

MARGINS-I: Monitoring of Antibiotic Resistance Genes in Soils

Identifizierung und Quantifizierung der Antibiotikaresistenzgen-
Hintergrundbelastung von Böden in Österreich



MARGINS-I: Monitoring of Antibiotic Resistance Genes in Soils

Identifizierung und Quantifizierung der Antibiotikaresistenzgen-Hintergrundbelastung von Böden in Österreich



 Bundesministerium
Land- und Forstwirtschaft,
Regionen und Wasserwirtschaft

 Bundesministerium
Soziales, Gesundheit, Pflege
und Konsumentenschutz



Wien, 2023

Impressum

Projektnehmer: AGES – Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit

Department für Integrative Risikobewertung/Daten-Statistik-Risikobewertung (DSR) in Kooperation mit der Technischen Universität Wien, Institut für Wassergüte und Ressourcenmanagement

Adresse: Spargelfeldstrasse 191, A-1220 Wien (AGES)

Projektleiter: Dr. Markus Wögerbauer

Tel.: +43(0)50555-25717

E-Mail: markus.woegerbauer@ages.at

Projektmitarbeiter: Sonia Galazka, MSc.; Dr. Melanie Kuffner; Mag. Karin Weyermaier; Elena Radu, MSc.; Dr. Irina Korschineck; Dr. Georg Dersch; Valerie Vigl, BSc; Gloria Young, BSc; Linda Tomschiczek; Dr. Juliane Pichler; Prof. Dr. Franz Allerberger; Kathrin Spettel, MSc; Richard Kriz, BSc; DI.(FH) Michael Schwarz; DI. Johann Steinwider; Harald Bock; Sonja Mika; Dr. Stefanie Dobrovolny; Mag. Rupert Hohegger; Mag. Helga Reisenzein; Dr. Richard Gottsberger; Irina Dielacher, MSc.; Katarzyna Slipko, MSc.; DI. Gerhard Rab; Prof. Dr. Peter Strauss; Dr. Christian Baumgartner; Ronald Hillerbrand; Mag. Karoline Zsak; Ass. Prof. Dr. Julia Vierheilig; Ass. Prof. Dr. Norbert Kreuzinger; Mag. Dr. Markus Wögerbauer

Kooperationspartner: Technische Universität Wien, Institut für Wassergüte und Ressourcenmanagement; Ingenetix GmbH, Wien

Finanzierungsstellen: BMSGPK und BML

Projektlaufzeit: 2019 - 2022

1. Auflage

Die AGES-Projektleitung bedankt sich bei den zuständigen Behörden und Institutionen für die exzellente Zusammenarbeit und die Erlaubnis zur Bodenprobenziehung: MA 42 (Wiener Stadtgärten), MA 49 (Lainzer Tiergarten), MA 28 (Straßenverwaltung), MA 22 (Umweltschutz); Österreichische Bundesgärten; Nationalpark Donau-Auen (Bereich Natur und Wissenschaft, Orth/Donau) und Österreichische Bundesforste; Bundesamt für Wasserwirtschaft (Institut für Kulturtechnik und Bodenwasserhaushalt, Petzenkirchen). Wir bedanken uns überdies beim Austrian Science Fund (FWF) für die Möglichkeit zur Synergienutzung bei der Proben-sammlung im Rahmen des Forschungsprojekts ANTIVERSA (Projektnr. I 4374-B).

Alle Rechte vorbehalten.



Wien, 2023. Stand: 5. April 2023

Inhalt

Inhalt	3
1 Zusammenfassung	6
2 Summary	12
3 Hintergrund und Zielsetzungen	17
3.1 Wissenschaftlicher Hintergrund	17
3.2 Ziele	20
3.3 Versuchsdesign, Standorte und Proben	21
3.4 Auswahl der ARG Targets für die TaqMan qPCR	28
4 Material und Methoden	31
4.1 Entnahme und Behandlung der Proben	31
4.1.1 Bodenproben	31
4.1.2 Repräsentativität der Probenziehung	32
4.1.3 Kot-, Gülle-, Kompost- und Wasserproben	33
4.2 Chemische Bodencharakterisierung	33
4.3 DNA-Isolation	34
4.3.1 Bodenproben	34
4.3.2 Drainage- und Wasserproben	34
4.4 16S Amplikon Sequenzierung	34
4.5 SmartChip qPCR Array	36
4.6 TaqMan qPCR	37
4.6.1 dsDNA Standard-Generierung	38
4.6.2 Probenvorbereitung und Quantifizierung	39
4.6.3 TaqMan Assay Validierung	40
4.7 Bestimmung der Antibiotika-Konzentrationen	42
4.8 Kultivierung Antibiotika-resistenter Bakterien aus Boden- und Gülleproben	43

4.9	Taxonomische Klassifizierung antibiotikaresistenter Bakterien aus Boden- und Gülleproben: 16S Illumina MiSeq Amplikon Sequenzierung	45
5	Modul 1: Erfassung der ARG-Belastung von Ackerböden, urbanen und naturnahen Vergleichsflächen im Jahresverlauf	47
5.1	Quantifizierung von ARGs und MGEs mit TaqMan qPCR	47
5.1.1	ARG-Konzentrationen in HOAL-Acker-, Laub- und Nadelwaldböden.....	48
5.1.2	ARG-Vergleich: HOAL-Ackerböden mit pristinen und urbanen Gebieten.....	73
5.1.3	Saisonaler Vergleich: ARG- und MGE-Konzentrationen in den Donau-Auen.....	95
5.1.4	Saisonaler Vergleich: ARG- und MGE-Konzentrationen an den urbanen Standorten	107
5.1.5	ARG- und MGE-Konzentrationen in österreichischen Nadelwäldern	123
5.1.6	ARG- und MGE-Konzentrationen in HOAL-Drainage- und -Bachwasser	134
5.2	ARG-Abundanz im Agroökosystem: Zusammenfassung und Statistik	150
5.2.1	Vergleich der vier HOAL-Felder anhand aller Zeitpunkte.....	150
5.2.2	Vergleich HOAL-Feldproben vs. HOAL-Waldproben	152
5.2.3	Zeitlicher Verlauf auf den HOAL-Flächen	155
5.2.4	HOAL-Oberflächengewässer.....	158
5.2.5	Vergleich HOAL-Flächen und Vergleichsstandorte.....	159
5.2.6	Vergleich Composite und Triangle Sampling.....	166
5.3	Taxonomische Charakterisierung der Bodenbakterien-Population: Illumina MiSeq 16S Amplikon Sequenzierung.....	167
5.3.1	Bakterielle Taxa-Verteilung im HOAL-Betrieb	174
5.3.2	Unterschiede im bakteriellen Mikrobiom zwischen HOAL-Feldern, Donau-Auen und urbanen Regionen	179
5.3.3	Identifizierung klinisch relevanter Bakterien in den MARGINS-I Proben.....	182
5.3.4	Netzwerk-Analyse der bakteriellen Genera und Antibiotikaresistenz-Gene	183
5.4	ARG-Screening mit dem SmartChip qPCR Array.....	185
5.4.1	Untersuchung von 95 ARGs in 30 Proben	186
5.4.2	Untersuchung von weiteren 48 ARGs in 12 Proben	198
5.5	Kultivierung antibiotikaresistenter Bakterien aus Boden- und Gülleproben: Bestimmung der Resistenzraten	200

5.6 Sequenzierung der antibiotikaresistenten Bakterien aus Boden- und Gülleproben ...	205
5.7 Antibiotikakonzentrationen	210
5.8 Korrelation der ARG-Konzentrationen mit Abiotischen Standortfaktoren	216
5.8.1 Korrelation der ARG-Konzentrationen mit Wetterdaten	216
5.8.2 Korrelation der ARG-Konzentrationen mit Bodencharakterisierungsdaten (Selektionsdruck)	218
5.8.3 Korrelation der ARG-Konzentrationen mit mikrobieller Biodiversität	220
6 Modul 2: Erfassung potentieller ARG-Ausbreitungswege in einem HOAL- Schweinezuchtbetrieb	221
6.1 Überblick.....	221
6.2 Einleitung.....	222
6.3 Zielsetzung und Fragestellung.....	223
6.4 Durchführung	223
6.5 Ergebnisse.....	225
6.5.1 Selektionsdruck – Antibiotikamengen.....	225
6.5.2 ARG Profile in Schweinekot und Schweinegülle (TaqMan qPCR).....	226
6.5.3 Zeitliche Veränderungen der ARG Profile im Boden nach Gülleapplikation.....	227
6.5.4 Detektion von Gülle-assoziierten Bakteriengruppen in HOAL-Ökosystemen.....	230
6.6 Diskussion	234
6.7 Beobachtungen und Schlussfolgerungen	237
7 Modul 3: Handlungsempfehlungen	241
8 Anhang.....	246
8.1 Factsheet – MARGINS-I	246
Referenzen.....	252
Tabellenverzeichnis.....	260
Abbildungsverzeichnis.....	262
Abkürzungen.....	266

1 Zusammenfassung

Antibiotikaresistenzen gefährden nicht nur die individuelle, sondern auch die Öffentliche Gesundheit. Zahlreiche Resistenzgene, die problematisch in der Behandlung von Infektionskrankheiten sind, stammen aus Umweltquellen wie Gewässern und Böden oder aus der Lebens- und Futtermittelkette. Die bakterielle Bodenmikroflora ist von Natur aus reich an Antibiotikaresistenzgenen (ARGs). Durch landwirtschaftliche Praktiken wie Gülledüngung können zusätzlich ARGs in den Boden eingebracht werden. Agroökosysteme spielen daher eine Rolle bei der Ausbreitung - aber auch bei der Eindämmung - von Antibiotikaresistenzen. Da bis vor kurzem keine systematisch erhobenen, quantitativen Daten zur ARG-Hintergrundbelastung von österreichischen Böden vorlagen, versuchte das Projekt **MARGINS-I** diese Datenlücke zu schließen. Außerdem sollte die Auswirkung von Gülledüngung auf die ARG-Konzentration in Ackerböden untersucht werden.

In einer einjährigen Longitudinalstudie wurden die Konzentrationen von **Antibiotikaresistenzgenen** in Ackerböden eines österreichischen Freiluft-Versuchsgeländes (HOAL; Petzenkirchen, Niederösterreich) erhoben. **Vier HOAL-Felder** wurden untersucht: Feld F04 wurde im Beobachtungszeitraum und auch in den vorangegangenen Jahren nicht mit Gülle gedüngt. Die Felder F31 und F39 wurden im Verlauf der Studie frisch mit Schweinegülle gedüngt und waren auch in den vorangegangenen Jahren mit Schweinegülle gedüngt worden. Das Feld F32 wurde im Beobachtungszeitraum nicht mit Gülle gedüngt, war aber in den vorangegangenen Jahren mit Schweinegülle gedüngt worden. Auf den Feldern F04, F31 und F39 wurde im Beobachtungszeitraum Mais konventionell angebaut, auf Feld F32 Winterweizen. Zusätzlich wurden im HOAL frischer **Schweinekot, Schweinegülle, Kompost, Drainage- und Bachwasser** analysiert.

Außerdem wurde ein breites Spektrum von **Vergleichsböden** an nicht-landwirtschaftlichen Standorten mit unterschiedlich starkem anthropogenem Einfluss untersucht, um die Ergebnisse der HOAL-Ackerböden in diesen Kontext einordnen zu können. Die Vergleichsböden umfassten einen Laubwald und einen Nadelwald im HOAL-Gebiet, 5 Nadelwald-Standorte im Wiener Becken, drei Höhenstufen am Ötscher, 10 Standorte im Nationalpark Donau-Auen sowie 2 Laubwaldstandorte und vier Grasflächen in Wien.

HOAL-Felder, HOAL-Drainage- und Bachwasser und HOAL-Wälder wurden an 7 bis 10 verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf einer Vegetationsperiode (Herbst 2019 bis Herbst 2020) beprobt. Die Vergleichsboden-Standorte in Wien und im Nationalpark Donau-Auen wurden jeweils im Sommer und im Winter beprobt. Die Standorte im Wiener Becken und am Ötscher wurden nur einmal gesammelt. Insgesamt wurden 110 Proben untersucht, i.e. 85 Bodenproben, 20 Wasserproben, 3 Schweinegülleproben und jeweils eine Probe von Schweinekot und Kompost.

Zentrales Experiment war die **Quantifizierung von 26 qPCR-Targets** (TaqMan) in allen Proben. Die Targets umfassten **24 Antibiotikaresistenzgene (ARGs)** und **zwei mobile genetische Elemente (MGE)**. Die untersuchten ARGs inaktivieren Aminoglykoside (*aadA*, *nptII*, *nptIII*, *strB*), β -Lactame (*bla_{CTX-M-15}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM-1}*, *bla_{OXA-10}*, *bla_{TEM-1}*, *mecA*), Phenicol (*cmxA*), Diaminopyrimidine (*dfrA-1*); Makrolide (*ermB*, *ermF*), Polypeptide (*mcr-1*), Biozide (*qacEdelta1*), Fluorochinolone (*qnrS*), Nukleoside (*sat-4*), Sulfonamide (*sul1*), Tetrazykline (*tet(A)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(W)*) und Glykopeptide (*vanA*). Die ausgewählten Resistenzgene erfassen somit insgesamt **12 klinisch wichtige Antibiotikaklassen** und decken **sechs unterschiedliche Resistenzmechanismen** ab. Die untersuchten MGE-spezifischen Gene waren *intl1* und *ISPPs*. Als Surrogatmarker für die Gesamt-Abundanz der Bodenbakterien und zur Berechnung der relativen ARG-Häufigkeiten wurde außerdem das **16S rRNA-Gen** quantifiziert. Von jeder Probe wurden 3 biologische Probenreplikate in jeweils 3 technischen PCR-Replikaten gemessen. Die Kombination von absoluter und relativer Quantifizierung sowie die hohe Anzahl an Replikaten machen die Ergebnisse sehr vertrauenswürdig.

Ergänzend wurden in ausgewählten Proben **weitere Untersuchungen** durchgeführt:

- In 81 Proben wurde die Diversität und taxonomische Zusammensetzung der bakteriellen Mikroflora mittels **Illumina MiSeq 16S Amplikon Sequenzierung** untersucht. In Co-Occurrence Netzwerkanalysen wurden Korrelationen zwischen der Verbreitung bestimmter Organismen und der Abundanz einzelner ARGs hergestellt und so potentielle bakterielle ARG-Carrier identifiziert.
- 30 Proben wurden mit dem SmartChip-System der Firma **Resistomap** auf ein erweitertes Spektrum von 95 ARGs gescreent, und in 12 dieser Proben wurde dieses Spektrum noch einmal auf 143 Targets ausgedehnt um einen vertieften Überblick über das Vorkommen klinisch relevanter ARGs in den untersuchten Umweltkompartments zu bekommen.
- Bei 5 Proben wurden die **Resistenzraten kultivierbarer Bakterien** gegen 6 verschiedene Antibiotika ermittelt. 213 resistente Bakterien-Isolate wurden anhand von 16S rRNA Sequenzen taxonomisch identifiziert.
- 16 Proben wurden mittels **LC-MS/MS** auf 29 verschiedene **Antibiotika** untersucht, 5 weitere Proben wurden auf 20 Antibiotika untersucht.
- Für 38 Bodenproben wurden die wichtigsten **Bodenparameter** wie pH-Wert, Textur, Humusgehalt, Makronährstoffe, Schwermetalle und Spurenelemente bestimmt und auf Korrelationen mit den qPCR Ergebnissen untersucht.
- Von der Wetterstation im HOAL-Gebiet und von ZAMG-Wetterstationen in der Nähe der Vergleichsstandorte wurden für den Beobachtungszeitraum **meteorologische Daten** wie Temperatur, Luftdruck, Luftfeuchtigkeit, Regenmengen und Windgeschwindigkeiten abgerufen und auf Korrelationen mit den qPCR Ergebnissen untersucht.

Die qPCR-Ergebnisse zeigten insgesamt eine hohe ARG-Diversität in den Böden. Von 26 untersuchten Targets wurden 22 in den HOAL-Ackerfeldern detektiert, von denen wiederum 21 auch an nicht-landwirtschaftlich genutzten Vergleichsstandorten gefunden wurden. Die Abundanz der detektierbaren Targets variierte grob zusammengefasst in den langjährig Gülle-gedüngten HOAL-Feldern F31, F32 und F39 zwischen 10^2 und 10^6 Kopien pro Gramm Trockenboden und im langjährig Gülle-freien Feld F04 zwischen 10^2 und 10^5 Kopien pro Gramm Trockenboden, mit wenigen negativen Einzelproben. In den Vergleichsböden variierte sie zwischen 10^2 und 10^5 mit zahlreichen negativen Einzelproben.

Die Untersuchung von Schweinegülle und der **Vergleich der vier HOAL-Felder** gab Hinweis darauf, dass die Abundanz von 15 Targets in Ackerböden durch die Güllendüngung erhöht wird (*ermF*, *ermB*, *dfrA-1*, *sat-4*, *nptIII*, *strB*, *aadA*, *cmxA*, *sul1*, *qacEdelta1*, *tet(A)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(W)*, *intI1*). Erstens hatten diese Targets in der Gülle mit 10^6 bis 10^9 Kopien pro Gramm Trockenmasse eine viel höhere Abundanz als in den Böden. Zweitens trat bei dreizehn dieser Targets (alle außer *aadA* und *tet(O)*) im Feld F31 einen Tag bis eine Woche nach der Güllendüngung ein auffälliger Maximalwert (Peak) auf, der bis zum Ende des Vegetationszyklus wieder auf das Baseline-Niveau (= Zeitpunkt vor Gülle-Applikation) abflachte. Besonders ausgeprägt war der Konzentrationsanstieg bei *ermF*, das ausschließlich in der Woche nach der Güllendüngung detektierbar war. Bei *ermF* und *ermB* wiederholte sich dieser kurzfristige Gülle-Effekt auch im zweiten frisch mit Gülle gedüngten Feld F39, bei den meisten anderen Targets jedoch nicht oder nur sehr schwach, sodass eine statische Bestätigung nicht möglich war. Drittens waren 13 der genannten 15 Targets (alle außer *ermF* und *intI1*) über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg in den langjährig Gülle-gedüngten Feldern F31, F32 und F39 abundanter als im langjährig Gülle-freien Feld F04. Dieser langfristige Effekt der Güllendüngung war statistisch signifikant (ANOVA mit paarweisen post-hoc Vergleichen nach Tukey, $p < 0.05$). Die HOAL-Ackerböden erwiesen sich also kurzfristig als resilient gegenüber ARG-Einträgen aus der Gülle, die innerhalb einer Anbausaison wieder abgebaut wurden (F31) bzw. im Rauschen jahreszeitlicher Schwankungen unbemerkbar blieben (F39). Gleichzeitig führte die wiederholte Gülle-Anwendung über Jahre hinweg zu einem dauerhaften Konzentrationsanstieg von ARGs in den Ackerböden, der innerhalb einer Saison ohne Gülle (F32) nicht reversibel war. Im Drainage-Wasser schwankte die Abundanz der untersuchten Targets stark ohne klaren Zusammenhang mit der Güllendüngung.

An den **nicht-landwirtschaftlich genutzten Vergleichsstandorten** wurde dasselbe Spektrum von ARGs detektiert wie auf den HOAL-Feldern. Die Anzahl der detektierten Targets pro Einzelprobe war jedoch geringer. Sie variierte bei den Vergleichsstandorten zwischen 4 und 18 Targets pro Probe. Die niedrigsten Werte wurden an Nadelwaldstandorten im Wiener Becken und im HOAL-Nadelwald (NF) beobachtet, die höchsten auf anthropogen stark beeinflussten Grasflächen in Wien. Das langfristig Gülle-freie Feld F04 war mit 12 bis 18 detektierten Targets vergleichbar mit den Grasflächen in Wien. Die langfristig Gülle-gedüngten Felder F31, F39 und F32 befanden sich mit 15 bis 19 detektierten Targets am oberen Rand bzw. oberhalb des Schwankungsbereiches der Vergleichsböden. Für dieses

Gesamtbild waren vor allem 10 Targets verantwortlich: *dfrA-1*, *nptIII*, *strB*, *aadA*, *sat-4*, *sul1*, *qacEdelta1*, *tet(A)*, *tet(M)*, *tet(O)*. Sie wurden an den Vergleichsstandorten im Wiener Becken selten und auf den Wiener Grasflächen häufig detektiert. Außerdem waren sie in den Feldern F31, F39 und F32 signifikant abundanter als an (fast) allen Vergleichsstandorten (ANOVA mit paarweisen post-hoc Vergleichen nach Tukey, $p < 0.05$). Im Feld F04 waren 9 dieser Targets (alle außer *dfrA-1*) abundanter als an einzelnen Vergleichsstandorten, jedoch nicht abundanter als in den Wiener Grasflächen. Bei diesen 10 Targets zeigte sich also zusätzlich zum Gülle-Effekt auf den HOAL-Feldern ein vermehrtes Auftreten in Ackerböden im Vergleich zu nicht-landwirtschaftlich genutzten Flächen.

Bei *intl1*, *tet(W)*, *ermB* und *cmxA* wurde zusätzlich zum Gülle-Effekt auf den HOAL-Feldern wider Erwarten eine ubiquitäre Verbreitung an den Vergleichsstandorten festgestellt, bei *ermF* häufiges Auftreten in den Grasflächen und Laubwaldstandorten in Wien. *Mcr-1* war an den Vergleichsstandorten häufiger anzutreffen als auf den HOAL-Feldern.

Bei den übrigen Targets wurden weder ein Gülle-Effekt noch wesentliche Unterschiede zwischen Ackerböden und Vergleichsböden beobachtet. *Bla_{TEM-1}*, *vanA* und *ISPps* wurden ubiquitär und mit zeitlich konstanter Konzentration detektiert. *MecA*, *bla_{OXA-10}*, und *nptII* wurden nur punktuell in Einzelproben verschiedener Standorte detektiert. *QnrS*, *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{KPG}* und *bla_{NDM-1}* wurden in keiner Bodenprobe detektiert.

Die 16S rRNA-Gen Amplikon-Sequenzierung wurde für 68 Bodenproben, 5 organische Dünger (1x Kompost, 1x Schweinekot, 3x Schweinegülle) und 8 Wasserproben durchgeführt. Je Probe wurden 20 000 – 40 000 auf Qualität gefilterte Sequenzen analysiert. Die bakterielle Diversität war in den Bodenproben generell höher als in Wasserproben und organischen Düngematerialien. Die Genera *Clostridium sensu stricto 1*, *Terrisporobacter*, *Turicibacter* und *Romboutsia* wurden in Schweinegülle und in den Gülle-gedüngten Feldern besonders häufig detektiert, mit einem starken Anstieg nach Gülle-Applikation. Diese Daten deuten darauf hin, dass diese Bakterien von der Gülle in den Boden eingebracht wurden. *Clostridium sensu stricto 1* wurde mit niedriger Read-Anzahl (<30) auch in den Drainage- und in 75% der Bach-Wasserproben detektiert. In einer Netzwerkanalyse wurden die Antibiotikaresistenzgen-Konzentrationen mit der Häufigkeit der Bakterien-Genera korreliert. Hierbei konnte vor allem das Bakterium *Terrisporobacter* als potentieller Resistenzträger identifiziert werden, da die Antibiotikaresistenzgene *dfrA-1*, *nptIII*, *sat-4* und das Antiseptika-Resistenzgen *qacEdelta1* positiv nach Spearman mit dieser Gattung korrelieren.

Zusätzlich wurden in den untersuchten Proben Bakterien-Spezies bzw. -Genera identifiziert, die klinisch relevant sein könnten. Dazu zählten *Aeromonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium* und *Pseudomonas*. Diese Gattungen sind sowohl als Umweltkeime wie auch als Erreger von nosokomialen Infektionen dokumentiert.

Die Untersuchung von 95 Targets in Kot, Gülle, 8 HOAL-Ackerproben und 20 Vergleichsböden mit dem **Resistomap-SmartChip** zeigte eindrucksvoll die hohe ARG-Diversität in Böden: In den Vergleichsböden variiert die Anzahl der detektierten Targets pro Probe zwischen 37 und 62. Die HOAL-Felder F04 und F32 lagen mit 55-60 detektierten Targets innerhalb dieses Schwankungsbereichs, die Felder F31 und F39 mit 60-69 lagen darüber. Auffallend am Resistomap-Ergebnis war ein über alle Bodenproben konstantes Ranking von abundanten zu seltenen Targets. Die abundantesten Targets in den Böden waren *intl-1*, *mexF*, *ermE* und *vanA*. Während in den Bodenproben je nach Standort und Zeitpunkt einzelne Targets fehlen, wurde in Schweinekot und Schweinegülle das ganze Spektrum in einer einzigen Probe detektiert und es bestand ein anderes Abundanzranking als im Boden. In der Gülle dominierten vor allem Tetrazyklin-Resistenzgene, die in den Böden selten waren. In Gülle/Kot und Ackerböden wurden 15 gemeinsame Targets identifiziert, die in den Vergleichsböden nicht gefunden wurden (*ermF*, *bla_{TEM_1}*, *tetQ*, *tetM_3*, *tetA(P)*, *tetO_1*, *tetM_2*, *tetO_2*, *tetX*, *qacEdelta1_3*, *qacEdelta1_1*, *fosX*, *aadE*, *aphA3_1*, *tnpA_1*). In 12 Vergleichsböden aus dem Nationalpark Donau-Auen und dem Ötscher-Gebiet wurden 48 zusätzliche Targets untersucht. Dies führte zur Detektion von weiteren 13 bis 25 Targets pro Probe und verdeutlichte noch einmal die hohe ARG-Diversität in naturnahen Böden.

Kultivierbare Bakterien aus jeweils einer Probe vom langjährig Gülle-freien Feld F04, vom Gülle-gedüngten Feld F31, von 2 Standorten im Nationalpark Donau-Auen sowie von einer Gülleprobe wurden auf Resistenz gegen Vancomycin, Kanamycin, Sulfadiazin, Ampicillin, Erythromycin und Tetrazyklin getestet. In allen Proben wurden für jedes dieser Antibiotika resistente kultivierbare Bakterien detektiert. Die Resistenzraten wurden als Anteil der resistenten Bakterien an der Gesamtanzahl kultivierbarer Bakterien bestimmt. Bei Vancomycin und Kanamycin waren die Resistenzraten in den Donau-Auen-Böden (DA01 und DA10) und im nicht Gülle-gedüngten Feld (F04) am höchsten. Die Sulfadiazin-Resistenzrate war in einer der Donau-Auen Probe (DA10) erhöht und in allen anderen Proben gering. Bei Ampicillin war die Resistenzrate in allen Bodenproben ähnlich und in der Gülle sehr gering. Die Erythromycin-Resistenzrate war in allen Proben gering. Die Tetrazyklin-Resistenzrate war ebenfalls in allen Proben gering, mit dem höchsten Wert im Gülle-gedüngten Feld F31. In der Gülle war die Gesamtanzahl an kultivierbaren Bakterien 10-fach bzw. 100-fach höher als in den Bodenproben.

Zur Identifikation potentieller Resistenzträger wurden aus jeder der 5 Proben Vancomycin-, Kanamycin-, Sulfadiazin-, Ampicillin-, Erythromycin- und Tetrazyklin-**resistente Bakterien isoliert**. Die insgesamt 213 Isolate wurden anhand von *16S rRNA* Gensequenzen identifiziert. Die häufigsten Genera bei den resistenten Bodenisolaten waren *Pseudomonas*, *Pedobacter*, *Variovorax* und *Stenotrophomonas*, bei den Schweinegülle-Isolaten waren es *Brevibacterium*, *Enterococcus* und *Bavariicoccus*.

Zur Bestimmung des Selektionsdrucks wurde die **Konzentration von 29 verschiedenen Antibiotika** in 14 repräsentativ ausgewählten Bodenproben, einer Kot- und einer Gülle-Probe untersucht. Eine

Drainage-Wasserprobe und vier Bach-Wasserproben wurden auf 20 Antibiotika untersucht. In der Gülle konnte ein Fluorochinolon (Marbofloxacin: 20,8 µg/kg) und ein Tetrazyklin-Derivat (Doxycyclin: 102,0 µg/kg) nachgewiesen werden. In einer HOAL Bachwasserprobe konnte ein Sulfonamid (Sulfadimidin: < 0,0010 µg/L) qualitativ detektiert, aber nicht quantifiziert werden. Die detektierten Marbofloxacin- und Doxycyclin-Mengen übersteigen die für einige Bakterienarten/Antibiotikum-Kombinationen berichteten **minimalen selektiven Konzentrationen** (MSC) und könnten daher in der Gülle das Wachstum resistenter Bakterienstämme begünstigen.

In der **Korrelationsanalyse** wurde bei neun Targets eine negative Korrelation zwischen der Target-Abundanz und der Regenmenge am Tag der Probenahme beobachtet. Einzelne Targets korrelierten auch mit anderen meteorologischen Faktoren bzw. bestimmten Bodenparametern. Die Konzentrationen von *tet(O)* und *tet(M)* korrelierten z.B. positiv mit der detektierten Kupfermenge, während *tet(W)* negativ mit der Boden- und Lufttemperatur korrelierte.

2 Summary

Antimicrobial resistance is not only a threat for individual but also for Public Health. Many resistance genes, which are of concern in the treatment of infectious diseases, originate from environmental sources such as water and soil or from the food and feed chain. The bacterial microflora of soils is naturally abundant in antibiotic resistance genes (ARGs). Agricultural practices such as manure fertilization can introduce additional ARGs into the soil. Agroecosystems therefore play a role in the spread - but also in the containment - of resistance. Since until recently no systematically collected, quantitative data on background ARG contamination of Austrian soils were available, the **MARGINS-I** project sought to fill this data gap. In addition, the effect of manure fertilization on ARG concentrations in agricultural soils was investigated.

In a one-year longitudinal study, concentrations of **antibiotic resistance genes** were investigated in agricultural soils of an Austrian open-air experimental site (HOAL; Petzenkirchen, Lower Austria). **Four HOAL fields** were analyzed: Field F04 was not fertilized with manure during the observation period or in previous years. Fields F31 and F39 were freshly fertilized with pig manure during the study period and had also been fertilized with pig manure in previous years. Field F32 was not fertilized with manure during the observation period, but had been fertilized with swine manure in previous years. Fields F04, F31 and F39 had corn grown conventionally during the observation period, and field F32 had winter wheat grown. In addition, **fresh pig faeces, pig manure, compost, drainage and stream water** were analyzed in the HOAL.

In addition, a wide range of **comparator soils** at non-agricultural sites with varying degrees of anthropogenic influence were investigated in order to place the results of the HOAL agricultural soils in this context. The comparative soils included one deciduous forest and one coniferous forest in the HOAL area, 5 coniferous forest sites in the Vienna Basin, three altitudinal levels on the Ötscher, 10 sites in the Donau-Auen National Park, and 2 deciduous forest sites and four grasslands in Vienna.

HOAL fields, HOAL drainage and stream water, and HOAL forests were sampled at 7 to 10 different time points over the duration of a vegetation period (fall 2019 to fall 2020). The comparator soil sites in Vienna and the Donau-Auen National Park were sampled in summer and winter, respectively. The sites in the Vienna Basin and at the Ötscher were analyzed only once. A total of 110 samples were analyzed, i.e. 85 soil samples, 20 water samples, 3 pig manure samples and one sample each of pig faeces and compost.

The core experiment was the **quantification of 26 qPCR targets** (TaqMan) in all samples. The targets included **24 antibiotic resistance genes (ARGs)** and **two mobile genetic elements (MGEs)**. These ARGs inactivated aminoglycosides (*aadA*, *nptII*, *nptIII*, *strB*), β -lactams (*bla_{CTX-M-15}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM-1}*,

*bla*_{OXA-10}, *bla*_{TEM-1}, *mecA*), phenicols (*cmxA*), diaminopyrimidines (*dfrA-1*); macrolides (*ermB*, *ermF*), polypeptides (*mcr-1*), biocides (*qacEdelta1*), fluoroquinolones (*qnrS*), nucleosides (*sat-4*), sulfonamides (*sul1*), tetracyclines (*tet(A)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(W)*), and glycopeptides (*vanA*). These ARGs embrace a total of **12 clinically important antibiotic classes** and cover **six different resistance mechanisms**. MGEs-specific genes were *int11* and *ISPPs*. The **16S rRNA gene** was also quantified as a surrogate marker for total soil bacterial abundance and to calculate relative ARG abundances. From each sample, three biological sample replicates were quantified in three technical PCR replicates, each. The combination of absolute and relative quantification and the high number of replicates made the results highly reliable.

The following **analyses** were performed in selected samples, additionally:

- In 81 samples, the diversity and taxonomic composition of the bacterial microflora was analyzed using **Illumina MiSeq 16S amplicon sequencing**. Co-occurrence network analyses established correlations between the distribution of specific organisms and the abundance of individual ARGs, identifying potential bacterial ARG carriers.
- Thirty samples were screened for an expanded spectrum of 95 ARGs using the **Resistomap SmartChip** system, and in 12 of these samples the spectrum was further expanded to 143 targets to provide an in-depth overview of the occurrence of clinically relevant ARGs in the environmental compartments analyzed.
- **Resistance rates of culturable bacteria** to six different antibiotics were determined in 5 soil samples. 213 resistant bacterial isolates were taxonomically identified using *16S rRNA* sequences.
- Sixteen samples were analyzed for 29 different **antibiotics** by **LC-MS/MS**, and 5 additional samples were analyzed for 20 antibiotics.
- The most important **soil parameters** such as pH, texture, humus content, macronutrients, heavy metals and trace elements were determined for 38 soil samples and analyzed for correlations with the qPCR results.
- **Meteorological data** such as temperature, barometric pressure, humidity, rainfall, and wind speed were obtained from the weather station in the HOAL area and from ZAMG weather stations near the monitoring sites for the observation period and analyzed for correlations with the qPCR results.

Overall, the qPCR results showed high ARG diversity in the soils. Of 26 targets analyzed, 22 were detected in the HOAL agricultural fields, of which 21 were in turn also found in non-agricultural comparator sites. Roughly summarized, the abundance of detectable targets varied between 10² and

10⁶ copies per gram of dry soil in the long-term manured HOAL fields with few negative individual samples and between 10² and 10⁵ copies in the long-term manure-free field F04 again with few negative individual samples. In the comparator soils, the over-all abundance-range was between 10² and 10⁵ with numerous negative individual samples.

Analysis of swine manure and **comparison of the four HOAL fields** provided evidence that the abundance of 15 targets in agricultural soils is increased by manure fertilization (*ermF*, *ermB*, *dfrA-1*, *sat-4*, *nptIII*, *strB*, *aadA*, *cmxA*, *sul1*, *qacEdelta1*, *tet(A)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(W)*, *int1*). First, these targets had much higher abundance in manure than in soils, with 10⁶ to 10⁹ copies per gram of dry matter. Second, for thirteen of these targets (all except *aadA* and *tet(O)*) in field F31, a notable ARG concentration peak (maximum value) occurred one day to one week after manure fertilization, which leveled off again to the baseline level (= situation before manure application) by the end of the vegetation period. The increase in concentration was particularly pronounced for *ermF*, which was detectable exclusively in the week after manure fertilization. For *ermF* and *ermB*, this short-term manure effect was also repeated in the second freshly manure-fertilized field F39, but for most other targets the manure-induced increase was not or only very weakly observable, so that static confirmation was not possible. Third, 13 of the aforementioned 15 targets (all except *ermF* and *int1*) were more abundant in the long-term manure-fertilized fields F31, F32, and F39 than in the long-term manure-free field F04 over the entire observation period. This long-term effect of manure fertilization was statistically significant (ANOVA with Tukey's pairwise post-hoc comparisons, p<0.05). Thus, HOAL agricultural soils were found to be resilient to ARG inputs from manure in the short term, decreasing to baseline-levels within one cropping season (F31) or remaining undetectable in the noise of seasonal fluctuations (F39). At the same time, repeated manure application over years resulted in a permanent increase in concentration of ARGs in cropland soils that was not reversible within a season without manure (F32). In drainage water, the abundance of the investigated targets fluctuated strongly without a clear correlation with manure fertilization.

The same spectrum of ARGs was detected at **the non-agricultural comparator sites** as in the HOAL fields. However, the number of targets detected per individual sample was lower. It varied from 4 to 18 targets per sample at the comparator sites. The lowest values were observed at coniferous forest sites in the Vienna Basin and in the HOAL coniferous forest (NF), the highest on anthropogenically strongly affected grasslands in Vienna. The long-term manure-free field F04 was comparable to grasslands in Vienna with 12 to 18 targets detected. The long-term manure-fertilized fields F31, F39 and F32 were at the upper edge or above the range of variation of the comparator soils with 15 to 19 detected targets. Mainly 10 targets were responsible for this overall picture: *dfrA-1*, *nptIII*, *strB*, *aadA*, *sat-4*, *sul1*, *qacEdelta1*, *tet(A)*, *tet(M)*, *tet(O)*. They were rarely detected at the comparator sites in the Vienna Basin and frequently detected in the Vienna grass plots. Moreover, they were significantly more abundant in fields F31, F39 and F32 than in (almost) all comparator sites (ANOVA with Tukey's pairwise post-hoc comparisons, p<0.05). In field F04, nine of these targets (all except *dfrA-1*) were more abundant than at individual comparator sites, but not more abundant than in the

Vienna grass plots. Thus, these 10 targets showed increased abundance in cropland compared to non-cropland in addition to the manure effect (= peak) in the HOAL fields.

For *intl1*, *tet(W)*, *ermB*, and *cmxA*, in addition to the manure effect at the HOAL fields, ubiquitous distribution was found at the comparator sites, contrary to expectations, and for *ermF* frequent occurrence was found in the grasslands and deciduous forest sites in Vienna. *Mcr-1* was more frequent at the comparator sites than at the HOAL fields.

For the remaining targets, neither a manure effect nor significant differences between cropland and comparator soils were observed. *Bla_{TEM-1}*, *vanA* and *ISPs* were detected ubiquitously and with constant concentration over time. *MecA*, *bla_{OXA-10}* and *nptII* were detected only selectively in single samples from different sites. *QnrS*, *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{KPC}*, and *bla_{NDM-1}* were not detected in any soil sample.

16S rRNA gene amplicon sequencing was performed for 68 soil samples, 5 organic fertilizers (1x compost, 1x pig faeces, 3x pig manure) and 8 water samples. Per sample 20 000 - 40 000 high quality filtered sequences were analyzed. Bacterial diversity was generally higher in the soil samples than in water samples and organic fertilizers. The genera *Clostridium sensu stricto 1*, *Terrisporobacter*, *Turcibacter* and *Romboutsia* were detected particularly frequently in pig manure and in the manured fields, with a strong increase after manure application. These data suggest that these bacteria were introduced into the soil from the manure. *Clostridium sensu stricto 1* was also detected with low read counts (<30) in the drainage and in 75% of the stream water samples. In a network analysis, the correlation of antibiotic resistance gene concentrations with the frequency of bacterial genera was investigated. In particular, the bacterium *Terrisporobacter* was identified as a potential resistance gene carrier, since the antibiotic resistance genes *dfrA-1*, *nptIII*, *sat-4* and the antiseptic resistance gene *qacEdelta1* correlated positively with this genus according to Spearman.

In addition, bacterial species or genera that could be clinically relevant were identified in the samples analyzed. These included *Aeromonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium* and *Pseudomonas*. These genera have been documented as both environmental bacteria as well as pathogens of nosocomial infections.

The investigation of 95 targets in faeces, manure, 8 HOAL field samples and 20 reference soils with the **Resistomap SmartChip** system impressively showed the high ARG diversity in soils. In the comparator soils, the number of detected targets per sample varied between 37 and 62. HOAL fields F04 and F32 were within this range with 55 to 60 detected targets, fields F31 and F39 with 60 to 69 targets were above. A striking feature of the Resistomap result was a constant ranking from abundant to rare targets across all soil samples. The most abundant targets in the soils were *intl-1*, *mexF*, *ermE* and *vanA*. While individual targets were missing in the soil samples depending on location and time, the whole spectrum was detected in a single sample in pig faeces and manure and there was a different abundance ranking compared to soil. The manure was dominated by tetracycline resistance

genes, which were rare in the soil. In manure/feces and arable soils, 15 common targets were identified that were not found in the comparator soils (*ermF*, *bla_{TEM}_1*, *tetQ*, *tetM_3*, *tetA(P)*, *tetO_1*, *tetM_2*, *tetO_2*, *tetX*, *qacEdelta1_3*, *qacEdelta1_1*, *fosX*, *aadE*, *aphA3_1*, *tnpA_1*). In 12 comparator soils from the Donau-Auen National Park and the Ötscher region, 48 additional targets were investigated. This led to the detection of another 13 to 25 targets per sample and once again highlighted the high ARG diversity in near-natural soils.

Cultivable bacteria from one sample each from the long-term manure-free field F04, the manured field F31, 2 sites in the Donau-Auen National Park and one manure sample were tested for resistance to vancomycin, kanamycin, sulfadiazine, ampicillin, erythromycin and tetracycline. Cultivable bacteria resistant to each of these antibiotics were detected in all samples. Resistance rates were determined as the proportion of resistant bacteria to the total number of culturable bacteria. For vancomycin and kanamycin, resistance rates were highest in the Donau-Auen soils (DA01 and DA10) and in the non-manure-fertilized field (F04). The sulfadiazine resistance rate was elevated in one of the Donau-Auen samples (DA10) and low in all other samples. For ampicillin, the resistance rate was similar in all soil samples and very low in the manure. The erythromycin resistance rate was low in all samples. The tetracycline resistance rate was also low in all samples, with the highest value in manure-fertilized field F31. In the manure, the total number of culturable bacteria was 10-fold and 100-fold higher than in the soil samples.

To identify potential ARG carriers, vancomycin-, kanamycin-, sulfadiazine-, ampicillin-, erythromycin- and tetracycline-**resistant bacteria were isolated** from each of the 5 samples. A total of 213 isolates were taxonomically classified by *16S rRNA* gene sequences. The most common genera among the resistant soil isolates were *Pseudomonas*, *Pedobacter*, *Variovorax* and *Stenotrophomonas*, among the pig manure isolates they were *Brevibacterium*, *Enterococcus* and *Bavariicoccus*.

To determine the selection pressure, the **concentration of 29 different antibiotics** was determined in 14 representatively selected soil samples, one faeces and one manure sample. One drainage water sample and four stream water samples were analyzed for 20 antibiotics. Only in manure a fluoroquinolone (marbofloxacin: 20.8 µg/kg) and a tetracycline derivative (doxycycline: 102.0 µg/kg) were detected. In a HOAL stream water sample, a sulfonamide (sulfadimidine: < 0.0010 µg/L) could be qualitatively detected but not quantified. The detected amounts of marbofloxacin and doxycycline exceed the minimum selective concentrations (MSC) reported for some bacterial species/antibiotic combinations and could therefore favor the growth of resistant bacterial strains in the manure.

In the **correlation analysis**, a negative correlation was observed between target abundance and rainfall on the day of sampling for nine targets. Individual targets also correlated with other meteorological factors or certain soil parameters. For instance *tet(O)* and *tet(M)* correlated positively with the detected amounts of copper in soil, whereas *tet(W)* negatively correlated with soil- and air-temperature.

3 Hintergrund und Zielsetzungen

MARGINS-I ist Teil des zweiteiligen Projektes MARGINS. MARGINS-I beschäftigt sich mit der Ermittlung der natürlich vorkommenden Hintergrundkonzentrationen von klinisch relevanten Antibiotikaresistenzgenen (ARGs) in ausgewählten österreichischen Böden und der ARG-Verbreitung in Agroökosystemen (MARGINS-I). MARGINS-II ermittelt ARG-Konzentrationen in Abwässern und Oberflächengewässern (MARGINS-II). Die Ergebnisse von MARGINS sollen Risikomanager dabei unterstützen, das Übertragungsrisiko von Resistenzgenen aus der Umwelt auf medizinisch oder veterinärmedizinisch relevante Bakterien über evidenzbasiertes Risikomanagement zu reduzieren. Die Miteinbeziehung des Umweltresistoms zur Reduzierung der Ausbreitung von antimikrobiellen Resistenzen (AMR) entspricht dem „One-Health“ – Konzept zur Antibiotikaresistenz der Europäischen Kommission (1-3) und dem österreichischen Nationalen Aktionsplan zur Antibiotikaresistenz (4).

3.1 Wissenschaftlicher Hintergrund

Zahlreiche klinisch relevante Antibiotikaresistenzgene (ARGs) stammen ursprünglich aus **Umweltbakterien** (5, 6). Darunter sind Resistenzgene, die in der Humanmedizin große Schwierigkeiten bei der Therapie von Infektionskrankheiten verursachen (5, 7) wie z.B. *bla_{CTX-M}*, das Resistenz gegen Penicilline und Cephalosporine verleiht (8, 9), das Colistin-Resistenzgen *mcr1* (10) oder das Fluorochinolon-Resistenzgen *qnrA* (11)).

In der Umwelt – vor allem im Boden (13, 14), Wasser (15) und Sediment (16) - existiert ein riesiger Pool an **natürlich vorkommenden ARGs**. Antibiotika-resistente Bakterien (ARB) findet man in unberührten Gebieten, was darauf hinweist, dass es sich bei Antibiotikaresistenzen (AR) um ein evolutionär altes Phänomen handelt, das nicht erst durch den Einsatz von Antibiotika generiert worden ist (17). Das Umweltresistom stellt eine Bedrohung für die Gesundheit von Mensch und Tier dar, da ARGs im vernetzten globalen mikrobiellen Ökosystem (Abbildung 1) über horizontalen Gentransfer (HGT) auf pathogene Bakterien übertragen werden können (18, 19). Umgekehrt werden ARB und ARG aus menschlichen und tierische Ausscheidungen über Abwasser und Gülle in die Umwelt eingebracht (20-23), sodass die ARG-Konzentration in anthropogen beeinflussten Ökosystemen höher ist als in unberührter Natur (24). Die Auswirkungen von Antibiotikaresistenzen auf die menschliche Gesundheit sollten daher im Rahmen des „One Health“ Konzepts (1-3) unter Miteinbeziehung von Umweltkompartimenten analysiert werden (25, 26).

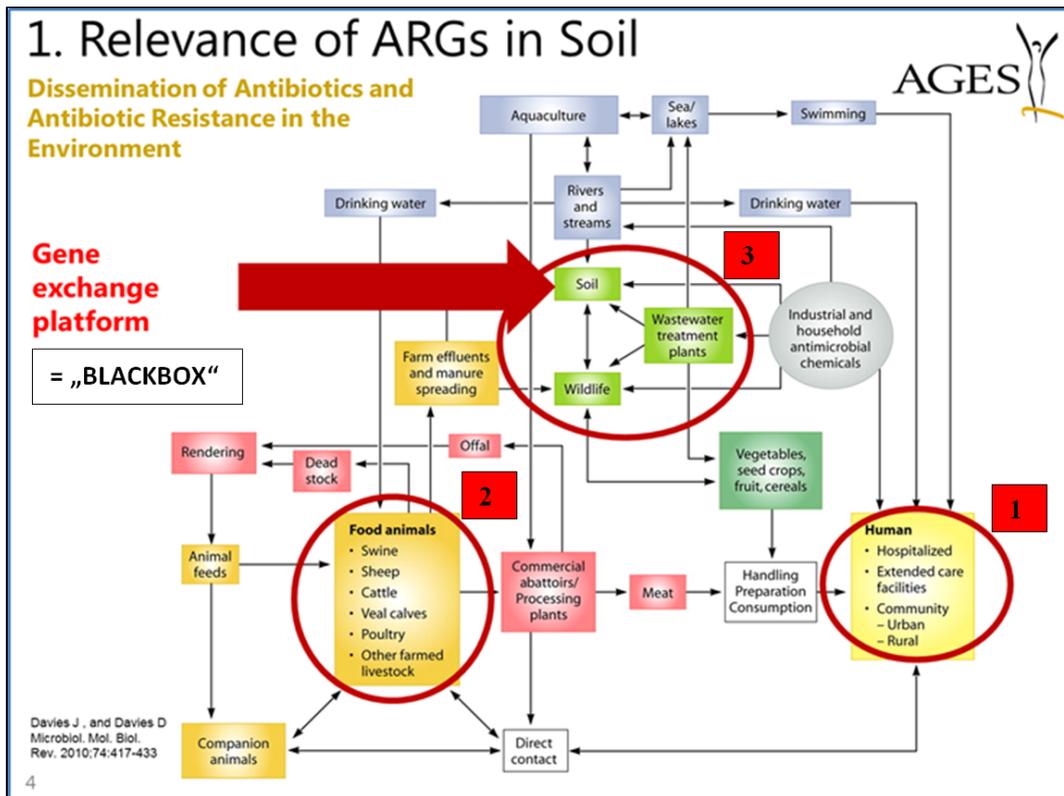


Abbildung 1. Verbreitung von Antibiotika, antibiotikaresistenten Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen im globalen mikrobiellen Ökosystem.

Abbildung aus Referenz (12); modifiziert.

Das **systematische Monitoring** von Antibiotikaresistenzen wurde als einer von vier strategischen Eckpfeilern zur Bekämpfung der AR von der WHO definiert (27). Da die Übertragung von Antibiotikaresistenzen in einem vernetzten mikrobiellen Ökosystem stattfindet (Abbildung 1), ist ein punktuelles Monitoring von einzelnen Netzwerkkompartimenten nicht zielführend. Erfolge z. B. bei der AR-Eindämmung in der Klinik (Kompartiment 1; Abbildung 1), im veterinärmedizinischen Bereich (Kompartiment 2) oder in der Lebensmittelproduktion (Kompartiment 2) sind durch einen permanenten Eintrag von neuen Antibiotikaresistenzen aus der Umwelt (Kompartiment 3) gefährdet, sollten keine Gegenmaßnahmen im Umweltbereich gesetzt werden.

Nur eine - relativ - kleine Anzahl von ARGs aus dem riesigen Arsenal des Umweltresistoms ist bisher klinisch auffällig geworden - das jedoch mit umso deutlicheren negativen Auswirkungen auf die Gesundheit von Mensch und Tier (7). Das bedeutet, dass nicht alle ARGs aus Umweltreservoirs ein gleich hohes Risikopotential aufweisen, auf Pathogene überzugehen (28, 29). Von zentraler Bedeutung ist es, **Hochrisiko-ARGs und Hotspots** für deren Bildung und Verbreitung zu erkennen (25), um Maßnahmen zur Eindämmung der Ausbreitung dieser Resistenzen setzen zu können (27, 30).

Als Hotspots für den Austausch von Antibiotikaresistenzen zwischen humanen Krankheitserregern, tierischen Keimen und Umwelt-Bakterien wurden **Kläranlagen** und **landwirtschaftlich genutzte**

Böden (Kompartiment 3; Abbildung 1) identifiziert (20, 22). Zahlreiche klinisch relevante Resistenzen stammen aus diesen Ökosystemen (12). Gerade in diesen beiden Habitaten findet jedoch kein koordiniertes Monitoring von Antibiotikaresistenzgenen statt. Böden und Kläranlagen stellen in vielen Fällen bezüglich Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen eine „Blackbox“ und eine immanente Gefahrenquelle für den tier- und humanmedizinischen Bereich dar (31, 32). Auch in Österreich war bis vor kurzem nicht bekannt, welche Antibiotikaresistenzgene in welcher Menge in landwirtschaftlich genutzten Böden und in Abwässern vorkommen. Für die Öffentliche Gesundheit ist es von zentralem Interesse, einen Überblick über den Status quo in diesen Ökosystemen zu gewinnen, um abzuschätzen, welches Gefahrenpotential von diesen ARG-Umweltreservoirs ausgeht und darauf aufbauend überlegen zu können, welche Risikomanagementmassnahmen zu setzen sind, um diese Gefahren zu minimieren. Aus diesem Grund beschäftigt sich das Projekt MARGINS-I mit ARGs in Ackerflächen und anderen Böden in Österreich. Das **Parallel-Projekt MARGINS-II** widmet sich ergänzend dazu der Situation in Abwässern und anderen Oberflächengewässern.

Der Boden ist ein Ökosystem mit besonders hoher bakterieller Biodiversität und stellt ein nahezu unerschöpfliches Reservoir an natürlich vorkommenden ARGs dar (33), (34). Bodenbakterien sind eine natürliche Quelle für Antibiotika und gleichzeitig Träger von Resistenzgenen (35). Die Zusammensetzung der lokalen Bodenbakterienpopulation prägt das ARG-Profil oder „Resistom“ der Böden (33). Bakterienpopulation und ARG-Profil werden von Standortfaktoren wie Bodentyp (36) und Bewuchs (37, 38) beeinflusst. In landwirtschaftlich genutzte Böden werden u. A. durch den Einsatz von Gülle als organischer Dünger ARB, Pathogene und nicht pathogene Bakterien aus dem Darm der Nutztiere eingebracht. Diese treten mit den Bodenbakterien in Kontakt und Antibiotikaresistenzen können neu kombiniert und bidirektional verbreitet werden (20). Unter Umständen enthält die Gülle auch Antibiotika, da diese von Säugetieren nach Applikation in hohem Maß in aktiver Form über Kot und Urin ausgeschieden werden (39).

Die Übertragung von Genen zwischen verschiedenen Bakterienspezies wird als horizontaler Gentransfer (HGT) bezeichnet und beruht auf den biologischen Mechanismen der Transformation, Konjugation und Transduktion (7, 12, 40, 41). Nachweise für einen direkten ARG-Transfer aus Bodenökosystemen auf humanpathogene Bakterien ist rar (42). Klar dokumentiert ist jedoch, dass Gülle-assoziierte ARGs in Böden übertragen werden können (43, 44) und dass die Ausbringung von **Gülle** die Konzentration von ARGs im Boden erhöht (34, 43, 45). Dabei gibt es im Wesentlichen 3 Möglichkeiten, wie Gülle-Applikation ARGs im Boden anreichern kann: a) im Boden natürlich vorkommende ARB vermehren sich durch den Eintrag von Nährstoffen; b) natürlich vorkommende ARB vermehren sich aufgrund von Selektion durch Antibiotika-haltige Gülle (46); c) ARB aus der Gülle überleben oder übertragen ihre ARG durch HGT auf Bodenbakterien (34).

Gülle-Applikation führt oft zu einem **vorübergehenden** ARG-Anstieg im Bodenresistom, der wieder abnimmt. Dabei dürfte es sich um ein kritisches Zeitfenster handeln, in dem es bevorzugt zur Übertragung von exogenen ARGs auf Bakterien in den entsprechenden ökologischen Nischen kommt

(47, 48). Durch langfristig wiederholte Applikation von Gülle werden ARG-Levels im Boden **dauerhaft** hochgehalten werden (34). Es ist von hohem Interesse, jene klinisch relevanten Resistenzgene zu ermitteln, deren Menge durch die Gülle-Anwendung steigt, sowie zu überprüfen, ob es sich bei dem Anstieg um ein temporäres Phänomen oder um eine dauerhafte Veränderung im Bodenmikrobiom handelt, das zur Fixierung und Vermehrung von Antibiotikaresistenzgenen in den exponierten Bodenbakterienpopulationen führt.

Folgende **Parameter** haben laut einer kürzlich veröffentlichten Metastudie einen Einfluss auf die durch Gülleapplikation induzierten Veränderungen im Bodenresistom (49): Gülleart (unbehandelt oder kompostiert), -typ (Schwein, Rind, Geflügel etc.), -ausbringungsrate und Gesamtexpositionsdauer des Feldes, Art der Feldfrucht, des Anbausystems; Bodentyp, -textur, und -pH-Wert; klimatische Faktoren wie mittlere jährliche Niederschlagsmenge und Lufttemperatur, aber auch Selektionsdruck durch Antibiotika und Schwermetall-Kontaminationen.

3.2 Ziele

Die spezifischen Projektziele von MARGINS-I waren:

1. Ermittlung der Hintergrundkonzentrationen von Antibiotikaresistenzgenen in ausgewählten österreichischen Böden (Modul 1).
2. Sammlung von Pilot-Daten für den Aufbau eines ARG-Monitoringsystems für landwirtschaftliche Böden.
3. Erfassung von ARG-Ausbreitungswegen in Agroökosystemen (Modul 2)
4. Identifizierung von Möglichkeiten zur Reduktion der Ausbreitung von Antibiotika-Resistenzen (Modul 3).

Um diese Ziele zu erreichen wurde die Konzentration von ARGs in Ackerböden im Verlauf einer Anbausaison erhoben und mit der Situation in nicht-landwirtschaftlich genutzten Böden an naturnahen und anthropogen stark beeinflussten Standorten verglichen.

Folgende Fragen wurden abgeklärt:

1. Welche ARGs befinden sich in wichtigen Umweltkompartimenten (Ackerböden, naturbelassenen Wiesen- und Waldböden, urbanen Böden, Drainage- und Bachwasser, Schweinekot, Schweinegülle, Kompost)?
2. In welcher Menge kommen klinisch relevante ARGs in diesen Kompartimenten vor?
3. Welche Umweltkompartimente weisen eine besonders hohe Belastung mit ARGs und damit ein hohes Potential für die Verbreitung von AR auf?
4. Wie schwankt die ARG-Konzentration im jahreszeitlichen Verlauf?

5. Wie wirkt sich die Anwendung von Schweinegülle auf die ARG-Konzentration in Ackerböden aus?
6. Welche Strategien können angewandt werden, um die Ausbreitung von ARGs in den unter Punkt 3 identifizierten Ökosystemen zu minimieren?

3.3 Versuchsdesign, Standorte und Proben

MARGINS-I umfasste eine einjährige Verlaufsstudie im landwirtschaftlichen Versuchsgelände des Hydrological Open Air Laboratory (HOAL; Petzenkirchen, Niederösterreich) und die Untersuchung von nicht-landwirtschaftlich genutzten Vergleichsstandorten im Raum Wien und Niederösterreich. In der Verlaufsstudie im HOAL sollte die ARG-Belastung von Ackerböden erhoben und Effekte der Gölledüngung erfasst werden. Mit der Untersuchung von Vergleichsböden sollte ein Eindruck von der ARG-Verbreitung in österreicherischen Böden entstehen, um die Situation auf den HOAL-Feldern in diesen Kontext einordnen zu können.

Das HOAL ist ein großflächiges Versuchsgelände (Abbildung 3), das sich durch den Anbau unterschiedlicher Feldfrüchte, unterschiedliche Bewirtschaftungsmethoden und das Auftreten von mehreren verschiedene Bodentypen auszeichnet (50). Die Bodentypen sind repräsentativ für österreicherische Maisanbauggebiete. Neben Äckern umfasst das HOAL auch einen Bach, sowie Wiesen und Wälder, die ebenso wie die Ackerflächen unter kontrollierten Bedingungen bewirtschaftet werden.

Tabelle 1. HOAL-Felder: Versuchsanordnung.

<p style="text-align: center;">Feld F04 „ohne Schweinegülle“ Braunerde + Pseudogley + Kolluvisol</p> <p style="text-align: center;">2016-2019: Anorganischer Dünger (NAC 27N)</p> <p style="text-align: center;">2020: Anorganischer Dünger (NAC 27N) + Kompost (+Klärschlamm) Mais</p>	<p style="text-align: center;">Feld F32 „langfristig Schweinegülle, kurzfristig keine Gülle“ Braunerde + Pseudogley + Kolluvisol</p> <p style="text-align: center;">2016-2019: Anorganischer Dünger (NAC 27N) + Schweinegülle</p> <p style="text-align: center;">2020: Anorganischer Dünger (NAC 27N) Winterweizen</p>
<p style="text-align: center;">Feld F31 „langfristig und kurzfristig Schweinegülle“ Braunerde + Pseudogley + Kolluvisol</p> <p style="text-align: center;">2016-2019: Anorganischer Dünger (NAC 27N) + Schweinegülle</p> <p style="text-align: center;">2020: Anorganischer Dünger (NAC 27N) Schweinegülle Mais</p>	<p style="text-align: center;">Feld F39 „langfristig und kurzfristig Schweinegülle“ Braunerde + Pseudogley + Kolluvisol</p> <p style="text-align: center;">2016-2019: Anorganischer Dünger (NAC 27N) + Schweinegülle</p> <p style="text-align: center;">2020: Anorganischer Dünger (NAC 27N) Schweinegülle Mais</p>

Im HOAL wurden **vier Ackerflächen (F04, F31, F32, F39)** im Zeitraum Herbst 2019 - Herbst 2020 untersucht. Feld F04 wurde im Beobachtungszeitraum und auch in den vorangegangenen Jahren nicht mit Gülle gedüngt. Feld F32 wurde im Beobachtungszeitraum nicht mit Gülle gedüngt, war aber in den vorangegangenen Jahren mit Schweinegülle gedüngt worden. Die Felder F31 und F39 wurden im Verlauf der Studie frisch mit Schweinegülle gedüngt und waren auch in den vorangegangenen Jahren mit Schweinegülle gedüngt worden.

