J., Chen, A.P. & Chang, G. (2005) X-ray structure of the *EmrE* multidrug transporter in complex with a substrate; *Science* 310, 1950-1953
- Prevost, G. et al. (1992) Prevost, G., Jaulhac, B. & Piemont, Y. (1992) DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis is more effective in distinguishing among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates; *J. Clin. Microbiol.* 30, 967-973
- Prudhomme, M. et al. (2006) Prudhomme, M., Attaiech, L., Sanchez, G., Martin, B. & Claverys, J.-P. (2006) Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*; *Science* 313, 89-92
- Raimondi, A. et al. (1991) Raimondi, A., Traverso, A. & Nikaido, H. (1991) Imipenem- and meropenem-resistant mutants of *Enterobacter cloacae* and *Proteus rettgeri* lack porins; *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 1174-1180
- Rather, P.N. et al. (1993) Rather, P.N., Orosz, E., Shaw, K.J., Hare, R. & Miller, G. (1993) Characterization and transcriptional regulation of the 2'-N-acetyltransferase gene from *Providencia stuartii*; *J. Bacteriol.* 175, 6492-6498
- Rather, P.N. et al. (1997) Rather, P.N., Porojcic, M.M. & Paradise, M.R. (1997) An extracellular factor regulating expression of the chromosomal aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase of *Providencia stuartii*; *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 1749-1754
- Recchia, G.D. & Hall, R.M. (1995) Recchia, G.D. & Hall, R.M. (1995) Gene cassettes: a new class of mobile element; *Microbiol.* 141, 3015-3027
- Resch, H. (2004) Resch, H. (2004) Planung und Bau einer Membranbelebungsanlage; *Wasser Abwasser* 145, 622-626
- Reynolds, M.G. (2000) Reynolds, M.G. (2000) Compensatory evolution in rifampin-resistant *Escherichia coli*; *Genetics* 156, 1471 - 1481
- Rijpkema, S.G. et al. (1995) Rijpkema, S.G., Molkenboer, M.J., Schouls, L.M., Jongejan, F. & Schellekens, J.F. (1995) Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch Ixodes ricinus ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes; *J. Clin. Microbiol.* 33, 3091-3095
- Ritz, D. et al. (2001) Ritz, D., Lim, J., Reynolds, C. M., Poole, L. B. & Beckwith, J. (2001) Conversion of a Peroxiredoxin into a disulfide reductase by a triplet repeat expansion; *Science* 294, 158-160
- Roberts, M.C. (1994) Roberts, M.C. (1994) Epidemiology of tetracycline resistance determinants; *Trends Microbiol.* 2, 353-357
- Ronaghi, M. & Elahi, E. (2002) Ronaghi, M. & Elahi, E. (2002) Pyrosequencing for microbial typing; *J. Chromatog. B* 782, 67-72

- Ronaghi, M. et al. (1998) Ronaghi, M., Uhlén, M. & Nyrén, P. (1998) A sequencing method based on realtime pyrophosphate; *Science* 281, 363-365
- Rose, P.E. & Pedersen, J.A. (2005) Rose, P.E. & Pedersen, J.A. (2005) Fate of oxytetracycline in streams receiving aquaculture discharges: model simulations; *Environ. Toxicol. Chem.* 24/1, 40-50
- Roth, A. et al. (1997) Roth, A., Mauch, H. & Göbel, U. (1997) *MiQ 1 1997: Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik*; Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm
- Roth, H.J. & Fenner, H. (1997) Roth, H.J. & Fenner, H. (1997) *Pharmazeutische Chemie III - Arzneistoffe: Struktur – Bioreaktivität – Wirkungsbezogene Eigenschaften*; (2. Auflage) Gustav Fischer Verlag – Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm
- Sacher, F. et al. (2001) Sacher, F., Lange, F.T., Brauch, H.-J. & Blankenhorn, I. (2001) Pharmaceuticals in groundwaters – Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany; *J. Chromatogr. A* 938, 199-210
- Sachse, K. & Hotzel, H. (1997) Sachse, K. & Hotzel, H. (1997) Identifizierung von Bakterien an Hand von Sequenzen der ribosomalen RNA-Gene; in BgVV-Hefte, G.A. Schreiber & K.W. Bögl eds. "Neue Wege der Lebensmittelanalytik: DNA-Analytische Verfahren zur Artendifferenzierung", Berlin 1997, 79-85
- Sagik, B.P. et al. (1981) Sagik, B.P., Sorber, C.A. & Moore, B.E. (1981) The survival of EK1 and EK2 systems in sewage treatment plant models; in Stuart B. Levy et al. eds. *Molecular biology, pathogenicity, and ecology of bacterial plasmids* (Plenum Press, New York)
- Saiki, R.K. et al. (1985) Saiki R.K.; Scharf S; Faloona F; Mullis K.B; Horn G. T; Erlich H.A.; Arnheim N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia; *Science* 230, 1350–1354.
- Salomon, M. (2005) Salomon, M. (2005) *Arzneimittel in der aquatischen Umwelt – Der Rat der Sachverständigen für Umweltfragen: Handlungsbedarf*; UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 17, 50-53
- Sanders, E. et al. (1990) Sanders, E., Egyptian, R.A.K., Deckwer, W.-D. (1990) Thermische Inaktivierung rekombinanter DNA; *BioEngineering* 2/90, 29 - 33
- Sato, K. & Nakae, T. (1991) Sato, K. & Nakae, T. (1991) Outer membrane permeability of *Acinetobacter calcoaceticus* and its implication in antibiotic resistance; *J. Antimicrob. Chemother.* 28, 35-45
- Saunders, J.R. et al. (1990) Saunders, J.R., Morgan, J.A.W., Winstanley, C., Raitt, F.C., Carter, J.P., Pickup, R.W., Jones, J.G. & Saunders, V.A. (1990) Genetic approaches to the study of gene transfer in microbial communities; in Fry, J.C. & Day, M.J. eds. *Bacterial genetics in natural environments*. Chapman and Hall, UK., pp. 3-21

- Schäfer, A. et al. (1990) Schäfer, A., Kalinowski, J., Simon, R., Seep-Feldhaus, A.-H. & Pühler, A. (1990) High-frequency conjugal plasmid transfer from Gram-negative *Escherichia coli* to various Gram-positive coryneform bacteria; J. Bacteriol. 172, 1663-1666
- Schlüter, A. et al. (2003) Schlüter, A., Heuer, H., Szcapanowski, R., Forney, L.J., Thomas, C.M., Pühler, A. & Top, E.M. (2003) The 64 508 bp IncP-1 $\beta$  antibiotic multiresistance plasmid pB10 isolated from a waste-water treatment plant provides evidence for recombination between members of different branches of the IncP-1 $\beta$  group; Microbiology 149, 3139-3153
- Schmitt, H. et al. (2006) Schmitt, H., Martinali, B., Stoob, K., Hamscher, G., van Beelen, P., Smit, E., van Leeuwen, K. & Seinen, W. (2006) Antibiotika als Umweltkontaminanten - Effekte auf Bodenbakterien; UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 18, 110 - 118
- Schöler, A. (2004) Schöler, A. (2004) Auswirkung von suspendierten Stoffen auf die Keimbelastung im gereinigten Abwasser und die Abwasserdesinfektion mit UV-Bestrahlung; Wasser und Abfall 5, 19-26
- Schouls, L.M. et al. (1999) Schouls, L.M., van de Pol, I., Rijpkema, S.G. & Schot, C.S. (1999) Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella species* in Dutch Ixodes ricinus ticks; J. Clin. Microbiol. 37, 2215-2222
- Schrag, S.J. & Perrot, V. (1996) Schrag, S.J. & Perrot, V. (1996) Reducing antibiotic resistance; Nature 381, 120-121
- Schrag, S.J. et al. (1997) Schrag, S.J., Perrot, V. & Levin, B.R. (1997) Adaptation to the fitness costs of antibiotic resistance in *Escherichia coli*; Proc. R. Soc. Lond. B 264, 1287-1291
- Schultz, T.W. et al. (1990) Schultz, T.W., Wyatt, N.L. & Lin, D.T. (1990) Structure-toxicity relationships for nonpolar narcotics: a comparison of data from the *Tetrahymena*, *Photobacterium* and *Pimephales* systems; Bull. Environ. Contam. Toxicol. 44, 67-72
- Schwarz, S. et al. (2004) Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B. & Cloeckaert, A. (2004) Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol; FEMS Microbiol. Rev. 28, 519-542
- Service, R.F. (1995) Service, R.F. (1995) Tracking the fingerprints of drug resistance; Science 270, 725
- Shaw, K.J. et al. (1993) Shaw, K.J., Rather, P.N., Hare, R.S. & Miller, G.H. (1993) Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes; Microbiol. Rev. 57, 138-163
- Sherman, D.R. et al. (1996) Sherman, D.R., Mdluli, K., Hickey, M.J., Arain, T.M., Morris, S.L., Barry, C.E. III. & Stover, C.K. (1996) Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*; Science 272, 1641-1643