Auf allen vier Feldern wurden an mindestens 7 Zeitpunkten Proben entnommen (1. vor der Aussaat 2. einen Tag nach der Düngung, 3. + 1 Woche, 4. + 6 Wochen, 5. + 18 Wochen nach Düngung, 6. vor der Ernte, 7. nach der Ernte und anschließend den in Abbildung 2 dargestellten Analysen zugeführt. Auf F04, F31 und F39 wurden 1-3 zusätzliche Probenahmen zur Bestätigung der Baseline bzw. zur Erfassung möglicher Effekte einer Pestizidanwendung durchgeführt. Eine derartige Longitudinalstudie wurde damit erstmals in Österreich durchgeführt. Sie ermöglicht die Auswahl aussagekräftiger Bodenprobenentnahmezeitpunkte für ein eventuelles ARG-Routinemonitoring sowie die Darstellung von Minimal- und Maximalkonzentrationen (Worst-Case Szenario) von ARGs in landwirtschaftlich genutzten Böden im Jahresverlauf.

Zusätzlich wurden im HOAL frischer **Schweinekot, Schweinegülle, Kompost** und **Drainagewasser und Bachwasser** analysiert. So sollte der Ausbreitungsweg von ARGs vom Tier über die Gülle in den Boden

und von dort in die Wassersäule erfasst werden. Schweinekot und Gülle stammten aus einem vor Ort ansässigen Schweinezucht-Betrieb. Die Gülle wurde im HOAL zur Düngung eingesetzt. Die Drainage-Wasserproben wurden am Ende des Drainagesystems der HOAL-Ackerflächen entnommen. Das Bachwasser wurde stromabwärts aus einem Bach entnommen, in den das Drainagewasser eingeleitet wird. Über eine Anbausaison verteilt wurden 10 Wasser-Probenahmen durchgeführt. Die Probenahmen fanden in zeitlicher Relation zur Güllendüngung auf Feld F39 statt (Tabelle 2), weil dieses Feld dem Drainagesystem am nächsten lag. Das Drainagewasser stammte jedoch auch aus den umliegenden HOAL-Feldern.

Ursprünglich war geplant gewesen, zusätzlich zu den Gülle-Effekten, die Auswirkung der Kulturpflanzen Mais (F31, F39) und Winterweizen (F32) auf Gülle-gedüngte Felder zu vergleichen. Dieses Vorhaben konnte nicht umgesetzt werden, da Feld F32 im Beobachtungsjahr 2020 anders als in den vorangegangenen Jahren nicht mit Schweinegülle gedüngt wurde (Tabelle 1). Im HOAL können von wissenschaftlicher Seite nämlich nur Beobachtungen und keine Versuchsanordnungen vorgenommen werden. Über Kultivierungsmaßnahmen auf den Feldern entscheiden die Landwirte. Dafür erlaubte diese **Abänderung im Versuchsdesign** nun eine differenzierte Untersuchung kurzfristiger und langfristiger Effekte von Schweinegülle.

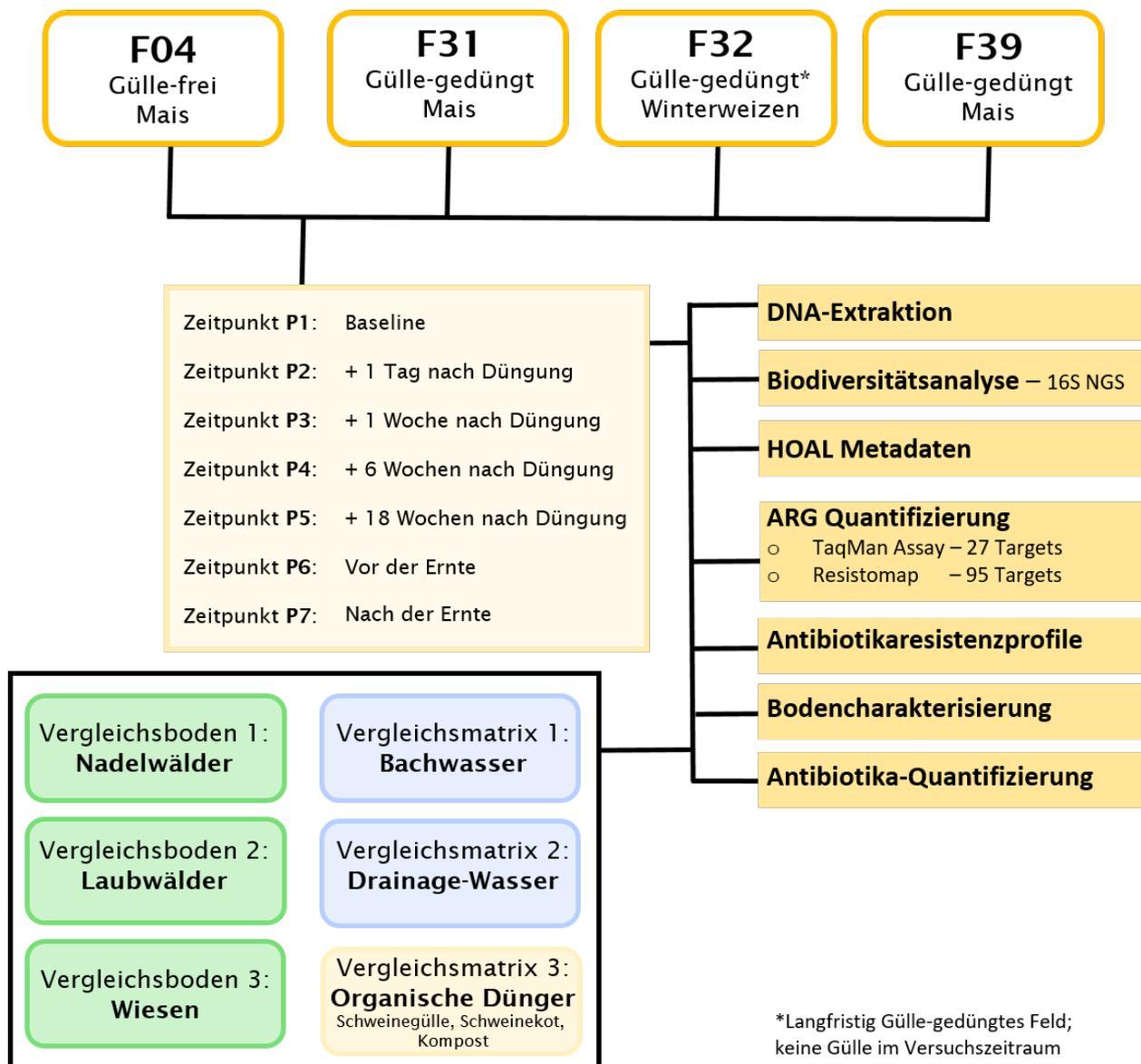


Abbildung 2. HOAL: Beprobungsplan und durchgeführte Analysen.

Als primäre **Vergleichsböden** wurden zwei Waldflächen im HOAL Gebiet (HOAL-Laubwald **OF** und HOAL-Nadelwald **NF**) untersucht. Diese wurden im gleichen Zeitraum wie die Ackerflächen an 6 verschiedenen Terminen beprobt, um vergleichbare Zeitreihen erstellen zu können (Tabelle 2).

Darüber hinaus wurde ein breites Spektrum von Vergleichsproben an nicht-landwirtschaftlichen Standorten in Wien und Niederösterreich gesammelt (Tabelle 2). Die Vergleichsstandorte waren durch unterschiedliche Vegetation charakterisiert (Wiese, Laub- oder Nadelwald) und an den einzelnen Standorten sollten verschiedene Umweltgradienten erfasst werden. Im **Nationalpark Donau-Auen** wurden Standorte in zunehmender Entfernung vom Donauufer beprobt: von DA01 nahe am Ufer bis DA10 mit der größten Entfernung. DA01-DA05 lagen im Überflutungsgebiet, DA06 bis DA10 außerhalb. Bei den Standorten im **Wiener Becken** wurde entlang der Strecke von Wöllersdorf (WD) über in Neusiedl am Steinfeld (StA, StB), Hohe Wand (HW) bis Neusiedl/Ochsenhaid (ND) auf

immer naturnähere Böden abgezielt. Im besonders naturbelassenen Ötschergebiet wurden Standorte in unterschiedlichen Höhenlagen (von **Oe3** bis hinauf zu **Oe1**) untersucht. In Wien wurden Parks und Grünflächen beprobt, wobei von **Lainzer Tiergarten (LT)** über **Prater (PP)**, **Augarten (AG)**, **Volksgarten (VG)** bis zu **Hadikpark (HP)** und schließlich **Breitenfurter Straße (BS)** (Grünstreifen am Straßenrand) eine immer stärkere anthropogene Umweltbelastung angenommen wurde. Die Vergleichsboden-Standorte in Wien und im Nationalpark Donau-Auen wurden jeweils in der warmen (Juli bzw. August 2020) und in der kalten Jahreszeit (November bzw. Dezember 2020) beprobt, um jahreszeitliche Schwankungen bestmöglich abzudecken. Die Standorte im Wiener Becken und am Ötscher wurden nur einmal beprobt.

Tabelle 2 gibt einen Überblick über alle untersuchten Proben dieses Projekts. Es wurden insgesamt 110 Proben gesammelt, die sich aus 85 Bodenproben, 3 HOAL-Gülle-, 1 HOAL-Kompost-, 1 HOAL-Schweinekot und 20 HOAL-Wasserproben (10x Bachwasser; 10x Drainage) zusammensetzen.

Tabelle 2. Standorte und Termine der Probenziehung.

SampleID	Standort	Beschreibung	Sampling_Datum	Zeitpunkt
F04_C_12_19	HOAL-Feld 04	2020 Mais	10.12.2019	Baseline 2019
F04_C_01_20	HOAL-Feld 04	2020 Mais	21.01.2020	Baseline 2020
F04_C_d	HOAL-Feld 04	2020 Mais	20.04.2020	3 Tage nach AD
F04_C_w	HOAL-Feld 04	2020 Mais	24.04.2020	1 Woche nach AD
F04_C_01wP	HOAL-Feld 04	2020 Mais	25.05.2020	1 Woche nach PA
F04_C_w06	HOAL-Feld 04	2020 Mais	29.05.2020	6 Wochen nach AD
F04_C_03wP	HOAL-Feld 04	2020 Mais	08.06.2020	3 Wochen nach PA
F04_C_w18	HOAL-Feld 04	2020 Mais	21.08.2020	18 Wochen nach AD
F04_C_bh	HOAL-Feld 04	2020 Mais	22.09.2020	vor Ernte
F04_C_aH	HOAL-Feld 04	2020 Mais	09.10.2020	nach Ernte
F31_C_12_19	HOAL-Feld 31	2020 Mais+Gülle	10.12.2019	Baseline 2019
F31_C_01_20	HOAL-Feld 31	2020 Mais+Gülle	21.01.2020	Baseline 2020
F31_C_d	HOAL-Feld 31	2020 Mais+Gülle	08.04.2020	1 Tag nach GD
F31_C_w	HOAL-Feld 31	2020 Mais+Gülle	14.04.2020	1 Woche nach GD
F31_C_w06	HOAL-Feld 31	2020 Mais+Gülle	19.05.2020	6 Wochen nach GD
F31_C_w18	HOAL-Feld 31	2020 Mais+Gülle	13.08.2020	18 Wochen nach GD
F31_C_bh	HOAL-Feld 31	2020 Mais+Gülle	10.09.2020	vor Ernte
F31_C_aH	HOAL-Feld 31	2020 Mais+Gülle	23.10.2020	nach Ernte
F32_C_01_20	HOAL-Feld 32	2020 Winterweizen	21.01.2020	Baseline 2020
F32_C_d	HOAL-Feld 32	2020 Winterweizen	26.03.2020	3 Tage nach AD
F32_C_w	HOAL-Feld 32	2020 Winterweizen	02.04.2020	1 Woche nach AD
F32_C_w06	HOAL-Feld 32	2020 Winterweizen	05.05.2020	6 Wochen nach AD
F32_C_w18	HOAL-Feld 32	2020 Winterweizen	14.07.2020	18 Wochen nach AD
F32_C_aH	HOAL-Feld 32	2020 Winterweizen	24.07.2020	nach Ernte
F32_C_09_20	HOAL-Feld 32	2020 Winterweizen	10.09.2020	Baseline 2020 (2)
F39_C_12_19	HOAL-Feld 39	2020 Mais+Gülle	10.12.2019	Baseline 2019
F39_C_01_20	HOAL-Feld 39	2020 Mais+Gülle	21.01.2020	Baseline 2020
F39_C_d	HOAL-Feld 39	2020 Mais+Gülle	10.04.2020	1 Tag nach GD
F39_C_w	HOAL-Feld 39	2020 Mais+Gülle	16.04.2020	1 Woche nach GD
F39_C_w06	HOAL-Feld 39	2020 Mais+Gülle	19.05.2020	6 Wochen nach GD
F39_C_w18	HOAL-Feld 39	2020 Mais+Gülle	11.08.2020	18 Wochen nach GD
F39_C_bh	HOAL-Feld 39	2020 Mais+Gülle	08.09.2020	vor Ernte
F39_C_aH	HOAL-Feld 39	2020 Mais+Gülle	09.10.2020	nach Ernte
M_04_20	HOAL-Schweinegülle	Org. Input	07.04.2020	Frühling
M_10_20	HOAL-Schweinegülle	Org. Input	09.10.2020	Herbst
M_01_21	HOAL-Schweinegülle	Org. Input	27.01.2021	Winter
F_07_20	HOAL-Schweinekot	Org. Input	14.07.2020	Sommer
C_09_20	HOAL-Kompost	Org. Input	23.09.2020	Herbst
Sys_01_20	HOAL-Sys	Drainage	21.01.2020	Baseline 2020 F39
Sys_d	HOAL-Sys	Drainage	15.04.2020	6 Tage nach GD F39
Sys_w02	HOAL-Sys	Drainage	23.04.2020	2 Wo. nach GD F39
Sys_w03	HOAL-Sys	Drainage	30.04.2020	3 Wo. nach GD F39
Sys_w04	HOAL-Sys	Drainage	08.05.2020	4 Wo. nach GD F39
Sys_w06	HOAL-Sys	Drainage	22.05.2020	6 Wo. nach GD H39
Sys_w08	HOAL-Sys	Drainage	08.06.2020	8 Wo. nach GD F39
Sys_w12	HOAL-Sys	Drainage	06.07.2020	12 Wo. nach GD F39
Sys_w16	HOAL-Sys	Drainage	03.08.2020	16 Wo. nach GD F39
Sys_w25	HOAL-Sys	Drainage	05.10.2020	25 Wo. nach GD F39
MW_01_20	HOAL-MW	Bach	21.01.2020	Baseline 2020 F39
MW_d	HOAL-MW	Bach	15.04.2020	6 Tage nach GD F39
MW_w02	HOAL-MW	Bach	23.04.2020	2 Wo. nach GD F39
MW_w03	HOAL-MW	Bach	30.04.2020	3 Wo. nach GD F39
MW_w04	HOAL-MW	Bach	08.05.2020	4 Wo. nach GD F39
MW_w06	HOAL-MW	Bach	22.05.2020	6 Wo. nach GD H39
MW_w08	HOAL-MW	Bach	08.06.2020	8 Wo. nach GD F39
MW_w12	HOAL-MW	Bach	06.07.2020	12 Wo. nach GD F39
MW_w16	HOAL-MW	Bach	03.08.2020	16 Wo. nach GD F39
MW_w25	HOAL-MW	Bach	05.10.2020	25 Wo. nach GD F39
OF_12_19	HOAL-Alter Wald	Laubwald	10.12.2019	Winter
OF_01_20	HOAL-Alter Wald	Laubwald	21.01.2020	Winter

SampleID	Standort	Beschreibung	Sampling_Datum	Zeitpunkt
OF_04_20	HOAL-Alter Wald	Laubwald	08.04.2020	Frühling
OF_07_20	HOAL-Alter Wald	Laubwald	14.07.2020	Sommer
OF_09_20	HOAL-Alter Wald	Laubwald	08.09.2020	Sommer
OF_12_20	HOAL-Alter Wald	Laubwald	01.12.2020	Winter
NF_12_19	HOAL-Neuer Wald	Nadelwald	10.12.2019	Winter
NF_01_20	HOAL-Neuer Wald	Nadelwald	21.01.2020	Winter
NF_04_20	HOAL-Neuer Wald	Nadelwald	08.04.2020	Frühling
NF_07_20	HOAL-Neuer Wald	Nadelwald	14.07.2020	Sommer
NF_09_20	HOAL-Neuer Wald	Nadelwald	08.09.2020	Sommer
NF_12_20	HOAL-Neuer Wald	Nadelwald	01.12.2020	Winter
WD_10_20	Wöllersdorf	Nadelwald	23.10.2020	Herbst
StA_10_20	Neusiedl am Steinfeld A	Nadelwald	23.10.2020	Herbst
StB_10_20	Neusiedl am Steinfeld B	Nadelwald	23.10.2020	Herbst
HW_10_20	Hohe Wand	Nadelwald	23.10.2020	Herbst
ND_10_20	Neusiedl/Ochsenhaid	Nadelwald	23.10.2020	Herbst
Oe1_07_20	Ötscher 1 (1600 m)	Nadelwald (Kiefer)	09.07.2020	Sommer
Oe2_07_20	Ötscher 2 (1500 m)	Wiese	09.07.2020	Sommer
Oe3_07_20	Ötscher 3 (1400 m)	Nadelwald (Fichte)	09.07.2020	Sommer
DA01_06_20	Donau Auen 01	Laubwald	09.06.2020	Sommer
DA01_11_20	Donau Auen 01	Laubwald	02.11.2020	Winter
DA02_06_20	Donau Auen 02	Wiese	09.06.2020	Sommer
DA02_11_20	Donau Auen 02	Wiese	02.11.2020	Winter
DA03_06_20	Donau Auen 03	Laubwald	09.06.2020	Sommer
DA03_11_20	Donau Auen 03	Laubwald	02.11.2020	Winter
DA04_06_20	Donau Auen 04	Laubwald	09.06.2020	Sommer
DA04_11_20	Donau Auen 04	Laubwald	02.11.2020	Winter
DA05_06_20	Donau Auen 05	Laubwald	09.06.2020	Sommer
DA05_11_20	Donau Auen 05	Laubwald	02.11.2020	Winter
DA06_06_20	Donau Auen 06	Laubwald	09.06.2020	Sommer
DA06_11_20	Donau Auen 06	Laubwald	02.11.2020	Winter
DA07_06_20	Donau Auen 07	Laubwald	09.06.2020	Sommer
DA07_11_20	Donau Auen 07	Laubwald	02.11.2020	Winter
DA08_06_20	Donau Auen 08	Wiese	09.06.2020	Sommer
DA08_11_20	Donau Auen 08	Wiese	02.11.2020	Winter
DA09_06_20	Donau Auen 09	Laubwald	09.06.2020	Sommer
DA09_11_20	Donau Auen 09	Laubwald	02.11.2020	Winter
DA10_06_20	Donau Auen 10	Laubwald	09.06.2020	Sommer
DA10_11_20	Donau Auen 10	Laubwald	02.11.2020	Winter
BS_07_20	Breitenfurter Straße	Grünstreifen	08.07.2020	Sommer
BS_12_20	Breitenfurter Straße	Grünstreifen	10.12.2020	Winter
HP_07_20	Hadikpark	Hunde-Park	08.07.2020	Sommer
HP_12_20	Hadikpark	Hunde-Park	10.12.2020	Winter
AG_02_20	Augarten	Wiese	19.02.2020	Winter
AG_07_20	Augarten	Wiese	07.07.2020	Sommer
VG_02_20	Volksgarten	Wiese	19.02.2020	Winter
VG_07_20	Volksgarten	Wiese	07.07.2020	Sommer
PP_02_20	Prater Park	Laubwald	19.02.2020	Winter
PP_07_20	Prater Park	Laubwald	07.07.2020	Sommer
LT_08_20	Lainzer Tiergarten	Laubwald	12.08.2020	Sommer
LT_12_20	Lainzer Tiergarten	Laubwald	10.12.2020	Winter

GD – Gülledüngung, AD – anorganische Düngung, PA – Pestizidanwendung

3.4 Auswahl der ARG Targets für die TaqMan qPCR

Das zentrale Element des Projektes war die Quantifizierung von 26 Genen („Targets“) in allen Proben mittels TaqMan qPCR. Die Targets umfassten 24 Antibiotikaresistenzgene und zwei mobile genetische Elemente (MGE). Als Surrogatmarker für die Gesamt-Abundanz der Bodenbakterien und zur Berechnung der relativen ARG-Häufigkeiten wurde außerdem das *16S rRNA*-Gen quantifiziert. Tabelle 3 gibt eine Übersicht über alle untersuchten qPCR-Targets. Die Auswahl der Targets erfolgte nach folgenden Kriterien: **i)** Resistenz gegenüber kritisch wichtigen (z. B. Aminoglykoside, Glykopeptide, Makrolide, Penicilline) bzw. sehr wichtigen (z. B. Sulfonamide, Tetrazykline) antimikrobiellen Substanzen für die Human- und Veterinärmedizin (51, 52). **ii)** Einsatz in der Tierhaltung und Veterinärmedizin in Österreich (Tabelle 13 in (53)). **iii)** Prävalenz in der Umwelt (d. h. in Schweinegülle, gedüngten Böden und Waldböden usw.) laut einschlägiger wissenschaftlicher Literatur (siehe Referenzen für die einzelnen ARGs unten). Die untersuchten ARGs decken sechs unterschiedliche Resistenzmechanismen ab und inaktivieren insgesamt 12 klinisch wichtige Antibiotikaklassen (Tabelle 3).

Der Auswahlprozess wird an folgenden Resistenzgenen beispielhaft dargestellt: Das Tetrazyklin-Resistenzgen ***tet(W)*** wurde aufgrund der hohen Tetrazyklin-Ausbringungsmenge (19,3 Tonnen) in österreichischen Schweinebetrieben im Jahr 2018 ausgewählt (53). Im Vergleich dazu waren die Einsatzmengen von Penicillinen (4 t), Makroliden (2 t) und Sulfonamiden (1,7 t) im Veterinärbereich in diesem Jahr deutlich geringer (53). Es ist bekannt, dass *tet(W)* in Ökosystemen, die mit Schweinegülle in Kontakt kommen, weit verbreitet ist (54-56). Die Beta-Laktamase ***bla_{TEM-1}*** wurde als Vertreter der Penicillin-inaktivierenden Resistenzgene ausgewählt. *Bla_{TEM-1}* ist der häufigste Resistenzmarker in vielen Plasmiden, die in der Gentechnik verwendet werden. In Schweinegülle sowie Gülle-gedüngten Böden ist *bla_{TEM-1}* weit verbreitet (55, 57). Das Erythromycin-Resistenzgen ***ermB*** und das Sulfonamid-Resistenzgen ***sul1*** wurden in Gülle und Gülle-gedüngten Böden nachgewiesen (55, 56). ***VanA*** ist das repräsentative Element des Vancomycin-Resistenzgenclusters und verleiht Resistenz gegen die Glykopeptide Vancomycin und Teicoplanin. Es wurde aufgrund seiner klinischen Bedeutung in unsere Analysen einbezogen (58-60). Die Aminoglykosid-Phosphotransferase-Gene ***aph(3')-IIa*** (= *nptII*) und ***aph(3')-IIIa*** (= *nptIII*) sind die in der Pflanzenbiotechnologie am häufigsten verwendeten Markergene (61, 62). *Aph(3')-IIIa* ist in österreichischen landwirtschaftlich genutzten Feldern (63) und in klinischen Isolaten (64) weit verbreitet.

Tabelle 3. Untersuchte TaqMan qPCR Targets.

Target	Funktion	inaktivierte Antibiotika-Klassen	Resistenz-Mechanismus	Information
16S rRNA	mikrobielle Biodiversitätsbestimmung	-	-	kodiert für ribosomale RNA; Surrogat-Marker für Bakterienzahl
<i>intl1</i>	MGE-spezifisches Element	-	-	Klasse 1 Integron Integrase (65)
<i>ISPs</i>	MGE-spezifisches Element	-	-	Insertionssequenz
<i>qacEdelta1</i>	Antiseptikaresistenzgen	Quartäre Ammoniumsalze	Efflux	Multipass-Membran-Transporter
<i>aadA (ant(3'')-Ia)</i>	Antibiotikaresistenzgen	Aminoglykoside	Antibiotika-Inaktivierung	Aminoglykosid-Nucleotidyltransferase
<i>nptII (aph(3')-IIa)</i>	Antibiotikaresistenzgen	Aminoglykoside	Antibiotika-Inaktivierung	Aminoglykosid-Phosphotransferase
<i>nptIII (aph(3')-IIIa)</i>	Antibiotikaresistenzgen	Aminoglykoside	Antibiotika-Inaktivierung	Aminoglykosid-Phosphotransferase
<i>strB (aph(6)-Id)</i>	Antibiotikaresistenzgen	Aminoglykoside	Antibiotika-Inaktivierung	Aminoglykosid-Phosphotransferase
<i>dfrA1</i>	Antibiotikaresistenzgen	Diaminopyrimidine	Antibiotika-Target-Ersatz	Dihydrofolatereduktase
<i>cmxA</i>	Antibiotikaresistenzgen	Phenicol	Efflux	Chloramphenicol-Resistenz durch Major-Facilitator-Superfamilie Antibiotika-Effluxpumpe
<i>qnrS</i>	Antibiotikaresistenzgen	Fluorochinolone	Target-Schutz	Quinolon-Resistenz-Protein
<i>vanA</i>	Antibiotikaresistenzgen	Glykopeptide	Umwandlung des Antibiotika-Targets	D-Ala-D-Ala Ligase Homolog
<i>ermB</i>	Antibiotikaresistenzgen	Makrolide	Umwandlung des Antibiotika-Targets	23S ribosomale RNA Methyltransferase
<i>ermF</i>	Antibiotikaresistenzgen	Makrolide	Umwandlung des Antibiotika-Targets	23S ribosomale RNA Methyltransferase

Target	Funktion	inaktivierte Antibiotika-Klassen	Resistenz-Mechanismus	Information
<i>sat-4</i>	Antibiotikaresistenzgen	Nukleoside	Antibiotika-Inaktivierung	Streptothricin-Resistenz
<i>mcr-1</i>	Antibiotikaresistenzgen	Polypeptide	Umwandlung des Antibiotika-Targets	Phosphoethanolamine-Transferase (Colistin-Resistenz)
<i>sul1</i>	Antibiotikaresistenzgen	Sulfonamide	Antibiotika-Target-Ersatz	Sulfonamid-resistente Dihydropteroat-Synthase
<i>tet(A)</i>	Antibiotikaresistenzgen	Tetrazykline	Efflux	Major-Facilitator-Superfamilie (MFS) Antibiotika-Effluxpumpe
<i>tet(M)</i>	Antibiotikaresistenzgen	Tetrazykline	ribosomaler Schutz	Tetrazyklin-resistentes ribosomales-Schutz-Protein
<i>tet(O)</i>	Antibiotikaresistenzgen	Tetrazykline	ribosomaler Schutz	Tetrazyklin-resistentes ribosomales-Schutz-Protein
<i>tet(W)</i>	Antibiotikaresistenzgen	Tetrazykline	ribosomaler Schutz	Tetrazyklin-resistentes ribosomales-Schutz-Protein
<i>bla_{CTX-M-15}</i>	Antibiotikaresistenzgen	β -Laktame	Antibiotika-Inaktivierung	Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL); CTX-M β -Laktamase; Resistenz gegenüber Penamen und Cephalosporinen
<i>bla_{KPC}</i>	Antibiotikaresistenzgen	β -Laktame	Antibiotika-Inaktivierung	Klasse A β -Laktamase; KPC β -Laktamase; Resistenz gegenüber Monobactamen, Carbapenemen, Cephalosporinen und Penamen
<i>bla_{NDM-1}</i>	Antibiotikaresistenzgen	β -Laktame	Antibiotika-Inaktivierung	Klasse B β -Laktamase; NDM beta-Laktamase; Resistenz gegenüber Carbapenemen, Cephalosporinen, Cephamycinen und Penamen
<i>bla_{OXA-10}</i>	Antibiotikaresistenzgen	β -Laktame	Antibiotika-Inaktivierung	Klasse D- β -Laktamase; OXA β -Laktamase; Resistenz gegenüber Penamen, Cephalosporinen, Carbapenemen
<i>bla_{TEM-1}</i>	Antibiotikaresistenzgen	β -Laktame	Antibiotika-Inaktivierung	Klasse A β -Laktamase; Resistenz gegenüber Penamen, Penemen, Cephalosporinen und Monobactamen
<i>mecA</i>	Antibiotikaresistenzgen	β -Laktame	Antibiotika-Target-Ersatz	Resistenz gegenüber Penamen

Daten stammen – falls nicht anders angegeben - aus CARD (<https://card.mcmaster.ca/>).

4 Material und Methoden

4.1 Entnahme und Behandlung der Proben

4.1.1 Bodenproben

Im HOAL wurden pro Feld jeweils zehn einzelne Bodenproben entlang zweier virtueller x-förmig angelegter Diagonalen entnommen (Abbildung 3). Die Probenahme erfolgte streng nach diesem Schema und ließ sichtbare Unterschiede in der Bodenqualität unberücksichtigt. An den Waldstandorten (HOAL-Wald und Vergleichsböden) wurden 10 Bodenproben innerhalb eines willkürlich gewählten Vierecks von ca. 10 x 10 m entnommen. An jedem Standort wurden zu jedem Probenahme-Termin dieselben Punkte beprobt (Tabelle 2). An den urbanen Standorten wurden 5 Bodenproben in einem willkürlich ausgewählten Viereck von 5 x 5 m entnommen.

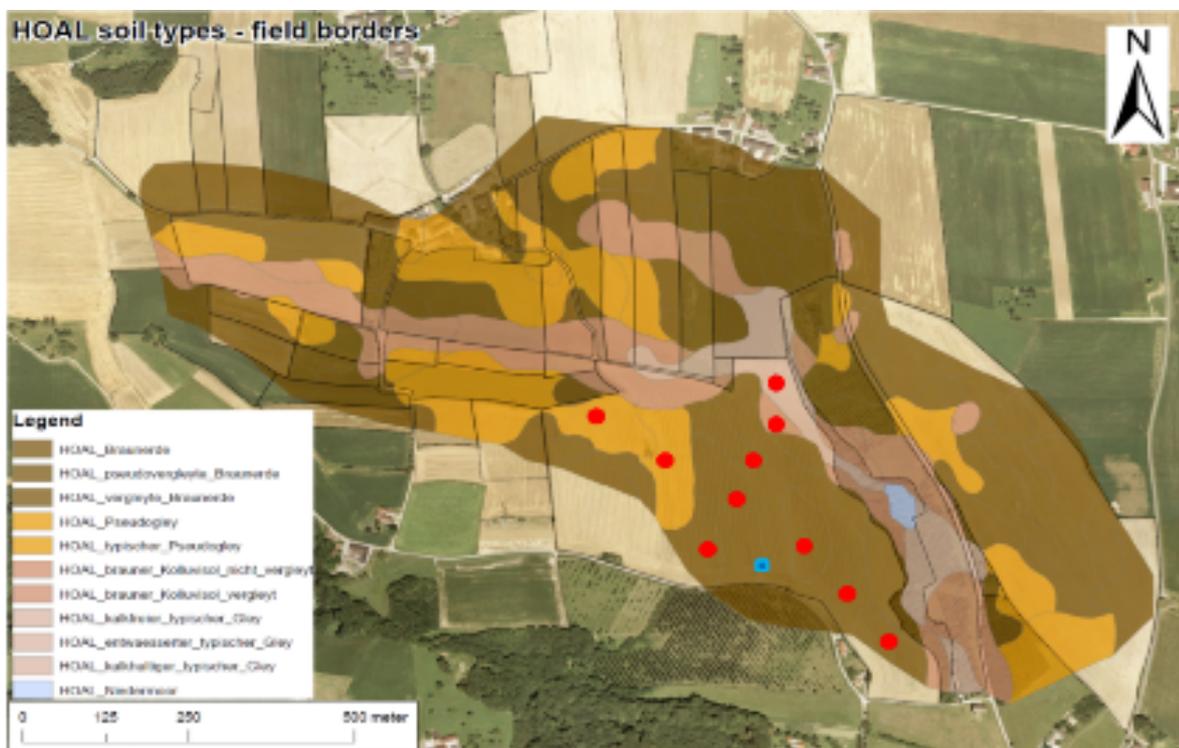


Abbildung 3. HOAL Testgelände: Bodentypen und Probenahme in einem HOAL Feld.

Rote Punkte: Zehn einzelne Bohrkern pro Testfeld. Blau: Sammelstelle Triangle-Probe. Verschiedene Bodentypen (Braunerde, Pseudogley und Kolluvisol) sind durch unterschiedliche Brauntöne dargestellt. Schwarze Linien kennzeichnen die Feldgrenzen. Die zehn einzelnen Bohrkern werden zu einer Bodenmischprobe zusammengefasst, die für die auf dem gesamten Feld herrschenden Bedingungen repräsentativ ist (Abbildung aus (50); modifiziert).

Der Boden wurde aus der Rhizosphäre (*sensu lato*) der Pflanzen 0 - 25 cm unter der Oberfläche mit einem Pürckhauer-Bohrer entnommen. An stark verdichteten Stellen wurde ein Hammer zu Hilfe genommen. Die Bohrkern wurden sofort nach der Entnahme separat in saubere Plastiksäckchen transferiert, gründlich homogenisiert, in einer Kühlbox gesammelt, ins Labor transportiert und vorzugsweise noch am selben Tag weiterverarbeitet. Wenn dies nicht möglich war, wurden die Proben im Labor bei 4-10°C gelagert und in der Regel innerhalb von 1-2 Tagen verarbeitet.

Im Labor wurden die 10 Einzelproben jedes Feldes bzw. 5 Einzelproben der Vergleichsflächen zu einer Bodenmischprobe vereinigt, um eine repräsentative Probe pro Untersuchungseinheit (d. h. pro "Feld") zu erhalten. Jede Mischprobe entsprach ca. 750 g, sodass genügend Material für die nachfolgenden molekularen, mikrobiologischen und physikalisch-chemischen Analysen zur Verfügung stand. Mindestens 20 g der Bodenmischproben wurden für die DNA-Isolierung durch ein 2 mm Metallsieb gesiebt.

Bei jedem Schritt der Probeentnahme und -verarbeitung wurde sehr auf die Vermeidung von Boden-, Bakterien- und DNA-Kreuzkontaminationen geachtet. Die gesamte Ausrüstung wurde mit einer Natriumhypochlorit-haltigen Lösung dekontaminiert, die Feldarbeiter trugen während der Bodenprobenahme und -verarbeitung medizinische Plastikhandschuhe.

4.1.2 Repräsentativität der Probenziehung

Zentrales Anliegen ist die Erfassung der ARG Hintergrundbelastung über einen längeren Zeitraum in einem definierten Umfeld, um Schwankungen der ARG Konzentrationen im Jahresverlauf dokumentieren und zu erwartende Minimal- und Maximalkonzentrationen in landwirtschaftlich genutzten Flächen besser abschätzen zu können. Das HOAL eignet sich aus folgenden Gründen optimal dafür:

1. Eine breite Variation an unterschiedlichen Bodentypen (Cambisole (56 %), Planosole (21%), Anthrosole (17 %), Gleysole (6 %), Histosole (< 1 %)) (50) bildet die Bodenzusammensetzung eines typischen österreichischen Ackeranbaugebiets ab.
2. Der Anbau zahlreicher für Österreich typischer Feldfrüchte (vorwiegend Mais, Winterweizen, Raps) im HOAL ermöglicht einen Vergleich der ARG-Konzentrationen in Relation zur angebauten Nutzpflanze und damit Rückschlüsse auf andere Anbaugebiete mit gleicher Bepflanzung und gleichem Bodentyp.
3. Die im HOAL zur Anwendung gelangenden unterschiedlichen Anbaumethoden (z.B. künstliche vs. organische Düngung) sind repräsentativ für die allgemein in Österreich eingesetzten landwirtschaftlichen Methoden. Die Auswirkungen unterschiedlicher

Bodenbearbeitungstechniken auf die ARG-Prävalenz und Konzentration lassen sich im HOAL ökonomisch und einfach dokumentieren.

4. Das HOAL wird schon seit 2009 für Monitoring-Studien herangezogen. Es ist daher möglich auf Langzeitdaten (z.B. bezüglich Entwässerung und Richtung der Wasserströme innerhalb des Bodenkörpers, was Rückschlüsse auf die Bewegung von ARGs in der wässrigen Bodenphase zulässt) zurückzugreifen. Kostensparende Synergieeffekte kommen zum Tragen.
5. Durch Fokussierung der Arbeiten auf eine repräsentative landwirtschaftliche Nutzfläche wie das HOAL lässt sich der Probenziehungsaufwand massiv reduzieren, was eine signifikante Verminderung der Projektkosten ermöglicht, ohne die Aussagekraft der erzielten Ergebnisse zu beeinträchtigen.
6. Gleichzeitig ermöglicht die vergleichende Analyse von Bodenproben aus nicht- oder wenig-anthropogen beeinflussten Bereichen (z.B. HOAL-Wiesen-, oder -Waldböden, die als Kontrollen dienen können) interessante Schlussfolgerungen zum Thema Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen.
7. Durch Stabilisierung und Standardisierung der Rahmenbedingungen, wie es im HOAL-Testgelände möglich ist, werden stochastische Nebeneffekte reduziert, die sonst bei einer österreichweiten Probenziehung auftreten.

4.1.3 Kot-, Gülle-, Kompost- und Wasserproben

Die Drainage- und Bach-Wasserproben wurden in 5 Liter Plastikbehältern gesammelt, die nach der Ankunft im Labor bis zur Verarbeitung bei 4°C gelagert wurden. Die Kot-, Gülle- und Kompostproben wurden vom HOAL zur Verfügung gestellt und wie die Bodenproben transportiert und gelagert. Die DNA-Aufreinigung wurde mit dem DNeasy PowerSoil DNA Kit (Qiagen, Österreich) durchgeführt, die Wasserproben mit dem DNeasy PowerWater Kit (Qiagen, Österreich) aufgereinigt (siehe Kapitel 4.3).

4.2 Chemische Bodencharakterisierung

Die Bodencharakterisierung erfolgte am Institut für nachhaltige Pflanzenproduktion der AGES in Wien. Diese Abteilung ist offiziell für die Analyse von Bodenparametern in Österreich zertifiziert und erstellt diese Art von Daten routinemäßig gemäß den einschlägigen nationalen (ÖNORM) und internationalen Richtlinien (<http://www.ages.at/landwirtschaft/produkte-und-tarife/tarife-des-geschaeftsfeldes-ernaehrungssicherung/boden/>). Aliquote der ungesiebten Bodenmischproben wurden auf folgende Parameter untersucht: Korngröße (Sand, Schluff, Ton), pH-Wert, Phosphor,

Kalium, Kohlenstoff, Stickstoff, Humus, organischer Gesamtkohlenstoff und Schwermetalle (Bor, Cadmium, Kupfer, Zink, Eisen, Mangan und Quecksilber). Die Analysen wurden gemäß folgender Richtlinien durchgeführt: ÖNORM L 1090, ÖNORM L 1085, ÖNORM L 1083, ÖNORM L 1087, ÖNORM L 1080, ÖNORM L 1095, ÖNORM L 1061-2.

4.3 DNA-Isolation

4.3.1 Bodenproben

Die Gesamt-DNA wurde mit dem DNeasy PowerSoil Kit aus dem gesiebten Boden extrahiert, gemäß den Anweisungen des Herstellers (Qiagen 2017), jedoch mit folgenden Abänderungen:

1. Die Gesamt-DNA wurde aus 1 g Boden extrahiert. Dies ist die wissenschaftlich anerkannte Bodenmenge, die für die Analyse der mikrobiellen Biodiversität hinreichend repräsentativ ist. Hierfür wurden vier 0,25 g Aliquote parallel mit 4 Extraktionssäulen extrahiert. Die vier Extrakte wurden zu einer DNA-Probe vereinigt, deren Volumen durch Vakuumzentrifugierung verringert wurde. 2. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei mindestens 10 000 g für 1 Minute durchgeführt. 3. Die Homogenisierung der Bodenproben wurde mit dem Fastprep-24-Gerät (MP Biomedicals, USA) unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: Zweimal starkes Schütteln (6 m/s; 30 s); mit einer Unterbrechung zum Abkühlen.

4.3.2 Drainage- und Wasserproben

Die Wasserproben wurden mit 0,22-µm-Filtern gefiltert, und die Gesamt-DNA wurde aus dem auf den Filtern abgelagerten Material extrahiert. Die Filter wurden in kleine Stücke geschnitten und die DNA wurde mit dem DNeasy PowerWater Kit (Qiagen, Deutschland) gemäß den Anweisungen des Herstellers mit leichten Änderungen extrahiert. Die Änderungen des Protokolls bestanden in einer mechanischen Zellyse, die mit dem FastPrep Bead Beater (MP Biomedicals, USA) in einem doppelten Durchlauf bei 6 m/s für jeweils 30 Sekunden durchgeführt wurde, einer Zentrifugation bei 13 000 x g für 3 min und einer Elution in einem doppelten Aliquot von 50 µl RNase- und DNase-freiem Wasser.

4.4 16S Amplikon Sequenzierung

Die 16S-Amplikon-Sequenzierung erfolgte mit der Illumina MiSeq V3-Technologie und wurde von der LGC Genomics GmbH (Deutschland) sowie auch in-House an der AGES Spargelfeldstraße durchgeführt. Für die zweistufige Nextera-PCR-Amplifikation wurden die von Illumina empfohlenen Primer verwendet, welche für die Region V3-V4 der 16S rRNA spezifisch sind (Tabelle 4).

Tabelle 4. 16S Sequenzierungsprimer (V3-V4 Region).

16S Primer	Sequenz (5'-3')	Länge [Basen]
Forward	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG	50
Reverse	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC	55

Die Vorbereitung der Sequenz-Library wurde laut Illumina „16S Metagenomic Sequencing Library Preparation“ Protokoll durchgeführt. Alle DNA-Templates wurden für den Einsatz in der PCR auf 5 ng/μL verdünnt. Die spezifische 16S PCR wurde mit dem in Tabelle 5 dargestellten Temperaturprogramm durchgeführt.

Tabelle 5. Temperaturprofil der spezifischen 16S PCR.

Zyklen	°C	Zeit
1x	95	3 min
30x	95	30 s
	55	30 s
	72	30 s
1x	72	5 min
1x	4	-

Die amplifizierten Proben wurden mit AMPure Beads (Beckman Coulter, Österreich) aufgereinigt (siehe Kapitel 0). Das Amplikon/Bead Verhältnis betrug 1/0,8. Die aufgereinigten Amplikons wurden in der Index-PCR mit Illumina Index-Adaptoren versehen, die an den 16S Primer-Overhang binden. Die Index-Adaptoren ermöglichen die Bindung an die zur Sequenzierung eingesetzten Flowcell und kennzeichnen gleichzeitig jede Probe mit zwei aus 8 Nukleotiden aufgebauten Sequenzcodes jeweils am 5'- und 3'-Ende. Dies garantierte für jede Probe eine einzigartige Kombination aus Indizes. Das Temperaturprofil kann aus Tabelle 6 entnommen werden. Nach der Index-PCR folgte wieder ein Aufreinigungsschritt mit den AMPure Beads, diesmal im Amplikon/Bead Verhältnis von 1/1,12. Die Konzentration der aufgereinigten Amplikons wurden mit dem Qubit Broad Range Kit am Qubit Fluorometer 2.0 (Thermo Fisher, Österreich) gemessen und anschließend auf 4 nM mit 10 mM Tris-HCl (Sigma-Aldrich, Österreich) verdünnt. Zehn Mikroliter der verdünnten Proben wurden daraufhin in einem 1,5 mL Eppendorf-Röhrchen gesammelt. Die Konzentration dieses Pools wurde wieder mit dem Qubit Fluorometer unter Verwendung des Qubit High Sensitivity Kits gemessen. Der 4 nM Pool wurde 1:1 mit 0,2 M NaOH (Sigma-Aldrich, Österreich) denaturiert und auf 8 pM mit dem HT1 Puffer von Illumina verdünnt. Zusätzlich wurde diese verdünnte Library mit 5% 12,5 pM PhiX-DNA versetzt. Die Probe wurde anschließend auf einer V3 Flowcell mit 2x 300 bp beziehungsweise 2x 250 bp sequenziert.

Tabelle 6. Temperaturprofil der Index-PCR.

Zyklen	°C	Zeit
1x	95	3 min
	95	30 s
8x	55	30 s
	72	30 s
1x	72	5 min
1x	4	-

Die Bearbeitung der Rohsequenzen umfasste folgende Schritte: Die angestrebte Sequenziertiefe sollte durchschnittlich 100 000 Rohsequenzen betragen, wobei alle Proben auf mindestens 50 000 Reads normiert wurden, um die Proben von den unterschiedlichen Läufen miteinander vergleichen zu können. Adapter wurden automatisch durch die Illumina MiSeq integrierte Software getrimmt. Das Conda Paket „Cutadapt“ wurde für die Entfernung von Primern eingesetzt. Daraufhin folgte ein Qualitätsfilter mit dem R-Paket „dada2“, mit Default-Einstellungen. Der dada2 Arbeitsablauf ermittelte Fehlerprofile, behob die Fehler mittels „Denoising“ und führte die Forward- und Reverse Reads zusammen („Merging“). Anschließend wurden chimäre Sequenzen entfernt. Die getrimmten und gefilterten Amplikon Sequenz Varianten (ASV) wurden über die 16S Datenbank Silva v138 taxonomisch zugeordnet, in einer „OTU-Tabelle“ aufgelistet und in Excel 365 visualisiert. Die Berechnung der α - und β -Diversität erfolgte mittels des R-Pakets „phyloseq“. Euler- und Venn-Diagramme wurden mit Hilfe der R-Pakete „MicrobiotaProcess“ und „VennDiagram“ erstellt. Für die Netzwerk-Analyse wurde der Rangkorrelationskoeffizient ρ nach Spearman zwischen den absoluten Kopienzahlen der 27 TaqMan qPCR Targets und der Häufigkeit der identifizierten bakteriellen Genera berechnet. Die Korrelation wurde mit den R Paketen „igraph“ und „visNetwork“ in Form eines Co-Occurrence Netzwerks dargestellt.

4.5 SmartChip qPCR Array

Die Prävalenz und die relative Abundanz zahlreicher ARGs in DNA-Extrakten aus Böden, Gülle und Kot wurden in einem Hochdurchsatzverfahren analysiert, dem SmartChip qPCR-System (66, 67). Für diese Methode stehen über 600 validierte Primer-Sets (Assays) zur Verfügung (<https://www.resistomap.com/>). Für die Analyse von 30 Proben wurden 95 Primer-Paare ausgewählt, für eine noch detailliertere Analyse von 12 dieser Proben wurden weitere 48 Primer-Paare eingesetzt (siehe Kapitel 5.4.2). Neben ARG Sequenzen wurden auch Integrons und mobile genetische Elemente (MGE) untersucht. Für einige Gene wurden mehrere Primer-Paare verwendet, um die Sequenzvielfalt

innerhalb des Gen-Targets zu erfassen. Als Referenzgen für die relative Quantifizierung der ARGs wurde das *16S rRNA* Gen mituntersucht.

Die qPCR SmartChip Analyse wurde von Resistomap (Finnland) folgendermaßen durchgeführt: Der SmartChip verfügte über 5184 Reaktionskammern mit einem Volumen von 100 nL, die mit dem SmartChip Multisample Nanodispenser befüllt wurden. Die verwendeten qPCR-Zyklusbedingungen und die ersten Schritte der Datenverarbeitung wurden bereits beschrieben (68). qPCR-Reagenzien wurden wie vom Hersteller empfohlen verwendet. Jede qPCR-Reaktion wurde in drei technischen Replikaten angesetzt.

Die Firma Resistomap führte die Aufbereitung der Rohdaten wie folgt durch: Als Nachweisgrenze wurde ein Schwellenwert-Zyklus (CT) von 27 verwendet (67, 69). Für jede Probe und jedes Primer-Paar wurde eine Schmelzkurvenanalyse und eine Untersuchung der PCR-Effizienz durchgeführt. PCR-Produkte mit unspezifischen Schmelztemperaturen und Mehrfachpeaks wurden als falsch positiv eingestuft und aus der Analyse ausgeschlossen. Zur Berechnung der relativen Häufigkeiten des nachgewiesenen Gens im Verhältnis zum *16S rRNA*-Gen wurde die $2^{-\Delta CT}$ -Methode verwendet mit $\Delta CT = CT$ des nachgewiesenen Gens – CT des *16S rRNA*-Gens (70). Als CT wurde in dieser Rechnung der mittlere CT der drei technischen Replikate eingesetzt. Ansätze bei denen die Zielsequenz nur in einem technischen Replikat nachgewiesen wurde, wurden von der Analyse ausgeschlossen.

4.6 TaqMan qPCR

Die extrahierte DNA der Böden und Oberflächen-Gewässer wurde mittels TaqMan qPCR (Ingenetix, Österreich) auf 27 unterschiedliche Gene (hier in weiterer Folge als „Targets“ bezeichnet) an der AGES getestet. Die jeweiligen Targets samt ihrer Funktion sind in Tabelle 3 zu finden.

Als Referenzgen für die relative Quantifizierung der Antibiotikaresistenzgene (ARGs) und mobilen genetischen Elemente (MGEs) wurde das *16S rRNA* Gen als 27. Target mituntersucht.

Die qPCR-Reaktionen wurden auf dem LightCycler480 II Instrument (Roche, Österreich) durchgeführt. Die 10 μ L qPCR-Reaktionsmischung bestand aus 2,5 μ L Wasser in PCR-Qualität (Roche, Österreich), 0,5 μ L TaqMan Assay (Ingenetix, Österreich), 5 μ L LightCycler 480 Probes Master 2x (Roche, Österreich) und 2 μ L DNA-Eluat als Template. Der TaqMan Assay enthält jeweils die Forward- und Reverse-Primer (jeweils 0,6 μ M im Reagenzmix) sowie auch die entsprechende TaqMan Sonde (0,2 μ M im Reagenzmix). Alle qPCR-Reaktionen wurden in drei technischen Wiederholungen angesetzt. Für die Negativkontrolle wurde Wasser in Molekularbiologie-Qualität als Template eingesetzt.

Folgendes Temperaturprogramm wurde für alle Ansätze verwendet: Auf eine 10-minütige erste Denaturierung bei 95°C folgten 45 Zyklen von 95°C für 10 Sekunden, 60°C für 30 Sekunden und 72°C für 10 Sekunden und ein abschließender Kühlschritt bei 40°C für 10 Sekunden (Tabelle 7).

Tabelle 7. Ampifikationsbedingungen für die TaqMan qPCR (LightCycler 480).

ARG	<i>sul1, vanA, nptII, tet(W), bla_{TEM-1}, aadA, strB, mcr-1, tet(A), ermF, bla_{KPC}, bla_{NDM-1}, mecA, ISPps, tet(M)</i>	<i>ermB, nptIII, int11, qnrS, cmxA, qacEdelta1, bla_{CTX-M-15}, dfrA-1, sat-4, bla_{OXA-10}, tet(O)</i>	16S rRNA
Hydrolyse-Sonden			
Label	FAM	5`YYE (VIC)	Cy5
Quencher	TAMRA	BHQ	
Konzentration	0.2 µM	0.2 µM	0.2 µM
PCR Ansatz			
Template	2 µL	2 µL	2 µL
PCR Mastermix	8 µL	8 µL	8 µL
Gesamtvolumen	10 µL	10 µL	10 µL
PCR Bedingungen			
Denaturierung	1x	95°C / 10 min	
- Denaturierung		95°C / 10 s	
- Annealing	45x	60°C / 30 s	
- Extension		72°C / 10 s	
Abkühlung	1x	40°C / 10 s	

4.6.1 dsDNA Standard-Generierung

Die einzelsträngigen DNA-Positivkontrollen (Ingenetix, Österreich) wurden mit dem LC480 Programm aus der Tabelle 7 an der AGES hochamplifiziert. Die so erzeugten doppelsträngigen Amplikons wurden mit der „AMPure XP Beads“ (Beckman Coulter, USA) Methode aufgereinigt. Hierfür wurden die Amplikons des jeweiligen Standards in einer MIDI Platte (Thermo Fisher Scientific, USA) gepoolt, mit den magnetischen Beads von Beckman Coulter gemischt und für 5 Minuten inkubiert. Die beladene MIDI-Platte wurde für weitere 2 Minuten auf ein magnetisches 96-well Gestell (Invitrogen, USA) gesetzt, sodass die Amplikons an die Beads binden konnten, während Kontaminanten (Salze, Primer/Primer-Dimere, dNTPs) ausgeschlossen wurden. Die Amplikon-Beads wurden daraufhin 2x mit 200 µL 80% Ethanol gewaschen und 10 Minuten lang getrocknet bis keine organischen Reste mehr zu sehen waren. Mittels 25 µL 10mM Tris-HCl (Sigma-Aldrich, USA) wurden die doppelsträngigen Amplikons nach einem 2-minütigen Vortex-Schritt von den Beads gelöst. Die MIDI-Platte wurde wiederum für 2 Minuten auf das magnetische Gestell gesetzt. Daraufhin konnte man die eluierten aufgereinigten Amplikons in einem 1,5 mL Eppendorf Röhrchen sammeln. Eine grafische Darstellung des Aufreinigungsprozesses ist in Abbildung 4 zu sehen.

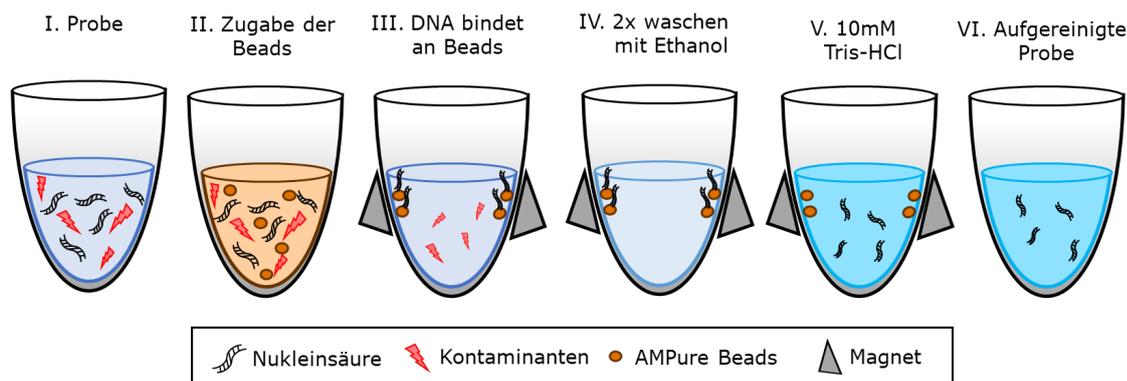


Abbildung 4. Aufreinigungsprozess der Amplikons mittels AMPure XP Beads.

(I) Die Probe samt Kontaminanten. (II) Die Probe wird mit den AMPure Beads vermischt, sodass sich die Nukleinsäure anhand der Festphasen-reversiblen Immobilisierung (solid-phase reversible immobilisation, SPRI) an die paramagnetischen Beads binden kann. (III) Kontaminanten bleiben in der wässrigen Phase und werden durch Pipettieren entfernt. (IV) Die Bead-gebundene Nukleinsäure wird zwei Mal mit 80% Ethanol gewaschen. (V) Die DNA wird anhand einer pH-Veränderung durch 10 mM Tris-HCl von den Beads gelöst. (VI) die gepufferte Lösung mit der aufgereinigten DNA wird in ein frisches Eppendorf-Röhrchen transferiert.

Die Konzentration der nun doppelsträngigen DNA-Standards wurde mit dem Qubit Fluorometer 2.0 und dem Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Österreich) laut Herstellerangaben ermittelt. Zusammenfassend wurden 195 µL Assay-Mix mit 5 µL Probe (hier: aufgereinigte dsDNA Standards) beziehungsweise 190 µL Assay-Mix mit 10 µL Standard (beigefügt im Kit) gemischt. Daraufhin folgte eine 2-minütige Inkubation im Dunklen, woraufhin die Proben und Standards bereit für das Messen waren. Anhand der Amplikon-Größe, Avogadro-Konstante und der durchschnittlichen Masse einer ein-Basenpaar schweren doppelsträngigen-DNA konnten die Kopienzahlen ermittelt werden. Die Berechnung der Kopienzahl pro Mikroliter ist in der unten angeführten Formel 1 zu finden.

Formel 1: Berechnung der Kopienzahl pro Mikroliter:

$$\frac{\text{Kopienzahl}}{\mu\text{L}} = \frac{X \text{ ng} \times 6,0221 \times 10^{23} \text{ Moleküle/Mol}}{\left(N \times 660 \frac{\text{g}}{\text{Mol}} \times 1 \times \frac{10^9 \text{ ng}}{\text{g}} \right)}$$

X=Amplikon-Konzentration [ng/µL]; N=dsDNA/Amplikon-Länge (Basenpaare); Avogadro-Konstante: 6,022x10²³ Moleküle/Mol; durchschnittliche molekulare Masse der doppelsträngigen DNA (Basenpaar): 660 g/Mol; Konversion zu Nanogramm: 1x10⁹ng/g

4.6.2 Probenvorbereitung und Quantifizierung

Alle Boden- und Wasserproben wurden einer Inhibitionstestung unterzogen, indem die DNA-Isolate 1:5 und 1:25 mit Wasser in Molekularbiologie-Qualität verdünnt wurden. Die verdünnten Proben wurden daraufhin mittels der 16S rRNA qPCR analysiert. Wenn die Differenz zwischen den Cp-Werten

der 1:5 und 1:25 Verdünnung zwischen 2.1 bis 2.7 betrug, wurden die Proben für die restlichen Targets mit der 1:5 Verdünnung getestet. Lagen die Werte außerhalb dieses Bereichs wurden die Proben für die restlichen Targets 1:25 verdünnt.

Die absoluten Konzentrationen während der qPCR wurden anhand der dsDNA Standards mit dem Second Derivative Maximum Algorithmus der LC480-Software Version 1.5 berechnet. Alle qPCR-Ergebnisse wurden pro Trockengewicht Boden (K/g TB) beziehungsweise pro Liter gefiltertem Wasser (K/L GW) angegeben. Die Datenanalyse erfolgte mittels Excel 2019.

4.6.3 TaqMan Assay Validierung

Vor der Analyse der Bodenproben wurden die qPCR-TaqMan-Assays gemäß einer Richtlinie des Paul Ehrlich-Instituts für alle ausgewählten Targets validiert (71). Es wurden sieben semilogarithmische Verdünnungsstufen jedes Standards hergestellt (8000 bis 0,512 Kopien/Assay). Jede Verdünnung wurde in drei unabhängigen qPCR-Läufen mit acht Wiederholungen pro Lauf durchgeführt, und die daraus resultierenden 24 Datenpunkte pro Verdünnung wurden statistisch analysiert. Die 95%-Nachweisgrenze (LOD) wurde durch eine logistische Regression bestimmt. Die quantitative Bestimmungsgrenze (LOQ) wurde anhand einer Kalibrationskurve ermittelt. Hierzu wurde der Logarithmus der Verdünnungsstufe gegen den entsprechenden Ct-Wert aufgetragen und mittels linearer Regression eine Regressionsgerade durch die Punkte gelegt. Die Bestimmungsgrenze wurde mit folgender Formel berechnet:

Formel 2: LOQ Bestimmung

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{S}$$

σ (Sigma).....Standardabweichung der Reaktionsvariablen

S.....Steigung der Kalibrationskurve

Die Inter-Assay- und Intra-Assay-Variabilität wurden anhand der Standardabweichung und des Variationskoeffizienten für jede Verdünnung berechnet (Tabelle 8). Die ermittelten LOD/LOQ-Werte entsprechen Literaturdaten (72).

Tabelle 8. TaqMan qPCR Validierungsergebnisse für ARG und MGE Targets.