- Sieffert, M. & Stolle, A. (2002) Sieffert, M. & Stolle, A. (2002) Nachweis und Differenzierung von *Vibrio* spp. in Krusten- und Schalentieren; Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz 45, 507-513
- Silicato, S. et al. (2005) Silicato, S., Buchberger, W., Licek, E. & Schay, G. (2005) Fischzuchtanstalten als mögliche Quellen für das Antibiotikum Oxytetracyclin in Fließgewässern; Wasser und Abfall 6, 15-19
- Sinclair, A. et al. (2003) Sinclair, A., Arnold, C. & Woodford, N. (2003) Rapid detection and estimation by pyrosequencing of 23S rRNA genes with a single nucleotide polymorphism conferring linezolid resistance in enterococci; Antimicrob. Agents Chemother. 47, 3620-3622
- Sinell, H.-J. (1994) Sinell, H.-J. (1994) Vom Tier über Lebensmittel auf den Menschen übertragbare Infektionen; Bundesgesundhbl. 37, 60-65
- Sjogren, R.E. (1995) Sjogren, R.E. (1995) Thirteen-year survival study of an environmental *Escherichia coli* in Field mini-plots; Water, Air, and Soil Pollution 81, 315-335
- Smith, H.O. et al. (1995) Smith, H.O., Tomb, J.-F., Dougherty, B.A., Fleischmann, R.D. & Venter, J.C. (1995) Frequency and distribution of DNA uptake signal sequences in the *Haemophilus influenzae* RD genome; Science 269, 538-540
- Smith, H.W. (1969) Smith, H.W. (1969) Transfer of antibiotic resistance from animal and human strains of *Escherichia coli* to resident *E. coli* in the alimentary tract of man; The Lancet 1969, 1174-1176
- Smith, K.E. et al. (1999) Smith, K.E., Besser, J.M., Hedberg, C.W., Leano, F.T., Bender, J.B., Wicklund, J.H., Johnson, B.P., Moore, K.A. & Osterholm, M.T. (1999) Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota, 1992-1998; N. Engl. J. Med. 340, 1525-1532
- Smith, M.W. et al. (1992) Smith, M.W., Feng, D.-F. & Doolittle, R.F. (1992) Evolution by acquisition: the case for horizontal gene transfer; TIBS - Trends Biochem. Sci. 17, 489-493
- Sneath, P.H.A. (1993) Sneath, P.H.A. (1993) Evidence from *Aeromonas* for genetic crossing-over in ribosomal sequences; Int. J. Syst. Bacteriol. 43, 626-629
- Sniegowski, P.D. et al. (1997) Sniegowski, P.D., Gerrish, P.J. & Lenski, R.E. (1997) Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E. coli*; Nature 387, 703-5
- Spratt, B.G. (1994) Spratt, B.G. (1994) Resistance to antibiotics mediated by target alterations; Science 264, 388-393
- St. John, P.M. et al. (1998) St. John, P.M., Davis, R., Cady, N., Czajka, J., Batt, C.A. & Craighead, H.G. (1998) Diffraction-based cell detection using a microcontact printed antibody grating; Anal. Chem. 70, 1108-1111
- Stelzer, W. & Ziegert, E. (1988) Stelzer, W. & Ziegert, E. (1988) Das Vorkommen von antibiotikaresistenten Koliformen im Abwasser einer Kläranlage; Zentralbl. Mikrobiol. 143, 415-423



- Storms, V. et al. (2002) Storms, V., van den Vreken, N., Gillis, M. & Vandamme, P. (2002) Evaluation of tRNA intergenic length polymorphism (tDNA-PCR) for the differentiation of the members of the Burkholderia cepacia complex; System. Appl. Microbiol. 25, 376-385
- Stotzky, G. & Babich, H. (1986) Stotzky, G. & Babich, H. (1986) Survival of, and genetic transfer by, genetically engineered bacteria in natural environments; Adv. Appl. Microbiol. 31, 93-138
- Stull, T.L. et al. (1988) Stull, T.L., LiPuma, J.J. & Edlind, T.D. (1988) A broad spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA; J. Infect. Dis. 157, 280-286
- Sutcliffe, J.G. (1979) Sutcliffe, J.G. (1979) Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322; Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 77-90
- Szcepanowski, R. et al. (2004) Szcepanowski, R., Krahn, I., Linke, B., Goesmann, A., Pühler, A. & Schlüter, A. (2004) Antibiotic multiresistance plasmid pRSB101 isolated from wastewater treatment plant is related to plasmids residing in phytopathogenic bacteria and carries eight different resistance determinants including a multidrug transport system; Microbiology 150, 3613-3630
- Taddei, F. et al. (1997) Taddei, F., Radmann, M., Maynard-Smith, J., Toupance, B., Gouyon, P.H. & Godelle, B. (1997) Role of mutator alleles in adaptive evolution: Nature 387, 700-702
- Tauch, A. et al. (2000) Tauch, A., Krieft, S., Kalinowski, J. & Pühler, A. (2000) The 51,409-bp R-plasmid pTP10 from the multiresistant clinical isolate *Corynebacterium striatum* M82B is composed of DNA segments initially identified in soil bacteria and in plant, animal, and human pathogens; Mol. Gen. Genet. 263, 1-11
- Tauch, A. et al. (2003) Tauch, A., Schlüter, A., Bischoff, N., Goesmann, A., Meyer, F. & Pühler, A. (2003) The 79,370-bp conjugative plasmid pB4 consists of an IncP-1 $\beta$  backbone loaded with a chromate resistance transposon, the *strA-strB* streptomycin resistance gene pair, the oxacillinase gene blaNPS-1, and a tripartite antibiotic efflux system of the resistance-nodulation-division family; Mol. Gen. Genomics 268, 570-584
- Tawfik, D.S. (2006) Tawfik, D.S. (2006) Loop grafting and the origins of enzyme species; Science 311, 475-476
- Tennstedt, T. et al. (2003) Tennstedt, T., Szcepanowski, R., Braun, S., Pühler, A. & Schlüter, A. (2003) Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant; FEMS Microbiology Ecology 45, 239-252
- Thomas, C.M. (1989) Thomas, C.M. ed. (1989) Promiscuous plasmids of Gram-negative bacteria; Academic Press, London, San Diego, New York, Sydney, Tokyo, Toronto