Target	n	Effizienz		Steigung der Kalibrationskurve		intra-Assay Variabilität (%)		inter-Assay Variabilität (%)		LOD (K/g TB)	LOQ (K/g TB)
<i>aadA</i>	24	0,9989	- 0,9997	-3,44	- -3,41	0,17	- 1,68	0,17	- 0,76	1,8E+03	1,9E+04
<i>bla_{CTX-M-15}</i>	24	0,9936	- 0,9988	-3,55	- -3,42	0,16	- 1,73	0,04	- 0,55	5,3E+03	4,1E+03
<i>bla_{KPC}</i>	24	0,9991	- 0,9999	-3,54	- -3,41	0,35	- 2,60	0,06	- 0,58	1,1E+03	1,4E+04
<i>bla_{NDM-1}</i>	24	0,9982	- 0,9996	-3,40	- -3,33	0,22	- 1,74	0,05	- 0,44	1,2E+03	9,8E+03
<i>bla_{OXA-10}</i>	24	0,9989	- 0,9999	-3,52	- -3,36	0,30	- 2,22	0,04	- 0,75	8,9E+02	7,2E+03
<i>bla_{TEM-1}</i>	24	0,9995	- 0,9998	-3,45	- -3,36	0,21	- 1,13	0,07	- 0,35	1,4E+03	5,9E+03
<i>cmxA</i>	24	0,9969	- 0,9998	-3,48	- -3,36	0,28	- 3,01	0,06	- 0,61	1,1E+03	1,3E+04
<i>dfrA-1</i>	24	0,9961	- 0,9998	-3,61	- -3,36	0,17	- 2,02	0,05	- 1,62	1,3E+03	1,3E+04
<i>ermB</i>	24	0,9989	- 0,9996	-3,52	- -3,38	0,20	- 1,78	0,07	- 0,33	8,9E+02	2,9E+03
<i>ermF</i>	24	0,9990	- 0,9999	-3,73	- -3,61	0,15	- 1,29	0,06	- 3,70	1,4E+03	7,9E+04
<i>intI1</i>	24	0,9999	- 1,0000	-3,45	- -3,42	0,27	- 0,97	0,05	- 0,55	8,9E+02	4,3E+03
<i>ISPps</i>	24	0,9969	- 0,9990	-3,23	- -3,17	0,35	- 1,12	0,05	- 0,40	3,7E+03	4,9E+03
<i>mcr-1</i>	24	0,9986	- 0,9813	-3,47	- -3,16	0,20	- 2,77	0,05	- 1,31	1,4E+03	1,8E+04
<i>mecA</i>	24	0,9982	- 0,9997	-3,60	- -3,34	0,21	- 1,53	0,05	- 0,54	3,3E+03	9,1E+03
<i>nptII</i>	24	0,9964	- 0,9992	-3,12	- -3,03	0,23	- 2,50	0,04	- 0,47	1,7E+03	8,6E+04
<i>nptIII</i>	24	0,9944	- 0,9994	-3,22	- -3,11	0,20	- 1,70	0,03	- 0,53	1,1E+03	2,3E+04
<i>qacEdelta1</i>	24	0,9998	- 0,9999	-3,44	- -3,41	0,21	- 2,14	0,05	- 2,06	1,5E+03	2,7E+04
<i>qnrS</i>	24	0,9971	- 0,9995	-3,56	- -3,43	0,21	- 1,97	0,05	- 0,60	3,7E+03	1,3E+04
<i>sat-4</i>	24	0,9998	- 0,9999	-3,52	- -3,45	0,24	- 1,37	0,07	- 1,58	9,5E+02	9,1E+03
<i>strB</i>	24	0,9997	- 0,9998	-3,53	- -3,48	0,20	- 1,57	0,04	- 1,11	1,3E+03	5,2E+03
<i>sul1</i>	24	0,9998	- 0,9999	-3,51	- -3,44	0,16	- 2,24	0,07	- 0,57	1,1E+03	7,9E+03
<i>tet(A)</i>	24	0,9998	- 1,0000	-3,56	- -3,46	0,16	- 0,83	0,05	- 1,02	1,2E+03	9,5E+03
<i>tet(M)</i>	24	0,9995	- 0,9999	-3,58	- -3,43	0,18	- 1,73	0,07	- 0,87	1,1E+03	9,7E+03
<i>tet(O)</i>	24	0,9926	- 0,9994	-3,58	- -3,09	0,44	- 3,20	0,06	- 1,06	4,8E+03	2,2E+04
<i>tet(W)</i>	24	0,9878	- 0,9956	-3,66	- -3,30	0,40	- 3,40	0,32	- 0,73	2,7E+03	2,0E+05
<i>vanA</i>	24	0,9983	- 0,9998	-3,42	- -3,35	0,12	- 3,13	0,12	- 0,79	8,6E+02	8,3E+03

n= Anzahl der Messungen pro Verdünnungsstufe; LOD = 95% Detektionslimit; LOQ= Quantifizierungslimit; K/g TB = Kopien pro Gramm Trockengewicht Boden.

Informationen zu den verwendeten Targets und deren Funktion werden in Tabelle 3 aufgelistet.

4.7 Bestimmung der Antibiotika-Konzentrationen

Die Bestimmung von Antibiotika-Konzentrationen in den Boden-, Gülle- und Kot-Proben wurde im Nationalen Veterinärforschungsinstitut (Piwet) in Pulawy, Polen, durchgeführt.

Die Identifizierung und Quantifizierung von 29 verschiedenen antimikrobiellen Substanzen, darunter Sulfonamide, Tetrazykline, Fluorochinolone und Trimethoprim erfolgte mittels Flüssigchromatographie - Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) unter Verwendung eines Agilent HPLC-Gerätes der Serie 1200 in Verbindung mit einem API 4000 Triple-Quadrupol-Massenanalysator mit Turbo Ion Spray-Quelle (AB Sciex, Kanada).

Die Probenvorbereitung für die Multiclass-Analyse von antimikrobiellen Rückständen in Kot und Gülle umfasste die Zugabe von Na₂EDTA und die Extraktion mit Ameisensäure in Acetonitril und anschließend mit in Acetonitril gelöstem Ammoniak, gefolgt von der Filtration durch eine SPE-Säule, Verdampfung und Rekonstitution vor der LC-Injektion. Die chromatographische Trennung erfolgte auf einer C18-Säule mit Gradientenelution. Bei den Boden- und Sedimentproben wurden ausgewählte Verbindungen durch Zugabe von Acetonitril, Zitronensäure und Natriumacetat extrahiert. Aufgereinigt wurde mit Oasis HLB-Kartuschen. Vor der LC-Injektion wurden die Proben zusätzlich mit Spritzenfiltern gereinigt. Die Massenspektren wurden im selektiven Multiple-Reaction-Monitoring-Modus mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometrie-Detektor aufgenommen.

Die bei der Analyse von Gülle, Kot und Boden angewandte Methode wurde entsprechend den analytischen Anforderungen validiert, indem die Parameter Linearität, Präzision, Genauigkeit, Spezifität, Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze ermittelt wurden. Die Bestimmungsgrenzen lagen je nach Analyten im Bereich von 5 - 50 µg/kg/L.

Antibiotika-Konzentrationen in HOAL Wasserproben wurden extern im Umweltbundesamt in Wien nach den dort akkreditierten Methoden bestimmt. Getestet wurden 20 Antibiotika (Penicilline, Makrolide, Tetrazykline, Sulfonamide, Metronidazol).

4.8 Kultivierung Antibiotika-resistenter Bakterien aus Boden- und Gülleproben

Antibiotika-resistente Bakterien wurden über Ausplattieren von Probenverdünnungen auf mit Antibiotikum versetzten Selektivagarplatten gezüchtet. Isolierte Einzelkolonien wurden für eine taxonomische Klassifizierung auf eine 16S NGS Amplikonsequenzierung vorbereitet.

In Tabelle 9 sind die verwendeten Fungizide und Antibiotika mit den eingesetzten Arbeitskonzentrationen und Lösungsmitteln aufgelistet. Die Lösungen wurden bei 4°C gelagert.

Tabelle 9. Fungizide und Antibiotika: Lösungsmittel und Arbeitskonzentrationen.

Supplemente			
Fungizide	Konzentration µg/ml	Lösungsmittel	Hersteller
Benomyl	20	Absolute EtOH	Sigma Aldrich
Nystatin	20	Absolute EtOH	Sigma Aldrich
Cycloheximide	50	Absolute EtOH	Sigma Aldrich
Antibiotika			
Sulfadiazine	50	Dimethylformamide (DMF)	Sigma Aldrich
Erythromycin	100	Absolute EtOH	Sigma Aldrich
Vancomycin	10	UltraPure Distilled Water DNase/RNase Free-Invitrogen	Thermo Fisher
Kanamycin	100	UltraPure Distilled Water DNase/RNase Free-Invitrogen	Thermo Fisher
Tetrazykline	10	Absolute EtOH	Sigma Aldrich
Ampicillin	50	UltraPure Distilled Water DNase/RNase Free-Invitrogen	Thermo Fisher

Für die Bakterienkultivierung wurden Petrischalen mit einem Durchmesser von 90 mm (VWR Sterile Petrischale in Polystyrol) verwendet. Zur Herstellung der Agarplatten wurde das Vollmedium Standard I Nutrient Agar (Merck; 37 g/l) bzw. das Minimalmedium R2A Agar (Merck; 15,2 g/l) jeweils in einem Erlenmeyerkolben abgewogen und mit der korrekten Menge an Wasser vermischt. Die Nährmedien wurden für 15 Minuten bei 121°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf unter 50°C wurden die Fungizide Benomyl (20 µg/ml), Nystatin (20 µg/ml) und Cycloheximide (50 µg/ml) zu jedem Nährmedium zugefügt, um das Wachstum von Pilzen zu verhindern. Zur Bestimmung der Antibiotikaresistenzraten in den isolierten Bakterienpopulationen wurde den Selektivagarplatten jeweils Sulfadiazin (50 µg/ml), Erythromycin (100 µg/ml), Vancomycin (10 µg/ml), Kanamycin (100 µg/ml), Tetrazyklin (10 µg/ml) oder Ampicillin (50 µg/ml) zugesetzt. Die Temperatur wurde mit einem Infrarot-Thermometer kontrolliert. Pro Antibiotikum wurde jeweils ein Erlenmeyerkolben mit Nutrient Agar und ein Erlenmeyerkolben mit R2A hergestellt, welche beide alle 3 Fungizide

enthielten. Pro Petrischale wurden ca. 16-20 ml Agar gegossen. Die fertigen Agarplatten wurden bis zur Verwendung bei 4°C im Dunklen aufbewahrt.

Zur Homogenisierung wurden die Bodenproben gesiebt (Retsch; 2.0 mm-Maschensieb) und in sterile Plastikbeutel verpackt. Zwischen jeder Probe wurden die Handschuhe gewechselt und das Sieb in einer 10% Danklorix-Lösung 10-15 Minuten eingelegt, mit destilliertem Wasser abgeschwemmt und mit Tüchern getrocknet. Die Bodenproben wurden bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

In 15 ml sterilen Polypropylen Röhren (VWR) wurden pro Bodenprobe 1 g Probe, welche gut vermischt und gesiebt wurde, 2,5 g sterile Glasperlen (Roth) mit einem Durchmesser von 0,75-1 mm und 9 ml Phosphat gepufferte Salzlösung (Thermo Fischer; steril gefiltertes PBS; 1X) hinzugefügt. Das Anfangsröhrchen wurde mindestens 5 Minuten mit mehreren kurzen Pausen, bei denen das Röhrchen händisch geschüttelt wurde, gevortext. Die Pausen wurden hinzugefügt, um sicherzustellen, dass die Probe gut durchmischt wurde. Neben dem Anfangsröhrchen wurden weitere sterile Polypropylen Röhren (15 ml; VWR) mit 9 ml Phosphatpuffer (PBS; 1X) vorbereitet. Nach diesem Schritt, wurde in etwa 2 Minuten gewartet, damit sich ein klarer Überstand im Röhrchen bildet, welcher ca. 1-2 cm hoch ist. Vorsichtig wurden mit einer Pipette 1 ml des Überstands in das nächste 15 ml Röhrchen mit 9 ml Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS; 1X) überführt und auf und ab pipettiert. Das Röhrchen wurde gevortext, mit einer neuen Pipettenspitze 1 ml entnommen und in das nächste 15 ml Röhrchen mit 9 ml PBS transferiert. In Vorversuchen wurden die passenden Verdünnungsstufen an die jeweilige Probe angepasst. Die Gülleprobe wurde so gehandhabt wie die Bodenproben, jedoch wurde statt 1 g Probe 1 ml Probe verwendet.

Die Proben wurden pro Verdünnungsstufe in 2 Replikaten mit einer sterilen Öse ausplattiert. Die Petri-Platte wurde in Sektoren unterteilt und pro Sektor wurden 20 µL ausplattiert. Die jeweilige Verdünnung wurde, bevor sie ausplattiert wurde, gevortext. Die Nutrient Agar und R2A Platten wurden nach dem Ausplattieren bei 27°C inkubiert. Die Kolonien bildenden Einheiten (KBE) auf dem Vollmedium Nutrient Agar sowie auf dem Minimalmedium R2A mit und ohne Antibiotika wurden nach 48h und nach 120 Stunden gezählt, notiert und für weitere Berechnung verwendet.

10 Einzelkolonien jeder Antibiotikaplatte (Nutrient Agar mit Tetrazyklin; Nutrient Agar mit Kanamycin; Nutrient Agar mit Erythromycin; Nutrient Agar mit Vancomycin; R2A mit Tetrazyklin; R2A mit Kanamycin; R2A mit Erythromycin; R2A mit Vancomycin) pro Probe (F04_C_07_21; Huber 31; Donau-Auen 1; DA10_11_20; Gülle) wurden auf LB Agarplatten mit einer Impföse ausgestrichen, um

sicherzustellen, dass Reinkulturen für die Kryo-Stocks verwendet werden. Nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen bei 27°C wurden die Reinkulturen mit einer Impföse in 1 ml 50% Glycerin-Lösung in einem Kryo-Röhrchen (VWR; 2ml) transferiert. Jene LB Agar Platten mit einer Mischkultur wurden nicht für die weiteren Arbeitsschritte miteinbezogen. Die Kryo-Röhrchen wurden bis zur DNA-Extraktion bei -80°C gelagert. Die Koloniebildende Einheiten (KBE) auf den verschiedenen Agarplatten wurden gezählt und KBE/ml Suspension, KBE/g Probe und Resistenzrate wurden auf folgende Weise berechnet:

Formel 3: Berechnung der Kolonien-bildenden Einheiten und Antibiotika-Resistenzraten

$$\text{KBE/ml} = \frac{\text{Mittelwert KBE} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{ausplattiertes Volumen}}$$

$$\text{KBE/g Probe} = \text{dilution volume} * \text{CFU/ml}$$

$$\text{Resistenzrate: } \frac{\text{Anzahl der resistenten Bakterien [KBE/g Probe]} * 100\%}{\text{Gesamtzahl der lebensfähigen Bakterien [KBE/g Probe]}}$$

4.9 Taxonomische Klassifizierung antibiotikaresistenter Bakterien aus Boden- und Gülleproben: 16S Illumina MiSeq Amplikon Sequenzierung

Die eingefrorenen Kryostocks wurden nach der Lagerung bei -80°C auf Raumtemperatur aufgetaut und mit einer Einmal-Öse (10 µL) in 1,2 mL LB-Medium überführt. Diese Kulturen wurden bei 30°C über Nacht für 12-16 Stunden bei 350 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 1 mL der Kultur in ein neues 1,5 mL Eppendorf-Röhrchen überführt und bei 15.000 x g für 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet wurde in 480 µL 50mM EDTA gelöst.

Durch die Zugabe von 60 µL Lysozym (10 mg/mL) wurde die Zellwand für den Zellaufschluss vorbereitet. Die DNA Extraktion erfolgte gemäß dem Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Österreich). Die DNA wurde in 100 µL 10 mM Tris-HCl gelöst.

Nach der DNA Extraktion aller angewachsenen Reinkulturen wurden die Proben für die 16S NGS Sequenzierung vorbereitet. Hierzu wurde wieder das Illumina 16S Metagenomic Library Preparation Protokoll herangezogen. Die 270 extrahierten Proben wurden auf 5 ng/µL verdünnt und die 16S V3-V4 Region wurde mit den laut Protokoll modifizierten Primern für 30 Zyklen am ProFlex PCR-System (Life Technologies, Österreich) amplifiziert. Vier Forward- und vier Revers-Primervarianten (jeweils 10 µM) (Tabelle 10) wurden zusammengemischt, sodass die finale Konzentration der Primer pro 25 µL Reaktion 0,2 µM war.

Tabelle 10. Modifizierte 16S NGS Primersequenzen.

16S Primer	Sequenz (5'-3')	Länge
Forward		
w/o wobble	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG	50
1 N	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNCCTACGGGNGGCWGCAG	51
2 N	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNCCTACGGGNGGCWGCAG	52
3 N	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNCCTACGGGNGGCWGCAG	53
Reverse		
w/o wobble	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC	55
1 N	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNGACTACHVGGGTATCTAATCC	56
2 N	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNGACTACHVGGGTATCTAATCC	57
3 N	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNGACTACHVGGGTATCTAATCC	58

Mit und ohne Wobble-Basen zwischen der spezifischen Sequenz für die V3-V4 Region und der Bindungsstelle für die Index-primer.

Daraufhin folgte ein Waschschriff mittels den AMPure Beads (Beckman Coulter, Österreich) (DNA/Bead Ratio = 1/0,8) und ein 2,0 % Agarose Gel, das bei 4,6 V/cm für eine Stunde gelaufen ist. Nach Feststellung, dass die Proben erfolgreich amplifiziert und aufgereinigt wurden, wurden die Index-PCR und ein weiterer Waschschriff (DNA/Bead Ratio = 1/1,12) durchgeführt. Anschließend wurden alle Proben mittels Qubit Flex Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Österreich) in 8-Streifen mit dem Qubit Broad Range Kit (Thermo Fisher Scientific, Österreich) gemessen und auf 4 nM verdünnt. Die Proben wurden daraufhin gepoolt, mit 0,2 M NaOH (Sigma-Aldrich, Österreich) 1:1 denaturiert und die entstandene Library wurde auf 8 pM mit HT1 Puffer (Illumina, USA) verdünnt und mit 5% 12,5 pM PhiX gespiked. Der Sequenzierungslauf am Illumina MiSeq Gerät (Illumina, USA) wurde mit einer V2 Nano Flowcell (2x250 bp) durchgeführt.

Die Datenanalyse erfolgte mittels Adaptertrimmung durch die Illumina Software und das Conda Paket „Cutadapt“. Daraufhin liefen die FASTQ Dateien durch die DADA2 Pipeline in R. Die identifizierten Amplikon Sequenz Varianten (ASVs) wurden mit der Silva v138.1 Datenbank abgeglichen. Das entstandene taxonomische File wurde mittels Excel 365 analysiert und grafisch dargestellt.

5 Modul 1: Erfassung der ARG-Belastung von Ackerböden, urbanen und naturnahen Vergleichsflächen im Jahresverlauf

5.1 Quantifizierung von ARGs und MGEs mit TaqMan qPCR

Zur Ermittlung der Konzentrationen klinisch relevanter Antibiotika-Resistenzgene in österreichischen Böden wurden 27 TaqMan qPCR Systeme entwickelt (Ingenetix; Tabelle 3). Die Targets umfassten das *16S rRNA* Gen, das als Surrogat-Marker für die Anzahl der Bakterienzellen genutzt wurde, zwei mobile genetische Elemente (*intl1*, *ISPps*) und 24 Resistenzgene, die an der Inaktivierung von 12 verschiedenen Antibiotika-Klassen beteiligt sind (Aminoglykoside: *ant(3'')-Ia/aadA*, *aph(3')-IIa/nptII*, *aph(3')-IIIa/nptIII*, *aph(6)-Id/strB*; β -Lactame: *bla_{CTX-M-1-15}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM-1}*, *bla_{OXA-10}*, *bla_{TEM-1}*, *mecA*; Phenicol: *cmxA*; Diaminopyrimidine: *dfrA1*; Makrolide: *ermB*, *ermF*; Polypeptide: *mcr-1*; Biozide: *qacEdelta1*; Fluorochinolone: *qnrS*; Nukleoside: *sat-4*; Sulfonamide: *sul1*; Tetracykline: *tet(A)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(W)*; Glykopeptide: *vanA*). Die ARG-qPCR-Targets wurden unter Berücksichtigung der in Kapitel 3.4 dargestellten Kriterien ausgewählt.

Für die Berechnung der absoluten ARG-Konzentrationen wurde die Kopienzahl pro Gramm Trockengewicht Boden (K/g TB) ermittelt. Zur Bestimmung der relativen ARG-Häufigkeiten wurde die delta CT-Methode herangezogen (70). In den folgenden Grafiken sind absolute und relative ARG-Konzentrationen gemeinsam dargestellt. Bei allen Targets zeigen die Ergebnisse beider Quantifizierungsmethoden dieselben Verteilungstrends an und bestätigen einander.

5.1.1 ARG-Konzentrationen in HOAL-Acker-, Laub- und Nadelwaldböden

Auf den **HOAL-Feldern** (F04, F31, F32, F39) und **HOAL-Waldflächen** (OF, NF) wurden Zeitreihen mit 6 bis 10 Probenahme-Zeitpunkten im Jahresverlauf analysiert. Auf dem Feld F31 wurde bei 13 Targets (*ermF*, *ermB*, *dfrA-1*, *sat-4*, *nptIII*, *strB*, *cmxA*, *sul1*, *qacEdelta1*, *tet(A)*, *tet(M)*, *tet(W)*, *intl1*) nach der Gülle-Applikation ein Konzentrationsanstieg beobachtet. Dieser flachte bis zum Ende der Anbausaison wieder auf das Baseline-Niveau ab. Der Konzentrationsanstieg nach der Gülle-Applikation war im zweiten Gülle-gedüngten Feld F39 durchgängig weniger stark ausgeprägt. Bei denselben Targets (mit Ausnahme von *ermF* und *intl1*) war die Konzentration in den langjährig Gülle-gedüngten Feldern F31, F32 und F39 durchgehend höher als im langjährig Gülle-freien Feld F04. Auf den Feldern wurden insgesamt 22 der 26 untersuchten Targets detektiert, in den Wäldern 16.

Um die Auswirkung von organischer Düngung auf die Resistenzgenkonzentrationen im mit Schweinegülle-gedüngten Boden zu ermitteln, wurden Antibiotikaresistenzgen-Konzentrationen in Gülle- und nicht-Gülle-gedüngten Feldern miteinander verglichen (siehe Abschnitt 3.3). Hierfür wurden 27 qPCR-Targets in drei organischen Düngemitteln (Kompost, Schweinekot und Schweinegülle) sowie in Proben-Zeitreihen von 4 Feldern (F04, F31, F32 und F39), HOAL-Laubwald (OF)- und Nadelwald (NF) analysiert. Feld F04 wurde im Beobachtungszeitraum und auch in den vorangegangenen Jahren nicht mit Gülle gedüngt. Feld F32 wurde im Beobachtungszeitraum nicht mit Gülle gedüngt, war aber in den vorangegangenen Jahren mit Schweinegülle gedüngt worden. Die Felder F31 und F39 wurden im Verlauf der Studie frisch mit Schweinegülle gedüngt und waren auch in den vorangegangenen Jahren mit Schweinegülle gedüngt worden.

Das *16S rRNA* Target war in allen Proben mit Konzentrationen zwischen $1,5E+09$ (F04) und $2,9E+10$ (Kompost) K/g TB zu finden (Abbildung 5). Im Vergleich zu den Bodenproben, zeigten die Kompost- und Gülle-Proben die höchsten *16S* Konzentrationen, was für eine hohe Bakterienkonzentration spricht. Die *16S* Konzentrationen waren in allen Böden ähnlich.

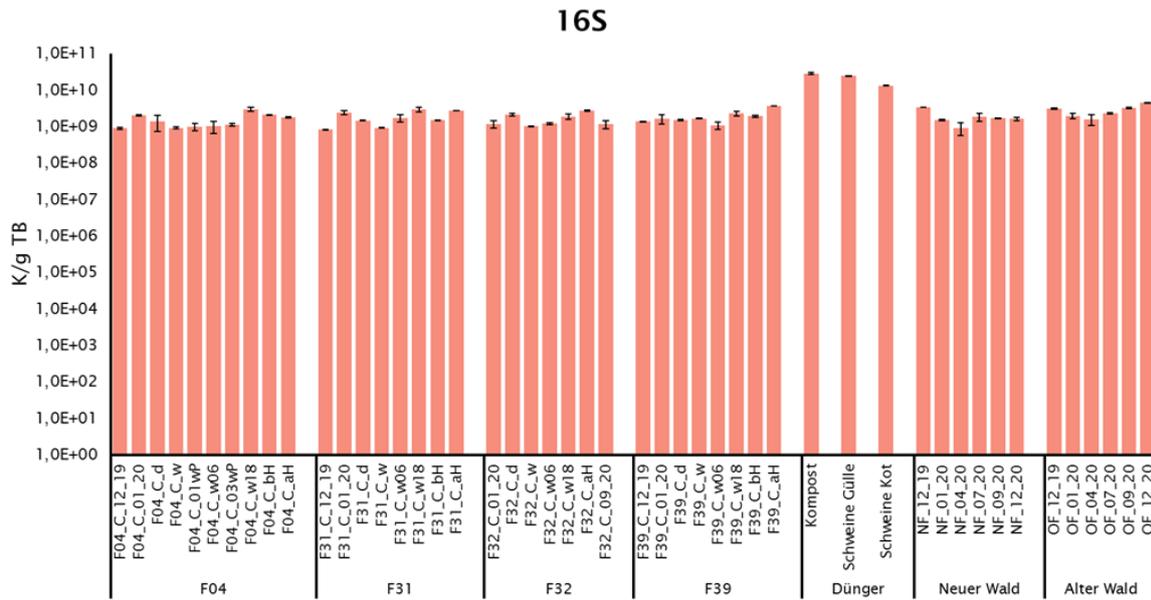


Abbildung 5. 16S rRNA–Gene in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.

Dargestellt werden Kopien pro Gramm Trockenboden als Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate.

Die arithmetischen Mittelwerte der ermittelten Kopienanzahl samt Standardabweichung, Minimum und Maximum können der folgenden Tabelle entnommen werden (Tabelle 11).

Tabelle 11. 16S-rRNA Gen-Kopienanzahl in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.

16S				
	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	1,5E+09	7,0E+08	9,0E+08	3,0E+09
F31	1,8E+09	8,2E+08	8,3E+08	3,0E+09
F32	1,6E+09	6,5E+08	1,0E+09	2,7E+09
F39	1,9E+09	8,2E+08	1,1E+09	3,7E+09
Kompost	2,9E+10	1,9E+09	2,9E+10	2,9E+10
Gülle	2,5E+10	8,3E+08	2,5E+10	2,5E+10
Kot	1,3E+10	4,6E+08	1,3E+10	1,3E+10
Alter Wald	1,8E+09	8,3E+08	9,3E+08	3,4E+09
Neuer Wald	2,8E+09	1,0E+09	1,6E+09	4,5E+09

Die Targets *int11* und *ISPps* wurden für die Quantifizierung der entsprechenden mobilen genetischen Elemente herangezogen. Das MGE-spezifische Integrasegen ***int11*** zeigte in allen vier Feldern (F04, F31, F32, F39) eine ähnliche Konzentration. Im Feld F31 konnte man nach der Gülle-Applikation einen Anstieg auf $5,2E+05 (\pm 6,1E+04)$ K/g TB beobachten, der nach 18 Wochen wieder auf das Baseline-Niveau von $2,9E+04 (\pm 7,4E+02)$ sank. Im langjährig Gülle-freien Feld F04 konnte *int11* zu einem Zeitpunkt nicht nachgewiesen werden. Im Nadelwaldboden NF war die Konzentration durchwegs geringer als in den Feldern und im Laubwald OF wurde das Gen zu mehreren Zeitpunkten nicht detektiert. In der Gülle war die *int11*-Konzentration mit $2,9E+06 (\pm 8,8E+04)$ höher als in den Böden. Auch die Kompost-Probe zeigte eine höhere *int11*-Kopienzahl als der Boden mit $8,6E+05 (\pm 4,4E+04)$ K/g TB. In der Kot-Probe war die Konzentration ähnlich wie in den Bodenproben $1,4E+04 (\pm 3,7E+02)$ (Tabelle 12 und Abbildung 6A).

Das zweite untersuchte MGE, ***ISPps***, zeigte in allen Böden eine ähnliche Konzentration (F04: $7,2E+03 (\pm 3,22E+03)$; F31: $1,1E+04 (\pm 5,8E+03)$; F32: $1,4E+04 (\pm 1,1E+04)$; F39: $4,0E+03 (\pm 1,6E+03)$; siehe Abbildung 6B), die über die Probenziehungsperiode konstant blieb. Auch in den organischen Düngematerialien lag eine ähnliche Konzentration wie in den Böden vor.

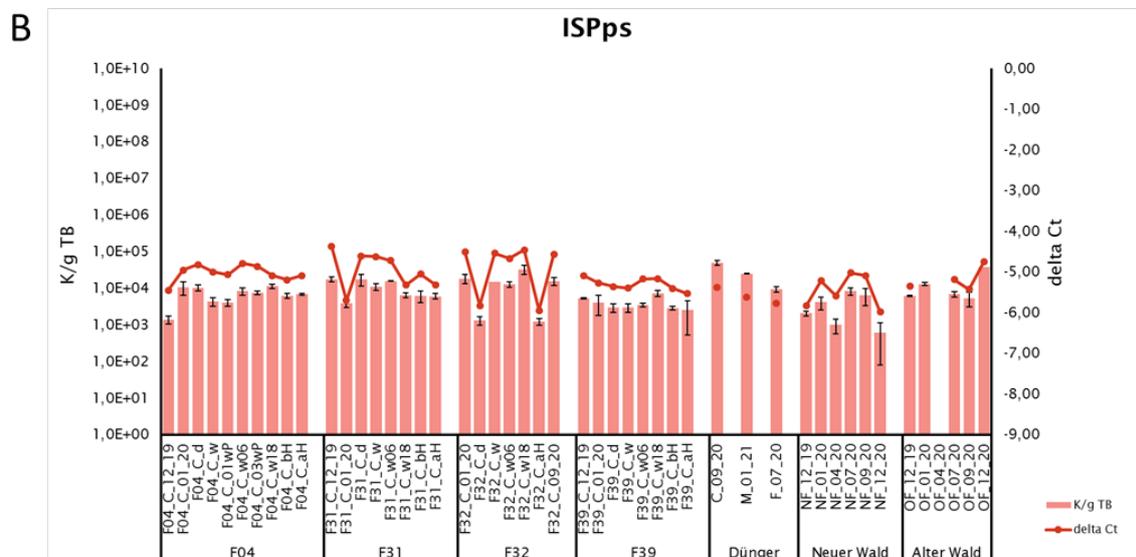
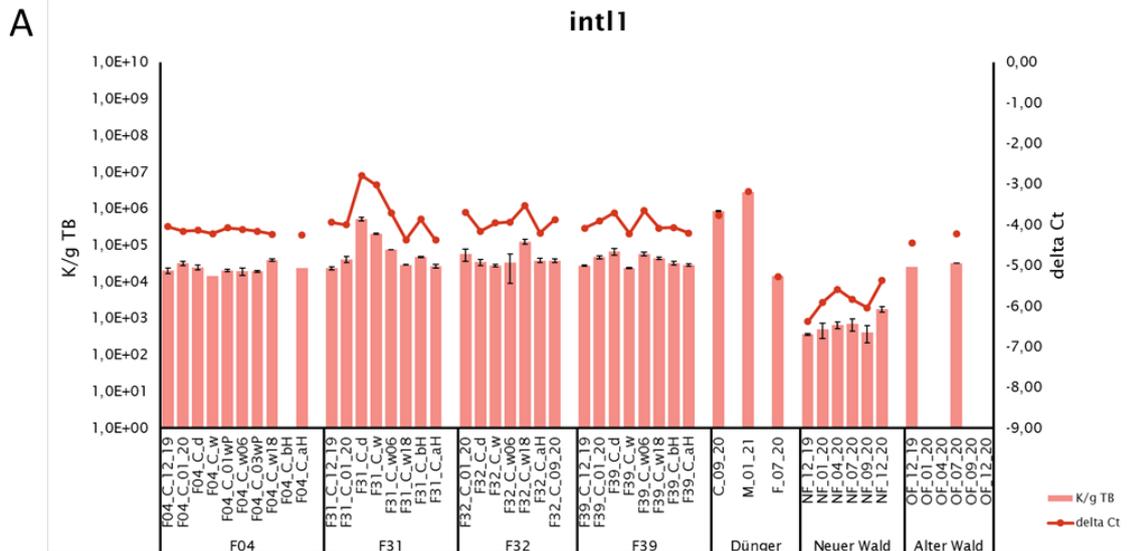


Abbildung 6. *Int11* und *ISPps* in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Tabelle 12. *IntI1* und *ISPPs* in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.

	IntI1				ISPPs			
	Mittelwert	SD	Min	Max	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	2,4E+04	7,7E+03	1,4E+04	4,0E+04	7,2E+03	3,2E+03	1,4E+03	1,1E+04
F31	1,2E+05	1,7E+05	2,4E+04	5,2E+05	1,1E+04	5,8E+03	3,9E+03	1,8E+04
F32	5,1E+04	3,5E+04	2,8E+04	1,3E+05	1,4E+04	1,1E+04	1,2E+03	3,3E+04
F39	4,1E+04	1,6E+04	2,4E+04	6,8E+04	4,0E+03	1,6E+03	2,6E+03	7,4E+03
Kompost	8,6E+05	4,4E+04	8,6E+05	8,6E+05	5,0E+04	7,3E+03	5,0E+04	5,0E+04
Gülle	2,9E+06	8,8E+04	2,9E+06	2,9E+06	2,5E+04	3,9E+02	2,5E+04	2,5E+04
Kot	1,4E+04	3,7E+02	1,4E+04	1,4E+04	9,5E+03	1,5E+03	9,5E+03	9,5E+03
Alter Wald	7,4E+02	5,3E+02	3,7E+02	1,8E+03	3,8E+03	3,2E+03	6,1E+02	8,5E+03
Neuer Wald	2,9E+04	5,2E+03	2,5E+04	3,3E+04	1,4E+04	1,4E+04	5,4E+03	3,8E+04

Quartäre Ammoniumsalze werden durch das ***qacEdelta1*** Gen inaktiviert, was die Empfindlichkeit der Trägerbakterien gegen Biozide reduziert. Im langjährig nicht Gülle-gedüngten Feld F04 war die Abundanz von ***qacEdelta1*** nahe am Detektionslimit und an zwei Zeitpunkten unter dem Detektionslimit. In den langjährig Gülle-gedüngten Feldern F31, F32, F39 war die Konzentration im Jahresmittel fast 100-fach höher als in F04 (Abbildung 7). Bei F31 und F39 war ein Anstieg nach der Güllendüngung sichtbar. Im Feld F32 zeigte sich ein Anstieg in der Probe F32_C_w18. Eine Erklärung für diesen Anstieg könnte die Ernte von Winterweizen 2 Wochen vor der Probenziehung sein.

In den Waldböden wurde dieses Target nicht detektiert. In der Gülle war die ***qacEdelta1***-Konzentration mit $3,1E+07 (\pm 2,5E+05)$ K/g TB höher als in den Böden (Tabelle 13). Auch die Kompost-Probe zeigte mit $1,75E+06 (\pm 1,9E+05)$ K/g TB eine höhere ***qacEdelta1***-Kopienzahl als der Boden. In der Kot-Probe war die Konzentration ähnlich wie die Höchstwerte unter den Bodenproben $3,6E+05 (\pm 1,2E+04)$ K/g TB.

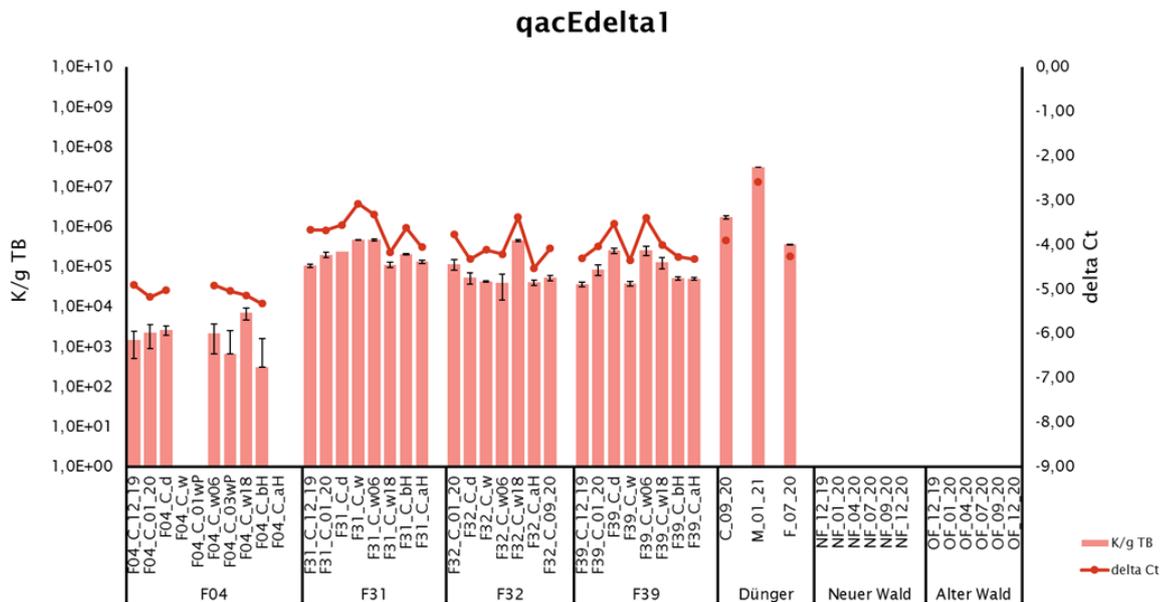


Abbildung 7. *QacDelta1* in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Tabelle 13. *QacDelta1* in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.

qacDelta1				
	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	2,4E+03	2,2E+03	3,1E+02	7,0E+03
F31	2,4E+05	1,5E+05	1,1E+05	4,7E+05
F32	1,2E+05	1,5E+05	4,0E+04	4,6E+05
F39	1,1E+05	9,5E+04	3,7E+04	2,6E+05
Kompost	1,8E+06	1,9E+05	1,8E+06	1,8E+06
Gülle	3,1E+07	2,5E+05	3,1E+07	3,1E+07
Kot	3,6E+05	1,2E+04	3,6E+05	3,6E+05
Alter Wald	-	-	-	-
Neuer Wald	-	-	-	-

Aus der Klasse der Aminoglykosid-Resistenzgene wurden das Aminoglykosid-Nukleotidyltransferasegen *aadA* (*ant(3'')-Ia*), die Aminoglykosid-Phosphotransferasen *nptII* (*aph(3')-IIa*), *nptIII* (*aph(3')-IIIa*) und *strB* (*aph(6)-Id*) untersucht (Abbildung 8). ***NptII*** wurde nur in wenigen Bodenproben mit Konzentrationen um $1,0E+03$ detektiert. Auch in der Literatur wird *nptII* als seltenes ARG im Boden beschrieben (63). ***AadA***, ***nptIII*** und ***strB*** wurden in (fast) allen Ackerbodenproben detektiert und zeigten ein ähnliches Verteilungsmuster. Im Jahresmittel waren *aadA*, *nptIII* und *strB* in den langjährig Gülle-gedüngten Feldern F31, F32 und F39 10 bis 100-mal höher konzentriert als im langjährig Gülle-freien Feld F04 (Tabelle 14). In den Waldböden wurden sie jeweils nur zu wenigen Zeitpunkten detektiert. *aadA* und *strB* waren in Gülle, Kot und Kompost abundanter als in den Bodenproben. *nptIII* war in Gülle und Kot abundanter als in den Bodenproben.

Bei *aadA* und *strB* war im Feld F31 einen Tag nach der Güllendüngung (F31_C_d) ein Anstieg zu sehen. Dieser Effekt war in geringerem Ausmaß auch bei F39 zu erkennen. Das langjährig Gülle-gedüngte Feld F32, das im Beobachtungsjahr keine Gülle erhielt, hatte vergleichbare Konzentrationen mit den Baseline-Werten von F31 und F39. In der Probe F32_C_w18, also 18 Wochen nach anorganischer Düngung von F32, gab es einen Peak. Dieses Phänomen wurde auch bei mehreren anderen Targets festgestellt. Eine mögliche Ursache dafür könnte die zwei Wochen vor Probenentnahme stattgefundenen Winterweizen-Ernte gewesen sein.

Bei *nptIII* konnte nach der Düngung von F31 nur ein 5-facher Anstieg nachverfolgt werden. Bei den Feldern F32 und F39 war die Targetkonzentration zeitlich konstant. Beim nicht mit Gülle gedüngten Feld F04 zeigte sich ein deutlicher Peak eine Woche nach Pestizid-Applikation mit einer 100-fach höheren *nptIII*-Konzentration im Vergleich zu dem vorherigen Datenpunkt.

Tabelle 14. *AadA*, *nptII*, *nptIII* und *strB* in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.

	aadA				nptII			
	Mittelwert	SD	Min	Max	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	2,9E+03	1,5E+03	6,6E+02	4,8E+03	-	-	-	-
F31	1,0E+05	8,8E+04	3,1E+04	2,9E+05	2,1E+03	-	2,1E+03	2,1E+03
F32	7,9E+04	9,0E+04	3,2E+04	2,8E+05	-	-	-	-
F39	1,7E+04	1,0E+04	7,2E+03	3,5E+04	2,1E+03	-	2,1E+03	2,1E+03
Kompost	1,6E+07	1,1E+06	1,6E+07	1,6E+07	1,9E+03	6,9E+02	1,9E+03	1,9E+03
Gülle	2,2E+08	1,8E+07	2,2E+08	2,2E+08	-	-	-	-
Kot	2,8E+06	7,6E+04	2,8E+06	2,8E+06	-	-	-	-
Alter Wald	3,2E+02	1,2E+02	1,8E+02	4,2E+02	7,6E+03	6,4E+02	7,6E+03	7,6E+03
Neuer	3,7E+02	1,5E+02	2,1E+02	5,0E+02	1,1E+04	4,7E+03	1,1E+04	1,1E+04

	nptIII				strB			
	Mittelwert	SD	Min	Max	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	8,3E+03	2,3E+04	3,5E+02	6,9E+04	2,6E+03	9,0E+02	1,2E+03	3,5E+03
F31	1,6E+04	1,5E+04	1,0E+03	4,4E+04	1,1E+05	1,0E+05	3,0E+04	3,0E+05
F32	1,1E+04	4,0E+03	4,8E+03	1,7E+04	5,7E+04	9,2E+04	1,7E+04	2,6E+05
F39	1,3E+04	3,6E+03	8,1E+03	1,8E+04	3,3E+04	1,9E+04	1,5E+04	6,7E+04
Kompost	9,2E+03	2,8E+03	9,2E+03	9,2E+03	1,3E+07	2,0E+06	1,3E+07	1,3E+07
Gülle	4,4E+07	2,1E+06	4,4E+07	4,4E+07	3,6E+08	3,6E+06	3,6E+08	3,6E+08
Kot	9,6E+06	4,3E+06	9,6E+06	9,6E+06	6,1E+05	1,6E+04	6,1E+05	6,1E+05
Alter Wald	-	-	-	-	4,5E+02	6,3E+01	4,1E+02	5,0E+02
Neuer	7,5E+02	8,2E+01	6,9E+02	8,4E+02	1,0E+03	6,7E+02	4,8E+02	1,8E+03

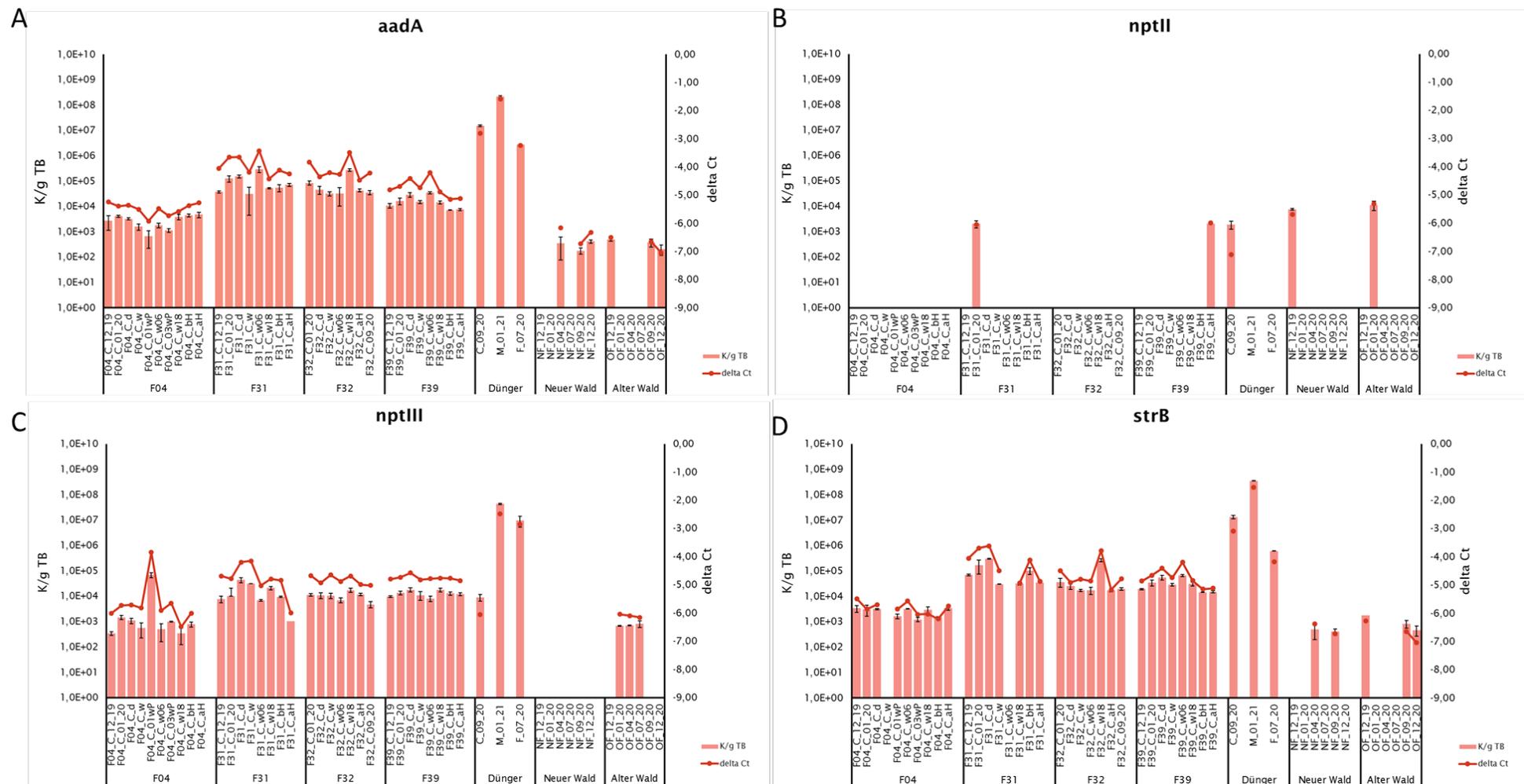


Abbildung 8. *AadA*, *nptII*, *nptIII* und *strB* in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (delta Ct).

Das Diaminopyrimidin-Resistenzgen *dfra-1* wurde in der Gülle-Probe mit der höchsten Abundanz gefunden ($1,5E+08 (\pm 3,4E+06)$ K/g TB), gefolgt von der Kompost-Probe ($2,6E+06 (\pm 6,9E+05)$ K/g TB) und der Kot Probe ($4,8E+04 (\pm 8,9E+03)$ K/g TB) (Tabelle 15). Von den Waldboden-Proben war nur eine einzige positiv für *dfra-1* (Abbildung 9). Auch im langjährig Gülle-freien Feld F04 konnte das Target nur sporadisch mit niedrigen Konzentrationen um $1,0E+03$ K/g TB nachgewiesen werden. In den drei langjährig Gülle-gedüngten Feldern F31, F32 und F39 wurde das Target zu jedem Zeitpunkt detektiert. Im Feld F31 zeigte *dfra-1* vor der Düngung eine mittlere Konzentration von $1,4E+04 (\pm 1,1E+04)$ K/g TB, und eine Woche nach der Düngung eine fast 5-fach höhere Konzentration, welche nach über 18 Wochen auf ca. $6,0E+02 (\pm 2,1E+02)$ K/g TB sank. Im Feld F32, welches 2020 nicht Gülle-gedüngt worden war, wurde kein solcher Anstieg verzeichnet. Bei F39 konnte erst 6 Wochen nach der Gölledüngung ein 6-facher Anstieg beobachtet werden.

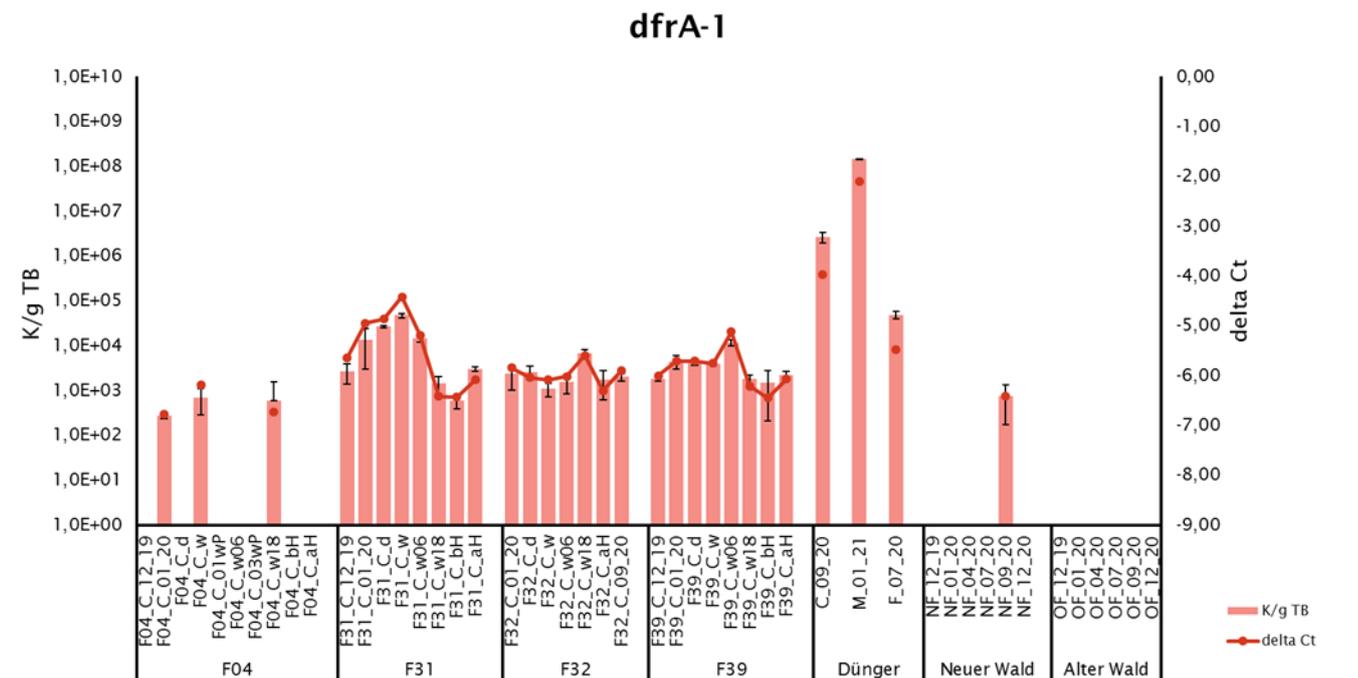


Abbildung 9. *Dfra-1* in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Tabelle 15. *DfrA-1* in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.

dfrA-1				
	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	5,2E+02	2,2E+02	2,8E+02	7,0E+02
F31	1,4E+04	1,6E+04	6,0E+02	4,7E+04
F32	2,6E+03	1,9E+03	1,1E+03	6,6E+03
F39	3,9E+03	3,3E+03	1,5E+03	1,2E+04
Kompost	2,6E+06	6,9E+05	2,6E+06	2,6E+06
Gülle	1,5E+08	3,4E+06	1,5E+08	1,5E+08
Kot	4,8E+04	8,9E+03	4,8E+04	4,8E+04
Alter Wald	7,5E+02	5,7E+02	7,5E+02	7,5E+02
Neuer Wald	-	-	-	-

Das Chloramphenicol-Resistenzgen ***cmxA*** konnte in allen Ackerboden-Proben nachgewiesen werden, in den Waldboden-Proben gab es Ausfälle (Abbildung 10). Das nicht-Gülle gedüngte Feld F04 hatte im Mittel niedrigere *cmxA* Konzentrationen als die Gülle-gedüngten Felder. Auch das Feld F32, welches nur in den Vorjahren Gülle-gedüngt wurde, wies eine fast 10-fach höhere Kopienzahl an *cmxA* auf als F04.

F31 zeigte eine Verzehnfachung der Targetkonzentration einen Tag nach der Güllédüngung im Vergleich zu der Baseline-Probe F31_C_12_19, welche nach über 18 Wochen wieder fast auf „Basis-Niveau“ sank (F31_C_bH). F39 zeigte 6 Wochen nach der Düngung nochmals eine 5-fach höhere *cmxA*-Konzentration an, welche dann langsam innerhalb der nächsten Wochen wieder absank.

Die Gülle-Probe hatte eine vergleichbare Konzentration wie die F31_C_d Probe (1 Tag nach Düngung), mit 1,0E+06 (\pm 4,1E+03) K/g TB. Am zweithäufigsten wurde *cmxA* in der Schweine Kot-Probe detektiert (4,3E+05 (\pm 1,8E+04) K/g TB, gefolgt von der Kompost-Probe mit 2,4E+05 (\pm 5,0E+04) K/g TB (Tabelle 16).

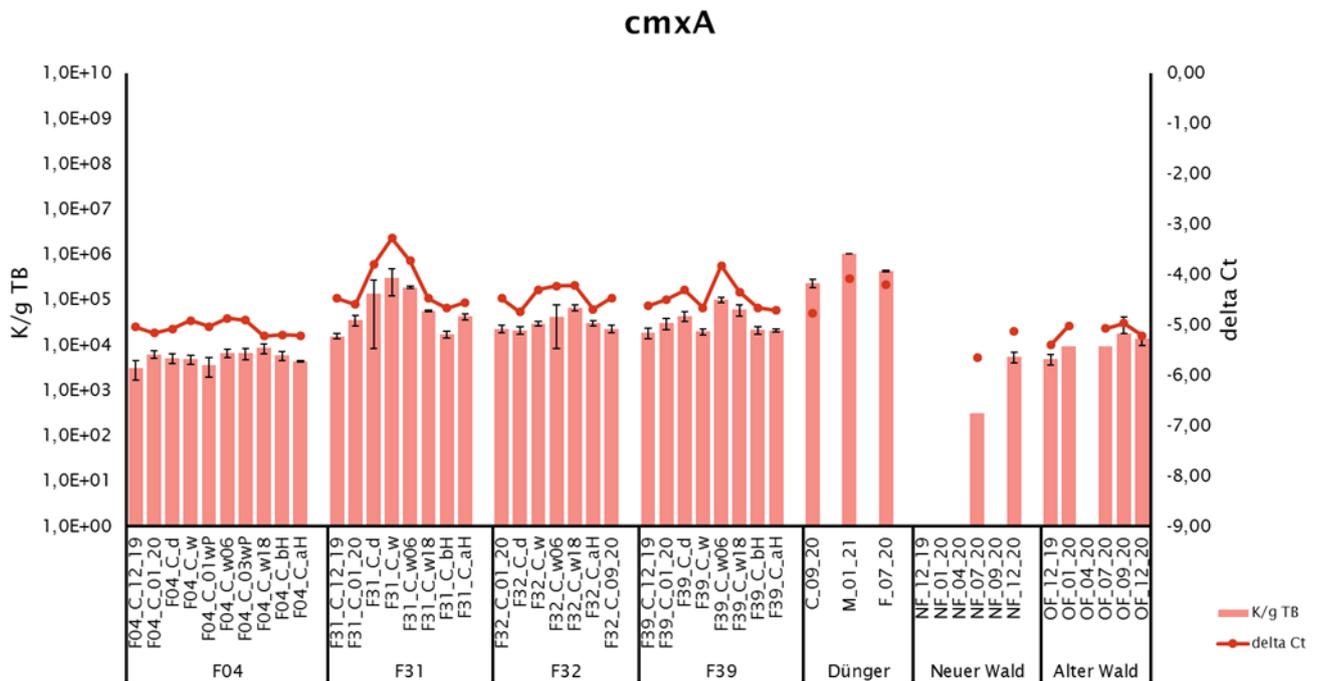


Abbildung 10. *CmxA* in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Tabelle 16. *CmxA* in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.

cmxA				
	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	5,5E+03	1,6E+03	3,1E+03	8,6E+03
F31	9,9E+04	1,0E+05	1,6E+04	3,0E+05
F32	3,4E+04	1,6E+04	2,1E+04	6,7E+04
F39	3,9E+04	2,9E+04	1,9E+04	1,0E+05
Kompost	2,4E+05	5,0E+04	2,4E+05	2,4E+05
Gülle	1,0E+06	4,1E+03	1,0E+06	1,0E+06
Kot	4,3E+05	1,8E+04	4,3E+05	4,3E+05
Alter Wald	2,9E+03	3,6E+03	3,2E+02	5,4E+03
Neuer Wald	1,1E+04	4,9E+03	5,0E+03	1,8E+04

Das Fluorchinolon-Resistenzgen *qnrS* konnte lediglich in der Schweinegülle ($1,71E+04 (\pm 4,7E+03)$ K/g TB) und im Schweinekot ($1,91E+04 (\pm 3,6E+03)$ K/g TB) nachgewiesen werden (Tabelle 17). Das Target konnte in keiner Bodenprobe detektiert werden (Abbildung 11).

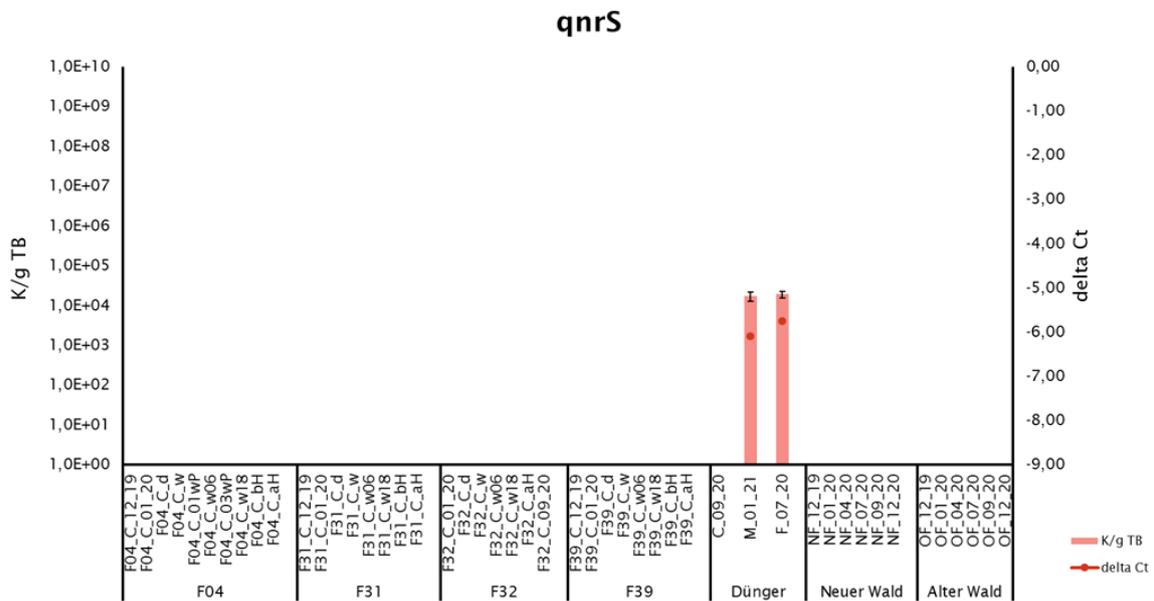


Abbildung 11. *QnrS* in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Tabelle 17. *QnrS* in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.

	<i>qnrS</i>			
	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	-	-	-	-
F31	-	-	-	-
F32	-	-	-	-
F39	-	-	-	-
Kompost	-	-	-	-
Gülle	1,7E+04	4,6E+03	1,7E+04	1,7E+04
Kot	1,9E+04	3,6E+03	1,9E+04	1,9E+04
Alter Wald	-	-	-	-
Neuer Wald	-	-	-	-

Das Vancomycin-Resistenzgen *vanA* wurde in allen Proben bis auf die Schweinekot-Probe nachgewiesen (Abbildung 12). Dieses Target kam in allen Proben mit einer relativ stabilen Konzentration vor, ohne Unterschiede zwischen dem nicht Gülle-gedüngten und den Gülle-gedüngten Feldern (durchschnittlich 2,0E+03 K/g TB in allen Erdproben). Kompost- und Gülle-Proben wiesen mit 1,3E+04 K/g TB eine ähnliche Konzentration an *vanA* auf wie die Bodenproben (Tabelle 18).