- Tichy, H.V. (1992) Tichy, H.V. (1992) Fingerabdrücke von Mikroorganismen; BIOforum 10/92, 352
- Tiedtke, A. et al. (2006) Tiedtke, A., Hillmann, A. & Westermeier, F. (2006) Abschlussbericht des Projektes: Untersuchung der Beseitigung von Bakterien im Abfluss von Kläranlagen mittels *Tetrahymena*
- Tietze, E. et al. (1990) Tietze, E., Tschäpe, H. & Golubev, A.V. (1990) DNA probes for studying streptothricin resistance evolution in enteric bacteria; J. Basic Microbiol. 30, 279-287
- Tjernberg, I. & Ursing, J. (1989) Tjernberg, I. & Ursing, J. (1989) Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization; APMIS 97, 595-605
- Tomasz, A. (2006) Tomasz, A. (2006) Weapons of microbial drug resistance abound in soil flora; Science 311, 342-343
- Towner, K.J. (1997) Towner, K.J. (1997) Clinical importance and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp.; J. Med. Microbiol. 46, 721-746
- Trevors, J.T. & Berg, G. (1989) Trevors, J.T. & Berg, G. (1989) Conjugal RP4 transfer between Pseudomonads in soil and recovery of RP4 plasmid DNA from soil; System. Appl. Microbiol. 11, 223-227
- Trevors, J.T. et al. (1987) Trevors, J.T., Barkay, T & Bourquin, A.W. (1987) Gene transfer among bacteria in soil and aquatic environments: a review; Can. J. Microbiol. 33, 191-198
- Trieu-Cuot, P. & Courvalin, P. (1983) Trieu-Cuot, P. & Courvalin, P. (1983) Nucleotide sequence of the *Streptococcus faecalis* plasmid gene encoding the 3'5"-aminoglycoside phosphotransferase type III; Gene 23, 331-341
- Trolldenier, H. (1998) Trolldenier, H. (1998) Antibiotika in der Tierhaltung; Bundesgesundhbl. 41, 257-259
- Tschäpe, H. (2000) Tschäpe, H. (2000) Lebensmittelbedingte Infektionskrankheiten durch Bakterien; Bundesgesundhbl. - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz 43, 758-769
- Tschäpe, H. et al. (1984) Tschäpe, H., Tietze, E., Prager, R., Voigt, W., Wolter, E. & Seltmann, G. (1984) Plasmid-borne streptothricin resistance in Gram-negative bacteria; Plasmid 12, 189-196
- Tschäpe, H. et al. (1993) Tschäpe, H., Tietze, E., Prager, R. & Fruth, A. (1993) Die Aufklärung von Infektionsketten und -quellen durch Genotypie der Erreger; Bundesgesundheitsblatt 36, 303-307
- Tsouvelekis, L.S. et al. (1992) Tsouvelekis, L.S., Tzelepi, E., Mentis, A.F., Vatopoulos, A.C. & Tsakris, A. (1992) Imipenem resistance in *Enterobacter aerogenes* is associated with derepression of chromosomal cephalosporinases and impaired permeability; FEMS Microbiol. Lett. 95, 195-200

Tuerk, C. & Gold, L. (1990) Tuerk, C. & Gold, L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase; *Science* 249, 505-510

Tuohy, M.J. et al. (2005) Tuohy, M.J., Hall, G.S., Sholtis, M. & Procop, G.W. (2005) Pyrosequencing as a tool for the identification of common isolates of *Mycobacterium* sp.; *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 51, 245-250

UBA (1997) UBA (1997) Hygienische Fragen der Umwelttechnik – Abwasserhygiene; in: *Jahresbericht 1997 Umweltbundesamt* S. 100-101

UBA (2005) UBA (2005) Eintrag von Antibiotika in die aquatische Umwelt - Antibiotika in kommunalen Kläranlagen; *Umwelt* 3, 174-175