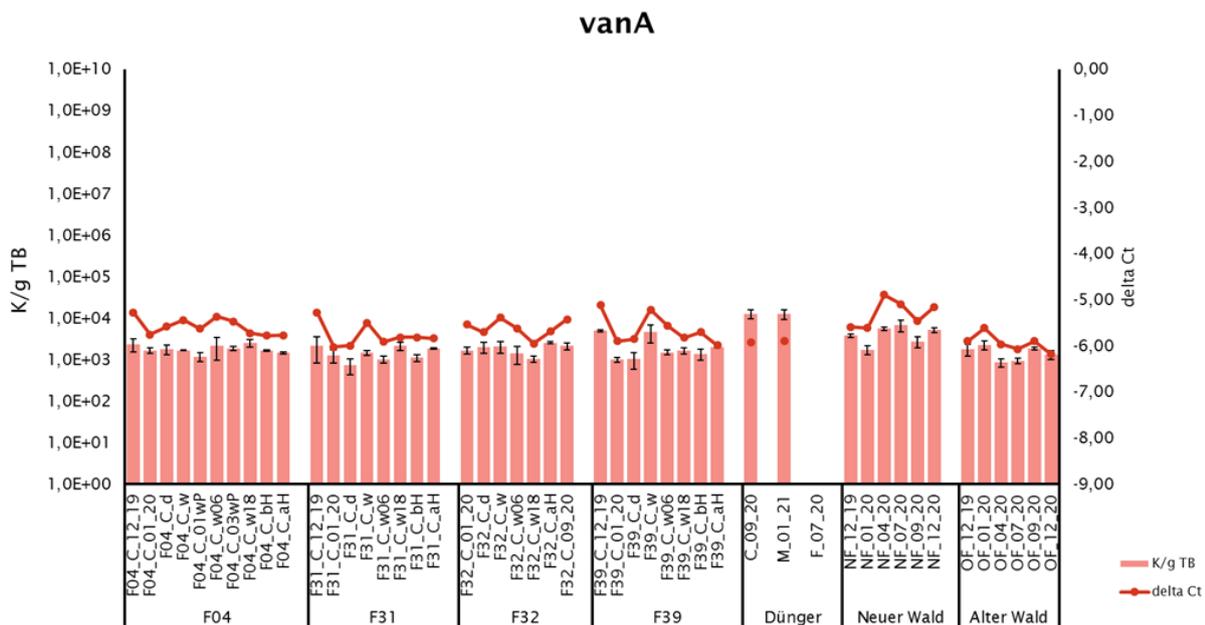


Abbildung 12. *vanA* in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (delta Ct).

Tabelle 18. *vanA* in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.

<i>vanA</i>				
	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	1,9E+03	4,2E+02	1,2E+03	2,6E+03
F31	1,5E+03	5,4E+02	7,4E+02	2,2E+03
F32	1,9E+03	5,1E+02	1,0E+03	2,6E+03
F39	2,3E+03	1,6E+03	1,0E+03	5,0E+03
Kompost	1,3E+04	3,3E+03	1,3E+04	1,3E+04
Gülle	1,3E+04	3,4E+03	1,3E+04	1,3E+04
Kot	-	-	-	-
Alter Wald	4,3E+03	1,9E+03	1,8E+03	6,8E+03
Neuer Wald	1,5E+03	5,7E+02	8,6E+02	2,3E+03

Die qPCR-Testung der Makrolid-Resistenzgene *ermB* und *ermF* zeigte folgende Ergebnisse:

Das Target *ermF* wurde ausschließlich in den 3 organischen Düngern sowie auf Feld F31 und F39 direkt nach Gülle-Applikation detektiert (Abbildung 13). *ErmB* kam in den Ackerböden zu allen Zeitpunkten vor. Im Neuen und im Alten Wald gab es Signal-Ausfälle bei den Herbst- und Winterproben. Die langjährig Gülle-gedüngten Felder F31, F32 und F39 hatten höhere Jahresmittelwerte als das langjährig Gülle-freie Feld F04 (Tabelle 19). Das Baseline-Level von F31 war jedoch vergleichbar mit den Werten von F04 und den beiden Wäldern. In den Feldern F31 und F39 zeigte die Konzentration von *ermB* einen Tag und eine Woche nach der Güllendüngung einen Anstieg. In F31 wurde eine 30-fach höhere *ermB*-Konzentration detektiert als in der 2020 Baseline Probe (F31_C_01_2020). Dieser Gülleffekt sank nach über 18 Wochen wieder auf Baseline-Niveau (siehe F31 und F39 in Abbildung 13).

Tabelle 19. *ErmB* und *ermF* in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.

	ermB				ermF			
	Mittelwert	SD	Min	Max	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	1,2E+03	5,8E+02	6,1E+02	2,2E+03	-	-	-	-
F31	1,9E+04	2,8E+04	1,3E+03	6,6E+04	3,8E+04	7,0E+03	3,3E+04	4,3E+04
F32	5,3E+03	2,4E+03	3,3E+03	1,0E+04	-	-	-	-
F39	9,9E+03	1,3E+04	1,6E+03	4,0E+04	4,0E+03	4,4E+03	8,6E+02	7,1E+03
Kompost	4,6E+04	1,2E+04	4,6E+04	4,6E+04	4,4E+06	5,6E+05	4,4E+06	4,4E+06
Gülle	3,7E+07	1,9E+06	3,7E+07	3,7E+07	1,4E+08	1,8E+06	1,4E+08	1,4E+08
Kot	2,8E+06	1,1E+04	2,8E+06	2,8E+06	4,0E+07	5,4E+05	4,0E+07	4,0E+07
Alter Wald	6,1E+02	2,1E+02	4,3E+02	8,3E+02	-	-	-	-
Neuer Wald	1,2E+03	1,3E+03	2,0E+02	2,7E+03	-	-	-	-

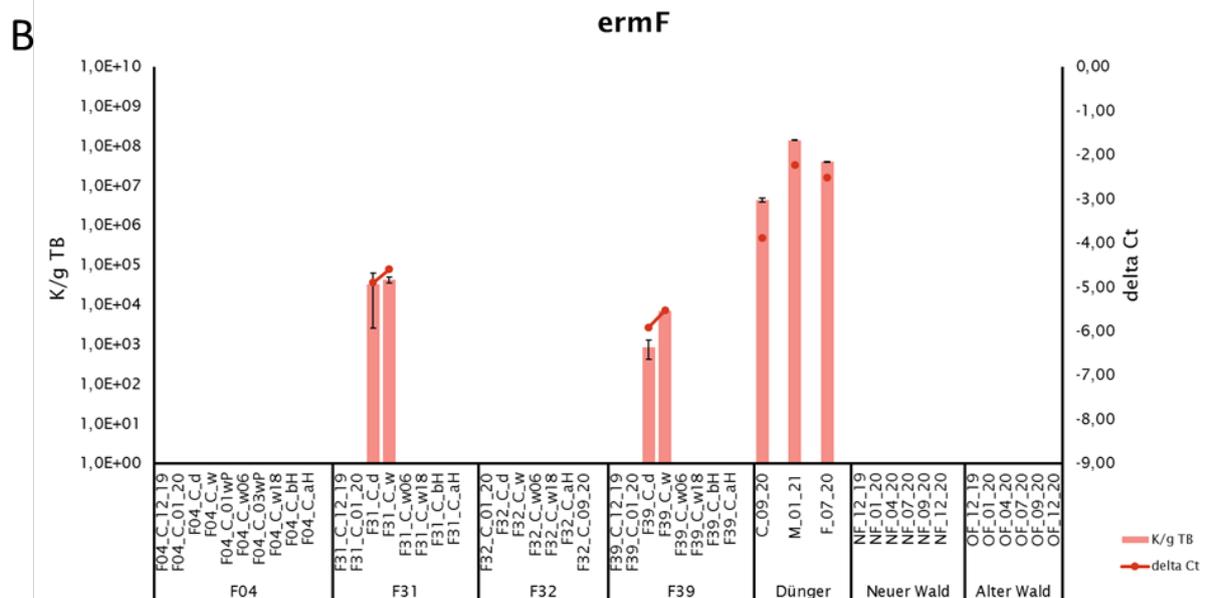
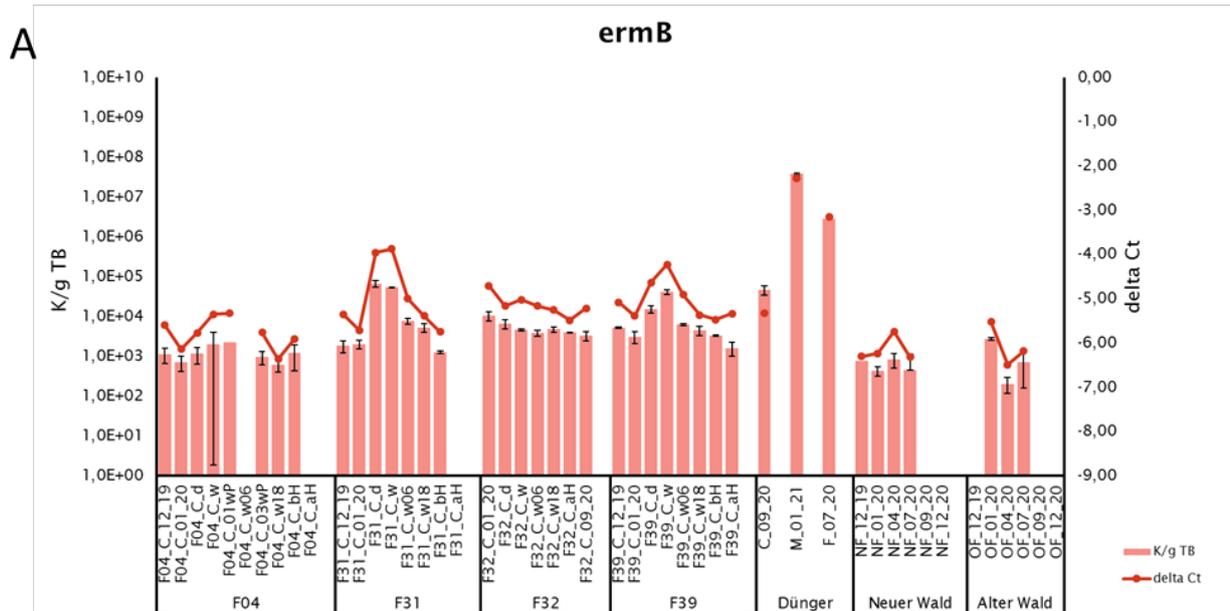


Abbildung 13. *ErmB* und *ermF* in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Sat-4 ist ein Resistenzgen, welches das Nukleosid-Antibiotikum Streptothricin inhibiert. Dieses Target konnte in keiner der Waldproben nachgewiesen werden (Abbildung 14). Im langjährig Gülle-freien Feld F04 gab es einige Signal-Ausfälle. Außerdem lag in den langjährig Gülle-gedüngten Feldern F31, F32 und F39 eine durchschnittlich 36-fach höhere Konzentration vor. In F31 war nach der Düngung ein Peak erkennbar. Das Target konnte auch in allen 3 organischen Düngern nachgewiesen werden, wobei die Schweinegülle die höchste *sat-4* Konzentration zeigte (5,3E+07 (± 1,3E+06) K/g TB) (Tabelle 20).

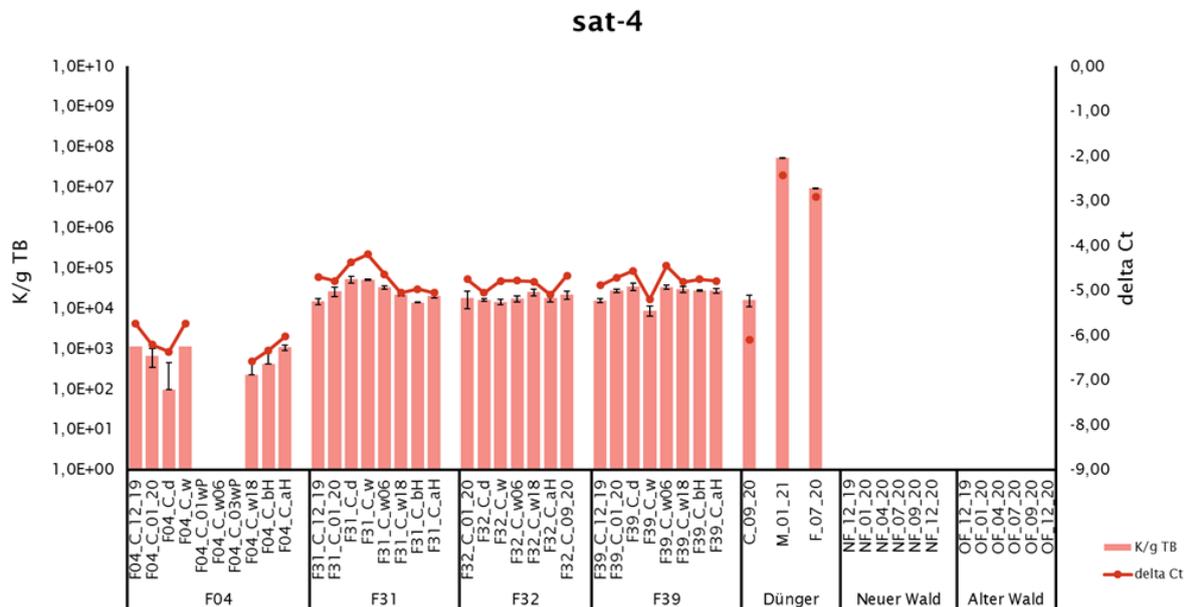


Abbildung 14. *Sat-4* in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Tabelle 20. *Sat-4* in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.

sat-4				
	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	6,8E+02	4,5E+02	9,9E+01	1,2E+03
F31	3,0E+04	1,5E+04	1,4E+04	5,3E+04
F32	1,9E+04	3,6E+03	1,5E+04	2,5E+04
F39	2,6E+04	9,0E+03	8,9E+03	3,5E+04
Kompost	1,6E+04	5,3E+03	1,6E+04	1,6E+04
Gülle	5,3E+07	1,3E+06	5,3E+07	5,3E+07
Kot	9,5E+06	2,6E+05	9,5E+06	9,5E+06
Alter Wald	-	-	-	-
Neuer Wald	-	-	-	-

Das Colistin-Resistenzgen *mcr-1* konnte lediglich in der Baseline-Probe des Gülle-gedüngten Felds F39 und in der Kompost-Probe in geringer Konzentration nachgewiesen werden (Tabelle 21 und Abbildung 15).

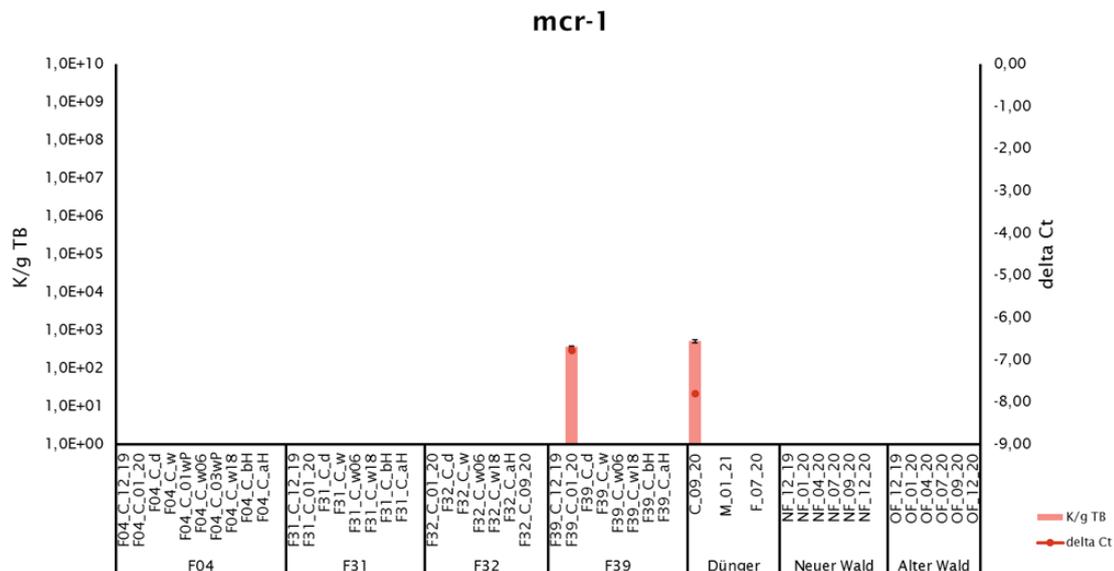


Abbildung 15. *Mcr-1* in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Tabelle 21. *Mcr-1* in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.

mcr-1				
	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	-	-	-	-
F31	-	-	-	-
F32	-	-	-	-
F39	3,6E+02	-	3,6E+02	3,6E+02
Kompost	5,1E+02	5,6E+01	5,1E+02	5,1E+02
Gülle	-	-	-	-
Kot	-	-	-	-
Alter Wald	-	-	-	-
Neuer Wald	-	-	-	-

Aus der Klasse der Sulfonamid-Resistenzgene wurde das Target ***sul1*** untersucht. Das Target konnte in allen Proben (mit Ausnahme von NF_09_20) detektiert werden (Abbildung 16). Die Waldproben und das nicht-Gülle gedüngte Feld F04 hatten eine *sul1*-Konzentration von rund 1,0E3 K/g TB. Bei den Gülle-gedüngten Feldern F31 und F39 war die *sul1*-Konzentration im Durchschnitt um das 39-fach höher als in F04. Bei F31 war ein Peak einen Tag und eine Woche nach der Güllédüngung zu sehen. Die *sul1* Konzentrationen fielen nach 18 Wochen wieder auf Baseline-Niveau. Das Langzeit Gülle-gedüngte Feld F32, das 2020 keine Gülle erhielt, zeigte ähnliche *sul1*-Hintergrundkonzentrationen wie F31 und F39. Auch bei diesem Target zeigte sich auf Feld F32 18 Wochen nach der anorganischen Düngung ein Peak (vgl. mit *int11*, *qacEdelta1*, *adaA*, *dfrA1*), der mit der Winterweizen-Ernte 2 Wochen vor Probenentnahme in Verbindung stehen könnte (Tabelle 22 und Abbildung 16).

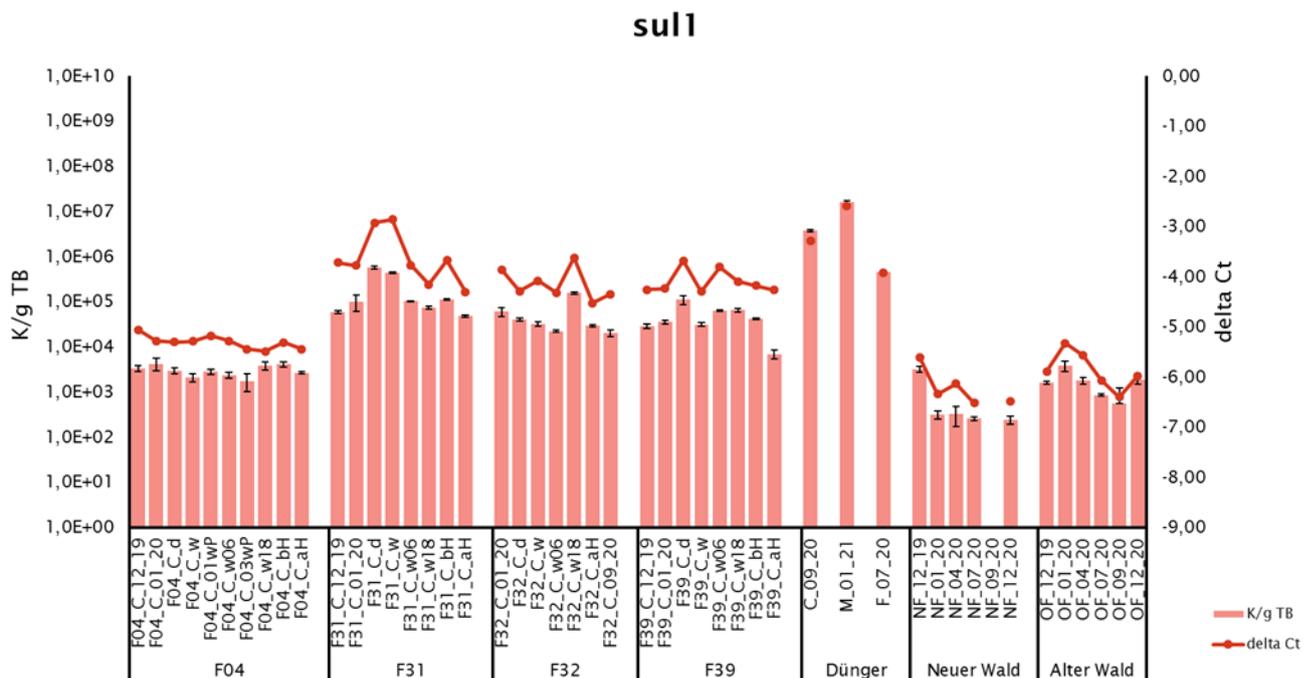


Abbildung 16. *Sul1* in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Tabelle 22. *Sul1* in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.

<i>sul1</i>				
	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	3,0E+03	8,5E+02	1,8E+03	4,2E+03
F31	1,9E+05	2,0E+05	4,9E+04	5,7E+05
F32	5,2E+04	4,8E+04	2,0E+04	1,6E+05
F39	4,8E+04	3,2E+04	6,9E+03	1,1E+05
Kompost	3,8E+06	2,6E+05	3,8E+06	3,8E+06
Gülle	1,6E+07	1,0E+06	1,6E+07	1,6E+07
Kot	4,5E+05	2,8E+04	4,5E+05	4,5E+05
Alter Wald	8,7E+02	1,3E+03	2,5E+02	3,2E+03
Neuer Wald	1,8E+03	1,1E+03	5,6E+02	3,8E+03

Die folgenden 4 Tetrazyklin-Resistenzgene wurden quantifiziert: ***tet(A)***, ***tet(M)***, ***tet(O)*** und ***tet(W)***. Die Tetrazyklin-Resistenzgene zeigten Ausfälle in beiden Wäldern, während sie in den vier Feldern zu allen Zeitpunkten detektiert wurden (Abbildung 17). Die positiven Werte in den Wäldern waren vergleichbar mit der Konzentration im Feld F04. Bei *tet(A)* und *tet(W)* war das Baseline-Level in allen Feldern ähnlich. Bei *tet(M)* und *tet(O)* wurde in den langjährig Gülle-gedüngten Feldern F31, F32 und F39 eine 27-fach bis 42-fach höhere Konzentration als im nicht-Gülle gedüngten Feld F04 festgestellt. Bei *tet(M)* und *tet(W)* wurde ein Ansteigen des Targets einen Tag und eine Woche nach der Güllendüngung detektiert, der nach 18 Wochen wieder auf Baseline-Niveau absank (Tabelle 23 und Abbildung 17). Die vier Targets wurden in allen drei organischen Düngern detektiert, mit besonders hohen Konzentrationen in Schweinekot und Gülle.

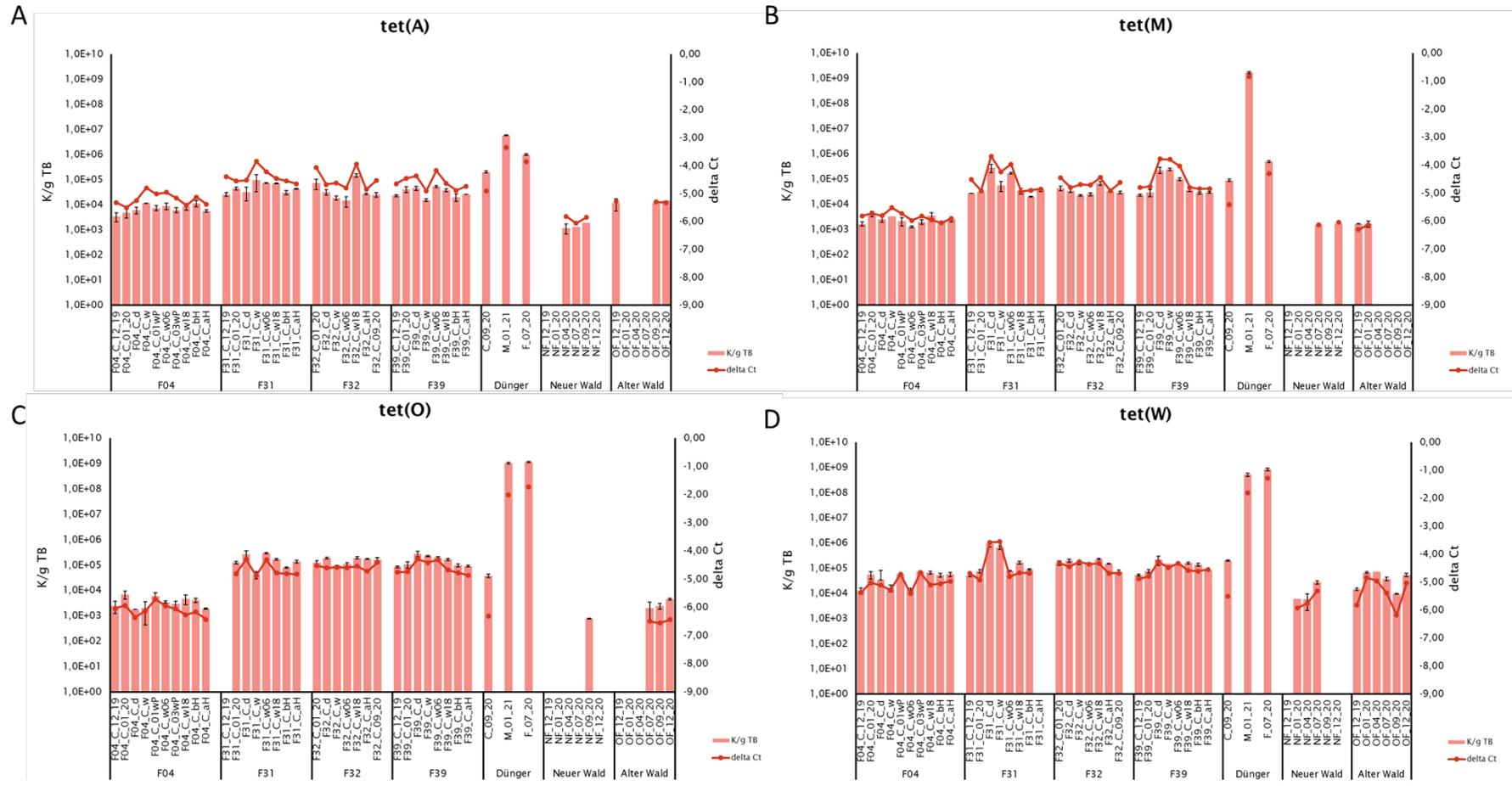


Abbildung 17. *Tet(A)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(W)* in HOAL-Bodenproben u. organischem Dünger.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Tabelle 23. *Tet(A)*, *tet(M)*, *tet(O)* u. *tet(W)* in HOAL-Bodenproben u. organischem Dünger.

	tet(A)				tet(M)			
	Mittelwert	SD	Min	Max	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	7,4E+03	2,7E+03	3,5E+03	1,2E+04	2,5E+03	9,2E+02	1,3E+03	4,2E+03
F31	5,2E+04	2,5E+04	2,6E+04	9,5E+04	8,2E+04	9,3E+04	2,0E+04	2,8E+05
F32	4,8E+04	4,8E+04	1,5E+04	1,5E+05	3,6E+04	1,5E+04	2,3E+04	6,7E+04
F39	3,3E+04	1,4E+04	1,5E+04	5,3E+04	9,0E+04	9,3E+04	2,3E+04	2,4E+05
Kompost	2,0E+05	1,9E+04	2,0E+05	2,0E+05	9,1E+04	1,0E+04	9,1E+04	9,1E+04
Gülle	5,8E+06	2,2E+05	5,8E+06	5,8E+06	1,7E+09	1,7E+08	1,7E+09	1,7E+09
Kot	1,0E+06	6,7E+04	1,0E+06	1,0E+06	4,9E+05	3,9E+04	4,9E+05	4,9E+05
Alter Wald	1,5E+03	3,9E+02	1,2E+03	1,9E+03	1,6E+03	9,9E+01	1,6E+03	1,7E+03
Neuer	1,3E+04	1,9E+03	1,1E+04	1,5E+04	1,7E+03	5,1E+00	1,7E+03	1,7E+03

	tet(O)				tet(W)			
	Mittelwert	SD	Min	Max	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	3,6E+03	1,8E+03	1,8E+03	7,0E+03	4,4E+04	2,3E+04	1,3E+04	7,3E+04
F31	1,6E+05	9,2E+04	4,2E+04	2,9E+05	2,9E+05	3,5E+05	5,2E+04	9,3E+05
F32	1,5E+05	3,9E+04	9,5E+04	1,9E+05	1,6E+05	5,0E+04	7,2E+04	2,3E+05
F39	1,6E+05	7,3E+04	8,4E+04	2,8E+05	1,3E+05	5,3E+04	5,4E+04	2,2E+05
Kompost	3,8E+04	5,5E+03	3,8E+04	3,8E+04	2,0E+05	1,3E+04	2,0E+05	2,0E+05
Gülle	1,0E+09	6,9E+07	1,0E+09	1,0E+09	5,2E+08	7,8E+07	5,2E+08	5,2E+08
Kot	1,1E+09	7,5E+07	1,1E+09	1,1E+09	8,4E+08	9,3E+07	8,4E+08	8,4E+08
Alter Wald	7,7E+02	2,8E+01	7,7E+02	7,7E+02	1,3E+04	1,2E+04	5,7E+03	2,7E+04
Neuer	3,0E+03	1,3E+03	2,0E+03	4,5E+03	4,3E+04	2,7E+04	9,5E+03	7,3E+04

Die Resistenzgene *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{OXA-10}, *bla*_{TEM-1} und *mecA* wurden repräsentativ als β -Lactam-Resistenzdeterminanten ausgewählt. Die Targets *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM-1} konnten in keiner der Acker-, Dünger- oder Waldproben detektiert werden (Abbildung 18). *Bla*_{OXA-10} wurde vereinzelt mit ähnlichen Konzentrationen (1,6E+03 K/g TB) in allen Proben-Gruppen detektiert (Tabelle 24). *Bla*_{TEM-1} wurde häufiger detektiert, wieder mit ähnlichen Kopienzahlen in den Feldern und Wäldern. Kompost, Schweinegülle und Schweinekot hatten die höhere *bla*_{TEM-1} Konzentrationen. *MecA* wurde kaum in den Proben detektiert. Lediglich F32, F39, Kompost- und Schweinegülle wiesen Konzentrationen zwischen 1,0E+03 – 1,0E+04 K/g TB auf. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die drei Targets nicht von den Gülle-Applikationen beeinflusst wurden.

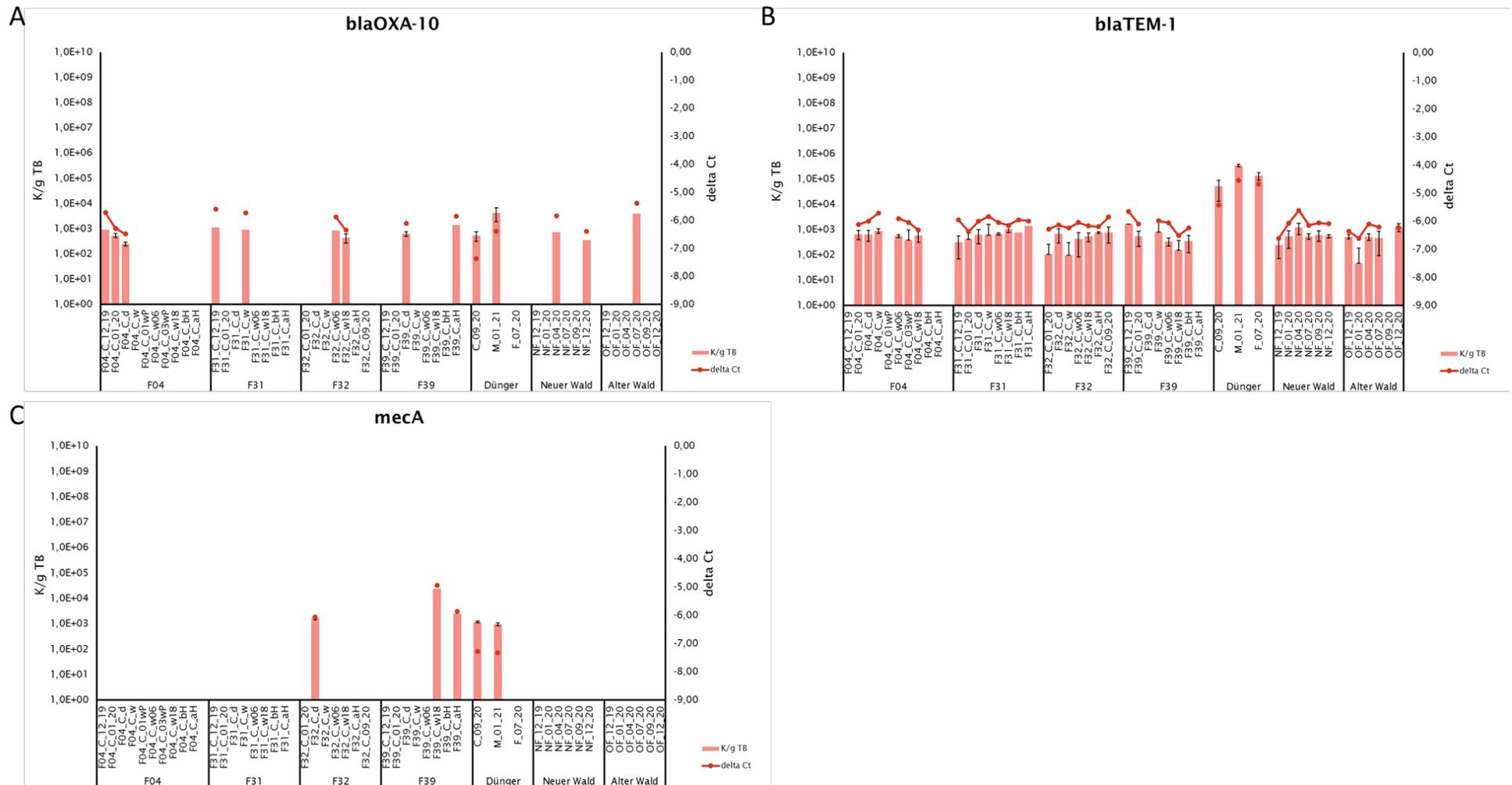


Abbildung 18. *blaOXA-10*, *blaTEM-1* und *mecA* in HOAL-Bodenproben u. org. Dünger.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Tabelle 24. *Bla_{OXA-10}*, *bla_{TEM-1}*, *mecA* in HOAL-Bodenproben u. organischem Dünger.

	blaOXA-10				blaTEM-1			
	Mittelwert	SD	Min	Max	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	5,7E+02	3,4E+02	2,5E+02	9,2E+02	6,2E+02	1,7E+02	3,8E+02	9,0E+02
F31	1,0E+03	1,4E+02	9,1E+02	1,1E+03	7,4E+02	3,5E+02	3,2E+02	1,4E+03
F32	6,4E+02	2,7E+02	4,5E+02	8,4E+02	4,9E+02	2,9E+02	9,5E+01	7,8E+02
F39	1,0E+03	5,5E+02	6,2E+02	1,4E+03	6,4E+02	5,4E+02	1,5E+02	1,7E+03
Kompost	5,4E+02	2,2E+02	5,4E+02	5,4E+02	5,2E+04	3,8E+04	5,2E+04	5,2E+04
Gülle	4,3E+03	2,4E+03	4,3E+03	4,3E+03	3,4E+05	3,9E+04	3,4E+05	3,4E+05
Kot	-	-	-	-	1,3E+05	4,5E+04	1,3E+05	1,3E+05
Alter Wald	5,3E+02	2,6E+02	3,4E+02	7,1E+02	6,2E+02	3,2E+02	2,4E+02	1,2E+03
Neuer	3,9E+03	4,8E+01	3,9E+03	3,9E+03	5,7E+02	4,5E+02	4,7E+01	1,3E+03

	mecA			
	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	-	-	-	-
F31	-	-	-	-
F32	1,7E+03	-	1,7E+03	1,7E+03
F39	1,3E+04	1,5E+04	2,5E+03	2,4E+04
Kompost	1,2E+03	8,1E+01	1,2E+03	1,2E+03
Gülle	9,6E+02	1,1E+02	9,6E+02	9,6E+02
Kot	-	-	-	-
Alter Wald	-	-	-	-
Neuer	-	-	-	-

5.1.2 ARG-Vergleich: HOAL-Ackerböden mit pristinen und urbanen Gebieten

Die **HOAL-Felder** wurden mit Sommer-Proben von naturnahen Standorten in den **Donau-Auen** und von **urbanen Parks** in Wien verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass einige Targets besonders mit den Gülle-gedüngten landwirtschaftlichen Böden assoziiert sind: ***qacEdelta1***, ***aadA***, ***strB***, ***sat-4***, ***sul1***, ***tet(A)***, ***tet(M)***, ***tet(O)*** und ***bla_{OXa-10}***. Die mobilen genetischen Elemente ***ISPPs*** und ***Int11*** und die ARGs ***bla_{TEM-1}***, ***cmxA***, ***tet(W)*** und ***vanA*** hatten auf Ackerböden, pristinen Böden und urbanen Böden eine ähnliche Verbreitung.

In diesem Kapitel werden die HOAL-Ackerböden pristinen und urbanen Vergleichsböden gegenübergestellt. Die pristinen Proben stammten aus dem Nationalpark Donau-Auen. Hier wurden Standorte in zunehmender Entfernung vom Donauufer beprobt: von DA01 nahe am Ufer bis DA10 mit der größten Entfernung. DA01-DA05 lagen im Überflutungsgebiet, DA06 - DA10 außerhalb. Die urbanen Proben stammten von Parks und Grünflächen in Wien. Hier wurde von Lainzer Tiergarten (LT) über Prater (PP), Augarten (AG), Volksgarten (VG), Hadikpark (HP) bis zur Breitenfurterstraße (BS, Grünstreifen am Straßenrand) eine immer stärkere anthropogene Umweltbelastung angenommen. Für den Vergleich mit den HOAL-Feldern wurden die Sommerproben dieser pristinen und urbanen Standorte herangezogen. Die Heatmap zeigt gut erkennbar die Konzentrationsunterschiede zwischen Gülle-gedüngten Feldern, Gülle-freiem Feld, pristinen und urbanen Böden (Abbildung 19).

Das **16S rRNA Gen** wurde in allen Proben nachgewiesen in einer Konzentration zwischen $8,3E+08$ und $7,9E+09$ K/g TB (Kopien/Gramm Trockengewicht Boden) (Tabelle 25). Die Abundanz des Gens war bei den drei Standort-Typen „Acker“, „pristin“ und „urban“ ähnlich, wobei die pristinen und urbanen Proben im Durchschnitt eine etwas höhere 16S rRNA Kopienzahl besaßen als die Ackerböden ($5,5E+09$ und $5,4E+09$ im Vergleich zu $1,7E+09$ K/g TB). Aus dieser 16S rRNA-Verteilung kann man schließen, dass die mikrobielle Abundanz in allen Proben ähnlich war (Abbildung 20).

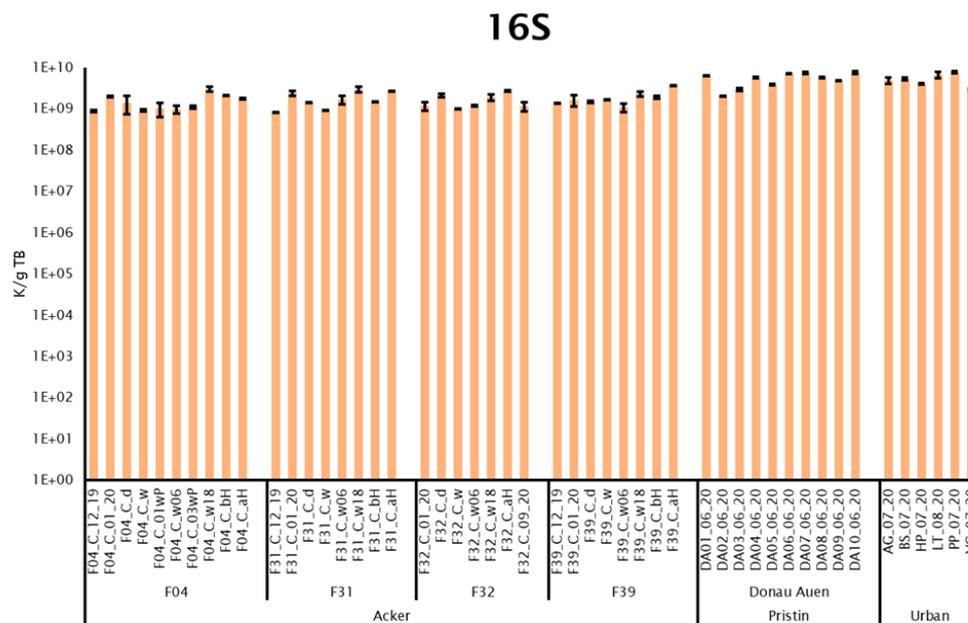


Abbildung 20. 16S rRNA–Gene in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen u. urbanen Böden.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate).

Tabelle 25. 16S rRNA–Genkonzentrationen in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen u. urbanen Böden.

	16S			
	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	1,5E+09	7,0E+08	9,0E+08	3,0E+09
F31	1,8E+09	8,2E+08	8,3E+08	3,0E+09
F32	1,6E+09	6,5E+08	1,0E+09	2,7E+09
F39	1,9E+09	8,2E+08	1,1E+09	3,7E+09
Donau-Auen	5,46E+09	1,94E+09	2,06E+09	7,74E+09
Urban	5,38E+09	1,77E+09	3,07E+09	7,89E+09

Die durchschnittliche Abundanz des MGE *int1* war bei allen drei Standort-Typen ähnlich, mit $5,8E+04$ ($\pm 9,1E+03$) Kopien beim Acker, $2,1E+04$ (SD $\pm 3,2E+03$) Kopien im pristinen Bereich und $3,6E+04$ ($\pm 1,9E+04$) K/g TB im urbanen Bereich (Tabelle 26). Bei den pristinen Proben zeigte sich eine sehr homogene Verteilung von *int1* (Abbildung 21). Auch bei den urbanen Proben war die Verteilung homogen. Nur die Probe vom anthropogen besonders stark beeinflussten Standort „Breitenfurter Straße“ zeigte mit $7,1E+04$ ($\pm 4,2E+03$) K/g TB eine deutlich höhere *int1* Kopienzahl. Bei *int1* wurde im Feld F31 nach der Gülledüngung ein Konzentrationsanstieg festgestellt (Abschnitt 5.1.1).

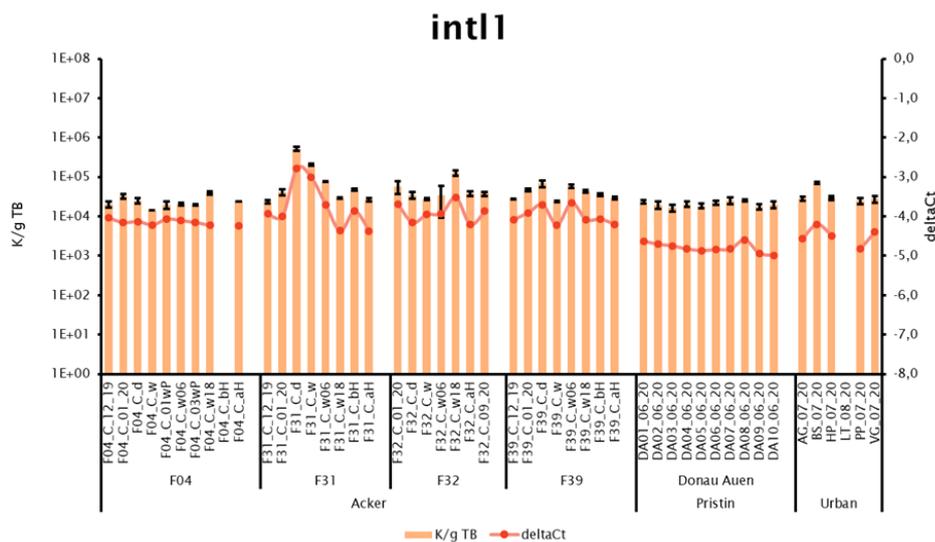


Abbildung 21. *Int1* in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Das MGE *ISPps* zeigte bei allen drei Standorttypen ähnliche Durchschnittswerte mit $8,7E+03$ ($\pm 6,8E+03$) K/g TB in den Ackerböden, $1,2E+04$ ($\pm 6,5E+03$) K/g TB in pristinen Böden und $1,0E+04$ ($\pm 6,7E+03$) K/g TB in den urbanen Böden (Tabelle 26). Bei *ISPps* war kein Gülle-Effekt festzustellen (vgl. Abschnitt 5.1.1). Unabhängig von der Gülledüngung zeigten sich in den Feldern F31 und F32 jedoch starke zeitliche Schwankungen (Abbildung 22). Die pristinen Proben aus den Donau-Auen hatten alle ähnliche Werte ($6,6E+03$ bis $2,8E+04$ K/g TB). Es zeigten sich also keine räumlichen Schwankungen. Zwischen den verschiedenen urbanen Standorten variierten die Ergebnisse deutlich, mit der niedrigsten Konzentration in der anthropogen am meisten belasteten Probe von der Breitenfurter Straße ($9,3E+02 \pm 5,0E+02$ K/g TB) und der höchsten Konzentration in der der Augarten-Probe ($2,0E+04 \pm 1,5E+03$ K/g TB).

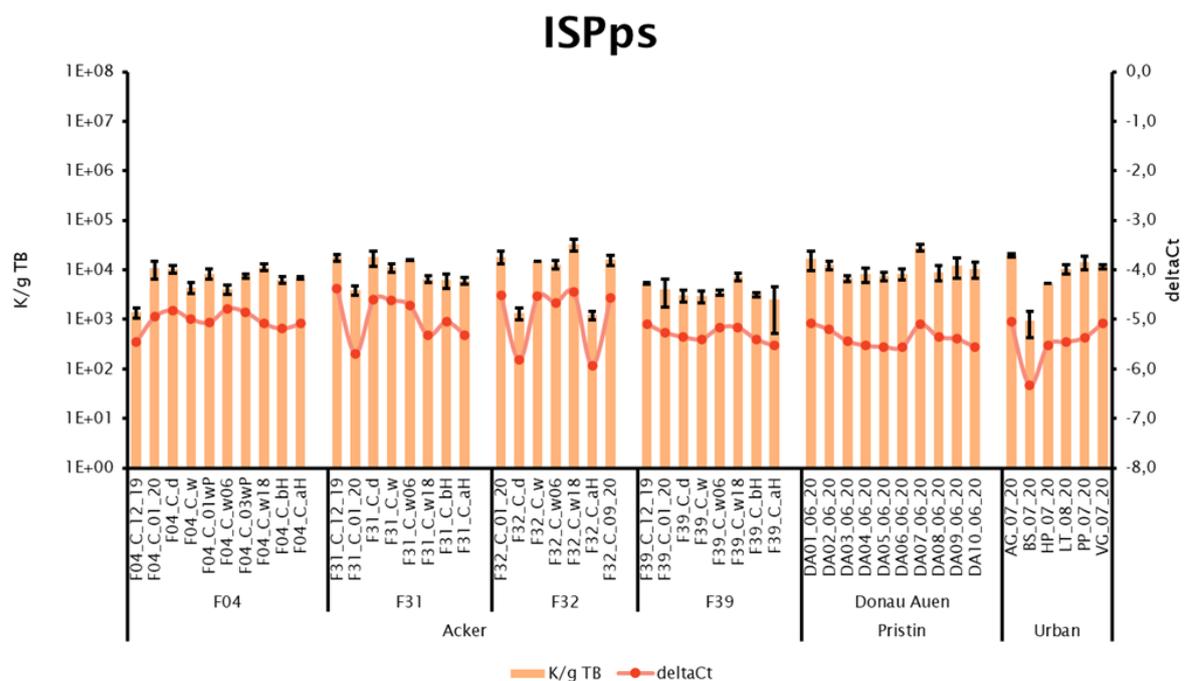


Abbildung 22. *ISPps* in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Tabelle 26. *IntI1* und *ISPps* in HOAL-Äckern, Donau-Auen und urbanen Böden.

	intl				ISPps			
	Mittelwert	SD	Min	Max	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	2,4E+04	7,7E+03	1,4E+04	4,0E+04	7,2E+03	3,2E+03	1,4E+03	1,1E+04
F31	1,2E+05	1,7E+05	2,4E+04	5,2E+05	1,1E+04	5,8E+03	3,9E+03	1,8E+04
F32	5,1E+04	3,5E+04	2,8E+04	1,3E+05	1,4E+04	1,1E+04	1,2E+03	3,3E+04
F39	4,1E+04	1,6E+04	2,4E+04	6,8E+04	4,0E+03	1,6E+03	2,6E+03	7,4E+03
DonauAuen	2,1E+04	3,2E+03	1,7E+04	2,6E+04	1,2E+04	6,5E+03	6,6E+03	2,8E+04
Urban	3,6E+04	1,9E+04	2,5E+04	7,1E+04	1,0E+04	6,7E+03	9,3E+02	2,0E+04

Wie im Abschnitt 5.1.1 bereits dargelegt, zeigte **qacEdelta1** einen klaren Konzentrationsunterschied zwischen dem langjährig Gülle-freien Feld F04 mit $2,4E+03 (\pm 2,2E+03)$ K/g TB und den langjährig Gülle-gedüngten Feldern F31, F32 und F39 ($1,8E+05 (\pm 1,4E+05)$ K/g TB) gezeigt (Tabelle 27). In Abbildung 23 wird ersichtlich, dass dieses Target in nicht-landwirtschaftlich genutzten Flächen viel seltener auftrat als in den Ackerböden. Bei den urbanen Proben hatte nur die anthropogen am stärksten belastete Probe BS_07_20 ein positives Signal ($2,5E+04 (\pm 6,4E+03)$ K/g TB). Allerdings wurde **qacEdelta1** auch in einer Probe aus dem pristinen Gebiet der Donau-Auen nachgewiesen, mit einer ähnlichen Konzentration wie in F04 ($3,5E+03 (\pm 2,5E+03)$ K/g TB).

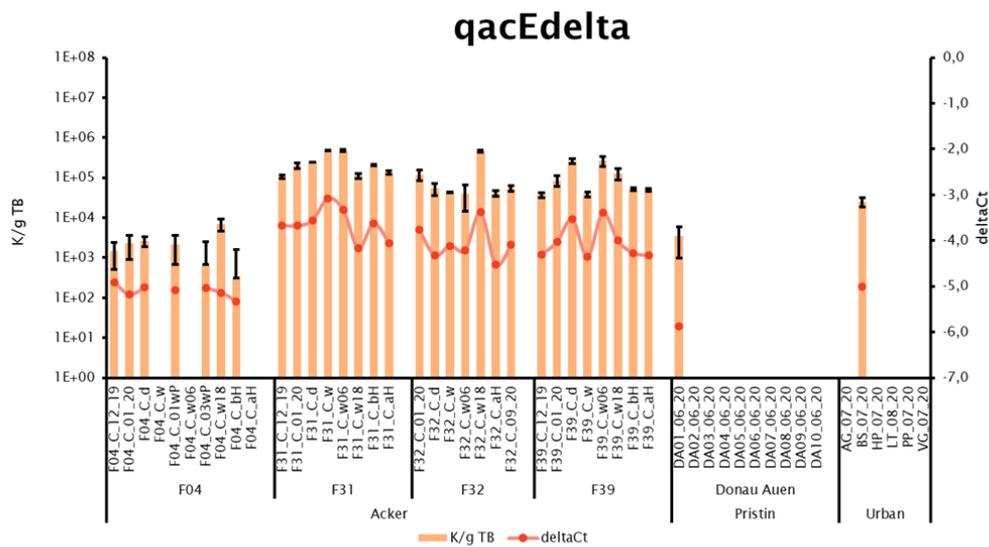


Abbildung 23. *QacEdelta1* in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Tabelle 27. *QacEdelta1* in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.

	qacEdelta1			
	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	2,4E+03	2,2E+03	3,1E+02	7,0E+03
F31	2,4E+05	1,5E+05	1,1E+05	4,7E+05
F32	1,2E+05	1,5E+05	4,0E+04	4,6E+05
F39	1,1E+05	9,5E+04	3,7E+04	2,6E+05
Donau Auen	3,5E+03	-	3,5E+03	3,5E+03
Urban	2,5E+04	-	2,5E+04	2,5E+04

Die Abbildungen 24-26 zeigen die Aminoglykosid-Resistenzgene *nptII* (*aph(3')-IIa*), *nptIII* (*aph(3')-IIIa*) und *strB* (*aph(6)-Id*) in HOAL-Ackerböden, pristinen und urbanen Proben. *AadA* trat mit einer durchschnittlichen Kopienzahl von $6,0E+04$ ($\pm 7,5E+04$) K/g TB in den organisch gedüngten Feldern F31 und F39, mit $7,9E+04$ ($\pm 9,0E+04$) K/g TB im Feld F32 und mit $2,9E+03$ ($\pm 1,5E+03$) K/g TB im anorganisch gedüngten Feld F04 auf. Die Abundanz des Gens an den pristinen ($5,9E+02$ ($\pm 2,0E+02$) K/g TB) und urbanen Standorten ($8,0E+02$ ($\pm 6,5E+02$) K/g TB) war um einiges niedriger als auf den Feldern (Tabelle 28).

NptII wurde in der Literatur bereits als ein Resistenzgen beschrieben, das selten im Boden vorkommt (63). Diese Beobachtung konnte im vorliegenden Projekt bestätigt werden. *NptII* wurde nur zu jeweils einem Zeitpunkt in den organisch gedüngten Feldern F31 und F39 detektiert (Abbildung 24). An den 10 pristinen Probenentnahmestellen wurde *nptII* nicht nachgewiesen und bei den urbanen Standorten waren nur die Proben aus dem Hadikpark und dem Volksgarten positiv ($1,9E+03$ und $1,4E+03$ K/g TB).

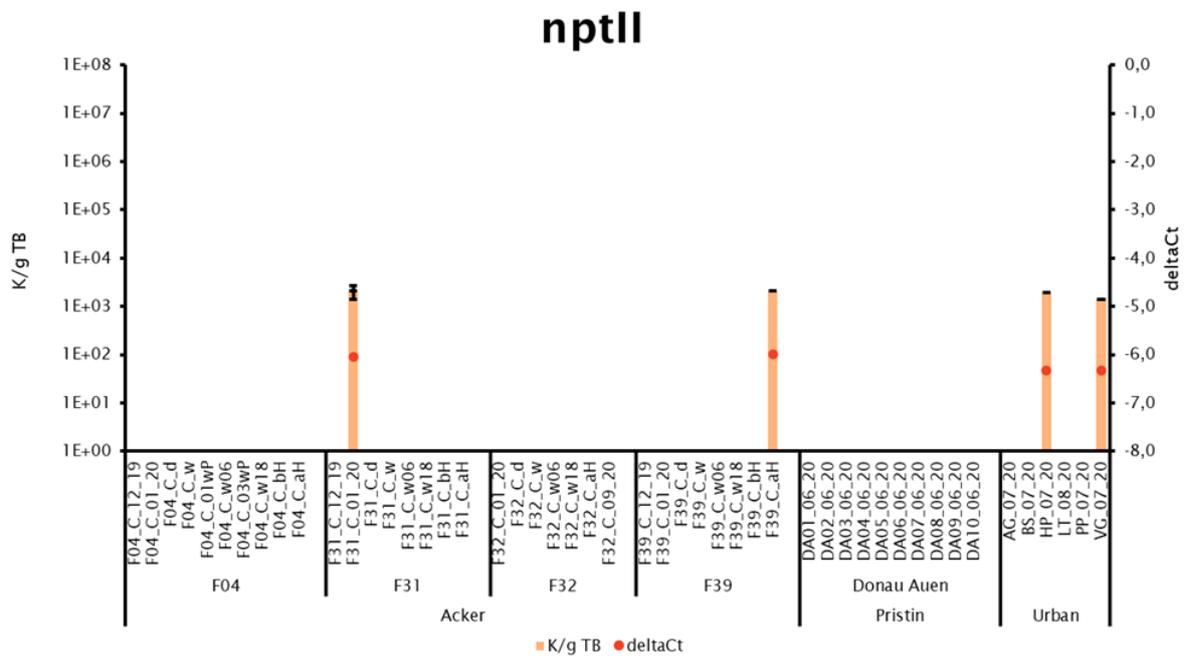


Abbildung 24. *NptII* in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

NptIII wurde in den Äckern zu (fast) allen Probenziehungsterminen nachgewiesen (Abbildung 25). Im Abschnitt 5.1.1 wurde ein Konzentrationsanstieg in Gülle-gedüngten Feldern beschrieben. Im pristinen und urbanen Bereich war dieses Target viel seltener. In den Donau-Auen wies ein einziger Standort ein Signal für *nptIII* auf, mit einer geringen Konzentration ($3,3E+02 \pm 1,3E+01$ K/g TB). Von den urbanen Proben zeigten lediglich Breitenfurter Straße, Hadikpark und Prater ein positives Signal, welches durchschnittlich niedriger war ($6,0E+02 (\pm 6,6E+02)$ K/g TB) als bei den Gülle-gedüngten Feldern.

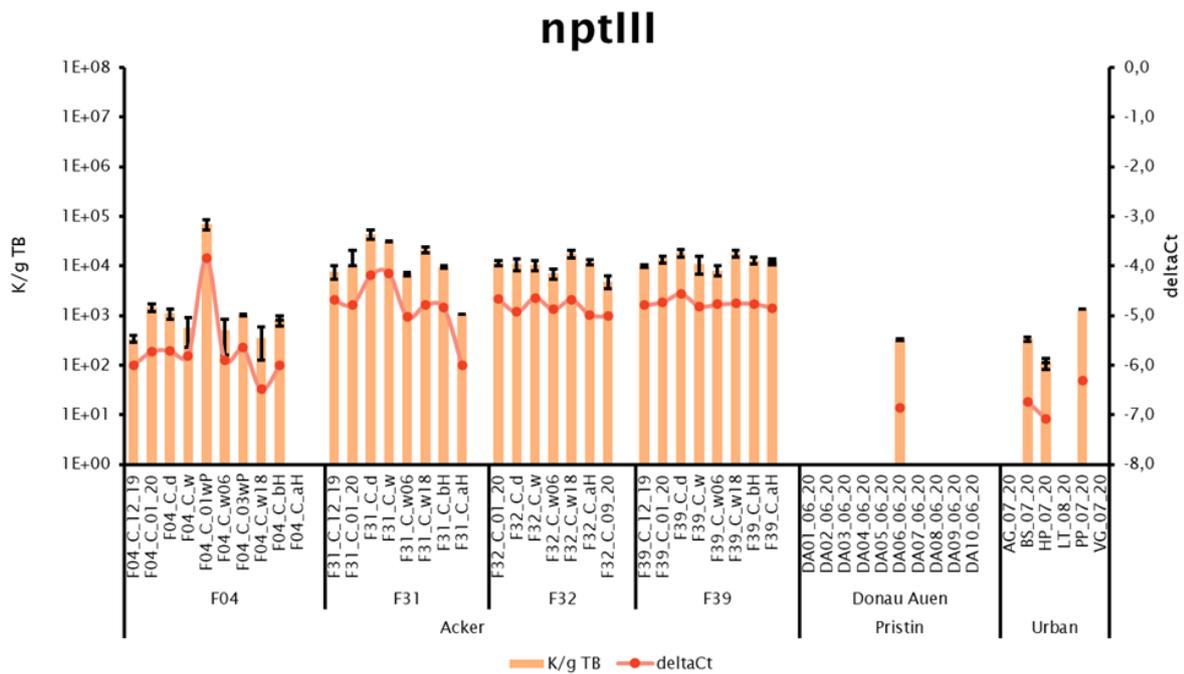


Abbildung 25. *NptIII* in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

StrB zeigte eine ähnliche Verteilung wie *aadA* (Abbildung 26). Das Gen ist mit zwei Ausnahmen in allen Ackerproben vorgekommen, mit einer durchschnittlichen Kopienzahl von $6,8E+04 (\pm 7,7E+04)$ K/g TB bei den durchgehend Gülle-gedüngten Feldern F31 und F39, mit $5,7E+04 (\pm 9,2E+04)$ K/g TB bei Feld F32 und mit $2,6E+03 (\pm 9,0E+02)$ K/g TB beim durchgehend anorganisch-gedüngten Feld F04. Bei den urbanen Proben waren drei von sechs positiv, und der Mittelwert aus diesen Proben war mit $1,1E+03 (\pm 5,6E+02)$ K/g TB ähnlich wie bei F04. Von den zehn pristinen Proben aus den Donau-Auen waren nur vier positiv, mit einem Mittelwert von $9,5E+02 (\pm 6,3E+02)$ K/g TB (Tabelle 28).

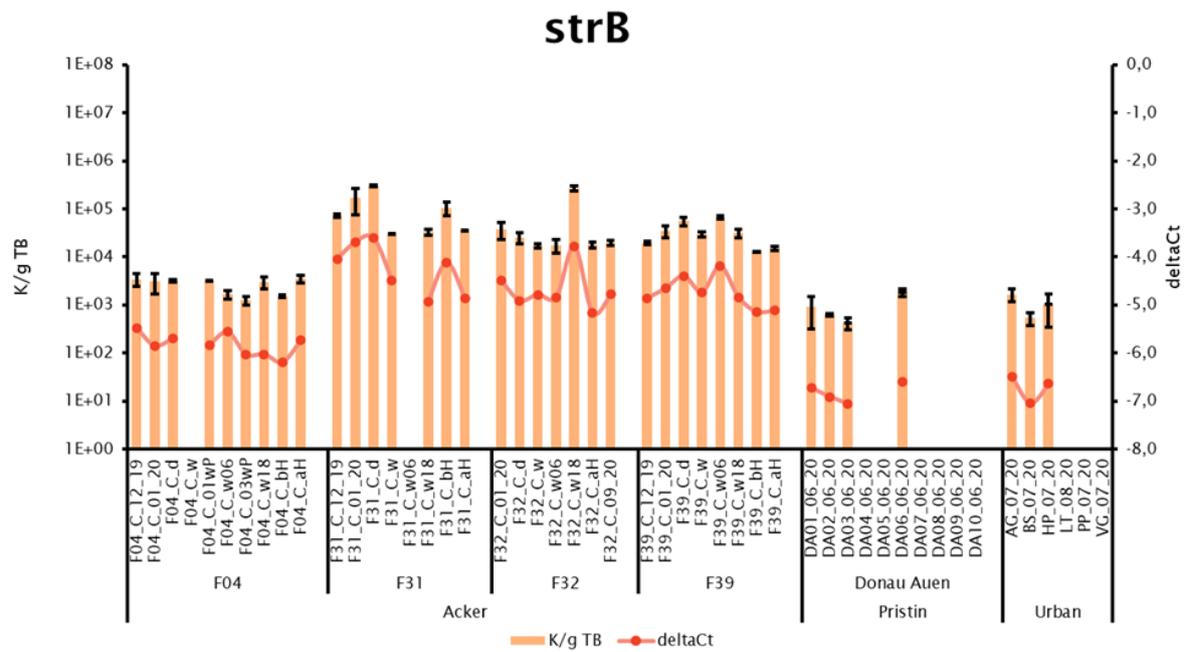


Abbildung 26. *StrB* in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Tabelle 28. *AadA*, *nptII*, *nptIII* und *strB* in HOAL-Feldern, Donau-Auen und urbanen Böden.

	aadA				nptII			
	Mittelwert	SD	Min	Max	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	2,9E+03	1,5E+03	6,6E+02	4,8E+03	-	-	-	-
F31	1,0E+05	8,8E+04	3,1E+04	2,9E+05	2,1E+03	-	2,1E+03	2,1E+03
F32	7,9E+04	9,0E+04	3,2E+04	2,8E+05	-	-	-	-
F39	1,7E+04	1,0E+04	7,2E+03	3,5E+04	2,1E+03	-	2,1E+03	2,1E+03
Donau Auen	5,9E+02	2,0E+02	3,2E+02	9,7E+02	-	-	-	-
Urban	8,0E+02	6,5E+02	3,0E+02	1,9E+03	1,7E+03	3,5E+02	1,4E+03	1,9E+03

	nptIII				strB			
	Mittelwert	SD	Min	Max	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	8,3E+03	2,3E+04	3,5E+02	6,9E+04	2,6E+03	9,0E+02	1,2E+03	3,5E+03
F31	1,6E+04	1,5E+04	1,0E+03	4,4E+04	1,1E+05	1,0E+05	3,0E+04	3,0E+05
F32	1,1E+04	4,0E+03	4,8E+03	1,7E+04	5,7E+04	9,2E+04	1,7E+04	2,6E+05
F39	1,3E+04	3,6E+03	8,1E+03	1,8E+04	3,3E+04	1,9E+04	1,5E+04	6,7E+04
Donau Auen	3,3E+02	-	3,3E+02	3,3E+02	9,5E+02	6,3E+02	4,2E+02	1,8E+03
Urban	6,0E+02	6,6E+02	1,1E+02	1,3E+03	1,1E+03	5,6E+02	5,3E+02	1,6E+03

Für die Klasse der Diaminopyrimidine wurde das Resistenzgen *dfrA-1* untersucht. Auch dieses Target ist in den langfristig Gülle-gedüngten Ackerfeldern F31, F32 und F39 zu (fast) allen Zeitpunkten nachweisbar, während es im Gülle-freien Feld F04 nur sporadisch Signale über dem Detektionslimit lieferte (Abbildung 27). Im Feld F31 wurde eine Erhöhung der Abundanz unmittelbar nach der Düngung festgestellt (F31_C_d und F31_C_w). Bei den nicht-landwirtschaftlich genutzten pristin und urbanen Vergleichsstandorten wurde *dfrA-1* nur in einer Probe aus dem Lainzer Tiergarten (LT_08_20) detektiert (Tabelle 29 und Abbildung 27).

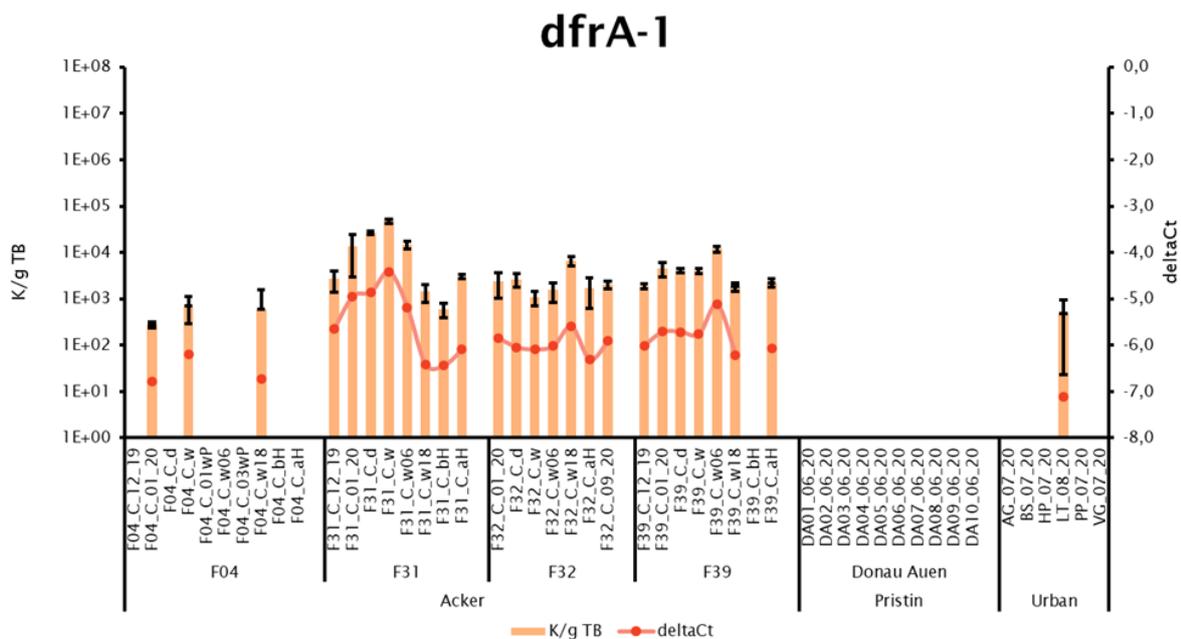


Abbildung 27. *DfrA-1* in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Tabelle 29. *DfrA-1* in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.

dfrA-1				
	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	5,2E+02	2,2E+02	2,8E+02	7,0E+02
F31	1,4E+04	1,6E+04	6,0E+02	4,7E+04
F32	2,6E+03	1,9E+03	1,1E+03	6,6E+03
F39	3,9E+03	3,3E+03	1,5E+03	1,2E+04
Donau Auen	-	-	-	-
Urban	4,9E+02	-	4,9E+02	4,9E+02

Das Chloramphenicol-Resistenzgen *cmxA* wurde in allen Ackerproben und in allen pristin und urbanen Vergleichsproben detektiert (Abbildung 28). Die Ackerfelder zeigten im Durchschnitt eine Kopienzahl von $4,3E+04 (\pm 7,9E+04)$ K/g TB an, wobei das nicht Gülle-gedüngte Feld F04 tendenziell niedrigere Konzentrationen aufwies ($5,5E+03 (\pm 1,6E+03)$ K/g TB). Feld F31 zeigte einen Anstieg nach der Düngung, mit einem Peak eine Woche nach dem Ereignis, welcher im Herbst wieder auf Baseline-Niveau absank. In den pristin (1,1E+04 ($\pm 6,0E+03$) K/g TB) und urbanen Proben ($9,6E+03 (\pm 5,0E+03)$ K/g TB) war die Abundanz von *cmxA* ähnlich wie im Feld F04 (Tabelle 30).

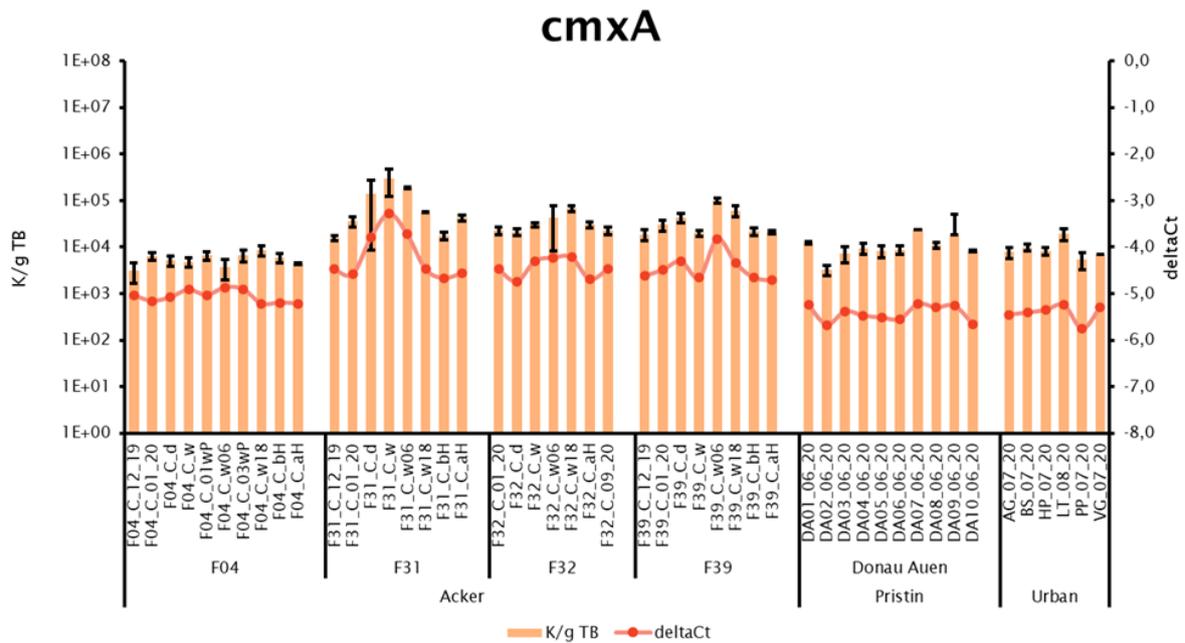


Abbildung 28. *cmxA* in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Tabelle 30. *cmxA* in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.

	<i>cmxA</i>			
	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	5,5E+03	1,6E+03	3,1E+03	8,6E+03
F31	9,9E+04	1,0E+05	1,6E+04	3,0E+05
F32	3,4E+04	1,6E+04	2,1E+04	6,7E+04
F39	3,9E+04	2,9E+04	1,9E+04	1,0E+05
Donau Auen	1,1E+04	6,0E+03	3,3E+03	2,4E+04
Urban	9,6E+03	5,0E+03	5,3E+03	1,9E+04

Das Fluorochinolon-Resistenzgen *qnrS* konnte in keiner Bodenprobe nachgewiesen werden.

VanA ist ein klinisch äußerst relevantes Resistenzgen, das Glykopeptide inaktiviert. Die *vanA*-Kopienzahlen verhielten sich sehr konstant über alle drei Standort-Typen, mit 1,9E+03 (\pm 9,0E+02) K/g TB für die Ackerböden, 1,1E+03 (\pm 4,3E+02) K/g TB für den pristinen und 2,1E+03 (\pm 2,3E+03) K/g TB für den urbanen Bereich (Tabelle 31 und Abbildung 29).

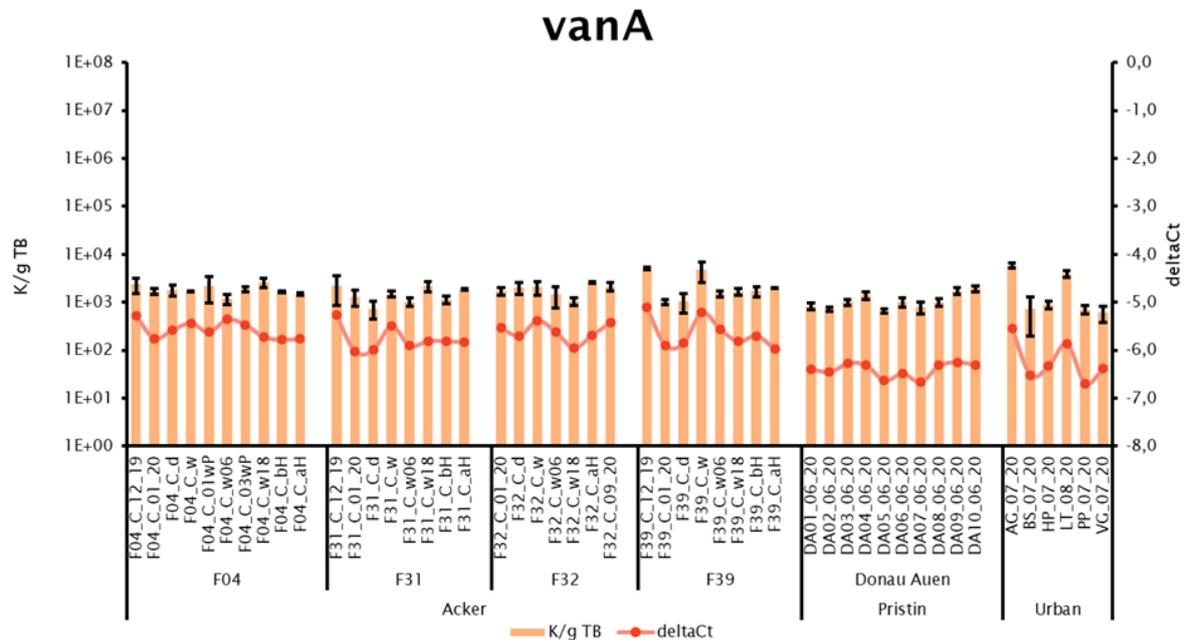


Abbildung 29. *vanA* in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Tabelle 31. *vanA* in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.

vanA				
	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	1,9E+03	4,2E+02	1,2E+03	2,6E+03
F31	1,5E+03	5,4E+02	7,4E+02	2,2E+03
F32	1,9E+03	5,1E+02	1,0E+03	2,6E+03
F39	2,3E+03	1,6E+03	1,0E+03	5,0E+03
Donau Auen	1,1E+03	4,3E+02	6,6E+02	1,9E+03
Urban	2,1E+03	2,3E+03	6,1E+02	6,0E+03

Als Makrolid-inaktivierende ARGs wurden *ermB* und *ermF* ausgewählt und getestet. *ErmB* wurde in allen Proben der langfristig Gülle-gedüngten Felder detektiert. Gülle-Applikation auf den Feldern F31 und F39 verursachte einen deutlichen Peak bei der Target-Konzentration (Abbildung 30). Beim nicht Gülle-gedüngten Feld F04 sank die Konzentration an zwei der zehn Zeitpunkte unter die Bestimmungsgrenze, und die durchschnittliche Target-Kopienzahl betrug $1,2E+03 (\pm 5,8E+02)$ K/g TB (Tabelle 32). Das Ergebnis für die pristinen Proben war ähnlich wie bei Feld F04 mit zwei von zehn Standorten unter dem Detektionslimit und einem Mittelwert von $3,5E+02 (\pm 9,1E+01)$ K/g TB. Die urbanen Proben hatten höhere *ermB*-Konzentrationen mit durchschnittlich $1,2E+03 (\pm 9,9E+02)$ K/g TB.

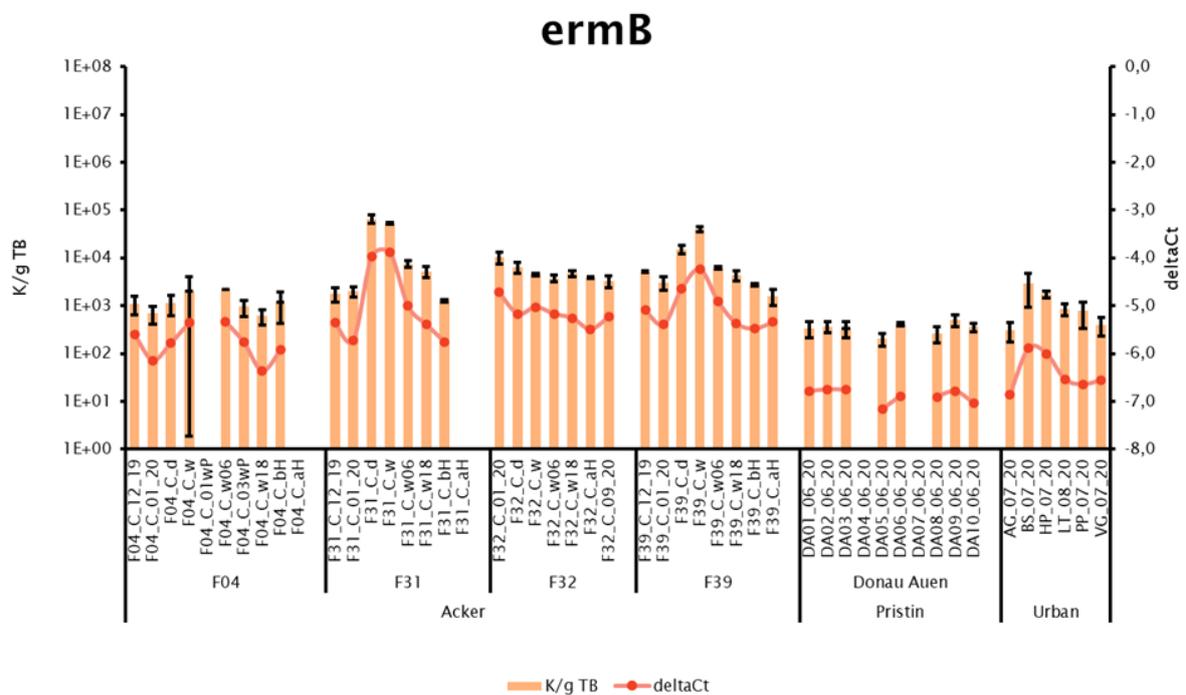


Abbildung 30. *ErmB* in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Für das zweite Makrolid-Resistenzgen *ermF* gab es auf den HOAL-Feldern nur unmittelbar nach der Gülledüngung ein positives Signal bei F31 und F39 (Abbildung 31). Der pristine Bereich zeigte keine Signale für *ermF*. Im Gegensatz dazu waren alle urbanen Proben bis auf BS_07_20 positiv, mit einer durchschnittlichen Kopienzahl von $2,4E+03 (\pm 1,7E+03)$ K/g TB (Tabelle 32). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass Gülle-Applikation und anthropogener Druck einen Einfluss auf die Abundanz von *ermF* haben.

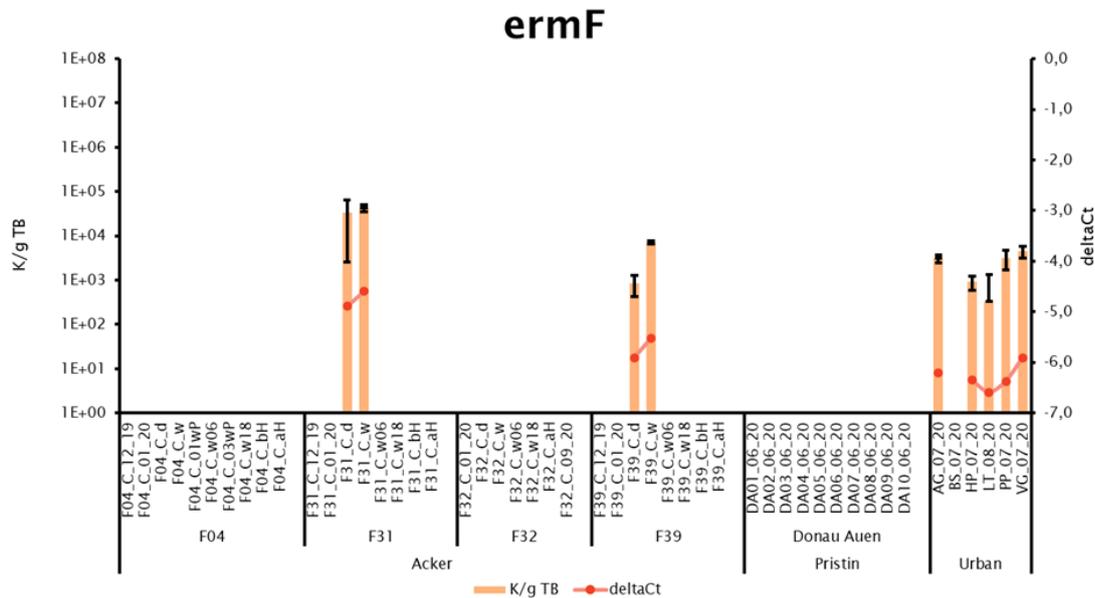


Abbildung 31. *ErmF* in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Tabelle 32. *ErmB* und *ermF* in HOAL-Äckern, Donau-Auen und urbanen Böden.

	ermB				ermF			
	Mittelwert	SD	Min	Max	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	1,2E+03	5,8E+02	6,1E+02	2,2E+03	-	-	-	-
F31	1,9E+04	2,8E+04	1,3E+03	6,6E+04	3,8E+04	7,0E+03	3,3E+04	4,3E+04
F32	5,3E+03	2,4E+03	3,3E+03	1,0E+04	-	-	-	-
F39	9,9E+03	1,3E+04	1,6E+03	4,0E+04	4,0E+03	4,4E+03	8,6E+02	7,1E+03
Donau Auen	3,5E+02	9,1E+01	2,0E+02	5,1E+02	-	-	-	-
Urban	1,2E+03	9,9E+02	3,1E+02	2,9E+03	2,4E+03	1,7E+03	3,3E+02	4,5E+03

Das Target **sat-4** ist ein Streptothricin-Resistenzgen, welches eine sehr robuste Konzentrationsverteilung für die Felder F31, F32 und F39 zeigte, mit einem Mittelwert von $6,4E+04$ ($\pm 4,5E+02$) K/g TB. Beim Gülle-freien Feld F04 gab es drei Ergebnisse unter der Bestimmungsgrenze (Abbildung 32). Der Mittelwert war um eine logarithmische Stufe niedriger ($2,6E+03$ ($\pm 1,2E+04$) K/g TB). In den Donau-Auen wurde das Target nur in 2 von 10 Proben nachgewiesen, mit einer durchschnittlichen Kopienzahl von $6,2E+02$ ($\pm 7,0E+02$) K/g TB. Bei den urbanen Proben wurde das Target in 5 von 6 Proben nachgewiesen, mit durchschnittlich $7,9E+02$ ($\pm 4,0E+02$) K/g TB (Tabelle 33).

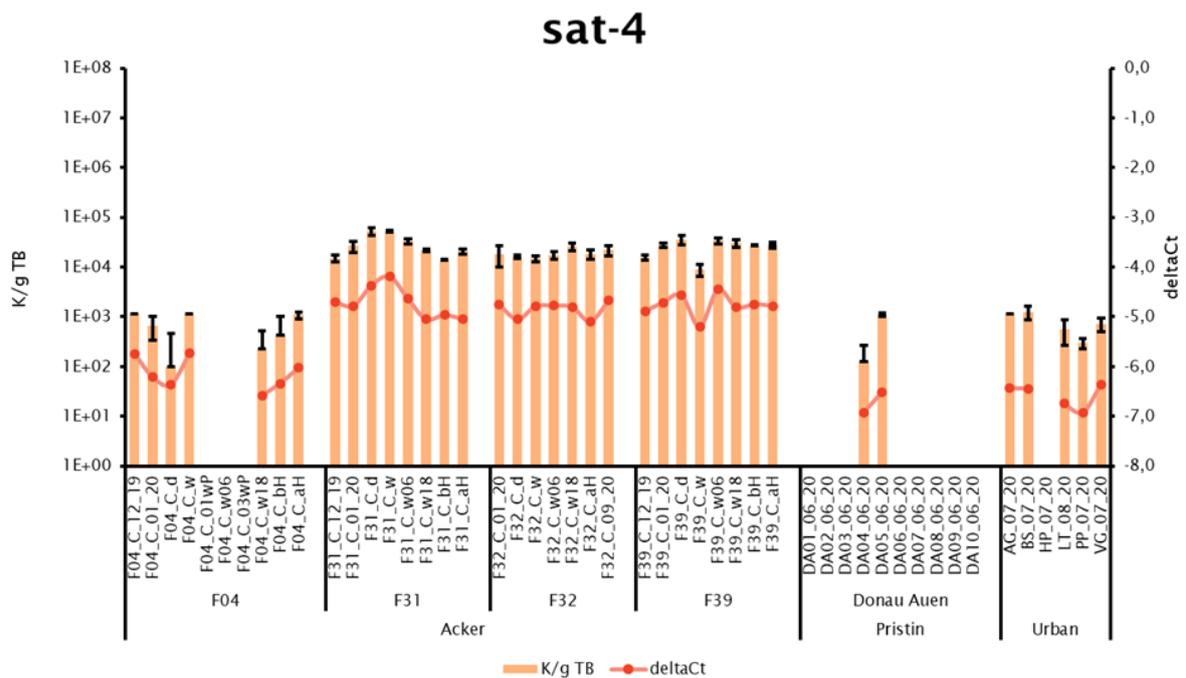


Abbildung 32. *Sat-4* in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Tabelle 33. *Sat-4* in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.

	sat-4			
	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	$6,8E+02$	$4,5E+02$	$9,9E+01$	$1,2E+03$
F31	$3,0E+04$	$1,5E+04$	$1,4E+04$	$5,3E+04$
F32	$1,9E+04$	$3,6E+03$	$1,5E+04$	$2,5E+04$
F39	$2,6E+04$	$9,0E+03$	$8,9E+03$	$3,5E+04$
Donau Auen	$6,2E+02$	$7,0E+02$	$1,3E+02$	$1,1E+03$
Urban	$7,9E+02$	$4,0E+02$	$3,0E+02$	$1,3E+03$

Das Colistin-Resistenzgen *mcr1* lieferte positive Signale nur knapp über dem Detektionslimit und war im Vergleich zu den übrigen Targets gegenläufig verteilt (Abbildung 33). Während von den insgesamt 33 Ackerproben nur eine einzige positiv war, wurde *mcr1* in 5 von 10 pristinen und in 4 von 6 urbanen Proben detektiert. Die durchschnittliche Konzentration in den Donau-Auen lag bei $1,6E+03$ ($\pm 9,6E+02$) K/g TB und war vergleichbar mit dem urbanen Bereich ($9,3E+02$ ($\pm 2,6E+02$) K/g TB) (Tabelle 34). Colistin-Resistenzen wurden eher in Verbindung mit Hühner-Kot als mit Schweinegülle beschrieben (73).

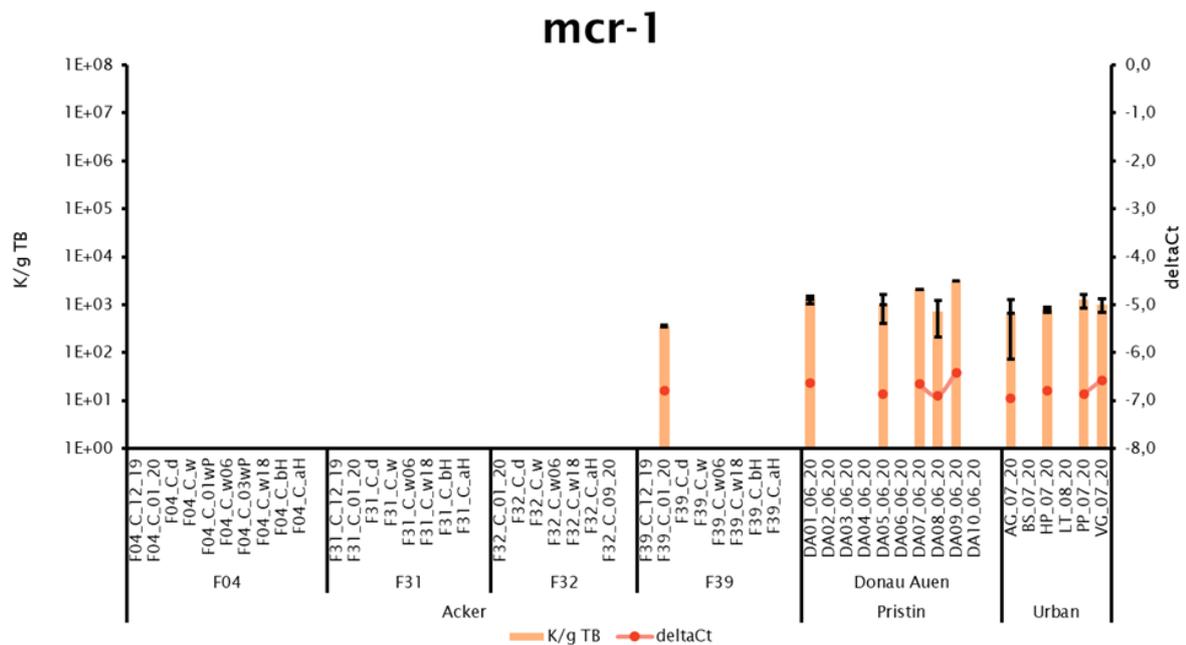


Abbildung 33. *Mcr-1* in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Tabelle 34. *Mcr-1* in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.

mcr-1				
	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	-	-	-	-
F31	-	-	-	-
F32	-	-	-	-
F39	3,6E+02	-	3,6E+02	3,6E+02
Donau Auen	1,6E+03	9,6E+02	7,1E+02	3,1E+03
Urban	9,3E+02	2,6E+02	6,7E+02	1,3E+03

Das Sulfonamid-Resistenzgen ***sul1*** zeigte die höchsten Kopienzahlen in den langfristig Gülle-gedüngten Feldern F31, F32 und F39 ($9,8E+04 \pm 3,2E+04$) K/g TB, mit einem deutlichen Anstieg nach der Gülle-Anwendung auf Feld F31 (Abbildung 34). Im langjährig Gülle-freien Feld F04 betrug der Mittelwert $3,0E+03 \pm 8,5E+02$ K/g TB (Tabelle 35).

Bei den pristin Proben waren die Konzentrationen niedriger und die Schwankungen größer, mit Kopienzahlen zwischen $2,1E+02$ und $2,0E+03$ K/g TB (Tabelle 35). In den urbanen Proben waren die Konzentrationen ähnlich wie in den pristin Proben, mit Ausnahme der Breitenfurter Straße ($1,6E+04 \pm 3,5E+03$) K/g TB).

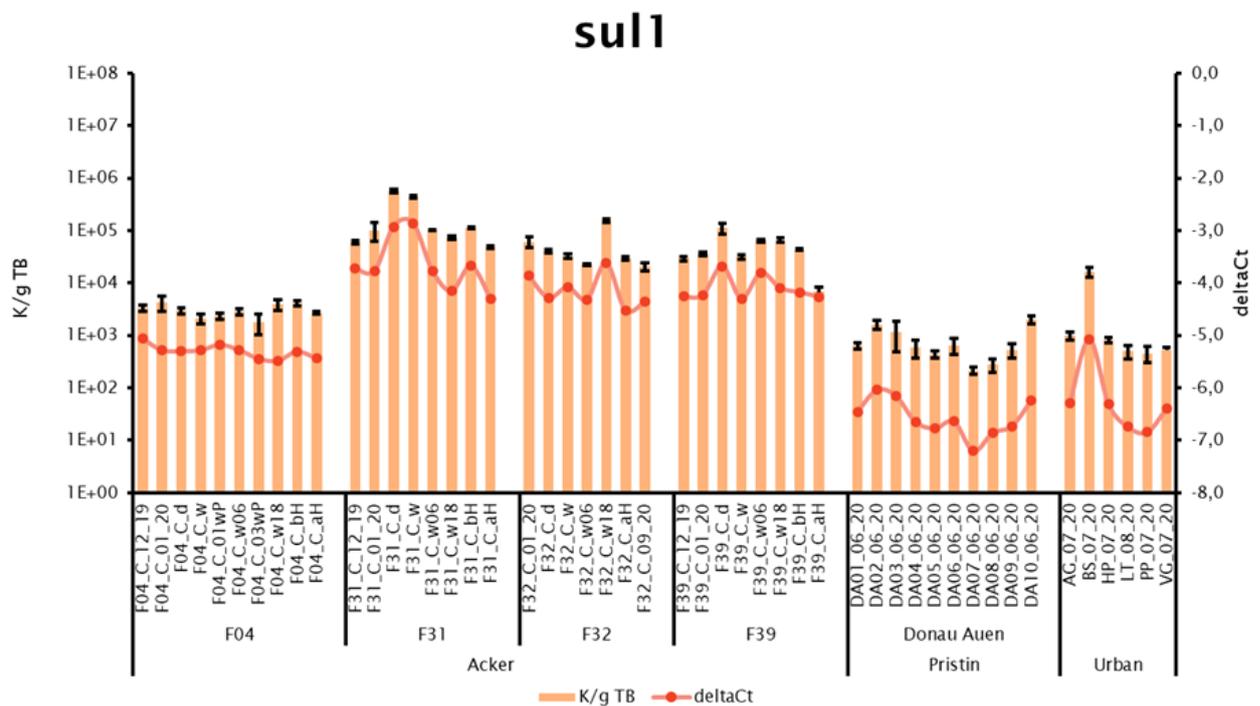


Abbildung 34. *Sul1* in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Tabelle 35. *Sul1* in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.

	<i>sul1</i>			
	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	3,0E+03	8,5E+02	1,8E+03	4,2E+03
F31	1,9E+05	2,0E+05	4,9E+04	5,7E+05
F32	5,2E+04	4,8E+04	2,0E+04	1,6E+05
F39	4,8E+04	3,2E+04	6,9E+03	1,1E+05
Donau Auen	8,1E+02	5,9E+02	2,1E+02	2,0E+03
Urban	3,2E+03	6,3E+03	4,6E+02	1,6E+04

Von den Tetrazyklin-Resistenzgenen wurden *tet(A)*, *tet(M)*, *tet(O)* und *tet(W)* analysiert. ***Tet(A)***, ***tet(M)*** und ***tet(O)*** zeigten ein gemeinsames Verteilungsmuster in Ackerproben, pristinen und urbanen Böden: Die höchsten Konzentrationen wurden in den langfristig Gülle-gedüngten Feldern F31, F32 und F39 gemessen (Abbildung 35). In F04 waren die Konzentrationen um eine logarithmische Stufe niedriger. In den pristinen und urbanen Proben waren die Konzentrationen ähnlich wie in F04, jedoch mit einigen Werten unter der Bestimmungsgrenze.

Tet(W) wurde in allen Proben nachgewiesen (F31_C_aH wurde nicht getestet). Die durchschnittlichen Kopienzahlen lagen in den drei langfristig Gülle-gedüngten Feldern jeweils über 1,0E+05 K/g TB und im Gülle-freien Feld F04 bei 4,4E+04 (\pm 2,3E+04) K/g TB. Im Vergleich zu den anderen Targets wurde *tet(W)* in den nicht-landwirtschaftlich genutzten Vergleichsböden durchwegs in hoher Konzentration gemessen, mit (2,1E+04 (\pm 3,7E+03) K/g TB in den Donau-Auen und 2,6E+04 (\pm 1,2E+04) K/g TB in den urbanen Proben (Tabelle 36).

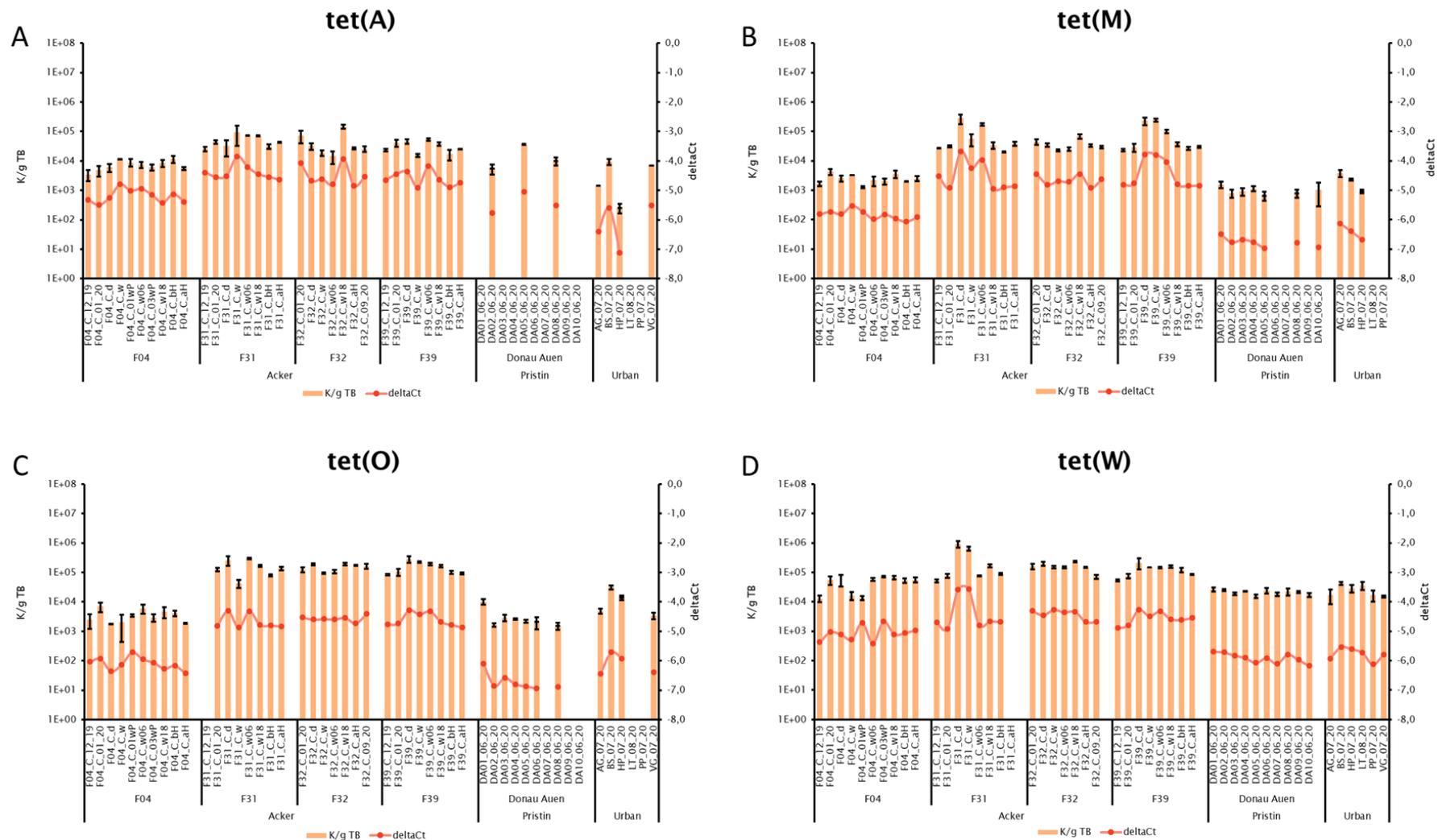


Abbildung 35. *Tet(A)*, *tet(M)*, *tet(O)* und *tet(W)* in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Tabelle 36. *Tet(A)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(W)* in HOAL-Äckern, Donau-Auen und urbanen Böden.

	tet(A)				tet(M)			
	Mittelwert	SD	Min	Max	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	7,4E+03	2,7E+03	3,5E+03	1,2E+04	2,5E+03	9,2E+02	1,3E+03	4,2E+03
F31	5,2E+04	2,5E+04	2,6E+04	9,5E+04	8,2E+04	9,3E+04	2,0E+04	2,8E+05
F32	4,8E+04	4,8E+04	1,5E+04	1,5E+05	3,6E+04	1,5E+04	2,3E+04	6,7E+04
F39	3,3E+04	1,4E+04	1,5E+04	5,3E+04	9,0E+04	9,3E+04	2,3E+04	2,4E+05
Donau Auen	1,7E+04	1,7E+04	5,5E+03	3,6E+04	9,9E+02	3,0E+02	6,6E+02	1,5E+03
Urban	4,5E+03	4,4E+03	2,5E+02	9,4E+03	1,8E+03	1,6E+03	3,0E+02	3,8E+03

	tet(O)				tet(W)			
	Mittelwert	SD	Min	Max	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	3,6E+03	1,8E+03	1,8E+03	7,0E+03	4,4E+04	2,3E+04	1,3E+04	7,3E+04
F31	1,6E+05	9,2E+04	4,2E+04	2,9E+05	2,9E+05	3,5E+05	5,2E+04	9,3E+05
F32	1,5E+05	3,9E+04	9,5E+04	1,9E+05	1,6E+05	5,0E+04	7,2E+04	2,3E+05
F39	1,6E+05	7,3E+04	8,4E+04	2,8E+05	1,3E+05	5,3E+04	5,4E+04	2,2E+05
Donau Auen	3,3E+03	3,1E+03	1,5E+03	1,0E+04	2,1E+04	3,7E+03	1,6E+04	2,7E+04
Urban	1,3E+04	1,3E+04	3,4E+03	3,1E+04	2,6E+04	1,2E+04	1,5E+04	4,3E+04

Von den Resistenzgenen gegen die klinisch relevanten β -Laktame wurden *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM-1}*, *bla_{OXA-10}*, *bla_{TEM-1}* sowie *mecA* untersucht. *Bla_{CTX-M-15}*, *bla_{KPC}* und *bla_{NDM-1}* konnten kein einziges Mal in den Proben nachgewiesen werden, während *bla_{OXA-10}* sporadisch in den Ackerfeldern detektiert wurde, jedoch nie im pristinen und urbanen Bereich (Abbildung 36). *MecA* wurde sporadisch in Ackerproben und in urbanen Böden detektiert.

Bla_{TEM-1} hingegen wurde mit einer -abgesehen von einzelnen Signal-Ausfällen- stabilen Konzentration in allen Proben detektiert. Die Mittelwerte betragen 6,3E+02 (\pm 3,5E+02) K/g TB für die HOAL-Felder, 6,6E+02 (\pm 3,3E+02) K/g TB im pristinen und 5,1E+02 (\pm 2,7E+02) K/g TB im urbanen Bereich (Tabelle 37).

Tabelle 37. *Bla_{OXA-10}*, *bla_{TEM-1}*, *mecA* in HOAL-Äckern, Donau-Auen und urbanen Böden.

	blaOXA-10				blaTEM-1			
	Mittelwert	SD	Min	Max	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	5,7E+02	3,4E+02	2,5E+02	9,2E+02	6,2E+02	1,7E+02	3,8E+02	9,0E+02
F31	1,0E+03	1,4E+02	9,1E+02	1,1E+03	7,4E+02	3,5E+02	3,2E+02	1,4E+03
F32	6,4E+02	2,7E+02	4,5E+02	8,4E+02	4,9E+02	2,9E+02	9,5E+01	7,8E+02
F39	1,0E+03	5,5E+02	6,2E+02	1,4E+03	6,4E+02	5,4E+02	1,5E+02	1,7E+03
Donau Auen	-	-	-	-	6,6E+02	3,3E+02	3,2E+02	1,2E+03
Urban	-	-	-	-	5,1E+02	2,7E+02	2,9E+02	8,2E+02

	mecA			
	Mittelwert	SD	Min	Max
F04	-	-	-	-
F31	-	-	-	-
F32	1,7E+03	-	1,7E+03	1,7E+03
F39	1,3E+04	1,5E+04	2,5E+03	2,4E+04
Donau Auen	-	-	-	-
Urban	1,7E+03	3,5E+02	1,4E+03	1,9E+03

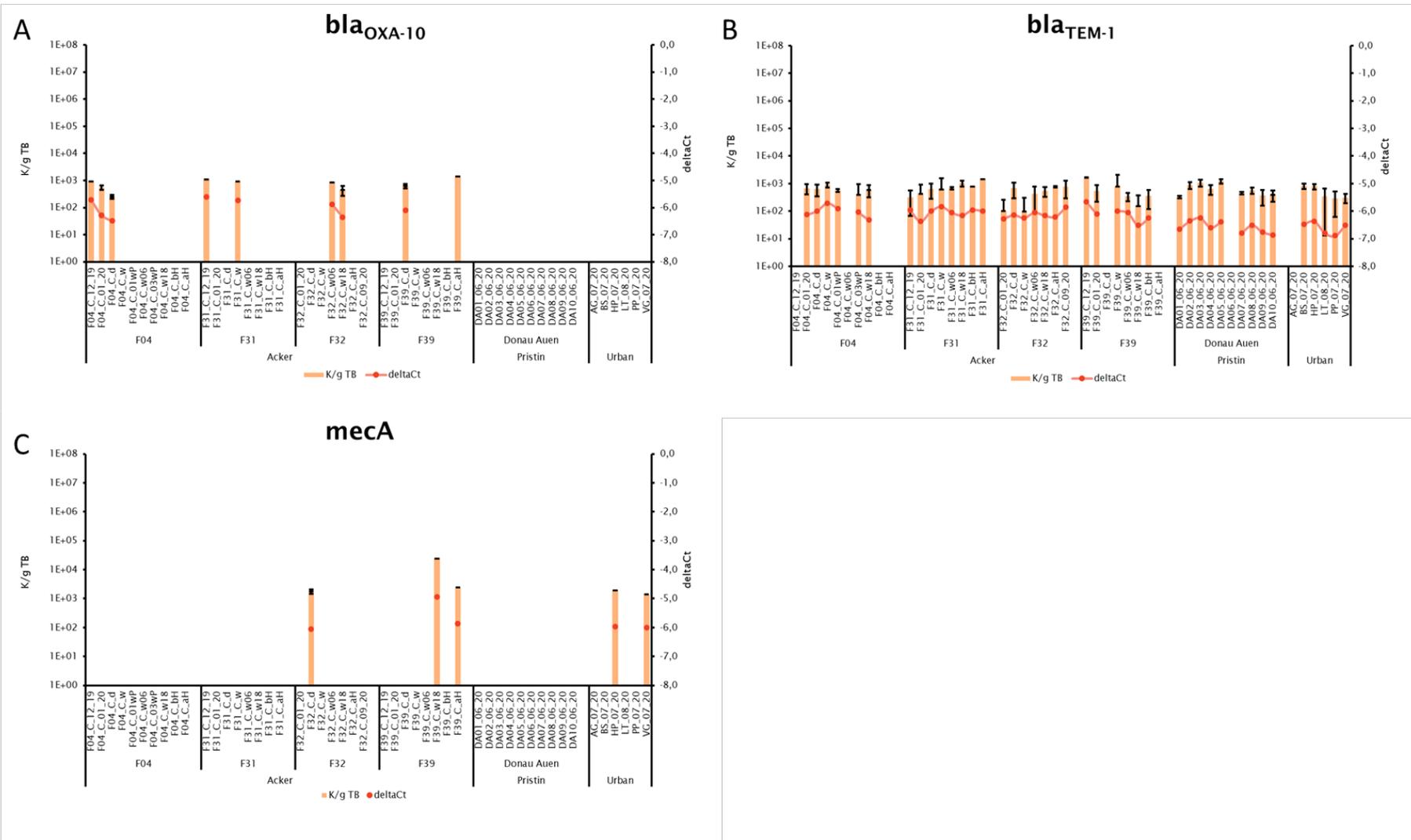


Abbildung 36. *Bla*_{OXA-10}, *bla*_{TEM-1} und *mecA* in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden. Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

5.1.3 Saisonaler Vergleich: ARG- und MGE-Konzentrationen in den Donau-Auen

In den **Donau-Auen** wurden 5 Standorte im Überflutungsgebiet und 5 Standorte im Hinterland jeweils im Sommer und im Winter untersucht. Insgesamt wurden 18 Targets in den Donau-Auen detektiert. **Int11**, **ISPps**, **vanA**, **ermB**, **sul1**, **tet(W)** und **bla_{TEM-1}** traten räumlich und zeitlich konstant auf. **AadA**, **sat4**, **tet(M)** und **tet(O)** waren im Überflutungsgebiet häufiger als im Hinterland. **NptII**, **nptIII** und **mcr1** waren im Winter häufiger als im Sommer. **CmxA** war im Sommer häufiger als im Winter. **StrB** wurde im Überflutungsgebiet nur im Sommer und im Hinterland nur im Winter detektiert. Die Targets **bla_{CTX-M-15}**, **bla_{KPC}**, **bla_{NDM-1}**, **bla_{OXA-10}**, **dfrA-1**, **ermF**, **mecA** und **qnrS** wurden in keiner der 20 getesteten Proben nachgewiesen. **NptII**, **sat-4** und **tet(A)** wurden nur vereinzelt detektiert.

Der Nationalpark Donau-Auen wurde an 10 unterschiedlichen Bodenstellen in zunehmender Entfernung vom Donauufer untersucht. Die Standorte DA01-DA05 waren von Überflutungen betroffen, DA06-DA10 waren geschützt. Die 10 Stellen wurden im Sommer 2020 und im Winter 2020 beprobt, um saisonale Effekte zu analysieren.

Die Bakterienzahl wurde anhand des **16S rRNA** Targets ermittelt. In allen Sommer- und Winterproben wurden Konzentrationen zwischen $2,1E+09$ und $9,7E+09$ K/g TB gemessen, ohne eindeutigen saisonalen Effekt und ohne große Unterschiede zwischen den Standorten (Abbildung 37).

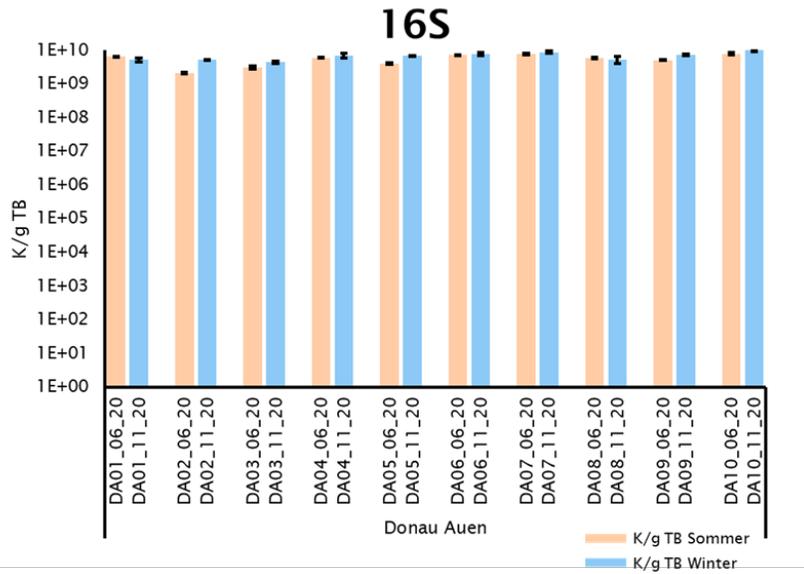


Abbildung 37. 16S rRNA-Gen Konzentrationen in den Donau-Auen im Sommer und Winter.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate).

Das MGE-assoziierte Integrasegen *intI1* wurde in allen Proben nachgewiesen, mit vergleichbaren Konzentrationen an allen Standorten sowohl zur Sommer- als auch zur Winterzeit ($1,6E+04$ bis $3,5E+04$ K/g TB) (Abbildung 38).

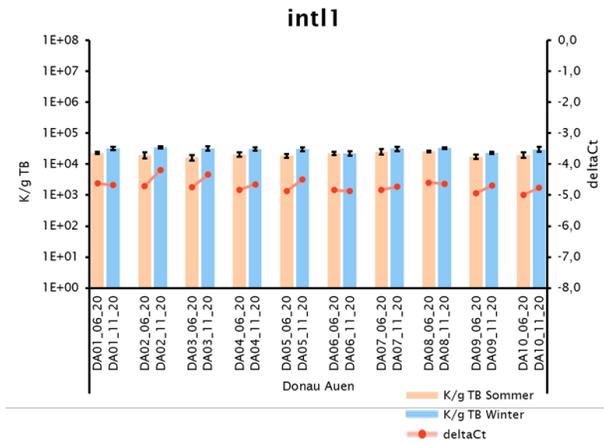


Abbildung 38. *intI1* in den Donau-Auen im Sommer und Winter.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Das MGE *ISPPs* wurde ebenfalls an allen Probenstellen detektiert, mit Konzentrationen zwischen $2,1E+03$ bis $2,8E+04$ K/g TB. An einigen Standorten gab es Unterschiede zwischen den Jahreszeiten, die jedoch nicht gleichlaufend waren. Bei DA03 und DA05 wurde eine dreifach höhere Kopienzahl im Winter festgestellt, bei DA04 hingegen eine vierfach höhere Kopienzahl im Sommer (Abbildung 39).

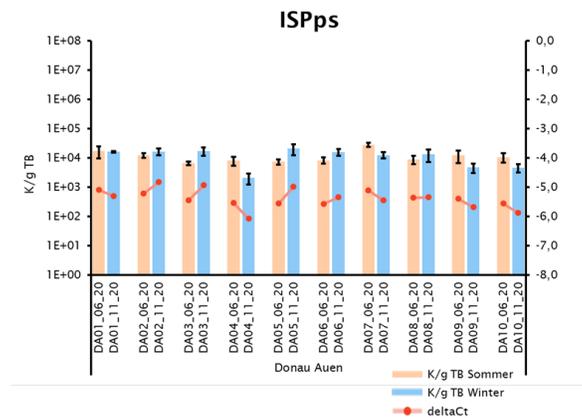


Abbildung 39. *ISPPs* in den Donau-Auen im Sommer und Winter.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt) auf der sekundären y-Achse.

Von den Aminoglykosid-Resistenzgenen *aadA*, *nptII*, *nptIII* und *strB* wurde ***aadA*** vor allem an den überflutungsgefährdeten Probeentnahmestellen DA01-DA05 detektiert und nur an zwei Standorten im Hinterland (Abbildung 40). An den einzelnen Probestellen konnte kein wesentlicher saisonaler Effekt festgestellt werden. ***NptII*** wurde in den Winterproben von vier Standorten detektiert, mit Konzentrationen zwischen $7,8E+03$ und $2,1E+04$ K/g TB. ***NptIII*** verhielt sich in den Donau-Auen ähnlich wie *nptII*. Es wurde an fünf Standorten im Winter und an einem Standort im Sommer detektiert, wobei die Signale knapp über dem Detektionslimit der qPCR Assays lagen ($2,4E+02$ bis $7,3E+02$ K/g TB). ***StrB*** wurde im Überflutungsgebiet hauptsächlich im Sommer und im Hinterland hauptsächlich im Winter detektiert. Auch hier lagen die Konzentrationen knapp über der Detektionsgrenze ($3,5E+02$ bis $1,8E+03$ K/g TB).

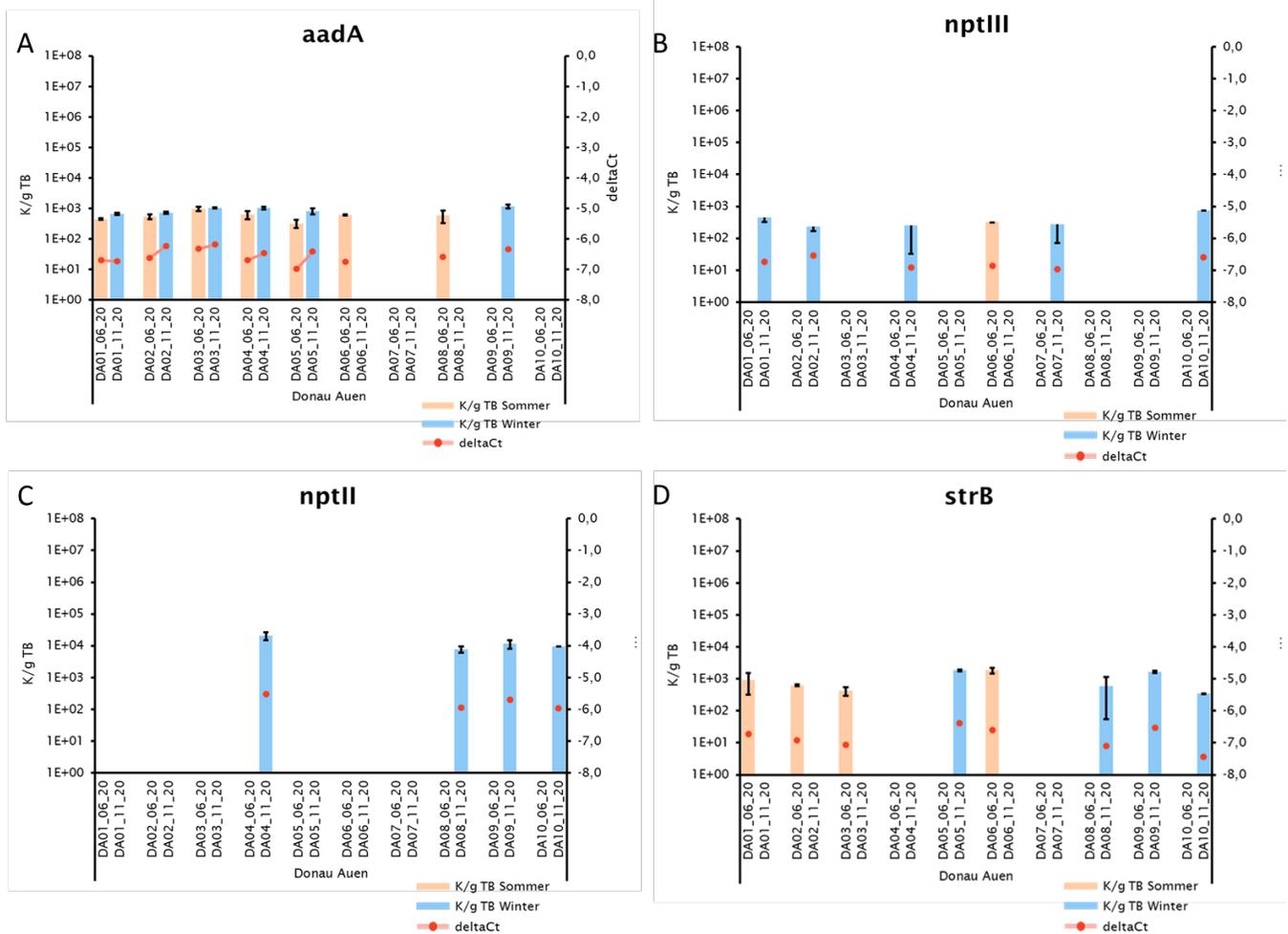


Abbildung 40. *AadA*-, *nptIII*, *nptII* und *strB* in den Donau-Auen im Sommer und Winter.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt) auf der sekundären y-Achse.

Das Glykopeptid-Resistenzgen *vanA* konnte in allen Proben nachgewiesen werden (Abbildung 41). Die Kopienzahl war über alle 10 Standorte und über die Saisonen konstant zwischen $6,1E+02$ und $1,9E+03$ K/g TB.

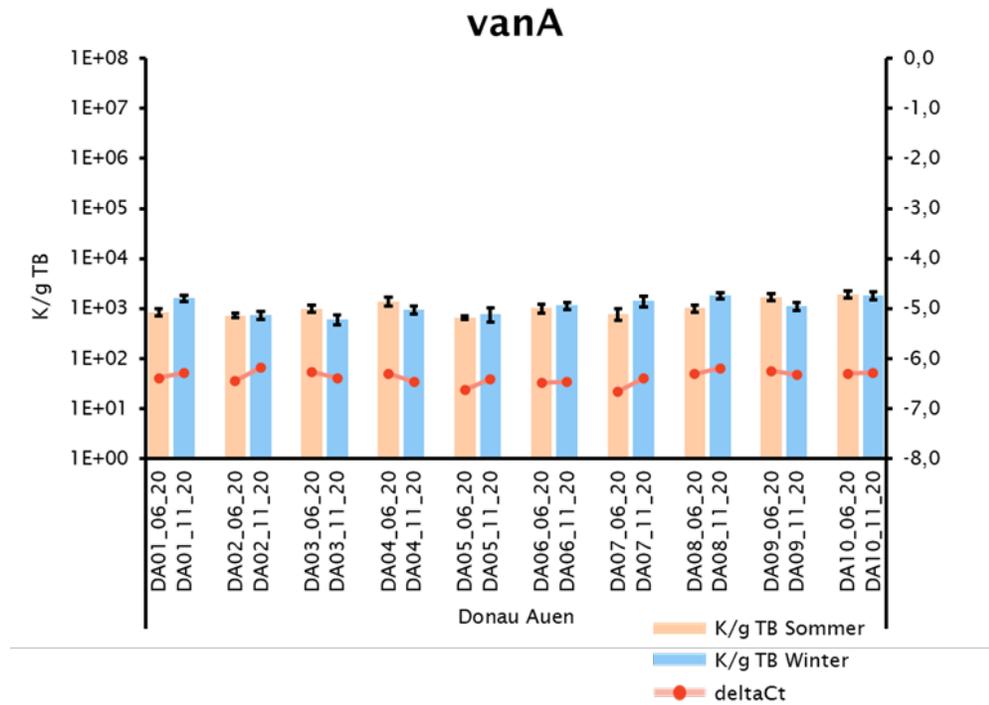


Abbildung 41. *VanA* in den Donau-Auen im Sommer und Winter.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt) auf der sekundären y-Achse.