Valsangiacomo, C. et al. (1995) Valsangiacomo, C., Baggi, F., Gaia, V., Balmelli, T., Peduzzi, R. & Piffaretti, J.-C. (1995) Use of amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Legionella pneumophila* and application to epidemiological studies; *J. Clin. Microbiol.* 33, 1716-1719

van Belkum, A. (1994) van Belkum, A. (1994) DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR; *Clin. Microbiol. Rev.* 7, 174-184

van Steenberg, T.J.M. et al. (1995) van Steenberg, T.J.M., Colloms, S.D., Hermans, P.W.M., de Graaff, J. & Plasterk, H.A. (1995) Genomic fingerprinting by restriction fragment end labeling; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5572-5576

Vanechoutte, M. et al. (1992) Vanechoutte, M., Rossau, R., De Vos, P., Gillis, M., Janssens, D., Paepe, N., De Rouck, A., Fiers, T., Claeys, G. & Kersters, K. (1992) Rapid identification of bacteria of the *Comamonadaceae* with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA); *FEMS Microbiol. Lett.* 93, 227-234

Vila, J. et al. (1994) Vila, J., Ruiz, J., Marco, F., Barcelo, A., Goni, P., Giralt, E. & Jimenez de Anta, T. (1994) Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs; *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 2477-2479

Vila, J. et al. (1996) Vila, J., Ruiz, J., Goni, P. & Jimenez de Anta, T.M. (1996) Detection of mutations in *parC* in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*; *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 491-493

Volokhov, D. et al. (2003) Volokhov, D., Chizhikov, V., Chumakov, K. & Rasooly, A. (2003) Microarray analysis of erythromycin resistance determinants; *J. Appl. Microbiol.* 95, 787-798

Vos, P. et al. (1995) Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. (1995) AFLP: a new concept for DNA fingerprinting; *Nucleic Acids Res.* 23, 4407-4414

- Wallmann, J. (1999) Wallmann, J. (1999) Antibakterielle Chemotherapie unter dem Aspekt der Antibiotikaresistenz; Bundesgesundhbl. - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz 42, 58-61
- Walsh, C. (1999) Walsh, C. (1999) Deconstructing vancomycin; Science 284, 442-443
- Waters, B. & Davies, J. (1997) Waters, B. & Davies, J. (1997) Amino acid variation in the *GyrA* subunit of bacteria potentially associated with natural resistance to fluoroquinolone antibiotics; Antimicrob. Agents Chemother. 41, 2766-2769
- Weißmann, H. & Beimfohr, C. (2004) Weißmann, H. & Beimfohr, C. (2004) Einsparung von Fällungsmitteln auf einer Großkläranlage anhand der Überwachung filamentöser Bakterien mit Gensonden; Wasser Abwasser 145, 652-655
- Welsh, J. & McClelland, M. (1991) Welsh, J. & McClelland, M. (1991) Genomic fingerprints produced by PCR with consensus tRNA gene primers; Nucleic Acids Res. 19, 861-866
- Westermeier, F. et al. (2006) Westermeier, F., Hillmann, A., Eichler, W. & Tiedtke, A. (2006) Capacity of ciliates in the elimination of suspended bacteria from sewage plant water; Poster (P25) bei der 25. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Protozoologie vom 08.03. bis 11.03.2006 in Liebenwalde bei Berlin
- WHO (2005) WHO (2005) World Health Organization, Department of essential drugs and medicines policy; Bundesgesundhbl. Gesundheitsforsch. – Gesundheitsschutz 48, 221-231
- Wiener, P. et al. (1998) Wiener, P., Egan, S. & Wellington, E.M.H. (1998) Evidence for transfer of antibiotic-resistance genes in soil populations of streptomycetes; Mol. Ecol. 7, 1205-1216
- Williams, D.H. (1999) Williams, D.H. (1999) Sugaring vancomycin; Nature 397, 567-568
- Williams, P.H. (1977) Williams, P.H. (1977) Plasmid transfer in the human alimentary tract; FEMS Microbiol. Lett. 2, 91-95
- Winnacker, E.-L. (1987) Winnacker, E.-L. (1987) From genes to clones - Introduction to gene technology; VCH, Weinheim
- Winter, G. & Milstein, C. (1991) Winter, G. & Milstein, C. (1991) Man-made antibodies; Nature 349, 293-299
- Witte, W. (1999) Witte, W. (1999) Antibiotic resistance in Gram-positive bacteria: epidemiological aspects; J. Antimicrob. Chemother. 44 (Topic A), 1-9
- Witte, W. & Klare, I. (1999) Witte, W. & Klare, I. (1999) Antibiotikaresistenz bei bakteriellen Infektionserregern; Bundesgesundhbl. - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz 42, 8-16