Das Makrolid-Resistenzgen *ermB* wurde in jeweils 8 von 10 Sommer- und Winter-Proben detektiert (Abbildung 42). Die gemessenen Konzentrationen variierten zwischen $2,0E+02$ und $1,0E+03$ K/g TB ohne klare saisonalen Unterschiede. Das zweite Makrolid-Resistenzgen *ermF* konnte in keiner der 20 Proben nachgewiesen werden.

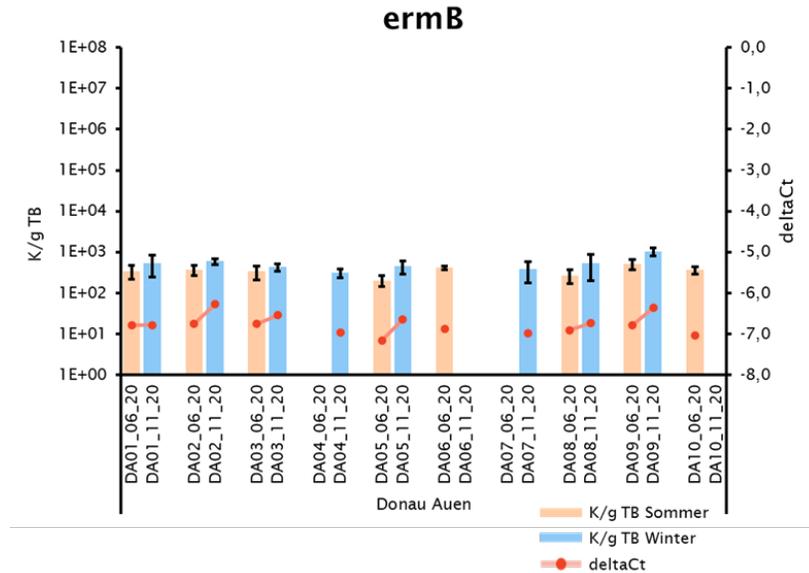


Abbildung 42. *ErmB* in den Donau-Auen im Sommer und Winter.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Das Chloramphenicol-Resistenzgen *cmxA* konnte in allen Sommer-Proben gemessen werden, jedoch nur in drei Winter-Proben aus dem Überflutungsgebiet (Abbildung 43). Das Target schwankte zwischen $1,0E+02$ (Winter-Probe DA05) und $2,4E+04$ K/g TB.

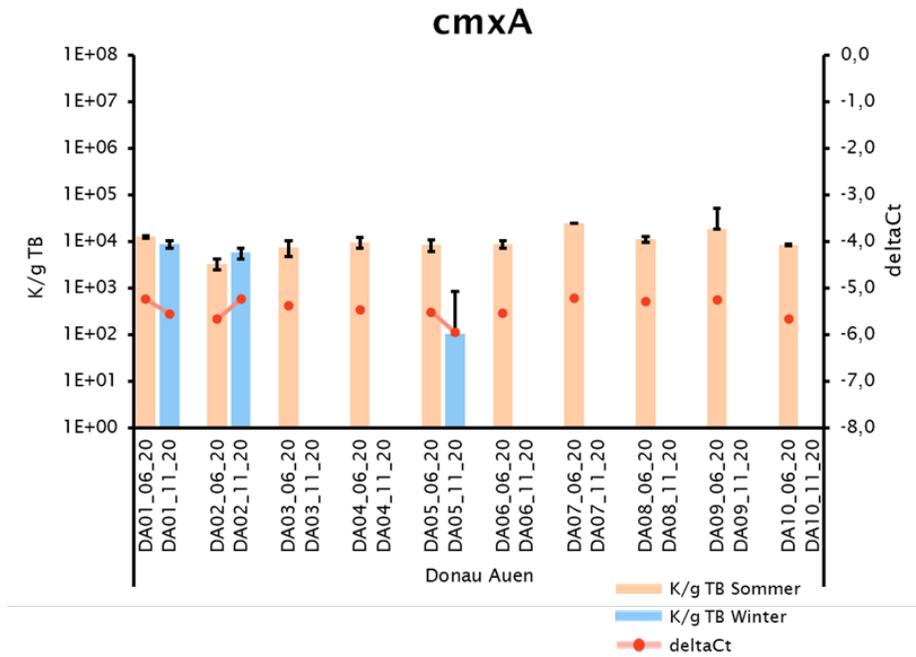


Abbildung 43. *CmxA* in den Donau-Auen im Sommer und Winter.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Das Streptothricin-Resistenzgen *Sat-4* kam nur sporadisch in den Donau-Auen vor, hauptsächlich im Überflutungsgebiet (Abbildung 44). Die positiven Signale wiesen Kopienzahlen zwischen $1,3E+02$ und $1,1E+03$ K/g TB nach.

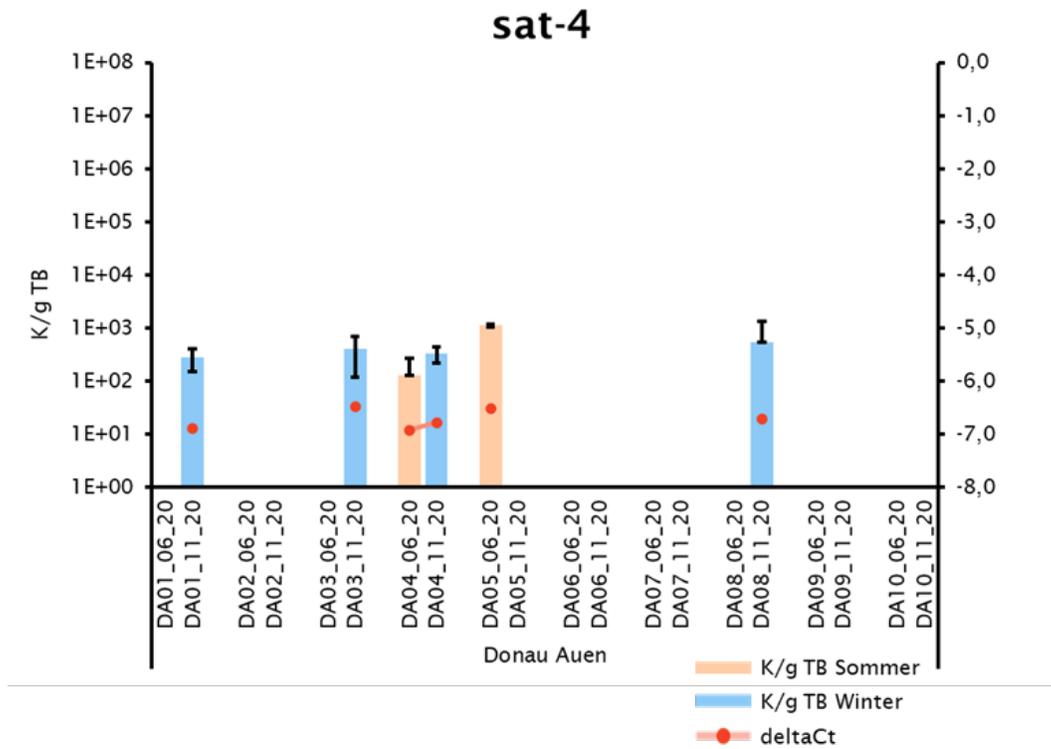


Abbildung 44. *Sat-4* in den Donau-Auen im Sommer und Winter.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt) auf der sekundären y-Achse.

Das Colistin-Resistenzgen *mcr-1* konnte in 9 von 10 Winterproben und in 5 von 10 Sommer-Proben nachgewiesen werden (Abbildung 45). Nur am Standort DA02 konnte das Target weder im Sommer noch im Winter detektiert werden. Die gemessenen Kopienzahlen lagen zwischen $4,0E+02$ und $3,1E+03$ K/g TB.

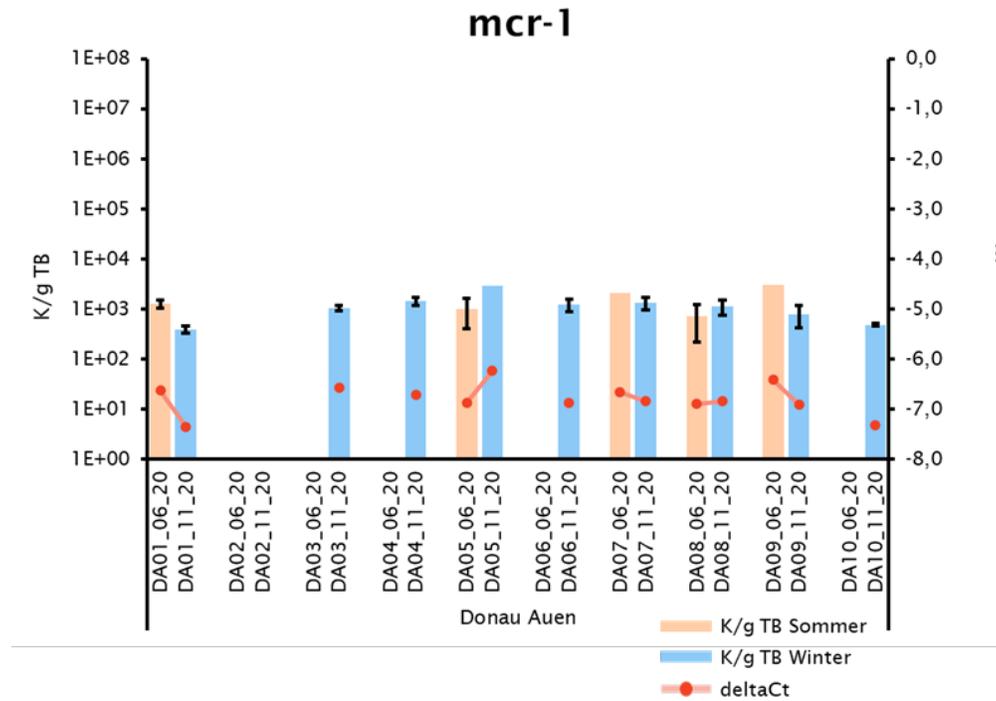


Abbildung 45. *Mcr-1* in den Donau-Auen im Sommer und Winter.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt) auf der sekundären y-Achse.

Das Sulfonamid-Resistenzgen *sul1* wurde in allen 20 Proben identifiziert (Abbildung 46). Die saisonalen Diskrepanzen waren bei DA07 am höchsten, wobei hier die Winter-Probe eine 9-fach höhere Kopienzahl aufwies als die Sommerprobe. Im Gegensatz dazu hatte die Sommerprobe von DA10 eine 7-fach höhere Kopienzahl als die Winterprobe. Der generelle Konzentrationsschwankungsbereich lag zwischen $2,1E+02$ und $2,0E+03$ K/g TB.

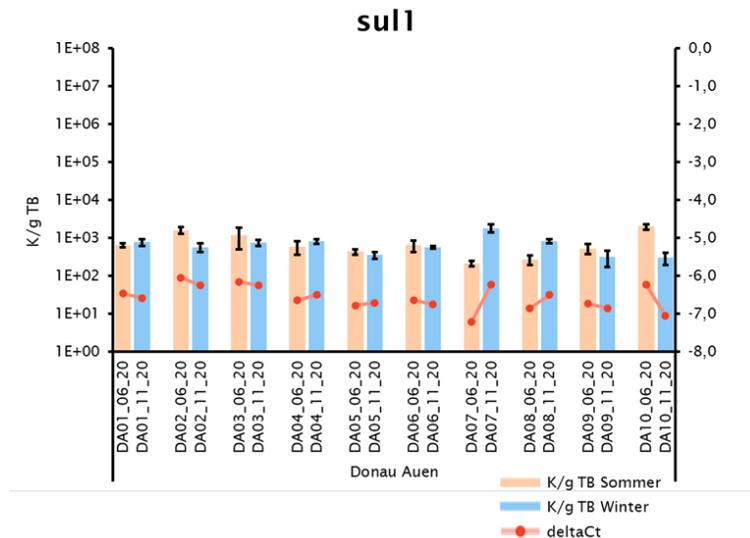


Abbildung 46. *Sul1* in den Donau-Auen im Sommer und Winter.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt) auf der sekundären y-Achse.

Als Vertreter der Tetracyclin-inaktivierenden ARGs wurden die 4 Resistenzgene *tet(A)*, *tet(M)*, *tet(O)* und *tet(W)* ausgewählt. ***Tet(A)*** wurde nur sehr sporadisch in 4 von 20-Proben nachgewiesen, mit Werten von $5,5E+03$ bis $3,6E+04$ K /g TB. Die Targets ***tet(M)*** und ***tet(O)*** waren jeweils in 6-7 Sommer-Proben und 7-8 Winter-Proben messbar. Sie wurden vor allem an Standorten im Überschwemmungsgebiet nachgewiesen (Abbildung 47). Im Falle von *tet(M)* wurden Konzentrationen zwischen $5,1E+02$ und $1,5E+03$ K/g TB gemessen, bei *tet(O)* Kopienzahlen zwischen $1,3E+03$ und $1,1E+04$ K/g TB. Bei ***tet(W)*** wurde in allen 20 Proben ein Signal ermittelt. Die Konzentration dieses Targets waren mit $1,6E+04$ und $6,4E+05$ K/g TB 10 bis 100-fach höher als jene der übrigen Tetracyclin-Resistenzgene sowie der meisten anderen ARG in den Donau-Auen. Bei 3 Proben aus dem nicht Überschwemmungs-gefährdeten Bereich gab es saisonale Unterschiede. Bei DA07, DA08 und DA10 konnten im Winter 35-mal, 16-mal und 8-mal höhere *tet(W)*-Kopien pro Gramm Trockengewicht Boden ermittelt werden, als in den Sommerproben.

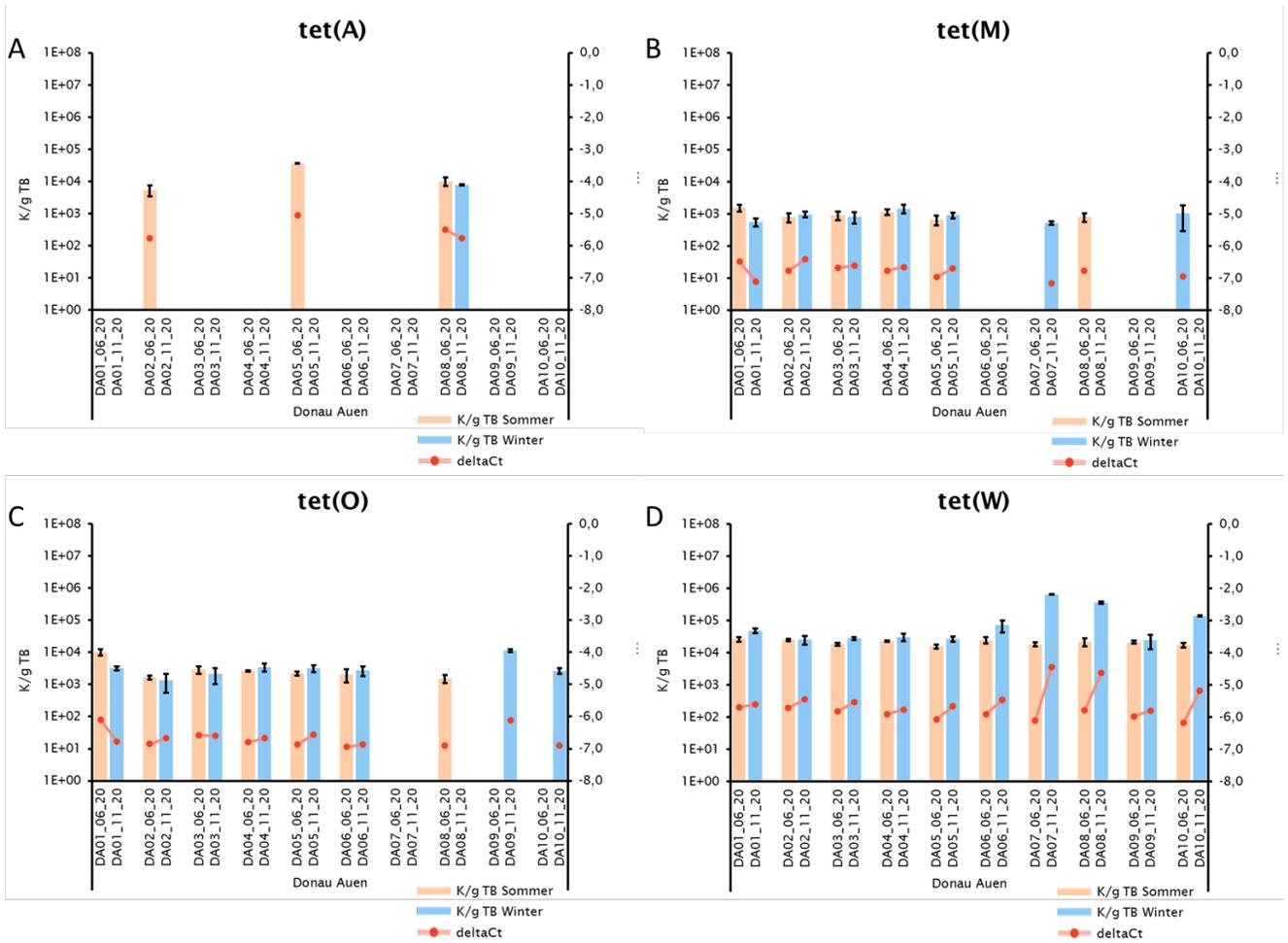


Abbildung 47. *Tet(A)*, *tet(M)*, *tet(O)* und *tet(W)* in den Donau-Auen im Sommer und Winter.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt) auf der sekundären y-Achse.

Von den β -Laktam-Resistenzgenen *bla*_{TEM-1}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{OXA-10} und *mecA* konnte nur *bla*_{TEM-1} detektiert werden (Abbildung 48). *bla*_{TEM-1} wurde in 19 von 20-Proben mit Konzentrationen zwischen 2,3E+02 und 2,2E+03 K/g TB detektiert. Ein wesentlicher saisonaler Unterschied konnte nur bei DA09 festgestellt werden, wo die Winterprobe eine 6-fach höhere Target-Konzentration aufwies als die Sommer-Probe.

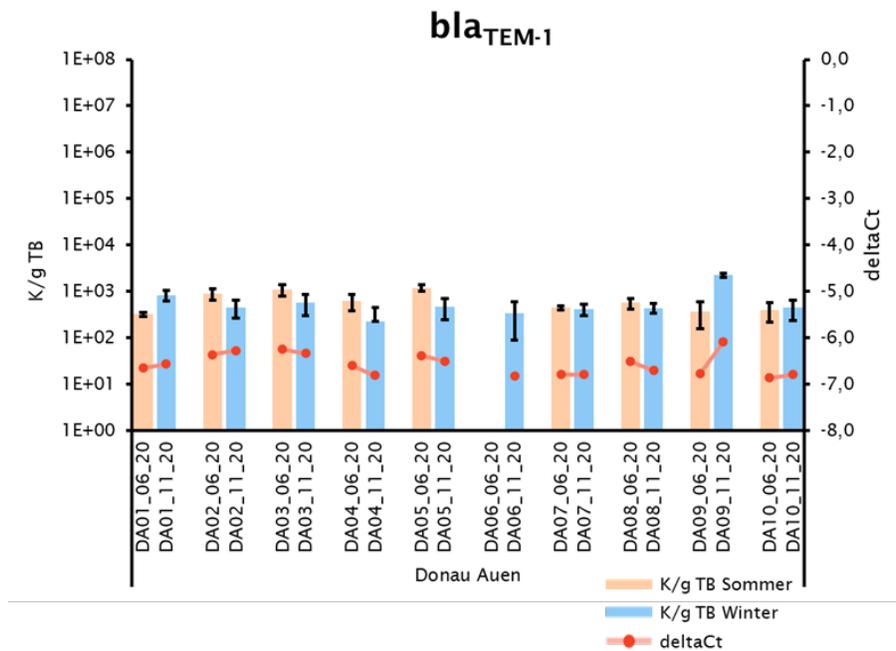


Abbildung 48. *bla*_{TEM-1} in den Donau-Auen im Sommer und Winter.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Das Target *qacEdelta1* konnte nur bei der Sommerprobe von DA01 mit einer Kopienzahl von 3,5E+04 (\pm 2,5E+04) detektiert werden; alle anderen Proben zeigten kein Signal für dieses Target (Daten nicht gezeigt). Das Makrolid-Resistenzgen *ermF*, das Diaminopyrimidin-Target-Ersatz-Gen *dfrA-1*, das Fluorochinolon- Resistenzgen *QnrS*, sowie die β -Lactam-Resistenzgene *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-10} und *mecA* wurden in keiner der 20 Proben aus dem Nationalpark Donau-Auen detektiert.

5.1.4 Saisonaler Vergleich: ARG- und MGE-Konzentrationen an den urbanen Standorten

Im Raum Wien wurde vom **Lainzer Tiergarten** ausgehend über **Prater, Augarten, Volksgarten** und **Hadikpark** bis zu einer Grünfläche an der **Breitenfurter Straße** ein Gradient zunehmender anthropogener Belastung abgedeckt. Im Lainzer Tiergarten und im Prater wurden **Laubwaldflächen** beprobt an den übrigen Standorten **Wiesen**. In den Laubwald-Proben wurden 15 der 27 Targets nachgewiesen, wobei **tet(W)**, **ISPPs** und **intl1** die Targets mit den höchsten Kopienzahlen waren. In den Wiesen-Proben wurden 21 von 27 Targets identifiziert, wobei **intl1**, **tet(W)** und **tet(O)** mit den höchsten Konzentrationen nachgewiesen wurden. Die beta-Laktam Targets **bla_{CTX-M-15}**, **bla_{KPC}**, **bla_{NDM-1}**, **bla_{OXA-10}**, **mecA** sowie auch das Fluorchinolon-Resistenzgen **qnrS** konnten an keinem der 6 Standorte detektiert werden.

Im Raum Wien wurde die ARG- und MGE-Hintergrundbelastung an sechs verschiedenen Standorten untersucht. Die Standorte waren Wiesen im Augarten (AG), Volksgarten (VG) und Hadikpark (HP), ein Wiesenstück neben der Breitenfurter Straße (BS), sowie Laubwaldflächen im Prater (PP) und im Lainzer Tiergarten (LT). Von jedem Standort wurde eine Sommer- und Winter-Probe analysiert. Wie in den Kapiteln 3.3 und 5.1.2 erläutert, sollten die urbanen Proben einen Gradienten anthropogener Belastung darstellen (LT<PP<AG<VG<HP<BS).

Anhand des **16S rRNA** Targets konnten an allen sechs Standorten Bakterienzahlen zwischen $2,1E+09$ und $7,9E+09$ K/g TB ermittelt werden (Abbildung 49).

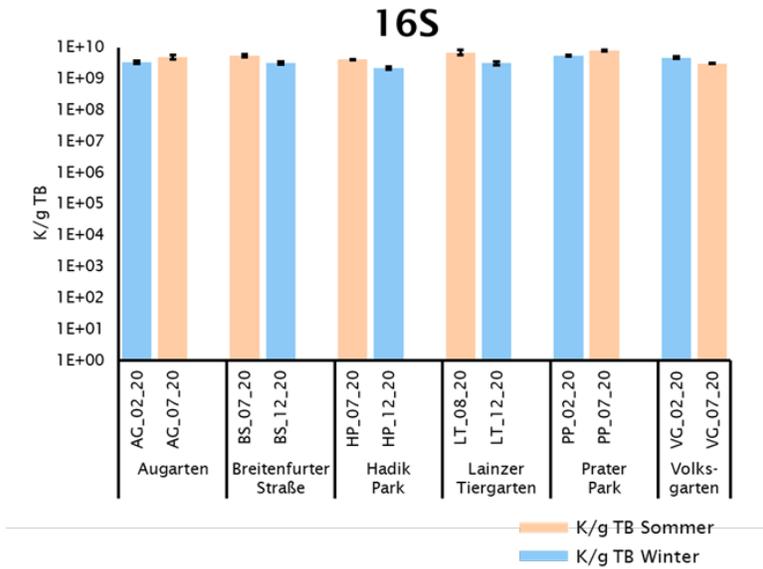


Abbildung 49. *16S rRNA*-Gene in den urbanen Proben im Sommer und Winter. Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate).

Das MGE-assoziierte Integrase-Target *intI1* wurde an allen Standorten im Sommer und Winter nachgewiesen, mit Ausnahme des Lainzer Tiergartens (Abbildung 50). Die positiv-getesteten Proben zeigten Kopienzahlen zwischen 2,1E+04 und 7,9E+04 K/g TB, wobei kein wesentlicher saisonaler Unterschied bemerkbar war.

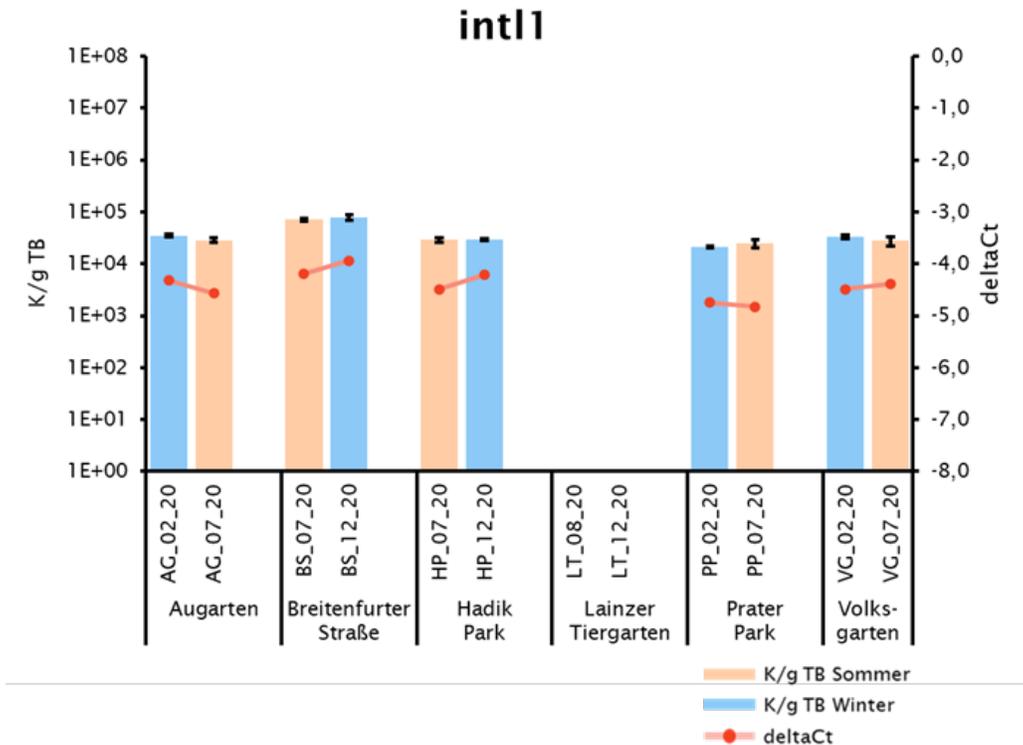


Abbildung 50. *intI1* in den urbanen Proben im Sommer und Winter.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Das MGE-Target *ISPps* wurde an allen 6 Standorten zu beiden Jahreszeiten detektiert. Die Proben von Breitenfurter Straße und Hadikpark hatten niedrigere Konzentrationen als die restlichen 4 Standorte. Insgesamt lag der Schwankungsbereich innerhalb der urbanen Proben zwischen $9,3E+02$ und $2,0E+04$ K/g TB. Ein leichter saisonaler Effekt war nur im Hadikpark sichtbar (Abbildung 51).

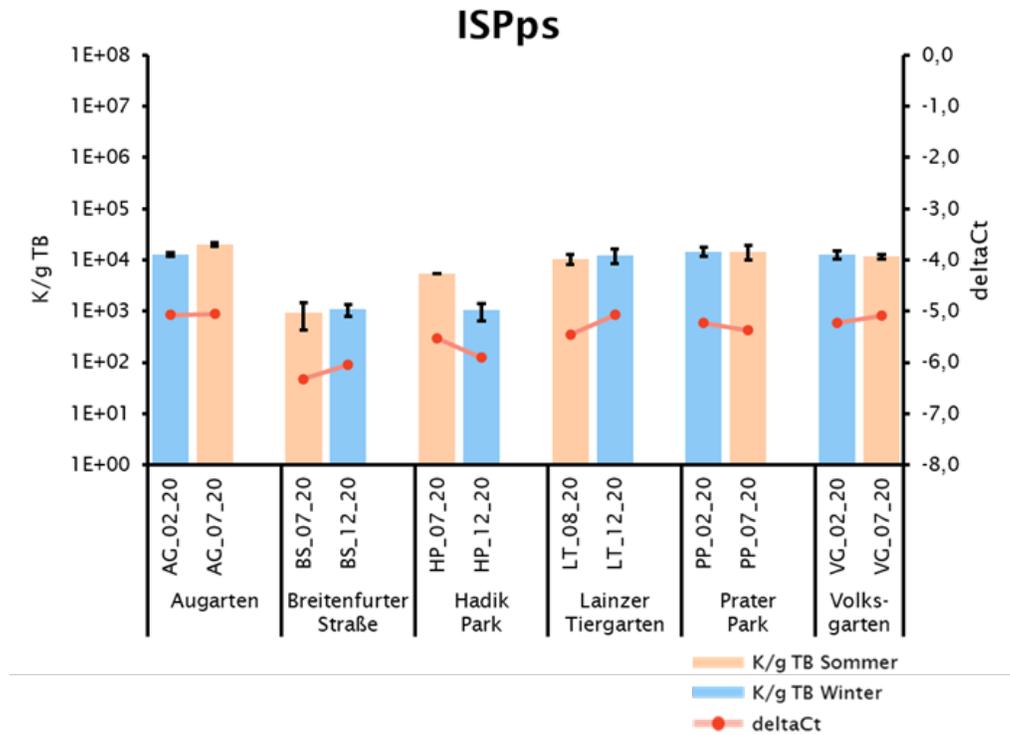


Abbildung 51. *ISPps* in den urbanen Proben im Sommer und Winter.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

QacEdelta1 wurde in den Winter-Proben des Augartens und Volksgartens und in beiden Proben der Breitenfurter Straße nachgewiesen. Die Kopienzahlen an den positiv getesteten Standorten lagen zwischen $1,3E+02$ und $3,5E+04$ K/g TB (Abbildung 52).

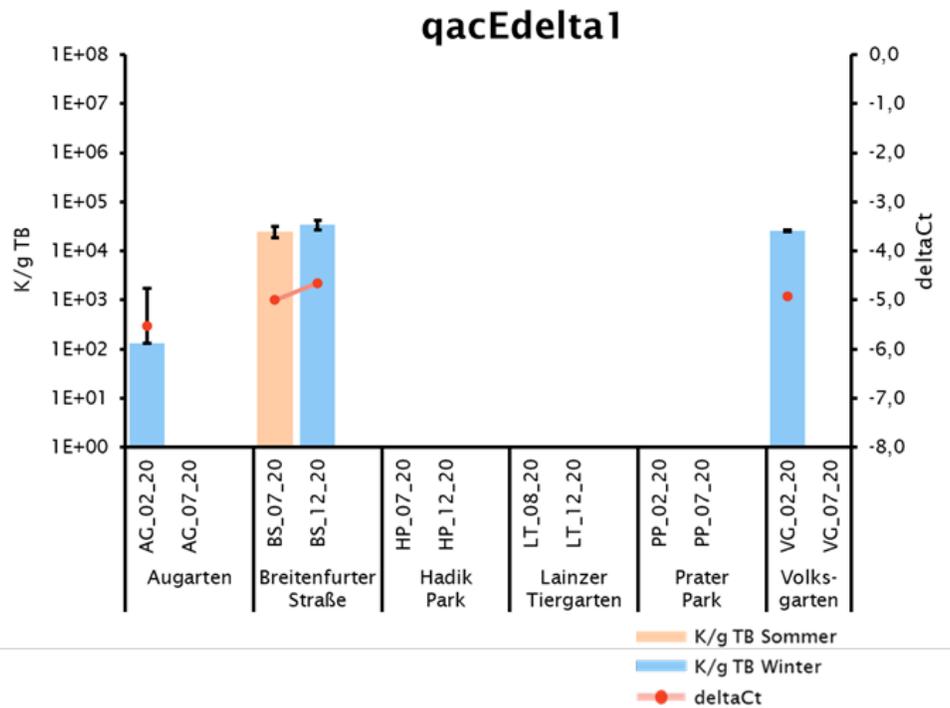


Abbildung 52. *QacEdelta1* in den urbanen Proben im Sommer und Winter.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Von den Aminoglykosid-Resistenzgenen *aadA*, *nptII*, *nptIII* und *strB* wurde kein Target im Lainzer Tiergarten detektiert (Abbildung 53). *AadA* wurde in beiden Proben des Augartens, der Breitenfurter Straße und des Hadikparks, sowie in der Sommerprobe des Praters gemessen, mit Konzentrationen zwischen $3,0E+02$ und $4,2E+03$ K/g TB. *NptII* wurde nur in der Sommer-Probe des Hadikparks sowie in beiden Proben des Volksgartens detektiert, mit Kopienzahlen zwischen $1,4E+03$ und $9,1E+03$ K/g TB. *NptIII* wurde in beiden Proben der Breitenfurter Straße und des Hadikparks detektiert, sowie in der Winter-Probe des Augartens. Hier lagen die Kopienzahlen zwischen $1,1E+02$ und $1,6E+03$ K/g TB. *StrB* wurde in beiden Proben von Augarten- und Breitenfurter Straße sowie in der Sommer-Probe des Hadikparks nachgewiesen. Die Konzentrationen lagen zwischen $5,3E+02$ und $3,9E+03$ K/g TB.

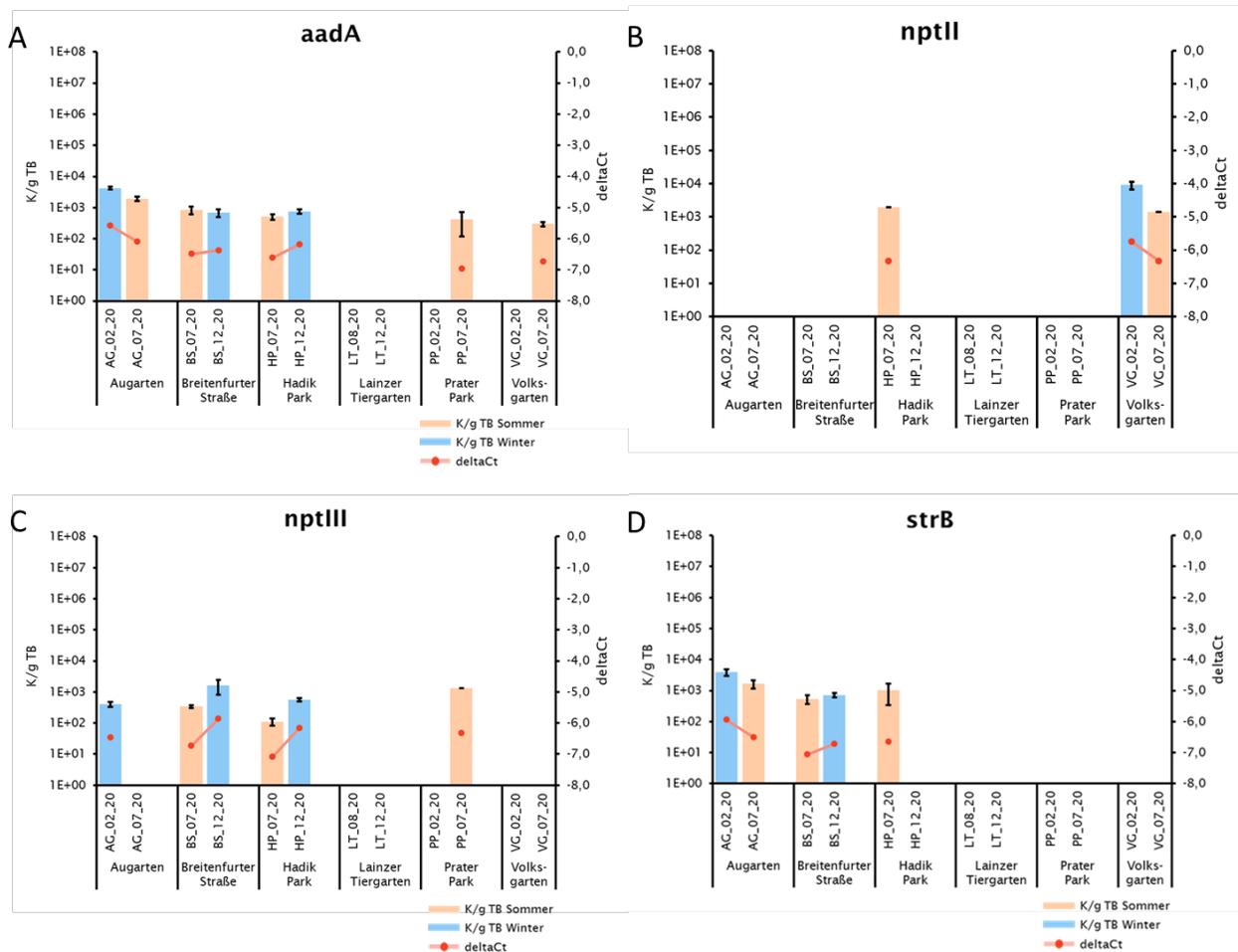


Abbildung 53. *AadA*, *nptII*, *nptIII* und *strB* in den urbanen Proben im Sommer und Winter.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Das Diaminopyrimidin-Resistenzgen *dfrA-1* konnte nur in 2 Proben detektiert werden: In der Winter-Probe der Breitenfurter Straße mit $7,5E+02$ (SD $\pm 9E+02$) K/g TB und in der Sommer-Probe des Lainzer Tiergartens mit einer hohen Standardabweichung ($4,9E+02 \pm 4,7E+02$ K/g TB). Alle anderen Proben waren negativ (Abbildung 54).

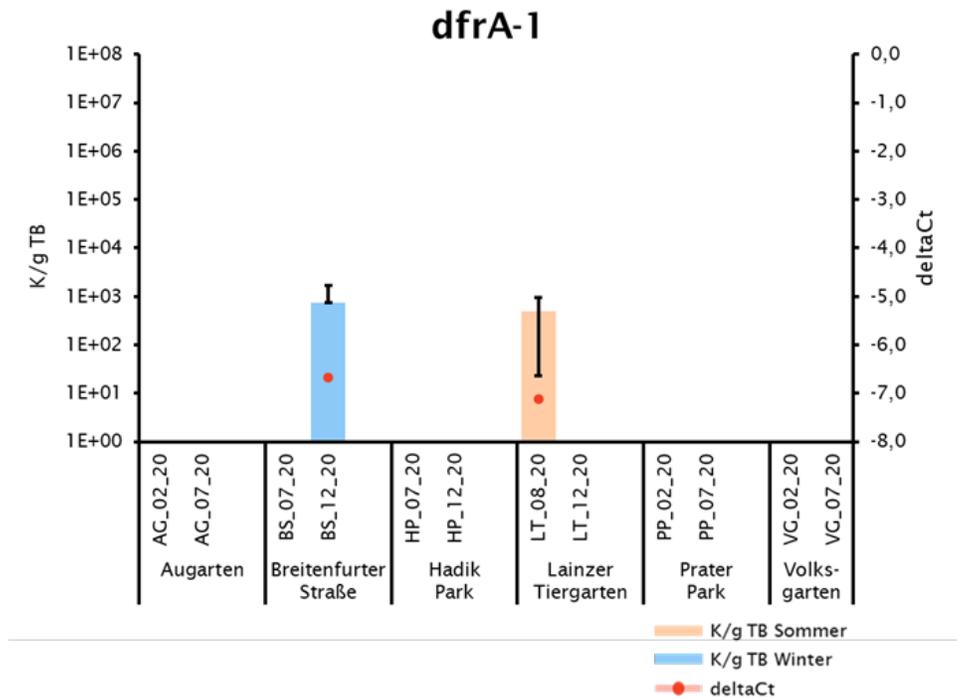


Abbildung 54. *DfrA-1* in den urbanen Proben im Sommer und Winter.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Das Chloramphenicol-Resistenzgen ***CmxA*** wurde in allen Wiesen-Proben zu beiden Jahreszeiten nachgewiesen, während in den Laubwäldern nur in den Sommer-Proben positive Signale festgestellt wurden (Abbildung 55). Hier ergab sich eine Konzentrationsschwankungsbreite von $5,3E+03$ bis $1,9E+04$ K/g TB.

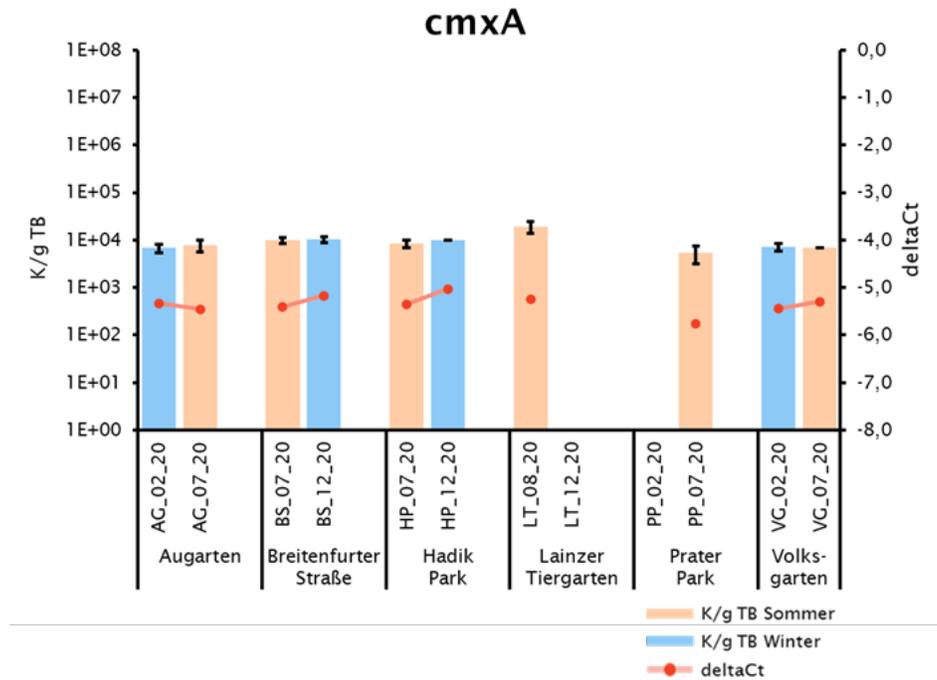


Abbildung 55. *CmxA* in den urbanen Proben im Sommer und Winter.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Das Fluoroquinolon-Target ***qnrS*** konnte an keinem Standort zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden.

Das Glykopeptid-Resistenzgen *vanA* wurde an allen sechs Standorten zu beiden Jahreszeiten detektiert (Abbildung 56). Die Kopienzahlen lagen zwischen $3,0E+02$ und $6,0E+03$ K/g TB. Das Target zeigte keine jahreszeitlichen Schwankungen, aber Unterschiede zwischen den Standorten. Die Augarten-Proben besaßen die höchste *vanA*-Konzentration, gefolgt vom Lainzer Tiergarten.

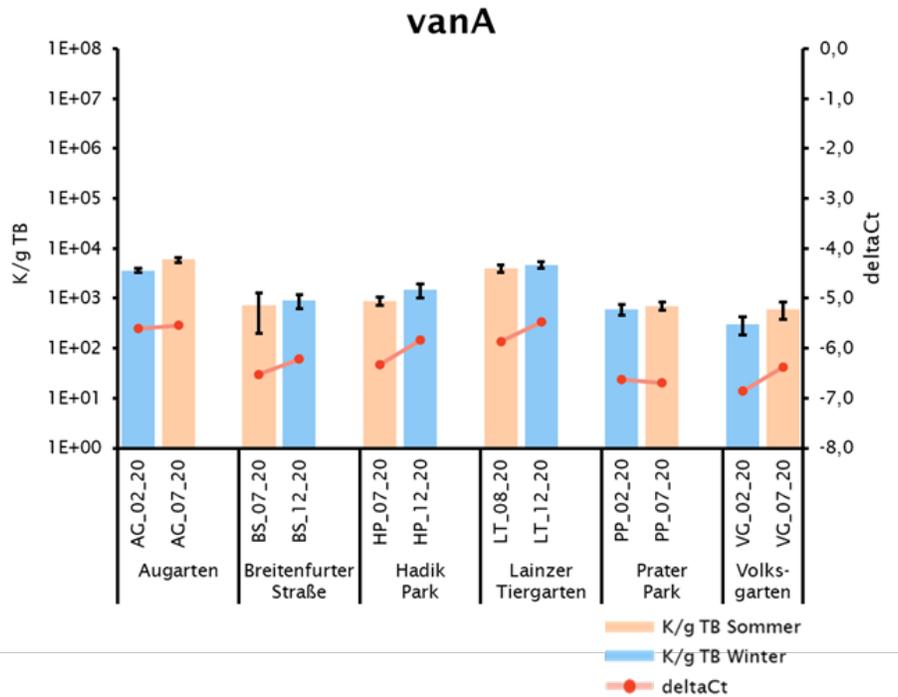


Abbildung 56. *VanA* in den urbanen Proben im Sommer und Winter.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Das Makrolid-Resistenzgen *ermB* wurde in allen getesteten Proben detektiert, wobei keine eindeutigen Unterschiede zwischen Sommer- und Winter-Proben festgestellt werden konnten (Abbildung 57). Die höchsten Konzentrationen wurden bei der Breitenfurter Straße detektiert, wobei die generelle Schwankungsbreite zwischen $3,1E+02$ und $2,9E+03$ K/g TB lag.

Das zweite getestete Makrolid-Resistenzgen *ermF* konnte an allen Standorten bis auf die Breitenfurter Straße nachgewiesen werden. Die höchsten Konzentrationen wurden im Prater zu beiden Jahreszeiten detektiert, gefolgt vom Augarten.

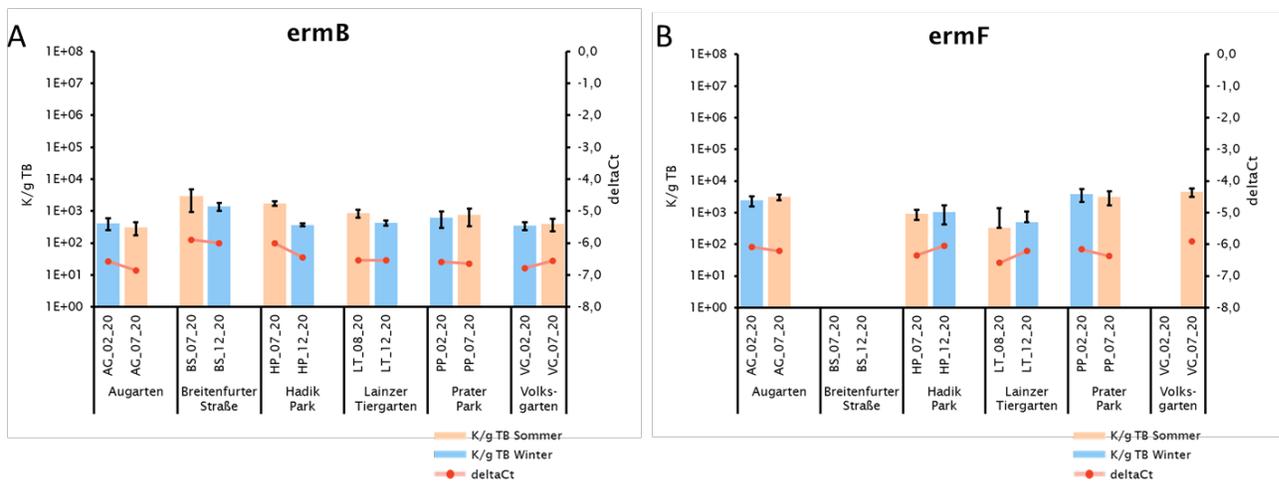


Abbildung 57. *ErmB* und *ermF* in den urbanen Proben im Sommer und Winter.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt) auf der sekundären y-Achse.

Das Streptothricin-Resistenzgen *sat-4* wurde an allen Standorten gemessen, wobei die Laubwald-Proben nur im Sommer ein Signal aufwiesen und im Hadikpark lediglich im Winter ein Signal detektiert wurde (Abbildung 58). Die Konzentrationen lagen zwischen $3,0E+02$ und $2,8E+03$ K/g TB.

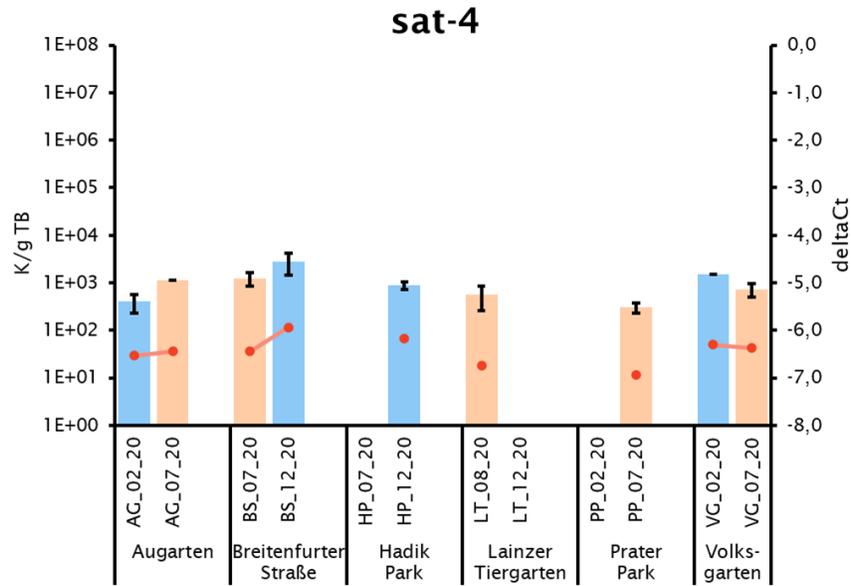


Abbildung 58. *Sat-4* in den urbanen Proben im Sommer und Winter.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Das Colistin-Resistenzgen *mcr-1* wurde im Augarten, Volksgarten und Hadikpark zu beiden Jahreszeiten mit vergleichbaren Kopienzahlen nachgewiesen, während beim Lainzer Tiergarten und bei der Breitenfurter Straße nur die Winter-Proben und beim Prater nur die Sommer-Probe ein Signal lieferten (Abbildung 59). Die *mcr-1* Konzentrationen in den urbanen Proben lagen zwischen $6,7E+02$ und $2,1E+03$ K/g TB.

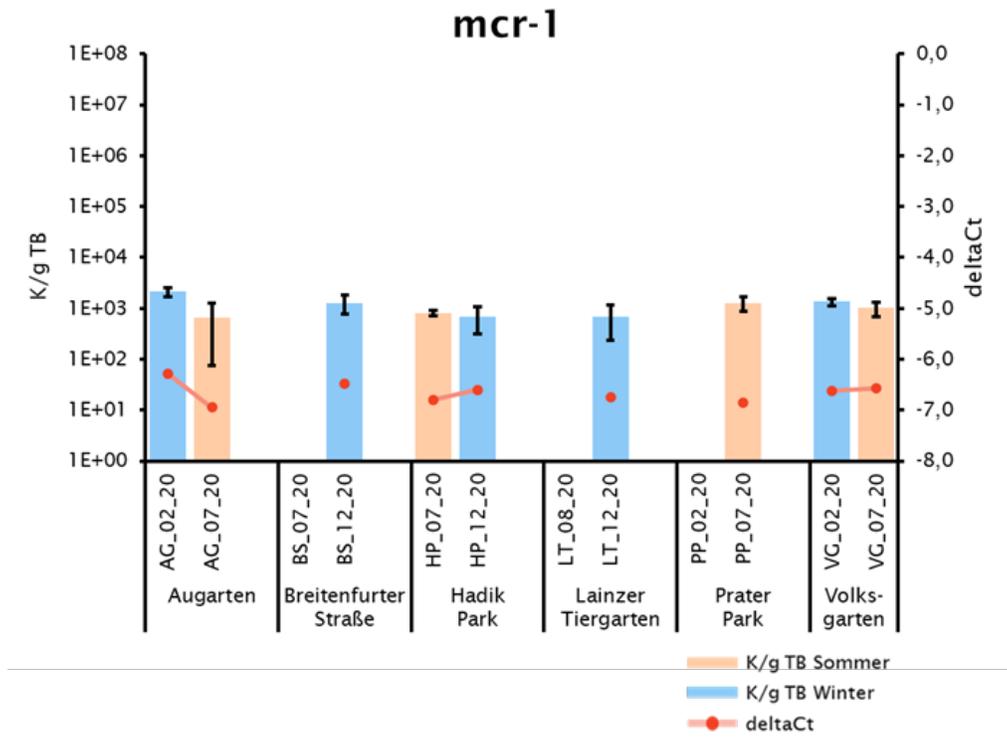


Abbildung 59. *Mcr-1* in den urbanen Proben im Sommer und Winter.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Das *sul1*-Target kodiert für Resistenzen gegen die Klasse Sulfonamid-Antibiotika und wurde an fünf Standorten zu beiden Jahreszeiten identifiziert (Abbildung 60). Die Ausnahme bildete der Lainzer Tiergarten, wo nur die Sommer-Probe ein positives Ergebnis aufwies. Die Breitenfurter Straße zeigte 10- bis 100-fach höhere *sul1*-Konzentrationen im Vergleich zu den restlichen Standorten. Im Volksgarten hatte die Winterprobe eine 9,7-fach höhere *sul1*-Kopienzahl als die Sommer-Probe. Der Konzentrations-Schwankungsbereich lag zwischen 3,2E+02 und 1,7E+04 K/g TB.

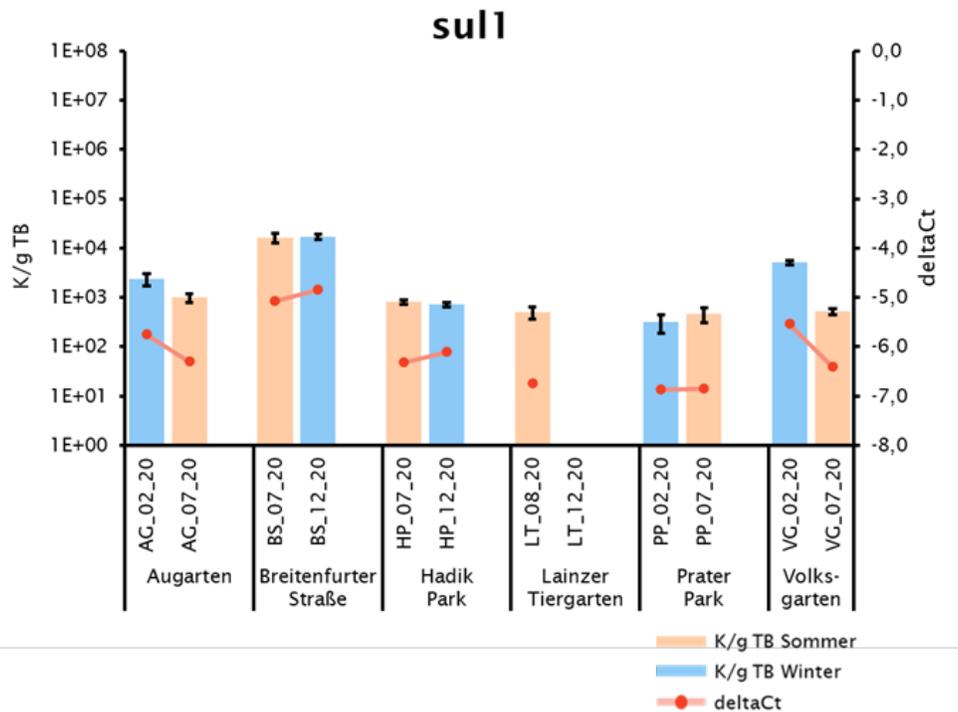


Abbildung 60. *Sul1* in den urbanen Proben im Sommer und Winter.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Von den 4 Tetrazyklin-Resistenz-Targets wurden *tet(A)*, *tet(M)* und *tet(O)* in keiner Probe der Laubwald-Standorte Lainzer Tiergarten und Prater detektiert (Abbildung 61). ***Tet(A)*** wurde an allen urbanen Wiesenstandorten im Sommer und Winter detektiert. Im Hadikpark wurde ein saisonaler Unterschied festgestellt, mit einer 62-fach höheren Kopienzahl im Winter als im Sommer. Auch im Augarten war die Konzentration im Winter tendenziell höher. Breitenfurter Straße und Volksgarten zeigten zu beiden Jahreszeiten die gleichen Konzentrationen. Bei ***tet(M)*** war im Volksgarten nur die Sommerprobe positiv, bei den übrigen Wiesen-Standorten konnte kein wesentlicher saisonaler Unterschied detektiert werden. Die gemessenen Konzentrationen variierten zwischen $3,0E+02$ und $4,7E+03$ K/g TB. Bei ***tet(O)*** wurden Werte zwischen $1,8E+03$ und $7,2E+04$ K/g TB gemessen mit der höchsten Konzentration bei der Breitenfurter Straße, gefolgt vom Augarten. Die saisonalen Unterschiede waren nicht bemerkenswert. ***Tet(W)*** konnte an allen 6 Standorten zu beiden Jahreszeiten mit stabilen Konzentrationen zwischen $9,3E+03$ und $4,3E+04$ K/g TB nachgewiesen werden.

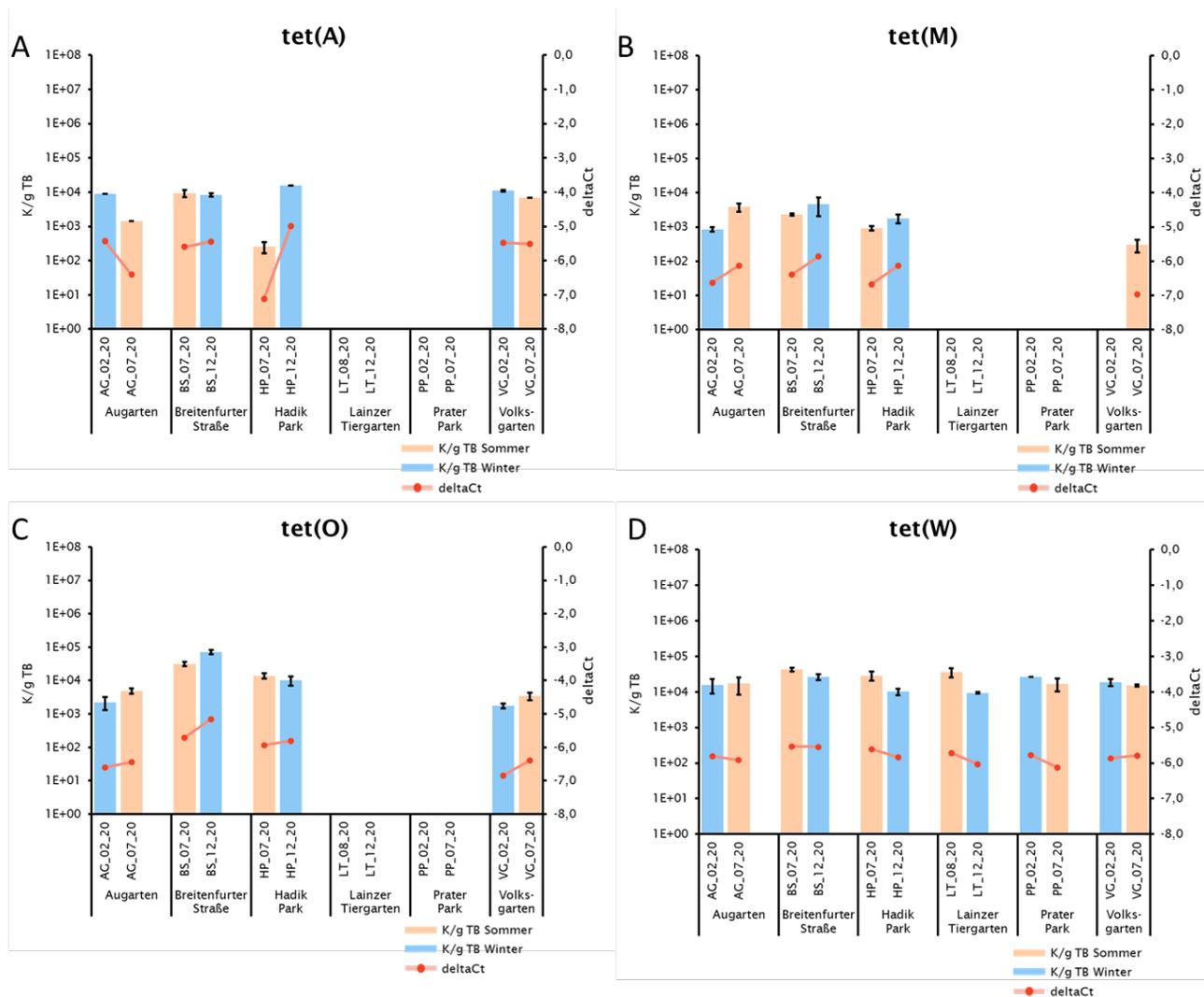


Abbildung 61. *Tet(A)*, *tet(M)*, *tet(O)* und *tet(W)* in den urbanen im Sommer und Winter.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Für die β -Laktam-Resistenzgene *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM-1}*, *bla_{OXA-10}* und *mecA* wurden keine positiven Signale generiert (Abbildung 62). Lediglich *bla_{TEM-1}* wurde in allen Proben detektiert, mit Ausnahme der Sommerprobe des Augartens. Das Target hatte konstante Werte von 2,9E+02 bis 9,9E+02 K/g TB an den einzelnen Standorten.

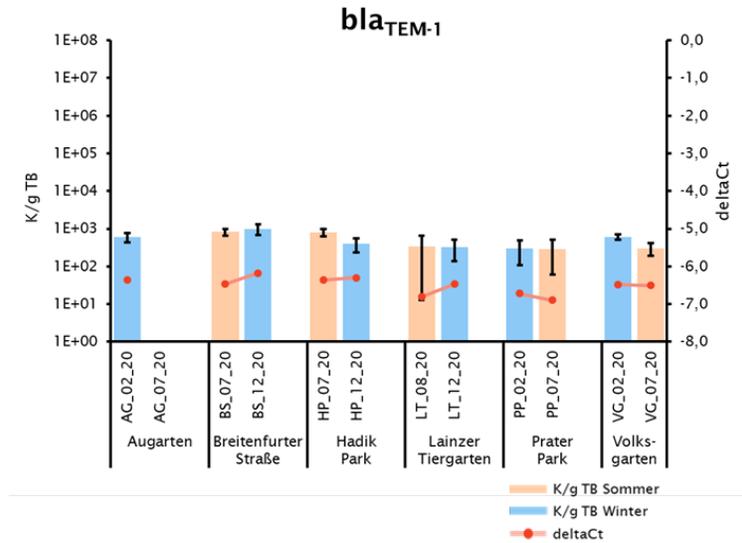


Abbildung 62. *Bla_{TEM-1}* in den urbanen Proben im Sommer und Winter.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

5.1.5 ARG- und MGE-Konzentrationen in österreichischen Nadelwäldern

Im Wiener Becken und im alpinen Bereich des Ötschers wurden **Nadelwaldstandorte** untersucht. Am **Ötscher** wurden **12 Targets** detektiert (*bla_{TEM-1}*, *cmxA*, *dfrA-1*, *ermB*, *intl1*, *ISPs*, *strB*, *sul1*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(W)*, *vanA*), während in den Nadelwäldern des **Wiener Beckens** nur **8 Targets** (*cmxA*, *ermB*, *intl1*, *ISPs*, *tet(A)*, *tet(W)*, *vanA*, *mcr-1*) nachgewiesen wurden. An keiner der 8 Probenentnahme-Stellen konnten die Targets *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM-1}*, *bla_{OXA-10}*, *ermF*, *mecA*, *aadA*, *nptII*, *nptIII*, *qacEdelta1*, *qnrS* und *sat-4* nachgewiesen werden.

Zusätzlich zum HOAL-Nadelwald NF wurden Nadelwaldstandorte im Ötschergebiet und im Wiener Becken untersucht. Am **Ötscher** wurden im Juli 2020 Bodenproben auf 3 unterschiedlichen Höhenstufen gezogen. Oe1 war ein Kieferwald-Standort auf 1600 m, Oe2 ein Wiesenstandort auf 1500 m und Oe3 ein Fichtenwald-Standort auf 1400 m Seehöhe. Bei den Standorten im **Wiener Becken** wurde entlang der Strecke von Wöllersdorf (WD) über in Neusiedl am Steinfeld (StA, StB) und Hohe Wand (HW) bis Neusiedl/Ochsenhaid (ND) auf immer naturnähere Böden abgezielt.

Beim **16S rRNA** Target, dem Surrogat-Marker für die Gesamtanzahl an Bakterien, konnte man einen leichten Anstieg mit zunehmender Höhenstufe erkennen (Abbildung 63). Dieser musste bei der Quantifizierung der ARG- und MGE-Targets berücksichtigt werden. Die Proben vom Wiener Becken hatten alle eine ähnliche 16S Kopienzahl wie Oe3. Die Schwankungsbreite befand sich zwischen 3,1E+08 und 5,6E+09 K/g TB.

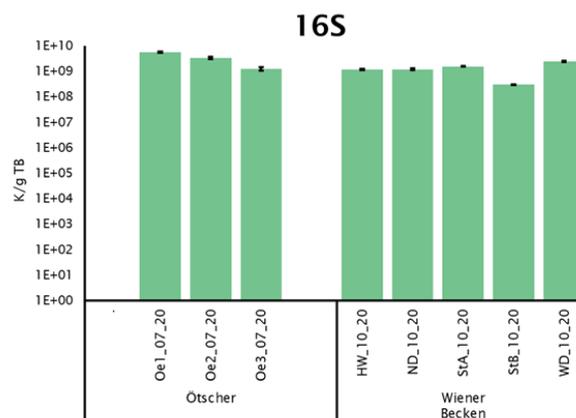


Abbildung 63. 16S rRNA-Gen Konzentrationen in österreichischen Nadelwäldern.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate).

Das Integrase-Gen *intl1* konnte in den zwei tieferen Lagen am Ötscher sowie an zwei Standorten im Wiener Becken detektiert werden, mit Konzentrationen zwischen 1,5E+04 und 3,2E+04 K/g TB (Abbildung 64).

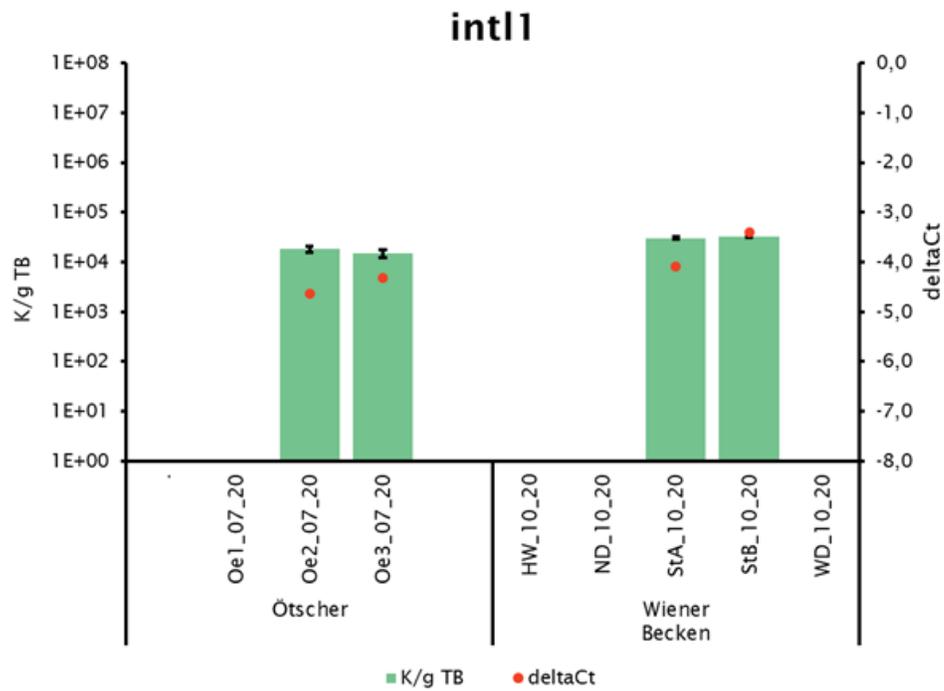


Abbildung 64. *Int1* in österreichischen Nadelwäldern.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Die Insertionssequenz *ISPps* wurde an allen Probestellen erfasst, mit Konzentrationen zwischen $5,2E+02$ und $9,0E+03$ K/g TB (Abbildung 65). Bei den Ötscher-Proben war in der absoluten Quantifizierung mit steigenden Höhenmetern ein Anstieg der Kopienzahl zu sehen. Dieser Trend bestätigte sich in der relativen Quantifizierung jedoch nicht, da mit der Seehöhe auch die Kopienzahl des Referenzgens *16S rRNA* stieg (Abbildung 63). Mit der Höhenstufe stieg also die Gesamtanzahl der Bakterien, während der Anteil an Trägern des *ISPps*-Gens konstant blieb. Die Proben aus dem Wiener Becken hatten tendenziell höhere *ISPps*-Konzentrationen als die Proben vom Ötscher.

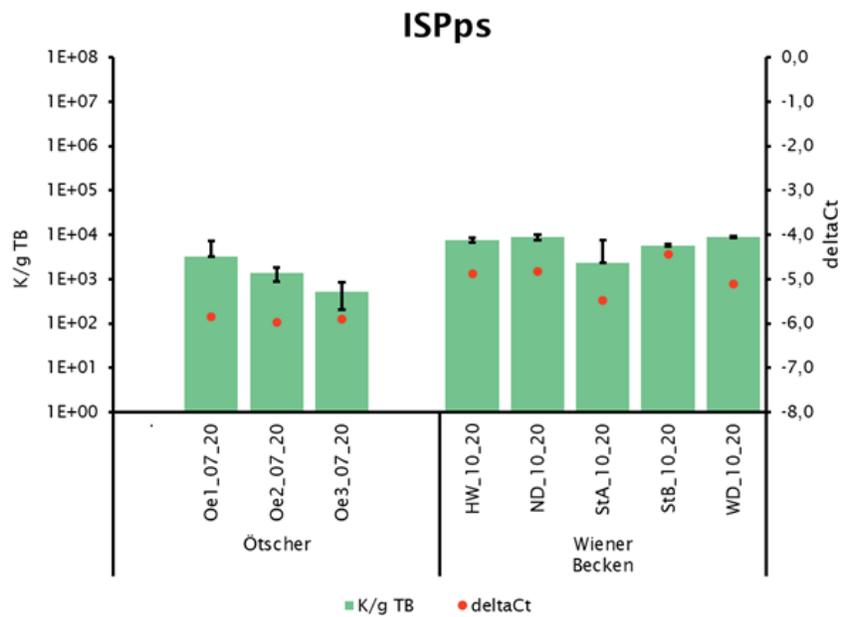


Abbildung 65. *ISPps* in österreichischen Nadelwäldern.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Von den 4 untersuchten Aminoglykosid-Resistenzgenen (*aadA*, *nptII*, *nptIII* und *strB*) wurde einzig *strB* in der Probe Oe3 Proben nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Das Diaminopyrimidin-Resistenzgen *dfrA-1* konnte lediglich an 2 Stellen am Ötscher detektiert werden. Die positiv getesteten Proben lagen zwischen $4,9E+02$ und $6,4E+02$ K/g TB (Abbildung 66).

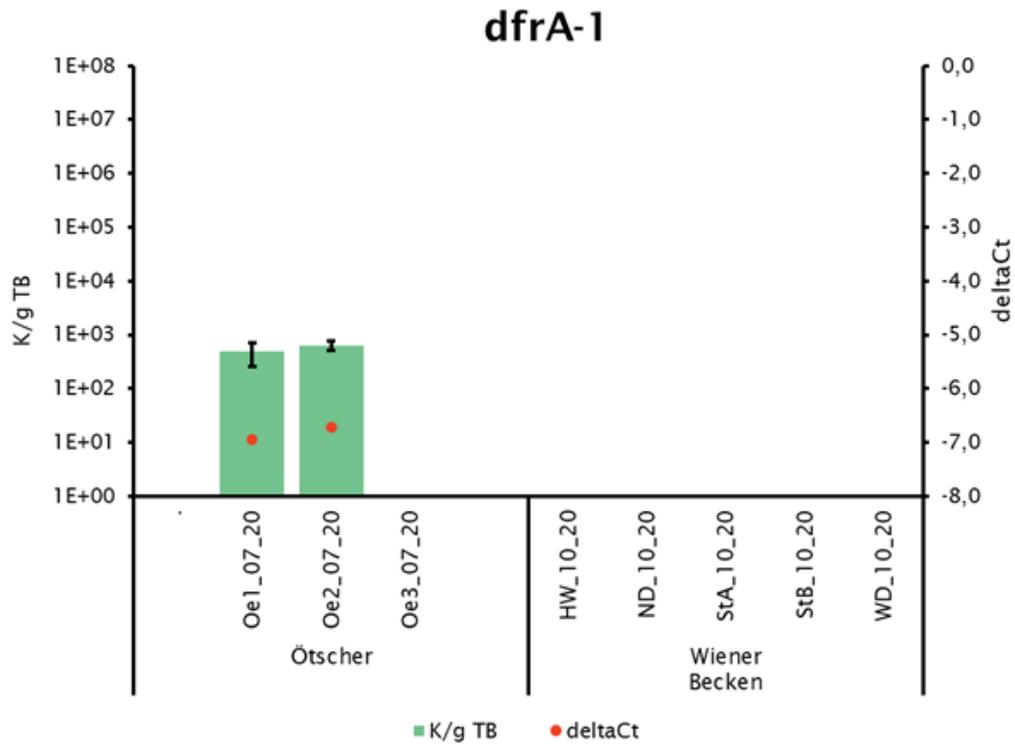


Abbildung 66. *DfrA-1* in österreichischen Nadelwäldern.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

CmxA, das Chloramphenicol-Resistenzgen, konnte in 7 der 8 Proben nachgewiesen werden. Die positiven Werte lagen in einem Schwankungsbereich zwischen $2,6E+03$ und $2,8E+04$ K/g TB (Abbildung 67). Die Standorte Oe2, StA und StB hatten die höchsten Messwerte.

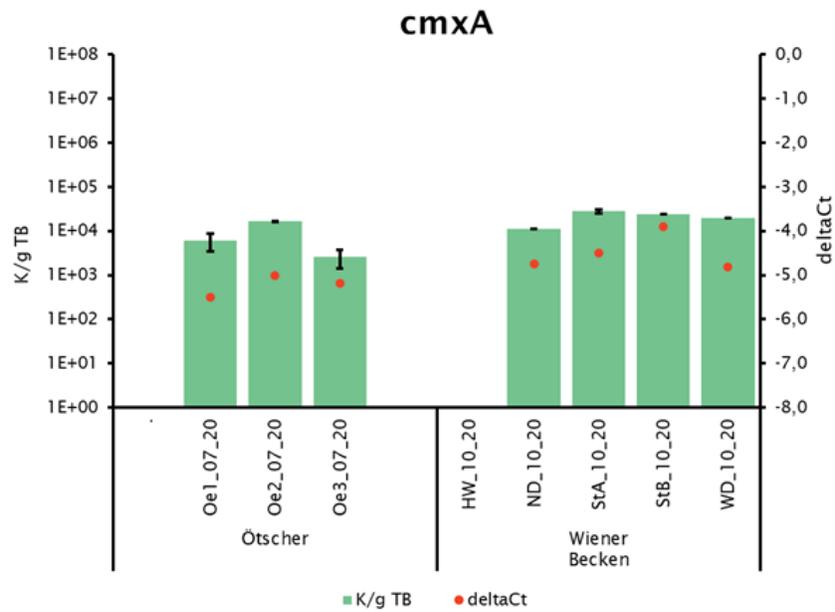


Abbildung 67. *CmxA* in österreichischen Nadelwäldern.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Das Fluorochinololon-Resistenzgen **qnrS** konnte in keiner der 8 Proben nachgewiesen werden.

Das Vancomycin-Resistenzgen *vanA* wurde in allen drei Ötscherproben und in zwei Proben aus dem Wiener Becken gemessen, mit Kopienzahlen zwischen $7,8E+02$ und $3,4+03$ K/g TB (Abbildung 68). Bei den Ötscher-Proben wurde in der absoluten Quantifizierung wieder ein leichter Konzentrationsanstieg mit der Seehöhe festgestellt. Dieser Trend bestätigte sich in der relativen Quantifizierung nicht, da mit der Seehöhe auch die Kopienzahl des Referenzgens *16S rRNA* stieg (Abbildung 63). Mit der Höhenstufe stieg also die Gesamtanzahl der Bakterien, während der Anteil an Trägern *vanA*-Gens konstant blieb.

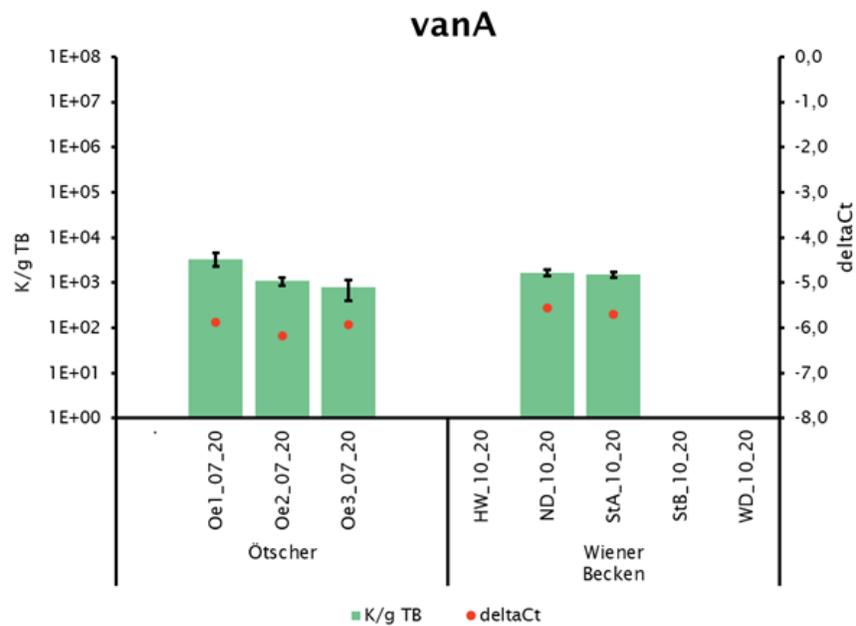


Abbildung 68. *VanA* in österreichischen Nadelwäldern.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Bei den Makrolid-Resistenzgenen wiesen alle Proben ein positives Signal für *ermB* auf, während sie für *ermF* negativ getestet wurden (Abbildung 69). Die *ermB*-Konzentrationen lagen im Bereich zwischen $2,4E+02$ und $5,7E+03$ K/g TB. Bei den Ötscher-Proben hatte wieder der niedrigste Standort (Oe3) den geringsten Wert in der absoluten Quantifizierung, bei der relativen Quantifizierung waren Oe1, Oe2 und Oe3 jedoch sehr ähnlich.

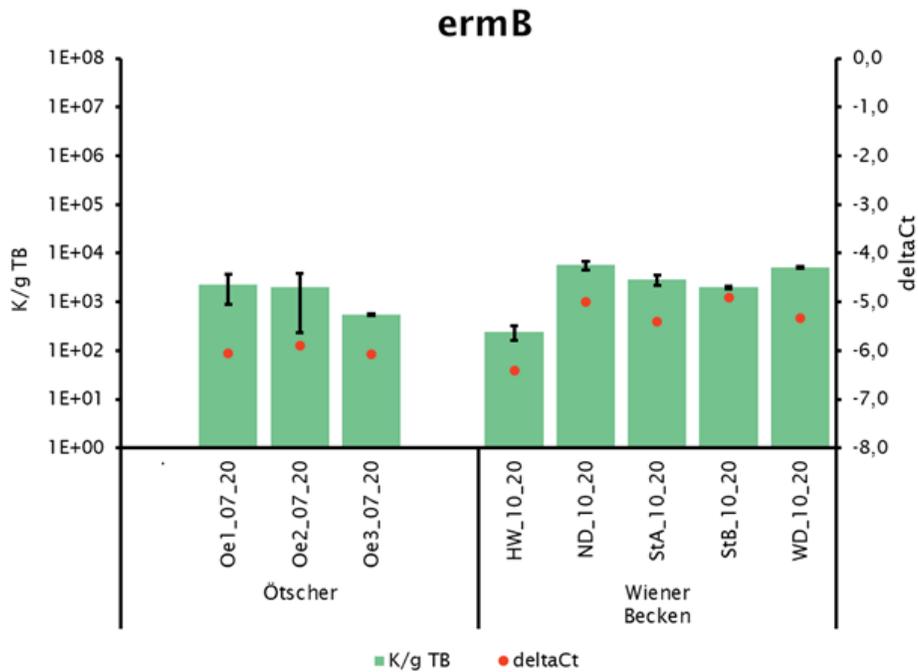


Abbildung 69. *ErmB* in österreichischen Nadelwäldern.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Das Streptothricin-Resistenzgen *sat-4* konnte in keiner der Ötscher- und Wiener Becken-Proben nachgewiesen werden.

Das Colistin-Resistenzgen *mcr-1* konnte in allen Proben aus dem Wiener Becken gemessen werden, jedoch in keiner Ötscher-Probe (Abbildung 70). In allen positiv-getesteten Proben wurden ähnliche Konzentrationen gemessen, mit Werten zwischen $5,4E+02$ und $1,5E+03$ K/g TB.

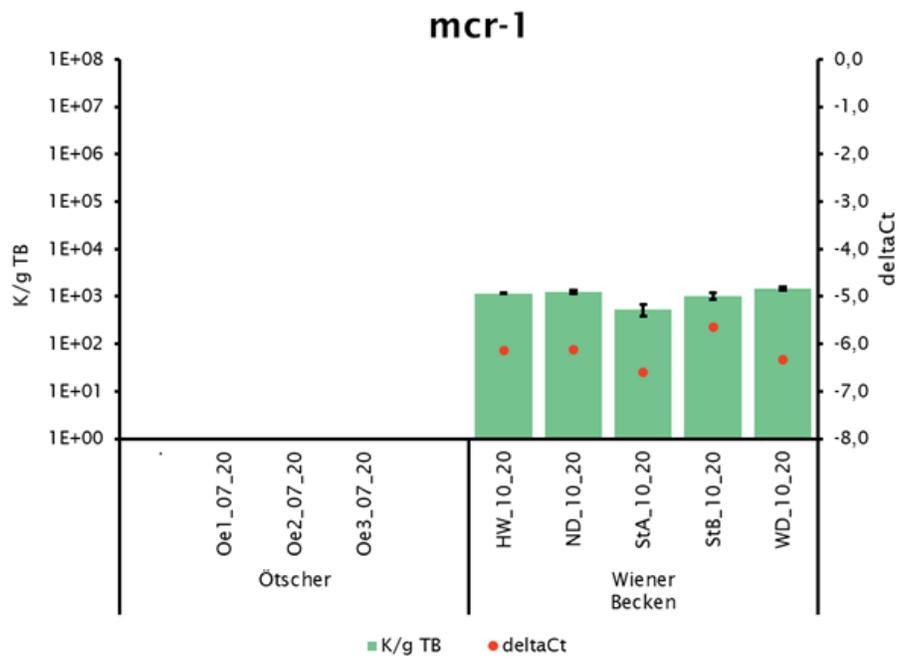


Abbildung 70. *Mcr-1* in österreichischen Nadelwäldern.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Das Sulfonamid-Resistenzgen *sul1* wurde im Gegensatz zu *mcr-1* in allen drei Ötscher-Proben detektiert und in keiner der 5 Wiener Becken Proben (Abbildung 71). Die Ötscher-Proben hatten eine durchschnittliche Kopienzahl von $7,0E+02$ (SD $\pm 3,3E+02$) K/g TB.

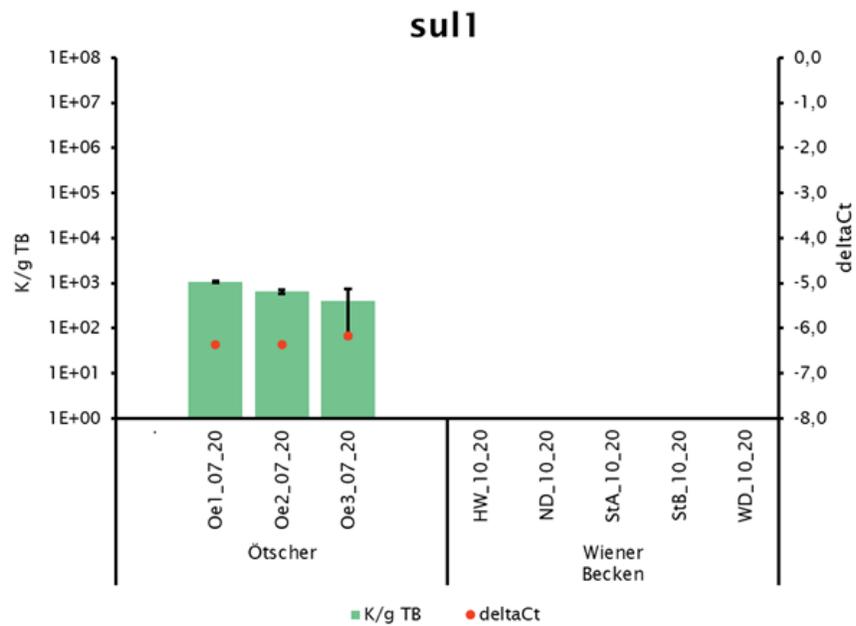


Abbildung 71. *Sul1* in österreichischen Nadelwäldern.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Die Tetrazyklin-Resistenzgene *tet(A)*, *tet(M)*, *tet(O)* und *tet(W)* wurden mit unterschiedlichen Verteilungsmustern nachgewiesen (Abbildung 72). Während *tet(A)* nur in 2 der Proben aus dem Wiener Becken nachgewiesen werden konnte, wurden *tet(M)* und *tet(O)* nur im Ötscher Gebiet detektiert. *Tet(W)* wurde in 2 Ötscher-Proben und in 2 Proben aus dem Wiener Becken gemessen. Die Konzentrationen lagen bei *tet(A)* zwischen $3,7E+03$ und $1,3E+04$ K/g TB, bei *tet(M)* zwischen $2,6E+03$ und $4,9E+03$ K/g TB, bei *tet(O)* zwischen $7,6E+03$ und $9,2E+03$ K/g TB und bei *tet(W)* zwischen $7,8E+02$ und $3,4E+03$ K/g TB.

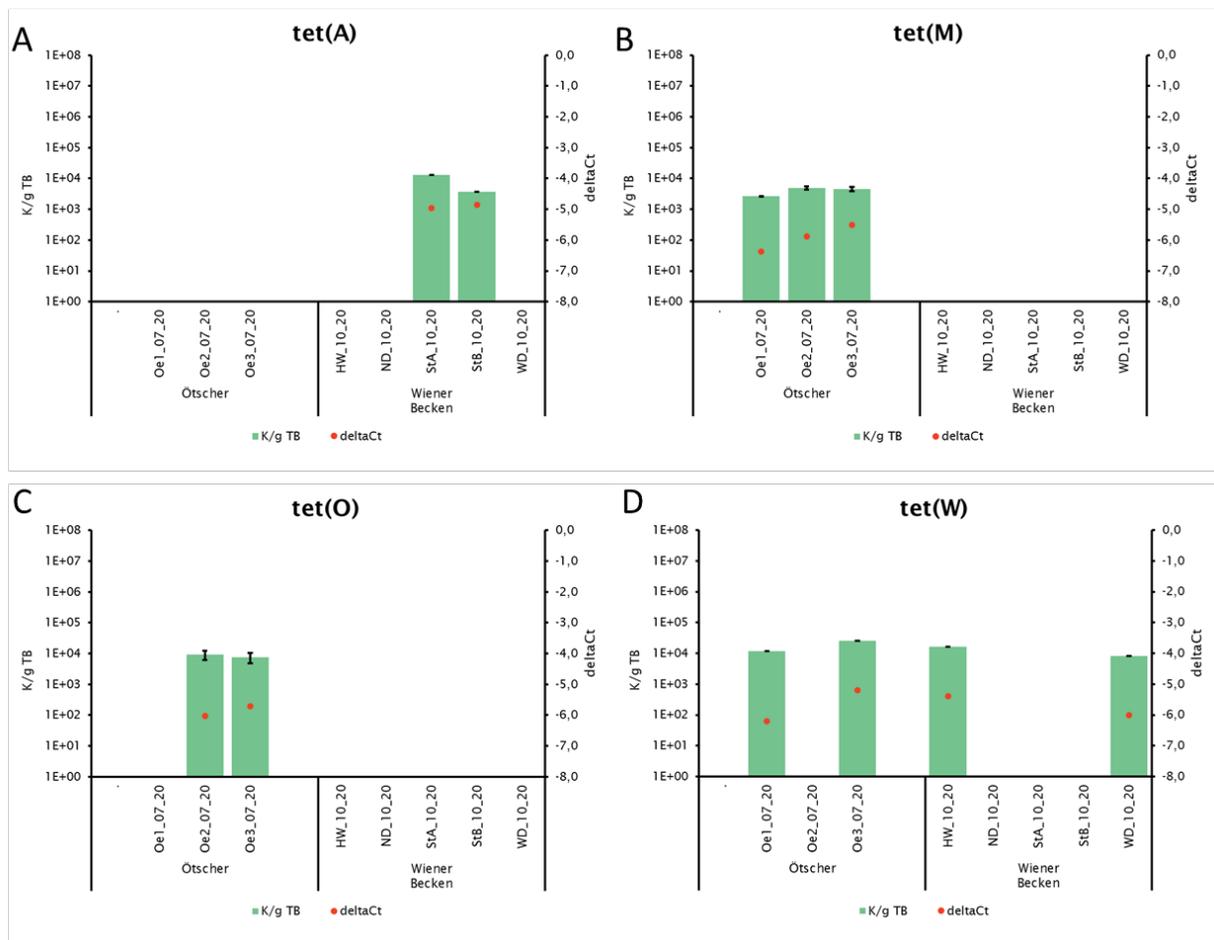


Abbildung 72. *Tet(A)*, *tet(M)*, *tet(O)* und *tet(W)* in österreichischen Nadelwäldern.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Bei den β -Laktam-Resistenzgenen konnten nur für *bla_{TEM-1}* positive Signale ermittelt werden, mit Werten zwischen $4,6E+02$ und $1,2E+03$ K/g TB nahe an der Detektionsgrenze (Abbildung 73). Die Targets *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{NDM-1}*, *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-10}* und *mecA* konnten in keiner der Proben nachgewiesen werden.

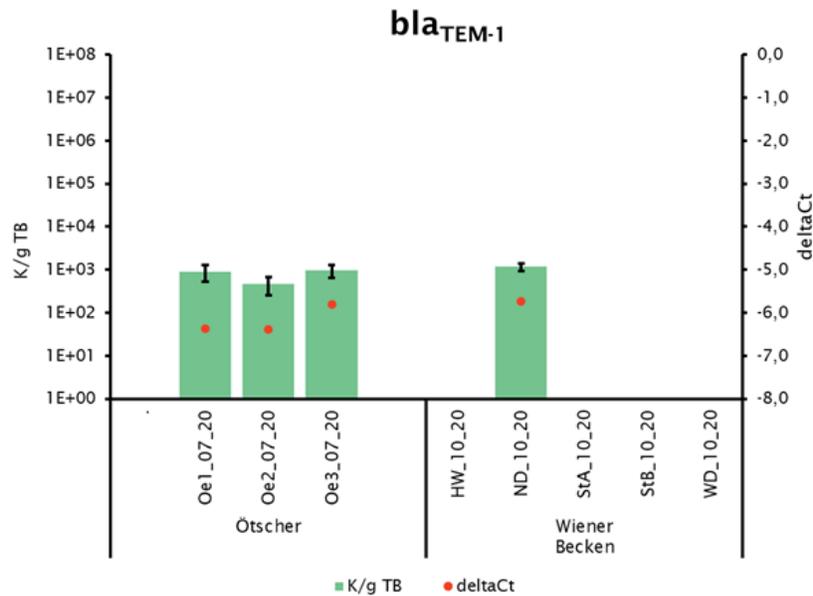


Abbildung 73. *Bla_{TEM-1}* in österreichischen Nadelwäldern.

Kopien pro Gramm Trockenboden (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

5.1.6 ARG- und MGE-Konzentrationen in HOAL-Drainage- und -Bachwasser

Das Drainage-System der HOAL-Felder und der es aufnehmende Bach wurden an 10 Zeitpunkten untersucht. In beiden Gewässer-Typen wurden 18 verschiedene Resistenzgen-Targets identifiziert, wobei die genetischen Elemente *intl1* und *ISPs* die höchsten Konzentrationen aufwiesen, gefolgt von *tet(W)*. Die Targets *aadA*, *bla_{OXA-10}*, *cmxA*, *ermB*, *intl1*, *nptIII*, *qacEdelata1*, *sat-4*, *strB*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(W)* und *vanA* wurden öfter in Bach-Proben detektiert als in den Drainage-Proben. Die Gülle-Düngung des nächstgelegenen Feldes F39 hatte **keinen** wesentlichen Einfluss auf die ARG- und MGE-Konzentrationen im Abwasser.

Im HOAL-Gebiet wurde neben Boden-, Kompost-, Schweine Kot- und Schweinegülle-Proben auch Oberflächenwasser untersucht. Hierbei wurden Proben aus einem F04- und F39-nahe gelegenen Bach und Drainage-Proben zu zehn Zeitpunkten gezogen. Diese Probenziehung wurden mit der Gülledüngung von F39 abgestimmt. Auf diese Weise sollte der Ausbreitungsweg von ARGs vom Tier über die Gülle in den Boden und von dort in die Wassersäule erfasst werden. Schweinekot und Gülle stammten aus einem vor Ort ansässigen Schweinezucht-Betrieb. Die Gülle wurde im HOAL zur Düngung eingesetzt. Die Drainage-Wasserproben wurden am Ende des Drainagesystems der HOAL-Ackerflächen entnommen. Das Bachwasser wurde stromabwärts aus einem Bach entnommen, in den das Drainagewasser eingeleitet wird. Über eine Anbausaison verteilt wurden 10 Wasser-Probenahmen durchgeführt. Die Probenahmen fanden in zeitlicher Relation zur Gülledüngung auf Feld F39 statt (Tabelle 2), weil dieses Gülle-gedüngte Feld dem Drainagesystem am nächsten lag. Ein Teil des Drainagewassers stammte jedoch auch aus anderen umliegenden HOAL-Feldern.

Die 20 Wasserproben wurden auf alle 27 qPCR-Targets getestet. Die absoluten Target-Konzentrationen wurden in Kopien pro Liter gefiltertem Wasser (K/LW) erhoben. Die relative Quantifizierung erfolgte anhand der deltaCt-Methode.

Beim **16S rRNA**-Target lagen die Konzentrationen im Bach konstant zwischen $1,0E+13$ und $6,0E+13$ K/LW (Abbildung 74). Bei den Drainage-Proben gab es große Schwankungen zwischen den einzelnen Probeentnahme-Zeitpunkten, was sich in der unterschiedlich starken Verunreinigung des Wassers mit Schlamm widerspiegelte. Hier konnten Konzentrationen zwischen $1,7E+11$ K/LW und $4,9E+13$ K/LW (in der am stärksten verschlammten Probe Sys_w16) gemessen werden. Diese Schwankungen hatten eine große Auswirkung auf die relative Quantifizierung der ARG- und MGE-Targets.

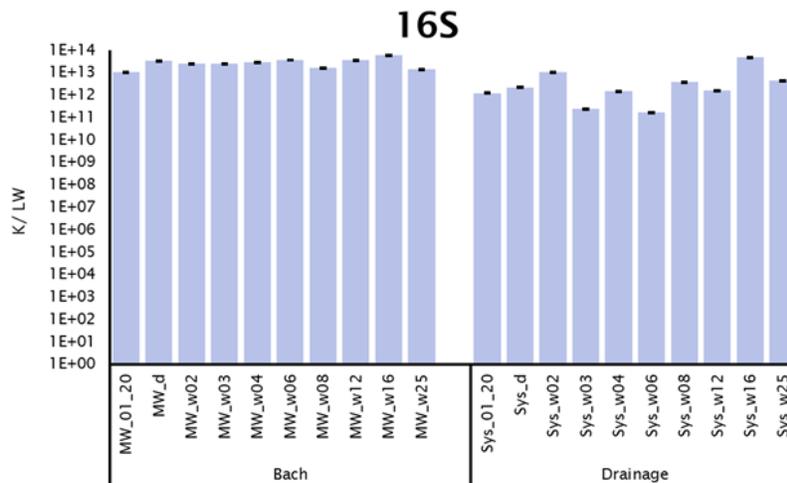


Abbildung 74. *16S rRNA*-Gene in Bach- und Drainage-Proben.

Kopien pro Liter Wasser (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate).

Das MGE-assoziierte Integrase-Target *intl1* wurde im Bach konstant mit Kopienzahlen um $1E+08$ K/LW gemessen (Abbildung 75). Eine Ausnahme bildete die Baseline-Probe vom Winter 2020 mit knapp $1E+07$ K/LW. Im Drainage-Wasser gab es bei Sys_w06 einen Ausfall. Einen Tag und 2 Wochen nach der Düngung des Feldes F39 stieg die *intl1*-Konzentration sichtbar an um nach 3 Wochen wieder auf den Jänner-Ausgangswert abzusinken. In den Drainage-Proben der letzten 4 Zeitpunkte wurden wieder höhere *intl1*-Konzentrationen gemessen, vermutlich aufgrund des verschlammten Wassers. Insgesamt konnten beim Drainage-Wasser *intl1*-Konzentrationen zwischen $2,8E+06$ und $1,0E+09$ K/LW gemessen werden.

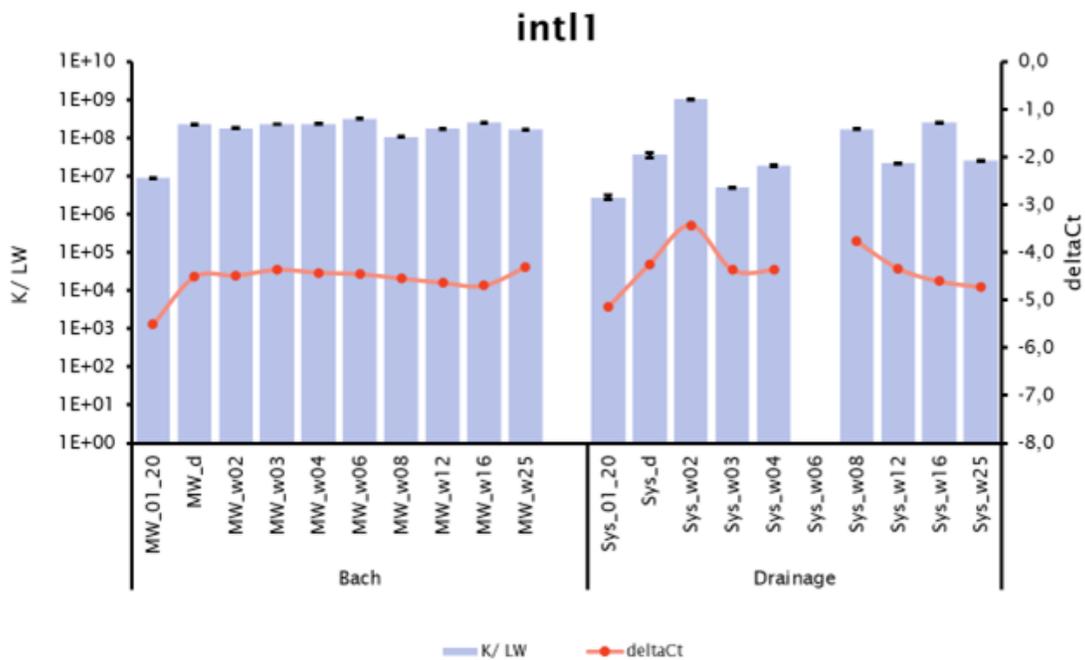


Abbildung 75. *Int1* in Bach- und Drainage-Proben.

Kopien pro Liter Wasser (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Das Target *ISPPs*, welches für eine Insertions-Sequenz kodiert, konnte in allen Proben detektiert werden (Abbildung 76). In den Bach-Proben gab es große Schwankungen zwischen den Zeitpunkten ($6,9E+05$ - $3,0E+08$ K/LW). In unseren Aufzeichnungen über Kulturmaßnahmen und Wetterparameter ließ sich keine eindeutige Ursache (Düngung, Starkregen o.Ä.) dafür erkennen. Beim Drainage-Wasser schwankte die *ISPPs*-Konzentration zwischen $9,6E+06$ und $2,2E+09$ K/LW.

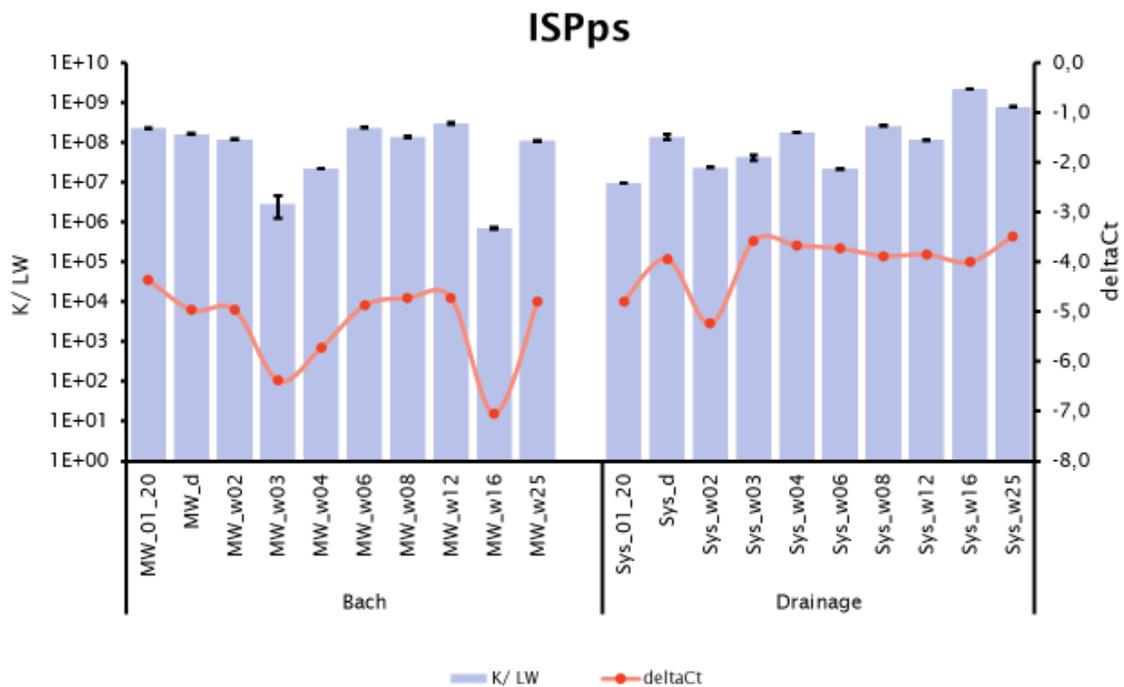


Abbildung 76. *ISPPs* in Bach- und Drainage-Proben.

Kopien pro Liter Wasser (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Das **qacEdelta1**-Target konnte zu 9 von 10 Zeitpunkten im Bach-Wasser identifiziert werden (Abbildung 77). Sechs Wochen nach der Gülledüngung des Feldes F39 gab es einen Signal-Ausfall, während die restlichen Proben-Konzentrationen zwischen $5,5E+05$ und $1,1E+08$ K/LW aufwiesen. Im Drainage-System wurde **qacEdelta1** nur sporadisch detektiert, mit Kopienzahlen zwischen $3,9E+06$ und $9,5E+07$ K/LW.

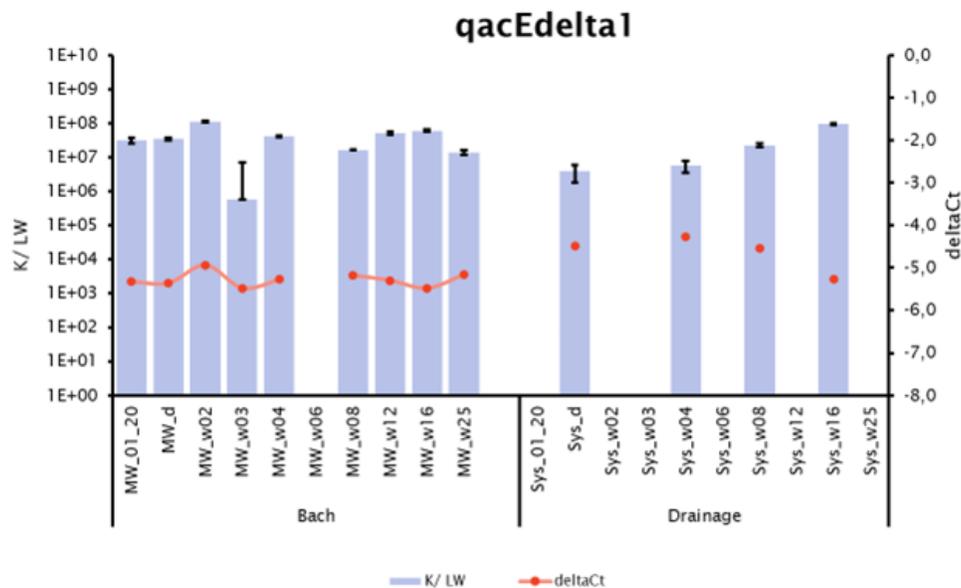


Abbildung 77. *QacEdelta1* in Bach- und Drainage-Proben.

Kopien pro Liter Wasser (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Von den vier Aminoglykosid-Resistenzgenen *aadA*, *nptII*, *nptIII* und *strB* wurde ***nptII*** in keiner Probe detektiert (Abbildung 78). ***AadA*** wurde in acht Bachproben und sieben Drainage-Proben detektiert. Die Konzentrationen in Bach und Drainage waren ähnlich, mit Schwankungen zwischen $2,6E+06$ und $3,5E+07$ K/LW.

NptIII wurde im Bach-Wasser häufiger nachgewiesen (7/10 Proben) als im Drainage-Wasser (nur in den 3 am stärksten verschlammten Proben). Die gemessenen Werte lagen zwischen $1,4E+06$ und $1,1E+07$ K/LW.

Auch ***strB*** wurde häufiger in den Bach-Proben (7/10) detektiert als in den Drainage-Proben (4/10). Auch hier hatten die positiv getesteten Proben ähnliche Kopienzahlen ($3,6E+06$ bis $6,9E+07$ K/LW).

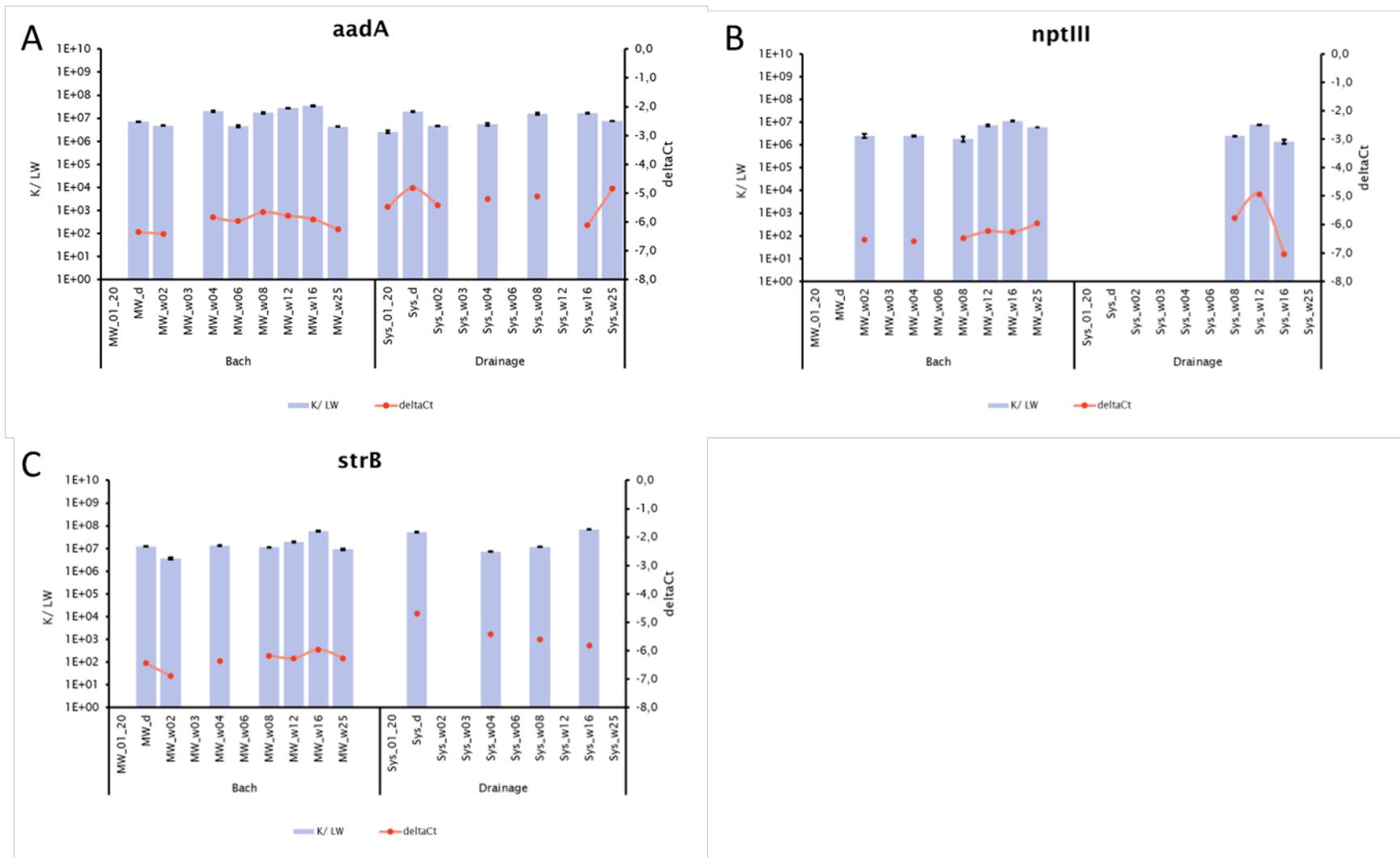


Abbildung 78. *AadA*, *nptIII* und *strB* in Bach- und Drainage-Proben.

Kopien pro Liter Wasser (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Das Diaminopyrimidin-Resistenzgen *dfrA-1* konnte in keinem der beiden Gewässer nachgewiesen werden.

Das Chloramphenicol-Target *cmxA* wurde in sechs von zehn Bachproben identifiziert, mit Konzentrationen zwischen $1,6E+07$ und $1,5E+08$ K/LW, während es nur in der am stärksten verunreinigten Probe des Drainage-Wassers identifiziert wurde ($1,4E+08 \pm 2,3E+06$ K/LW) (Abbildung 79).

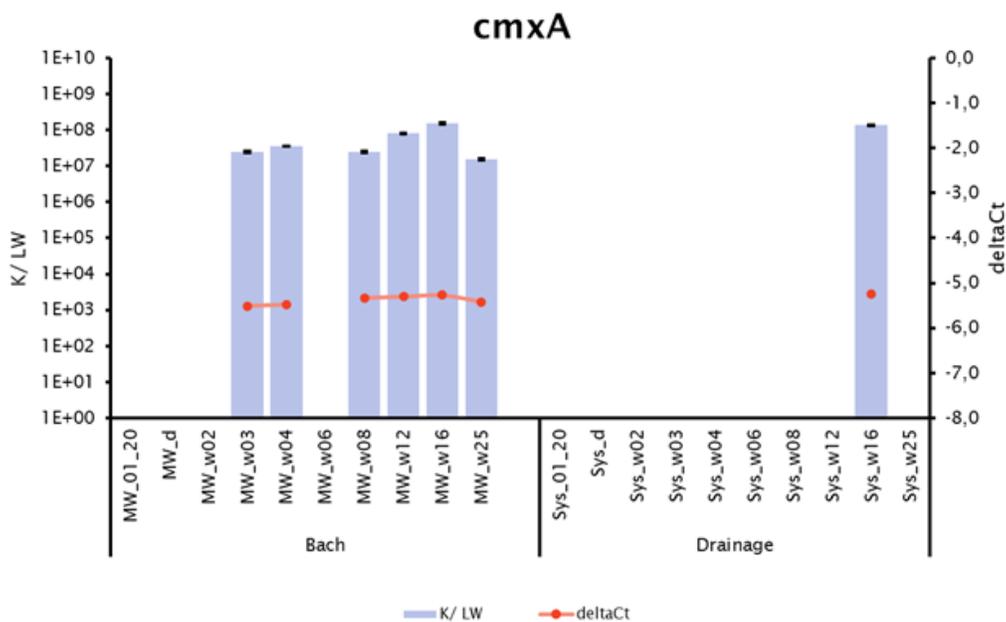


Abbildung 79. *CmxA* in Bach- und Drainage-Proben.

Kopien pro Liter Wasser (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

QnrS, das Fluorochinolon-Resistenzgen, wurde in einer Drainage-Probe nachgewiesen, in einer Konzentration von $4,9E+06$ (SD $\pm 5,9E+05$) K/LW (Daten nicht gezeigt). Sonst wurde es nur in Schweinekot und Schweinegülle detektiert, während das *qnrS*-Signal in allen Bodenproben fehlte.

Das Vancomycin-Resistenzgen *vanA* wurde ähnlich wie *cmxA* vor allem in Bach-Proben detektiert (7/10), während das Drainage-Wasser wieder nur in der am stärksten verunreinigten Probe ein Signal zeigte. Die Konzentrationen lagen zwischen $1,5E+06$ und $1,2E+07$ K/LW (Abbildung 80).

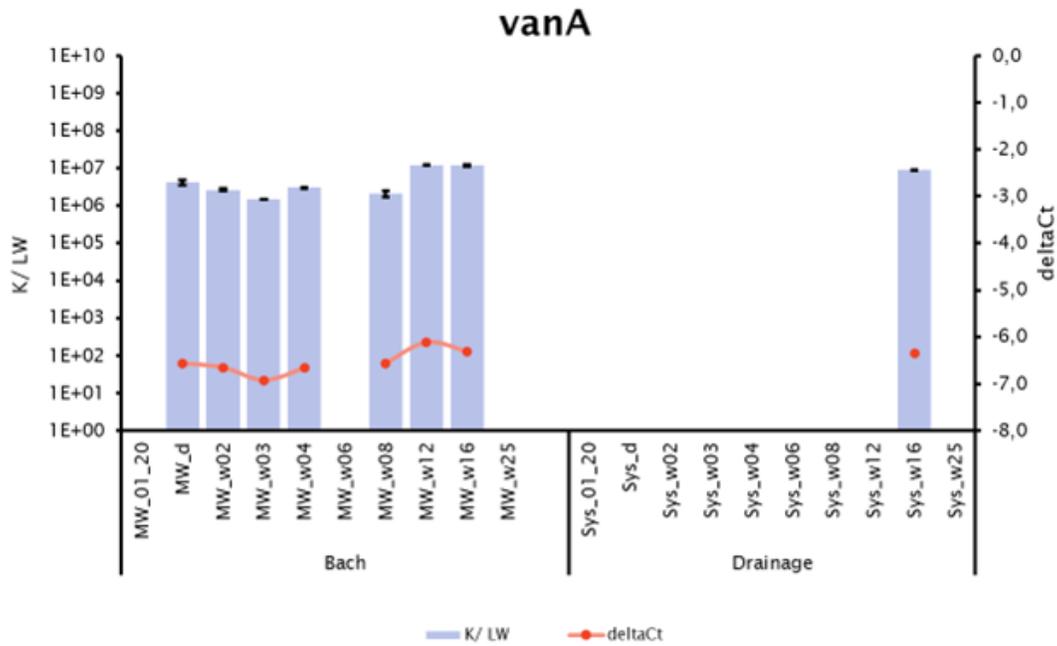


Abbildung 80. *vanA* in Bach- und Drainage-Proben.

Kopien pro Liter Wasser (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Als Vertreter für Makrolid-Resistenzgene wurden *ermB* und *ermF* getestet. Das Target *ermF* konnte in keiner der getesteten Proben nachgewiesen werden (Abbildung 81). *ErmB* wurde im Bach an sechs und im Drainage-Wasser an drei Zeitpunkten detektiert, mit Kopienzahlen zwischen 3,0E+06 und 1,0E+07 K/LW.

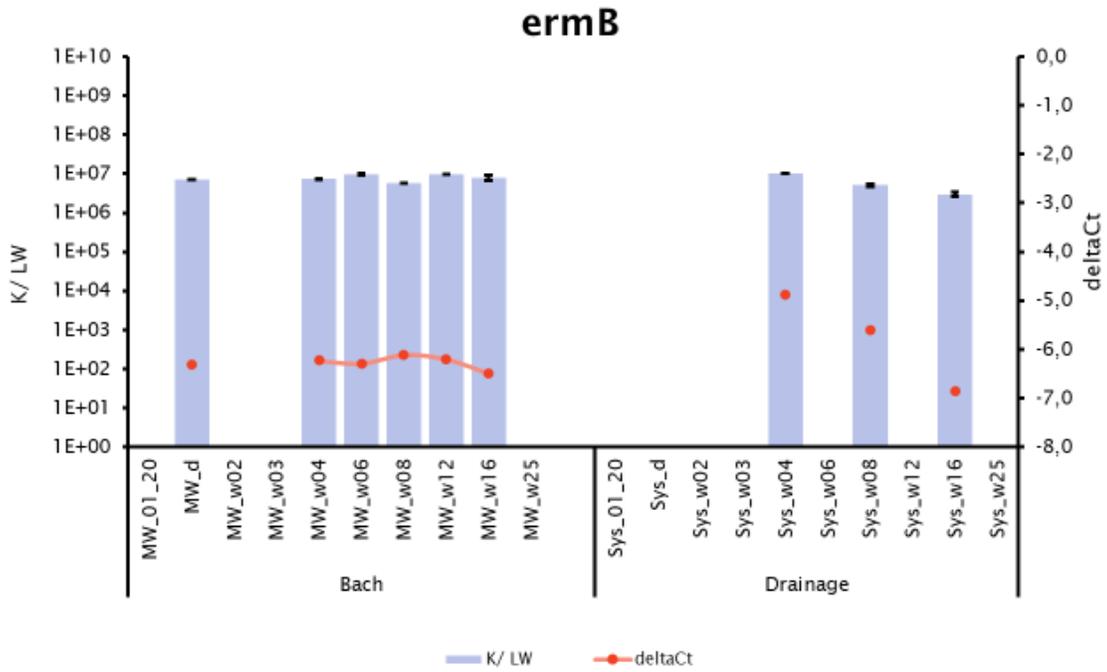


Abbildung 81. *ErmB* in Bach- und Drainage-Proben.

Kopien pro Liter Wasser (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Das Streptothricin-Resistenzgen *sat-4* wurde in 7/10-Bach- und in 5/10-Drainage-Wasser-Proben detektiert (Abbildung 82). Die Winter-Proben waren bei beiden Wasser-Systemen negativ. Im Drainage-System zeigten vor allem stark Schlamm-haltige Wasserproben ein Signal. Die Konzentrationen lagen bei diesem Target zwischen $6,7E+06$ und $7,9E+07$ K/LW.

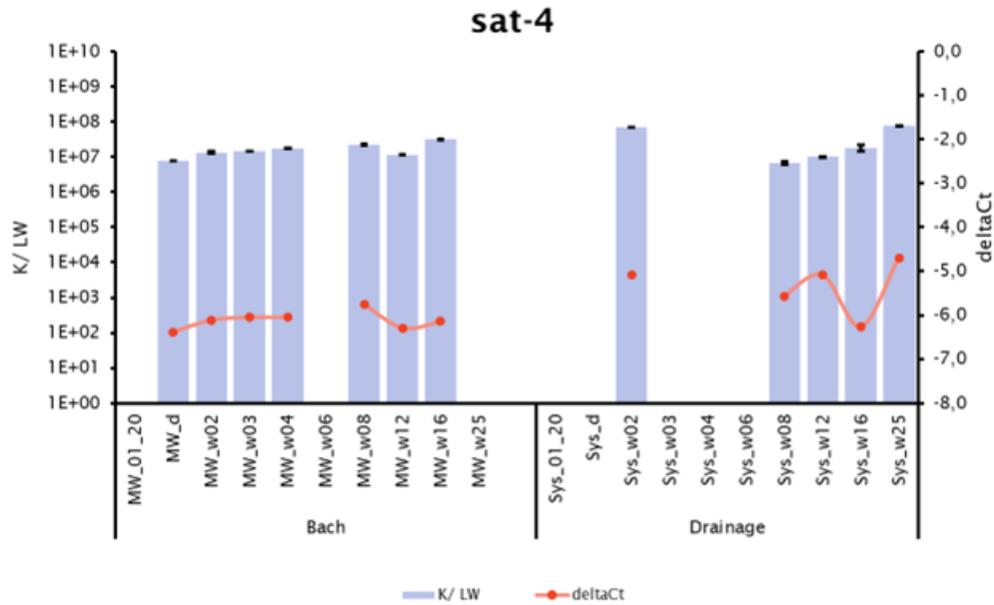


Abbildung 82. *Sat-4* in Bach- und Drainage-Proben.

Kopien pro Liter Wasser (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Das Colistin-Resistenzgen *mcr-1* wurde in 5/10-Bachwasser- und 6/10-Drainage-Wasser-Proben detektiert (Abbildung 83). Die Bach-Proben zeigten zwischen 2 und 6 Wochen nach der Düngung des Feldes F39 einen leichten Anstieg. Die Schwankungsbreite der Kopienzahl lag zwischen $5,7E+06$ und $5,8E+07$ K/LW.