- Witte, W. & Mielke, M. (2003) Witte, W. & Mielke, M. (2003)  $\beta$ -Laktamasen mit breitem Wirtsspektrum - Grundlagen, Epidemiologie, Schlussfolgerungen für die Prävention; Bundesgesundhbl. - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz 46, 881-890
- Witte, W. et al. (2004) Witte, W., Strommenger, B., Klare, I. & Werner, G. (2004) Bakterielle Erreger von Krankenhausinfektionen mit besonderen Resistenzen und Multiresistenzen - Teil I: Diagnostik und Typisierung; Bundesgesundhbl. Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz 47, 352-362
- Xavier, K.B. & Bassler, B.L. (2005) Xavier, K.B. & Bassler, B.L. (2005) Interference with AI-2-mediated bacterial cell-cell communication; Nature 437, 750-753
- Yamagishi, J. et al. (1986) Yamagishi, J., Yoshida, H., Yamayoshi, H. & Nakamura, S. (1986) Nalidixic acid-resistant mutations of the *gyrB* gene of *Escherichia coli*; Mol. Gen. Genet. 204, 367-373
- Yamamoto, S. & Harayama, S. (1996) Yamamoto, S. & Harayama, S. (1996) Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* strains based on the nucleotide sequences of *gyrB* genes and on the amino acid sequences of their products; Int. J. Syst. Bacteriol. 46, 506-511
- Yoshida, H. et al. (1988) Yoshida, H., Kojima, T., Yamagishi, J.-i. & Nakamura, S. (1988) Quinolone-resistant mutations of the *gyrA* gene of *Escherichia coli*; Mol. Gen. Genet. 211, 1-7
- Yoshida, H. et al. (1991) Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, M., Yamanaka, L.M. & Nakamura, S. (1991) Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*; Antimicrob. Agents Chemother. 35, 1647-1650
- Yoshimura, F. & Nikaido, H. (1982) Yoshimura, F. & Nikaido, H. (1982) Permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane to hydrophilic solutes; J. Bacteriol. 152, 636-42
- Zhao, J.R. et al. (2005a) Zhao, J.R., Bai, Y.J., Zhang, Q.H., Wang, Y., Luo, M. & Yan, X.J. (2005) Pyrosequencing-based approach for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*; Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 51, 135-7
- Zhao, J.R. et al. (2005b) Zhao, J.R., Bai, Y.J., Wang, Y., Zhang, Q.H., Luo, M. & Yan, X.J. (2005) Development of a pyrosequencing approach for rapid screening of rifampin, isoniazid and ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis*; Int. J. Tuberc. Lung Dis. 9, 328-332
- ZKBS (1999) Stellungnahme der ZKBS "zur Biologischen Sicherheit von Antibiotika-Resistenzgenen im Genom gentechnisch veränderter Pflanzen" vom 06.07.1999 (Az. 6790-10-62)

## Danksagung

Für die tatkräftige Unterstützung bei der Beschaffung der Literatur möchte ich mich bei den Kolleginnen der Bibliothek am Standort Essen bedanken, ganz besonders bei Frau Szpadzik.