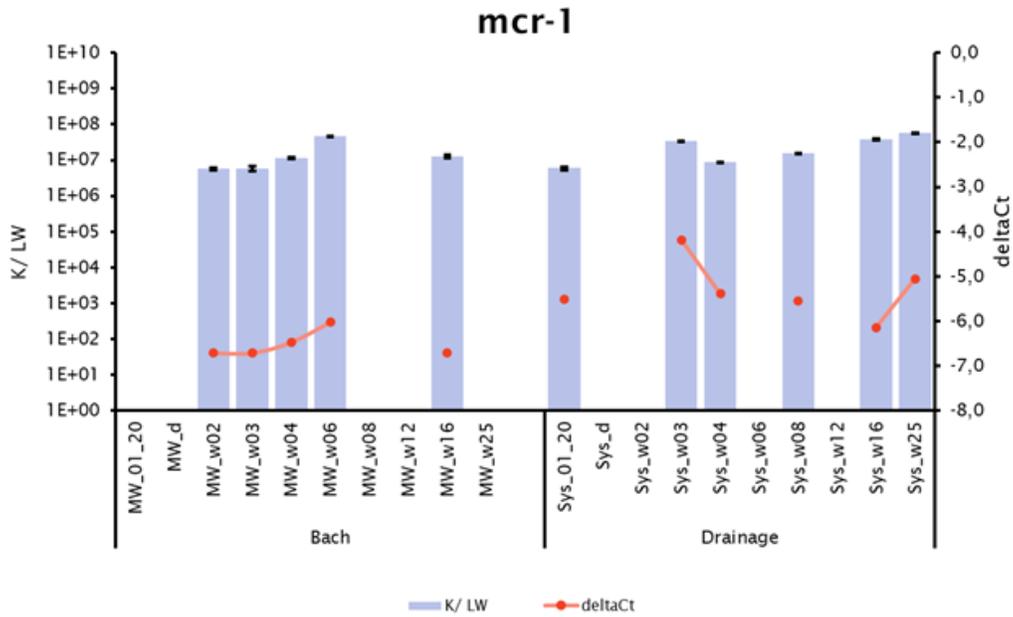


Abbildung 83. *Mcr-1* in Bach- und Drainage-Proben.

Kopien pro Liter Wasser (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Das Sulfonamid-Resistenzgen *sul1* wurde in Konzentrationen zwischen $1,6\text{E}+06$ und $3,7\text{E}+07$ K/LW detektiert (Abbildung 84).

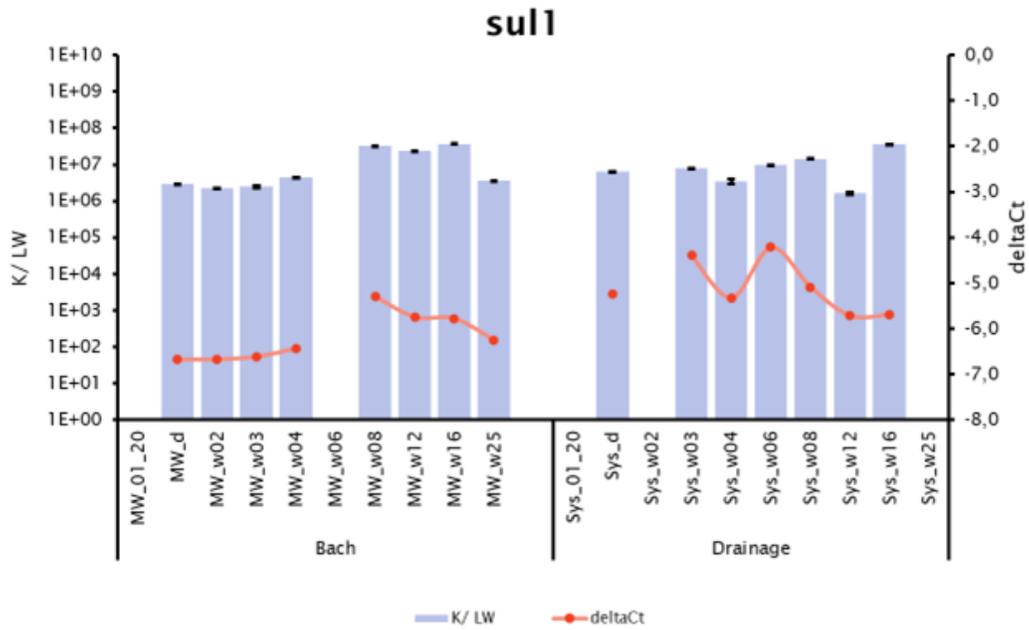


Abbildung 84. *Sul1* in Bach- und Drainage-Proben.

Kopien pro Liter Wasser (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

Von den vier Tetrazyklin-Resistenzgenen *tet(A)*, *tet(M)*, *tet(O)* und *tet(W)* wurde ***tet(A)*** nur sporadisch detektiert, wobei nur eine einzige Bach-Probe und 3 Drainage-Proben positiv waren (Abbildung 85). Die *tet(A)*-Konzentration war am höchsten in der stark verschmutzten Drainage-Probe und am niedrigsten in der Bach-Probe mit einem Schwankungsbereich von $2,9E+06$ und $1,3E+08$ K/LW.

Tet(M) konnte in 7 von 10-Bach- und 5 von 10-Drainage-Proben detektiert werden. Die höchsten Konzentrationen wurden an den letzten drei Monitoring-Zeitpunkten gemessen, also bei höheren Temperaturen und gröber verschlammtem Wasser. Die *tet(M)* Kopienzahl variierte zwischen $3,0E+06$ und $6,5E+07$ K/LW.

Tet(O) zeigte bei den Bach-Proben am Anfang und am Ende des Beobachtungszeitraumes einen Kopienzahl-Anstieg. Hierbei wurden zwischen $8,4E+06$ und $8,0E+07$ K/LW gemessen werden. Im Falle des Drainage-Systems lieferten nur 2 Proben ein positives Signal. Diese hatten vergleichbare Konzentrationen wie die Bach-Proben ($8,7E+06$ bis $2,5E+07$ K/LW).

Tet(W) konnte in allen Bach-Proben, mit Ausnahme der Winter-Probe MW_01_20, detektiert werden. Die Konzentration im Bach variierte zwischen $8,8E+07$ und $4,0E+08$ K/LW. Bei den Drainage-Proben gab es nur vereinzelt positive Signale. Die höchste Konzentration wurde in der am stärksten verschmutzten Probe Sys_w16 gemessen und die niedrigste einen Tag nach der Düngung des Feldes F39 ($1,5E+07$ bis $2,0E+08$ K/LW).

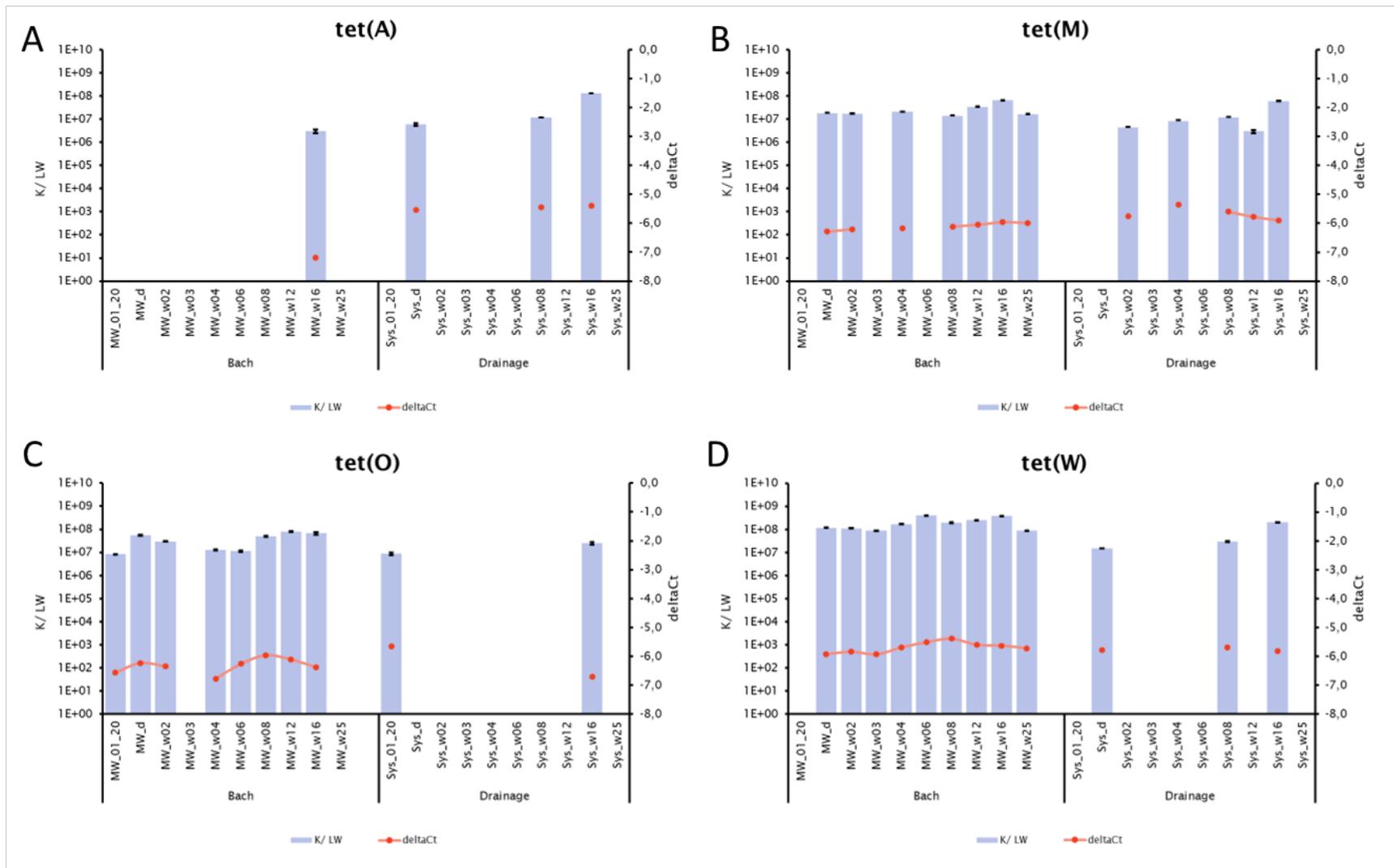


Abbildung 85. *Tet(A)*, B) *tet(M)*, C) *tet(O)* und D) *tet(W)* in Bach- und Drainage-Proben. Kopien pro Liter Wasser (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt)..

Von den 5 ausgewählten β -Laktam-Resistenzgenen *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{OXA-10}, *bla*_{TEM-1} und *mecA*, wurden nur positive Signale die Targets *bla*_{OXA-10} und *mecA* detektiert (Abbildung 86). *Bla*_{OXA-10} wurde in 2 der Bach-Proben nachgewiesen mit Werten von 1,0E+07 und 8,4E+07 K/LW. Bei *mecA* wurden im Bach positive Signale an den letzten 2 Probenahme-Zeitpunkten gemessen, bei den Drainage-Proben hingegen an zwei früheren Zeitpunkten. Die positiv getesteten Proben lagen zwischen 1,2E+07 und 2,4E+07 K/LW.

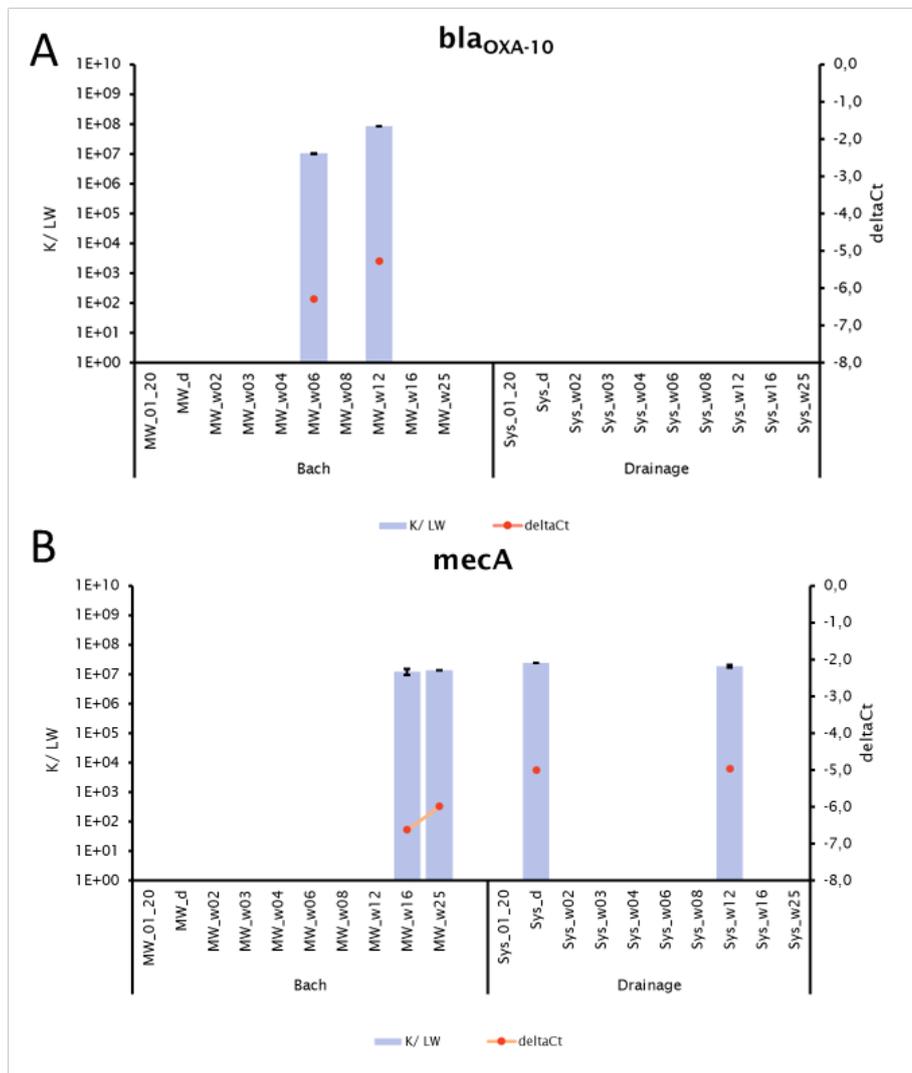


Abbildung 86. *Bla*_{OXA-10} und *mecA* in Bach- und Drainage-Proben.

Kopien pro Liter Wasser (Mittelwert und Standardabweichung der biologischen Replikate) und relative Quantifizierung (deltaCt).

In der nachstehenden Grafik wurde die Prävalenz (das Auftreten) der Targets pro Wasser-System grafisch dargestellt (Abbildung 87). Hier ist erkenntlich, dass die Targets *aadA*, *bla_{OXA-10}*, *cmxA*, *ermB*, *intl1*, *nptIII*, *qacEdelata1*, *sat-4*, *strB*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(W)* und *vanA* öfter in den zehn Bach-Proben detektiert wurden als in den Drainage-Proben. Die Gülledüngung des Feldes F39 schien keinen wesentlichen Einfluss auf die ARG- und MGE-Konzentrationen zu besitzen.

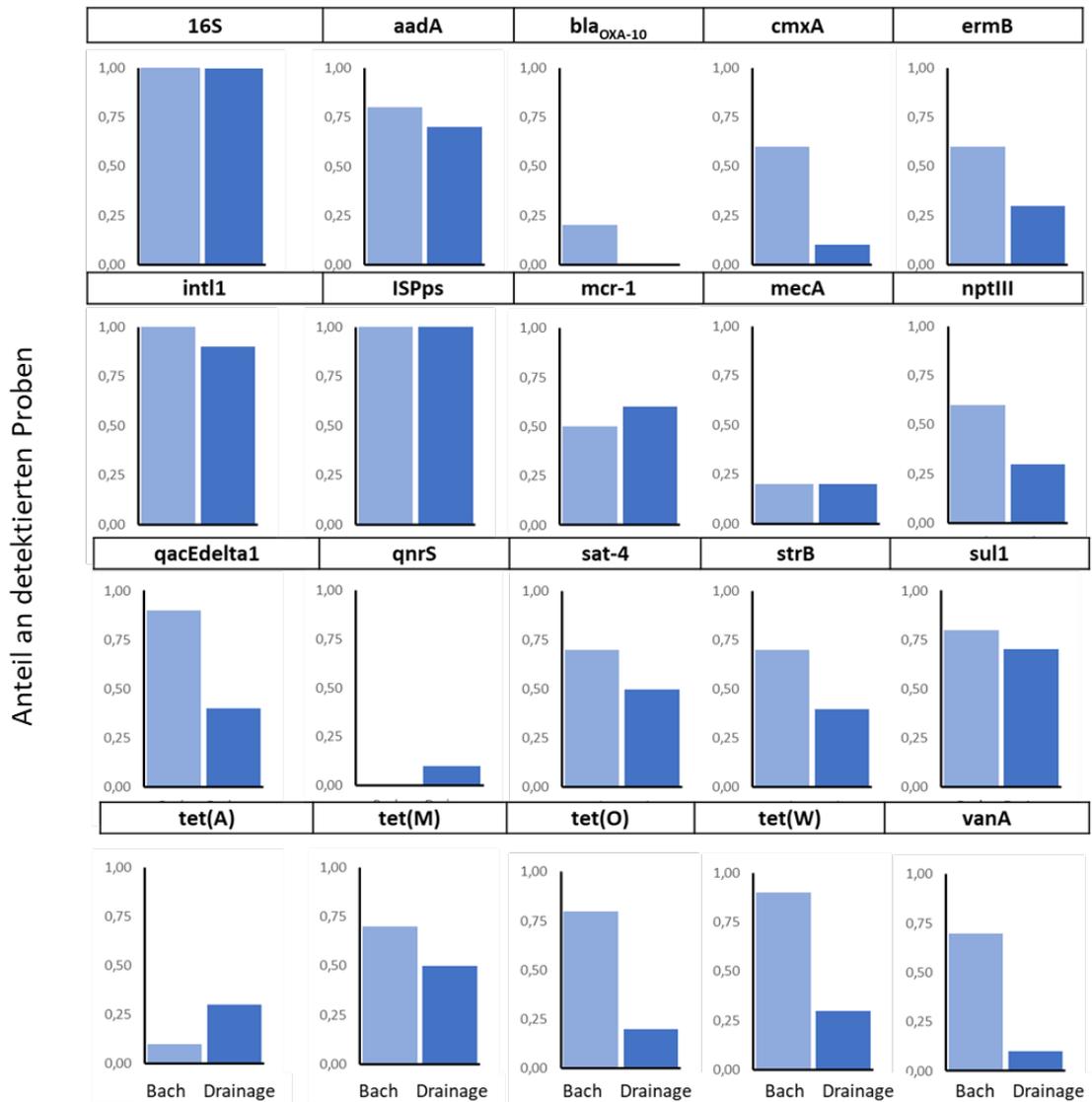


Abbildung 87. Bach- und Drainage: Anteil der Beprobungszeitpunkte mit positivem Ergebnis.

Zehn Probenentnahmezeitpunkte wurden pro Wasser-Typ gezogen und deren Anteil berechnet. Abgebildet sind die Targets, die ein positives Signal produziert haben.

5.2 ARG-Abundanz im Agroökosystem: Zusammenfassung und Statistik

5.2.1 Vergleich der vier HOAL-Felder anhand aller Zeitpunkte

Fünfzehn Targets (*ermF*, *ermB*, *dfrA-1*, *sat-4*, *nptIII*, *strB*, *aadA*, *cmxA*, *sul1*, *qacEdelta1*, *tet(A)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(W)*, *int11*) hatten in der **Gülle** mit 10^6 - 10^9 Kopien pro Gramm Trockenmasse eine viel höhere Abundanz als in den **Böden** (10^2 - 10^6 , mit Einzelwerten $< \text{LOQ}$).

Dreizehn dieser Targets (alle außer *ermF* und *int11*) waren über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg in den langjährig Gülle-gedüngten Feldern F31, F32 und F39 abundanter als im langjährig Gülle-freien Feld F04. Dieser langfristige Effekt der Güllendüngung war **statistisch signifikant** (ANOVA mit paarweisen post-hoc Vergleichen nach Tukey, $p < 0,05$). Feld F32 unterschied sich nicht von F31 und F39, obwohl hier im Untersuchungsjahr keine Gülle ausgebracht und eine andere Feldfrucht kultiviert wurde. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die **wiederholte Gülleanwendung** über Jahre hinweg zu einem **dauerhaften Konzentrationsanstieg** von ARGs in den Ackerböden führen, der innerhalb einer Saison ohne Gülle (F32) **nicht reversibel** war.

Im ersten Untersuchungsschritt wurden die vier HOAL-Ackerflächen (F04, F31, F32, F39) hinsichtlich Prävalenz und Abundanz der Targets miteinander verglichen. Die Abundanz wurde für statistische Tests log-transformiert ($\log_{10}(\text{Target} + 1)$), um eine annähernde Normalverteilung der Werte zu erreichen, die für diese Verfahren Voraussetzung ist.

Feld F32 unterschied sich nicht von F31 und F39, obwohl hier im Untersuchungsjahr keine Gülle ausgebracht und eine andere Feldfrucht kultiviert wurde. Deshalb werden **F31, F32 und F39** im folgenden Kapitel als „**langjährig Gülle-gedüngte Felder**“ zusammengefasst.

Liest man die Heatmap von oben nach unten, um die einzelnen Targets zu vergleichen, dann sind - bezogen auf die Felder vier Verteilungstypen zu erkennen. Vier Targets (*qnrS*, *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM-1}*) wurden in keiner Bodenprobe detektiert (**Verteilungstyp 1**). Fünf „**seltene Targets**“ (*mcr-1*, *mecA*, *bla_{OXA-10}*, *nptII*, *ermF*) wurden punktuell in 1-10 Bodenproben detektiert (**Verteilungstyp 2**). Vier „**konstante Targets**“ (*bla_{TEM-1}*, *vanA*, *ISPPs*, *intl1*) wurden in 27-33 Ackerbodenproben detektiert und waren in allen 4 Feldern ähnlich abundant (**Verteilungstyp 4**).

Die übrigen 13 ARG (*dfrA-1*, *ermB*, *nptIII*, *sat-4*, *tet(A)*, *cmxA*, *strB*, *aadA*, *tet(M)*, *sul1*, *qacEdelta1*, *tet(W)*, *tet(O)*) können als „**Gülle-assoziierte ARGs**“ beschrieben werden (**Verteilungstyp 3**). Bei diesen ARG war die Abundanz im langjährig Gülle-freien Feld F04 geringer als in den langjährig Gülle-gedüngten Feldern F32, F31 und F39. Außerdem war die Abundanz dieser ARGs in der Gülleprobe besonders hoch. Eine Varianzanalyse (ANOVA) bezüglich der vier HOAL Felder zeigte bei diesen 13 ARG signifikante Unterschiede in der logarithmierten Target-Abundanz ($\log_{10}(\text{Target} + 1)$). Die Post-Hoc Analyse nach Tukey zeigte dann, dass sich F04 bei allen 13 ARG von den anderen Feldern unterschied, während F31, F32, F39 meist keine signifikanten Unterschiede aufwiesen. Dieses Ergebnis kann als langfristiger Effekt der Gülledüngung erklärt werden. Aufgrund der Gülledüngung in den vorangegangenen Jahren war die Abundanz der 13 ARG in F31, F32 und F39 von Anfang an erhöht und blieb im gesamten Beobachtungszeitraum höher als in F04.

5.2.2 Vergleich HOAL-Feldproben vs. HOAL-Waldproben

Im HOAL-Laubwald (OF) und im HOAL-Nadelwald (NF), wurden über den ganzen Beobachtungszeitraum hinweg **weniger Targets** detektiert als auf den vier HOAL-Feldern. Von den 13 Targets, bei denen in Abschnitt 5.2.1 ein langfristiger Gülle-Effekt festgestellt wurde, wurden ***qacEdelta1*** und ***sat-4*** in keiner Waldprobe detektiert. Die übrigen 11 wurden in den **Wäldern seltener** detektiert und ihre Abundanz war in den Wäldern **signifikant geringer** als in den langfristig Gülle-gedüngten Feldern F31, F32 und F39. Teilweise war ihre Abundanz in den HOAL-Wäldern auch geringer als im nicht Gülle-gedüngten Feld F04 (ANOVA mit Post-Hoc Vergleichen nach Tukey, $p < 0,05$).

Im zweiten Untersuchungsschritt wurden die HOAL-Felder mit zwei nicht-landwirtschaftlich genutzten Vergleichsflächen im HOAL-Gebiet verglichen. Dies waren der HOAL-Laubwald (OF) und der HOAL-Nadelwald (NF), wo jeweils zu ähnlichen Zeitpunkten Proben gesammelt wurden wie auf den Feldern. In der Heatmap in Abbildung 88 ist sichtbar, dass in beiden Waldflächen weniger Targets detektiert wurden als in allen HOAL-Feldern. Abbildung 89 fasst den Anteil der positiven Proben für jedes Target zusammen.

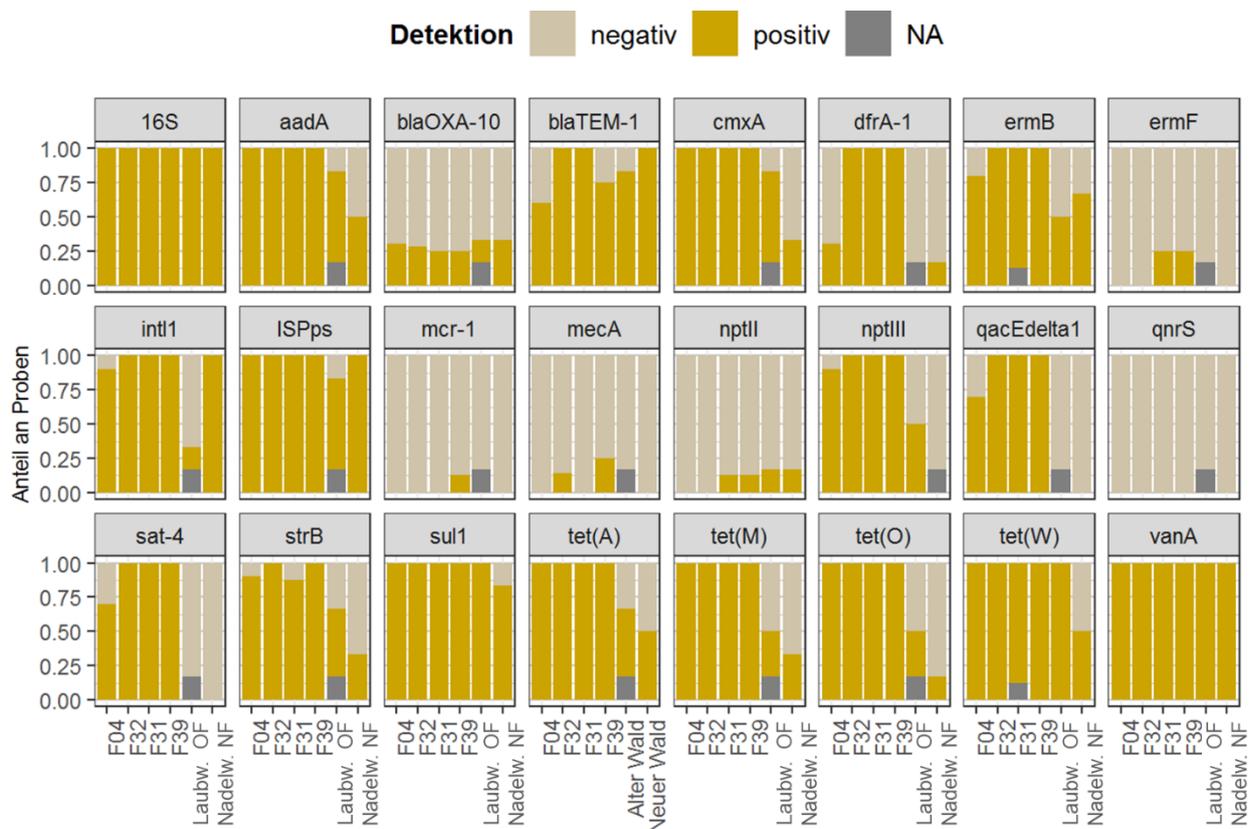


Abbildung 89. HOAL-Flächen: Anteil der Probenahme-Zeitpunkte mit positivem Ergebnis.

Gesamtanzahl der Probenahme-Zeitpunkte (N): F04 N=10, F32 N=6, F31 N=8, F39 N=9, OF N=6, NF N=6. NA=keine Daten.

Zusammenfassend kann festgehalten werden: Targets, die auf den Feldern nicht detektiert wurden, wurden auch in den Wäldern nicht detektiert (*bla_{CTX-M-15}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM-1}*, *qnrS*). Targets, die auf den Feldern selten waren, waren auch in den Wäldern selten (*bla_{OXA-10}*, *nptII*), oder wurden gar nicht detektiert (*mecA*, *mcr-1*, *ermF*). Die über alle vier Felder konstant verteilten Targets (*bla_{TEM-1}*, *vanA*, *ISPPs*, *int1*) wurden auch im HOAL-Laubwald OF konstant detektiert, im HOAL-Nadelwald NF lückenhafter.

Von den 13 Targets, bei denen in Abschnitt 5.2.1 ein langfristiger Gülle-Effekt festgestellt wurde (*dfrA-1*, *ermB*, *nptIII*, *sat-4*, *tet(A)*, *cmxA*, *strB*, *aadA*, *tet(M)*, *sul1*, *qacEdelta1*, *tet(W)*, *tet(O)*), wurden *qacEdelta1* und *sat-4* in keiner Waldprobe detektiert. Die übrigen 11 wurden in den Wäldern seltener detektiert und eine ANOVA mit Post-Hoc Vergleichen nach Tukey (Tabelle 38) zeigte, dass ihre Abundanz in den **Wäldern signifikant geringer** war als in den langfristig Gülle-gedüngten Feldern F31, F32 und F39. Teilweise war ihre Abundanz in den HOAL-Wäldern auch geringer als im nicht Gülle-gedüngten Feld F04. Ein Varianzkomponentenmodell mit zufälligen Effekten für ARGs schätzt das niedrigste **Konzentrationsniveau** für Nadelwald dann Laubwald (**Nadelwald < Laubwald < F04 < F32 < F39 < F31**).

Tabelle 38. Zusammenfassung der ANOVA mit Post-Hoc Vergleichen nach Tukey.

	ARG/MGE	NF-OF	OF-F04	NF-F04	OF-(F31,F32,F39)	NF-(F31,F32,F39)
2	<i>mcr-1</i>	/	/	/	/	/
	<i>mecA</i>	/	/	/	/	/
	<i>bla_{OXA-1}</i>	/	/	/	/	/
	<i>nptII</i>	/	/	/	/	/
3	<i>ermF</i>	/	/	/	/	/
	<i>dfrA-1</i>				*	*
	<i>ermB</i>				*	*
	<i>sat-4</i>		*****	*****	*****	*****
	<i>nptIII</i>		*	*	*	*
	<i>strB</i>			*	*	*
	<i>aadA</i>		*	*	*	*
	<i>cmxA</i>	*		*	(*)	*
	<i>sul1</i>	*		*	*	*
	<i>qacEdelta1</i>		*****	*****	*****	*****
	<i>tet(A)</i>			*	*	*
	<i>tet(M)</i>		*	*	*	*
	<i>tet(O)</i>		*	*	*	*
<i>tet(W)</i>	*		*		*	
4	<i>bla_{TEM-1}</i>	/	/	/	/	/
	<i>vanA</i>	*		*		*
	<i>ISPPs</i>	/	/	/	/	/
	<i>intl1</i>	*	*		*	*

Jede Spalte zeigt einen paarweisen Vergleich. Vergleiche der Felder untereinander werden nicht gezeigt, weil sie in Abschnitt 5.2.1 behandelt wurden. Vergleiche der Wälder mit F31, F32, F39 wurden in einer Spalte zusammengefasst. Farben bedeuten signifikante Unterschiede (p<0,05): z.B.: * in der Spalte „OF-F04“ = Target in OF signifikant geringer als in F04, * in der Spalte „NF-F04“ = Target in NF signifikant abundanter als in F04 (p<0,05). ***** in OF und NF nicht detektiert. (*) in OF nur signifikant geringer als in F31. Schrägstrich „/“ - ANOVA stellte keine Unterschiede fest, daher kein post-hoc Vergleich. Die Targets sind wie in der Heatmap nach Verteilungsmuster gruppiert (linke Spalte): 2) selten; 3) sehr abundant in der Gülle und in F32, F31, F39 abundanter als in F04; 4) in allen Acker-Feldern ähnlich abundant.

Die beiden Wälder NF und OF unterschieden sich nur bei *cmxA*, *sul1*, *vanA* und *intl1* signifikant voneinander (Tabelle 38). Alle Targets gemeinsam betrachtet zeigen keinen signifikanten Unterschied in der Prävalenz der untersuchten Targets (Fisher Test, p= 0,39).

5.2.3 Zeitlicher Verlauf auf den HOAL-Flächen

Bei dreizehn Targets, die in der Gülle sehr abundant waren (*ermF*, *ermB*, *dfrA-1*, *sat-4*, *nptIII*, *strB*, *cmxA*, *sul1*, *qacEdelta1*, *tet(A)*, *tet(M)*, *tet(W)*, *int11*), trat im Feld F31 einen Tag bis eine Woche nach der Gülle-Düngung ein Maximalwert auf. Besonders ausgeprägt war der Konzentrationsanstieg bei *ermF*, das ausschließlich in der Woche nach der Gülle-Düngung detektierbar war. Bei *ermF* und *ermB* wiederholte sich dieser Anstieg auch im zweiten frisch mit Gülle gedüngten Feld F39, bei den meisten anderen Targets jedoch nicht oder nur sehr schwach. Eine statische Bestätigung war nicht möglich.

Innerhalb des Beobachtungszeitraums zeigte die Abundanz jedes ARGs ein eigenes zeitliches Muster (Abschnitt 5.1.1). Für die Ackerböden können einige vielen Targets gemeinsame zeitliche Phänomene zusammenfassend beschrieben werden.

In den Balkendiagrammen war bei vielen Targets in derselben Probe, also zum selben Sampling-Zeitpunkt, ein auffällig hoher Wert („**Peak**“) sichtbar. Tabelle 39 hält für alle Targets fest, in welcher Probe jedes Feldes jeweils der Maximalwert gemessen wurde. Im Feld F04 verteilten sich die Maximalwerte der einzelnen ARG gleichmäßig auf viele verschiedene Zeitpunkte. Im Feld F32 hatten 14 ARGs synchron ein Maximum in der Probe F32_C_w18. Diese Probe wurde 18 Wochen nach der anorganischen Düngung gezogen, am 14.07.2020. In den HOAL Feldbearbeitungsdaten ist am 01.07.2020 die Weizenernte verzeichnet.

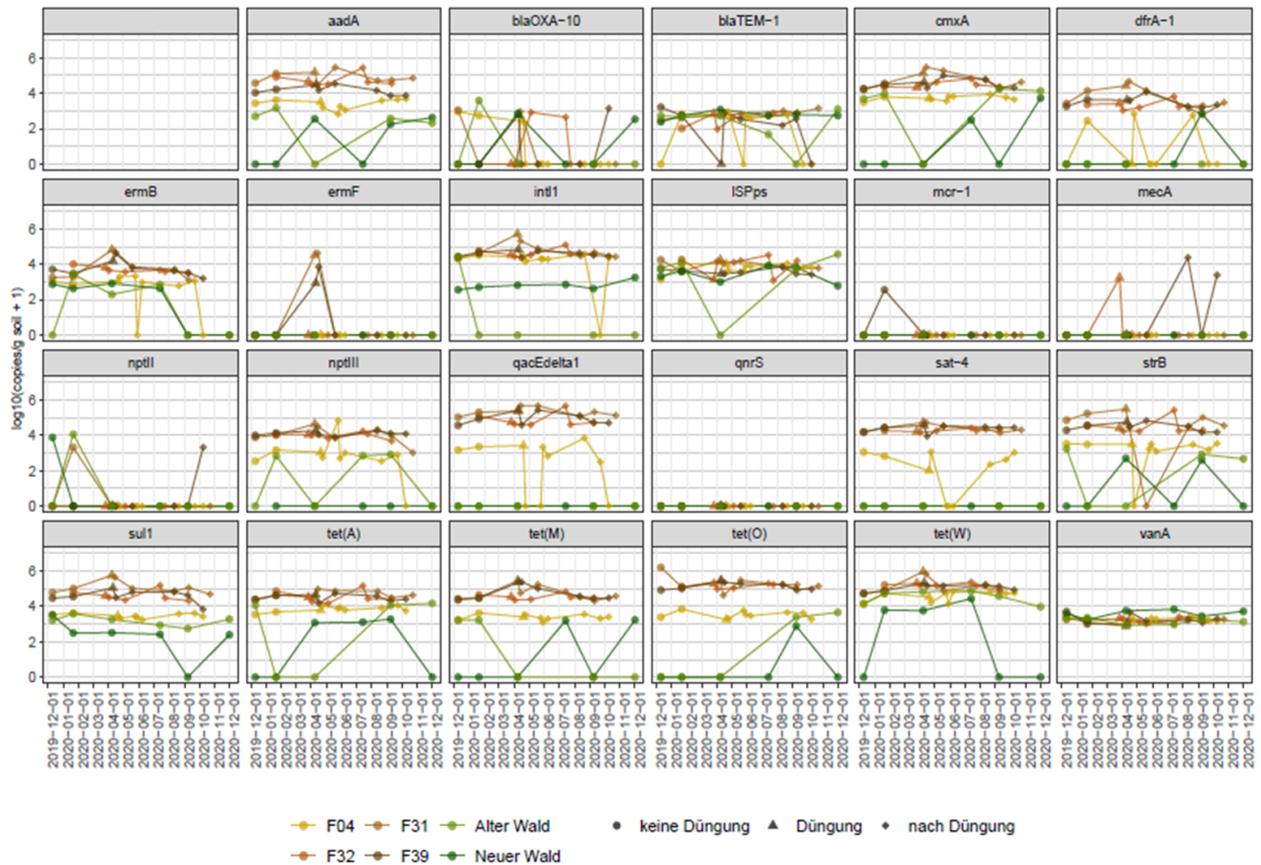
Tabelle 39. Matrix: Probe mit Maximalwert für jedes Target in jedem HOAL-Feld.

	Target	F04	F32	F31	F39
2	<i>mcr-1</i>				F39_C_01_20
	<i>mecA</i>		F32_C_d		F39_C_w18
	<i>bla_{OXA-10}</i>	F04_C_12_19	F32_C_w06	F31_C_12_19	F39_C_aH
	<i>nptII</i>			F31_C_01_20	F39_C_aH
3	<i>ermF</i>			F31_C_w	F39_C_w
	<i>dfrA-1</i>	F04_C_w	F32_C_w18	F31_C_w	F39_C_w06
	<i>ermB</i>	F04_C_01wP	F32_C_01_20	F31_C_d	F39_C_w
	<i>sat-4</i>	F04_C_w	F32_C_w18	F31_C_d	F39_C_d
	<i>nptIII</i>	F04_C_01wP	F32_C_w18	F31_C_d	F39_C_d
	<i>strB</i>	F04_C_aH	F32_C_w18	F31_C_d	F39_C_w06
	<i>aadA</i>	F04_C_aH	F32_C_w18	F31_C_w06	F39_C_w06
	<i>cmxA</i>	F04_C_w18	F32_C_w18	F31_C_w	F39_C_w06
	<i>sul1</i>	F04_C_01_20	F32_C_w18	F31_C_d	F39_C_d
	<i>qacEdelta1</i>	F04_C_w18	F32_C_w18	F31_C_w	F39_C_w06
	<i>tet(A)</i>	F04_C_w	F32_C_w18	F31_C_w	F39_C_w06
	<i>tet(M)</i>	F04_C_01_20	F32_C_w18	F31_C_d	F39_C_w
	<i>tet(O)</i>	F04_C_01_20	F32_C_w18	F31_C_w06	F39_C_d
	<i>tet(W)</i>	F04_C_03wP	F32_C_w18	F31_C_d	F39_C_d
4	<i>bla_{TEM-1}</i>	F04_C_w	F32_C_09_20	F31_C_aH	F39_C_12_19
	<i>vanA</i>	F04_C_w18	F32_C_aH	F31_C_12_19	F39_C_12_19
	<i>ISPPs</i>	F04_C_w18	F32_C_w18	F31_C_12_19	F39_C_w18
	<i>intl1</i>	F04_C_w18	F32_C_w18	F31_C_d	F39_C_d
	<i>16S</i>	F04_C_w18	F32_C_aH	F31_C_w18	F39_C_aH

Die Targets sind wie in Abbildung 88 nach Verteilungsmuster gruppiert (linke Spalte): 2) selten; 3) sehr abundant in der Gülle und in F32, F31, F39 abundanter als in F04; 4) in allen Ackerflächen ähnlich abundant.

Im Feld F31 erreichten 8 ARG (*ermB*, *sat-4*, *nptIII*, *strB*, *sul1*, *tet(M)*, *tet(W)*, *intl1*) den Maximalwert unmittelbar nach der Güllendüngung (F31_C_d), fünf weitere (*ermF*, *dfrA-1*, *cmxA*, *qacEdelta1*, *tet(A)*) eine Woche danach (F31_C_w). Bei 11 dieser 13 Targets (alle außer *intl1* und *ermF*) war im Gesamtvergleich ein signifikanter langfristiger Gülle-Effekt festgestellt worden (Abschnitt 5.2.1). Das kurzfristige Maximum nach der Düngung kann als weiterer Hinweis für die Gülle-Beeinflussung dieser ARG betrachtet werden. *ErmF* wurde ausschließlich in den Gülle-gedüngten Feldern F31 und F39 einen Tag und eine Woche nach der Düngung detektiert und war sehr abundant in der Gülleprobe (Abbildung 88). *ErmF* kann somit ebenfalls als „Gülle-beeinflusstes ARG“ beschrieben werden, und wird in Abbildungen und Tabellen daher dem Verteilungstyp 3 zugeordnet.

In den Balkendiagrammen (Abschnitt 5.1.1) traten die Maximalwerte in F31 bei vielen Genen als „Peaks“ sichtbar hervor (Zeitpunkt: 2020-04-01). In Zeitlinien in Abbildung 90 waren sie jedoch unauffälliger, und mit statistischen Tests konnten sie nicht als auffällige Werte bestätigt werden.



Grafik 12.07.2022, AGES/STA

Abbildung 90. Zeitliniendiagramm der Target-Abundanz für die HOAL-Flächen.

Im zweiten Gülle-gedüngten Feld F39 hatten 9 Targets (*ermF*, *ermB*, *sat-4*, *nptIII*, *sul1*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(W)*, *int1*) den Maximalwert nach der Güllédüngung (Tabelle 39), acht davon waren die gleichen wie in Feld F31 (Ausnahme: *tet(O)*). Die Maximalwerte waren hier mit Ausnahme von *ermB* und *tet(W)* jedoch weder im Balkendiagramm (Abschnitt 5.1.1) noch in der Zeitlinie (Abbildung 90) auffällige Peaks.

5.2.4 HOAL-Oberflächengewässer

Parallel zu den Böden wurde im HOAL Gebiet auch Wasser aus einem Drainagekanal und stromabwärts aus einem Bach beprobt. Alle ARG, die in den HOAL-Feldern detektiert wurden, fanden sich auch im Bachwasser wieder, mit Ausnahme von *bla_{TEM-1}*, *dfrA-1*, *ermF* und *nptII*. Dafür wurde hier *qnrS* detektiert, das sonst nur in Gülle und Kot gefunden worden war (Abbildung 88). Im Wasser schwankte die Abundanz der untersuchten ARG im zeitlichen Verlauf stärker als im Boden (Abbildung 91). Im Bach war die Abundanz generell höher als im Drainagekanal, wo viele ARGs während des Untersuchungszeitraums mehrmals unter die Bestimmungsgrenze sanken um später wieder detektiert zu werden.

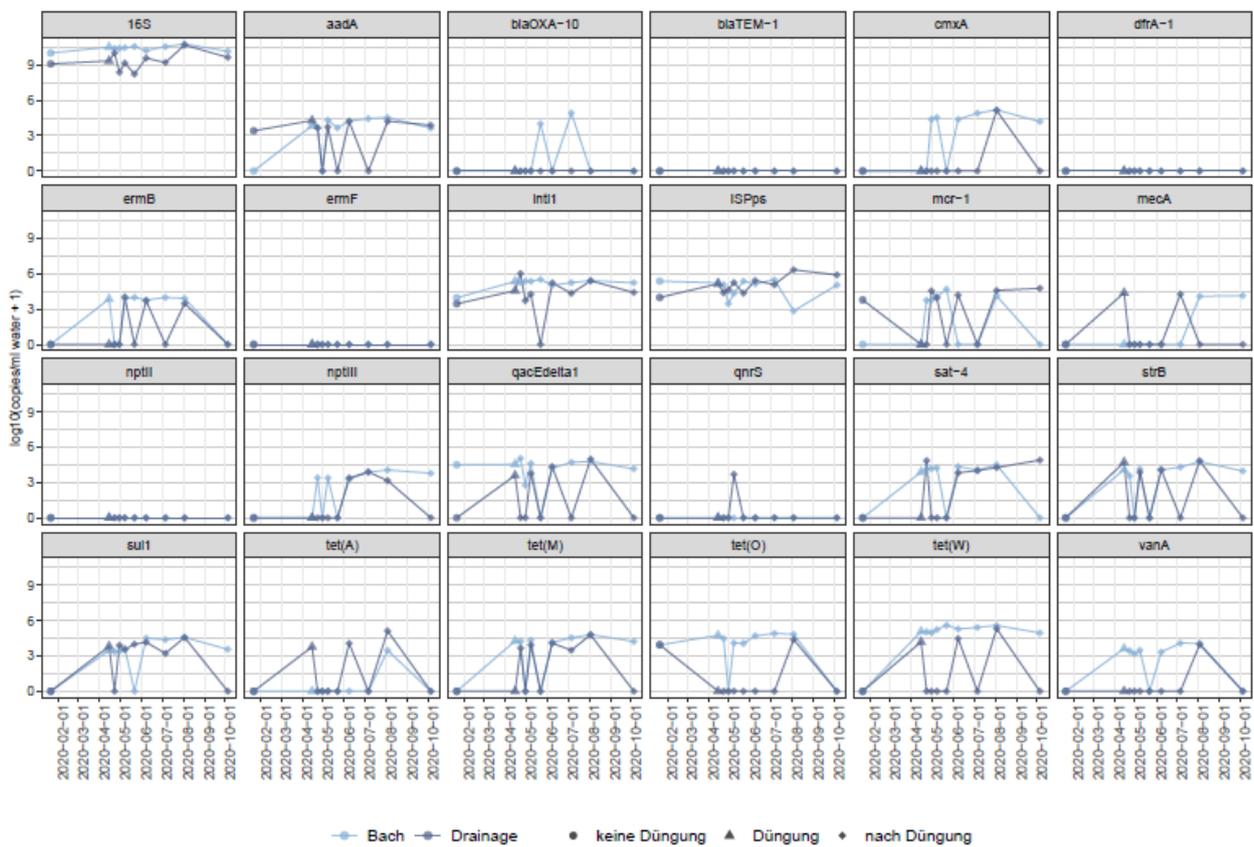


Abbildung 91. Zeitlinien der Target-Abundanz für die HOAL-Oberflächengewässer.

5.2.5 Vergleich HOAL-Flächen und Vergleichsstandorte

An den **nicht-landwirtschaftlich genutzten Vergleichsstandorten** wurde **dasselbe Spektrum** von **ARGs** detektiert wie auf den HOAL-Feldern. Die Anzahl der detektierten Targets pro Einzelprobe war jedoch **geringer**. Sie variierte bei den Vergleichsstandorten zwischen 4 und 18 Targets pro Probe. Die niedrigsten Werte wurden an Nadelwaldstandorten im Wiener Becken und im HOAL-Nadelwald gezählt, die höchsten auf anthropogen stark beeinflussten Grasflächen in Wien. Das langfristig Gülle-freie Feld F04 war mit 12-18 detektierten Targets vergleichbar mit den Grasflächen in Wien. Die langfristig Gülle-gedüngten Felder F31, F39 und F32 befanden sich mit 15-19 detektierten Targets am oberen Rand bzw. oberhalb des Schwankungsbereiches der Vergleichsböden.

Für dieses Gesamtbild waren vor allem 10 Targets verantwortlich: ***dfrA-1***, ***nptIII***, ***strB***, ***aadA***, ***sat-4***, ***sul1***, ***qacEdelta1***, ***tet(A)***, ***tet(M)***, ***tet(O)***. Bei diesen Targets zeigte sich also zusätzlich zum Gülle-Effekt auf den HOAL-Feldern (Abschnitt 5.2.1) ein vermehrtes Auftreten in Ackerböden im Vergleich zu nicht-landwirtschaftlich genutzten Flächen.

Bei ***intl1***, ***tet(W)***, ***ermB*** und ***cmxA*** wurde zusätzlich zum Gülle-Effekt auf den HOAL-Feldern wider Erwarten eine ubiquitäre Verbreitung an den Vergleichsstandorten festgestellt, bei ***ermF*** häufiges Auftreten in den Grasflächen und Laubwaldstandorten in Wien. ***Mcr-1*** war an den Vergleichsstandorten häufiger als auf den HOAL-Feldern.

Bei den übrigen Targets wurden weder ein Gülle-Effekt noch wesentliche Unterschiede zwischen Ackerböden und Vergleichsböden beobachtet. ***Bla_{TEM-1}***, ***vanA*** und ***ISPPs*** wurden ubiquitär und mit zeitlich konstanter Konzentration detektiert. ***MecA***, ***bla_{OXA-10}***, ***nptII*** wurden nur punktuell in Einzelproben verschiedener Standorte detektiert. ***QnrS***, ***bla_{CTX-M-15}***, ***bla_{KPC}*** und ***bla_{NDM-1}*** wurden in keiner Bodenprobe detektiert.

Die Abbildung 92A und Abbildung 92B stellen die qPCR Ergebnisse der HOAL-Felder und HOAL Wälder in den Kontext von Vergleichsböden, die im Raum Wien und Niederösterreich beprobt wurden. Sie umfassten 10 Standorte im Nationalpark Donau-Auen (Probenbezeichnungen beginnen mit DA01-DA10), 5 Standorte aus dem Wiener Becken entlang der Strecke von Wöllersdorf zur Hohen Wand (WD, StA, StB, HW, ND), drei Höhenstufen am Ötscher (Oe1, Oe2, Oe3), sowie sechs Parks bzw. Grünflächen in Wien (LT, PP, VG, AG, HP, BS). Die Vergleichsstandorte waren nicht-landwirtschaftlich genutzte Flächen mit Nadelwald, Laubwald oder Wiese. Anders als auf den HOAL-Flächen wurde jeweils nur an einem oder an zwei Zeitpunkten gesampelt. Eine detaillierte Beschreibung findet sich in Tabelle 2 und in Abschnitt 3.3.

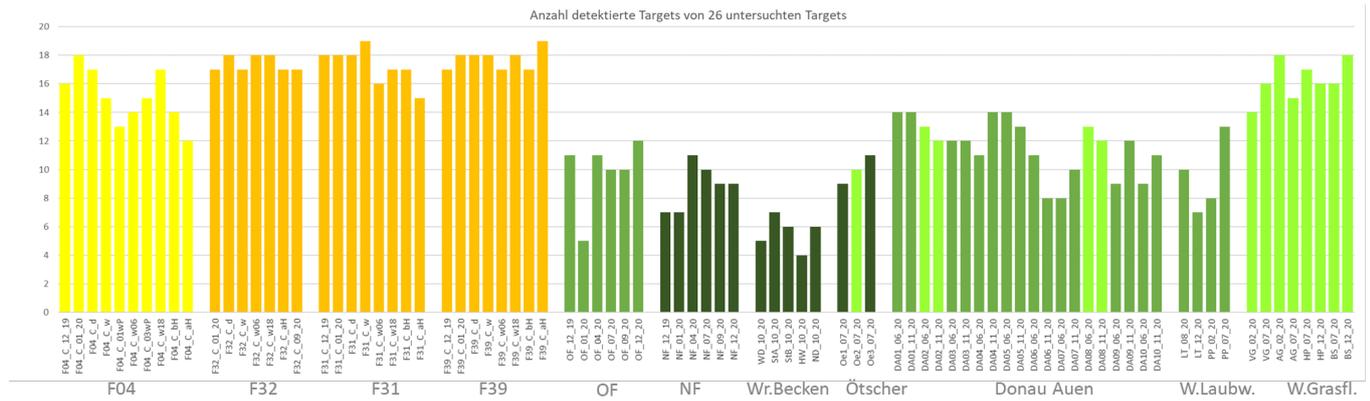
Eine einfache Kennzahl für die ARG-Belastung ist die Gesamtanzahl der detektierten Targets (Targets = ARGs + MGEs). Diese variierte an den Vergleichsstandorten zwischen 4 und 18 Targets pro Probe (Abbildung 92A). Unterschiede in der anthropogenen Belastung der Vergleichsstandorte spiegelten sich nur teilweise in der Verteilung der untersuchten ARG wieder. Die höchsten Werte wurden auf Grasflächen in Wien gezählt, wo von der stärksten anthropogenen Umweltbelastung ausgegangen werden kann. Die niedrigsten Werte wurden jedoch nicht im für seine Naturbelassenheit besonders

bekanntem Ötschergebiet gezählt, sondern an Nadelwaldstandorten im Wiener Becken. Die HOAL-Felder F31, F39 und F32 befanden sich mit 15-19 Targets am oberen Rand bzw. oberhalb dieses Spektrums. Auf Feld F04 lag die Gesamtanzahl mit 12-18 Targets im Schwankungsbereich von anthropogen stark beeinflussten Grasflächen Wien.

Eine weitere einfache Kennzahl ist die summierte Kopienanzahl aller untersuchten Targets (Abbildung 92B). Diese variierte an den Vergleichsstandorten zwischen 10^4 und 7×10^5 . Wieder befanden sich die jahrelang Gülle-gedüngten Felder F31, F32 und F39 mit $4 \times 10^5 - 4 \times 10^6$ am oberen Rand und oberhalb dieses Schwankungsbereiches, während sich Feld F04 mit $6 \times 10^4 - 2 \times 10^5$ innerhalb des Schwankungsbereiches befand.

HOAL-Laubwald und HOAL-Nadelwald waren hinsichtlich Target-Gesamtanzahl und Target-Gesamtkopienzahl vergleichbar mit Laub- bzw. Nadelwäldern an den Vergleichsstandorten.

A



B

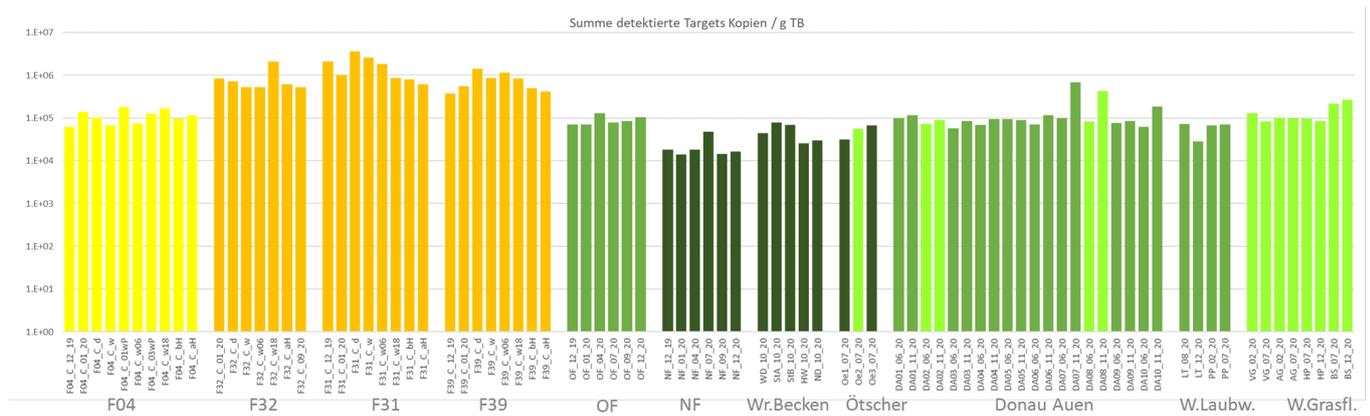


Abbildung 92. Detektierte Targets in HOAL-Bodenproben und Vergleichsstandorten.

A – Anzahl der detektierten Targets von 26 untersuchten Targets. B – Summierte Abundanz der detektierten Targets (Summe der Kopien aller Targets). Farbcode: **Acker**, **Wiese**, **Laubwald**, **Nadelwald**. Kopien/g TG – Kopien pro Gramm Trockenboden. W.Laubw. = Laubwaldflächen in Wien, W.Grasfl. = Grasflächen in Wien.

In Abbildung 93 wurde die Heatmap aus Abbildung 88 um die Vergleichsböden erweitert. In der Kopfzeile der Heatmap ist erkenntlich, wie die Vergleichsstandorte zu **fünf Vergleichsgebieten** zusammengefasst wurden. Abbildung 94A zeigt die Abundanz der einzelnen Targets in HOAL-Flächen und Vergleichsgebieten als Boxplots. Abbildung 94B zeigt, bei welchen Targets in einer ANOVA mit paarweisen Post-Hoc Vergleichen nach Tukey signifikante Unterschiede zwischen HOAL-Flächen und den Vergleichsgebieten festgestellt wurden. Ähnlich wie in den HOAL-Wäldern gab es in den Vergleichsgebieten insgesamt mehr negative Proben als in den HOAL-Feldern, d.h. mehr Proben in denen Targets nicht detektiert wurden („**Lücken**“). Vergleicht man die Abbildung 93 und Abbildung 94B miteinander, so zeigt sich, dass das Ergebnis der ANOVA stark vom Anteil der negativen Proben in den Vergleichsgebieten bestimmt wurde.

Jene 4 Targets, die nicht in den HOAL-Flächen detektiert wurden (**Verteilungstyp 1** in Abbildung 93), wurden auch in den Vergleichsflächen nicht detektiert (*bla_{CTX-M-15}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM-1}*, *qnrS*). Daher wurde keine ANOVA durchgeführt.

Von den 4 Targets, die auf den HOAL-Flächen selten detektiert wurden (**Verteilungstyp 2** in Abbildung 93), war *nptII* auch auf den Vergleichsflächen selten, *bla_{OXA-10}* und *mecA* oder wurden gar nicht detektiert. *Mcr-1* hingegen war im Wiener Becken, in den Donau-Auen und in Wiener Grasflächen häufig, sodass sich in der ANOVA signifikante Unterschiede zu den HOAL-Flächen ergaben (Abbildung 94B).

Von den vier über alle HOAL-Felder konstant verteilten Targets (**Verteilungstyp 4** in Abbildung 93), war *ISPPs* auch in den Vergleichsflächen so ubiquitär verteilt, dass mit der ANOVA keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden (Abbildung 94B). *VanA* und *bla_{TEM-1}* waren ebenfalls ubiquitär verteilt, jedoch mit Lücken im Wiener Becken, sodass sich signifikante Unterschiede zwischen Wiener Becken und HOAL-Flächen ergaben (Abbildung 94B). Bei *IntI1* gab es Lücken im HOAL-Laubwald, im Wiener Becken, und in den Laubwald-Flächen in Wien, weswegen sich vielfältige paarweise Unterschiede ergaben (Abbildung 94B).

ErmF, das im HOAL Gebiet ausschließlich auf Gülle-gedüngten Feldern nach der Gülle-Applikation detektiert wurde, konnte auch in Wiener Laubwald- und Grasflächen detektiert (Abbildung 93, Abbildung 94A). Da hier der Anteil der positiven Proben größer war, war auch die Abundanz von *ermF* signifikant höher als auf den HOAL-Flächen (Abbildung 94A und B).

Von den Targets, bei denen in den Abschnitt 5.2.1 ein langfristiger Gülle-Effekt festgestellt wurde (**Verteilungs-Typ 3** in Abbildung 93) erwies sich keines als spezifisch für Ackerböden. Sie wurden alle auch an Vergleichsstandorten detektiert. *ErmB* und *cmxA* waren ubiquitär verteilt, mit Lücken in den Donau-Auen, *tet(W)* war ubiquitär mit Lücken im Wiener Becken und am Ötscher. Signifikante Unterschiede zu den HOAL-Feldern ergaben sich hier nur für die Vergleichsgebiete mit Lücken. Betrachtet man die Verteilung der übrigen 10 Targets dieser Gruppe (*dfrA-1*, *nptIII*, *strB*, *aadA*, *sat4*,

sul1, qacEdelta1, tet(A), tet(M), tet(O) in den Vergleichsgebieten, so kann man zusammenfassend festhalten: Sie wurden im Wiener Becken am seltensten und auf den Wiener Grasflächen am häufigsten detektiert. Ötscher, Donau-Auen und Wiener Laubwälder lagen im Mittelfeld (Abbildung 93 und Abbildung 94). Die ANOVA mit den paarweisen Vergleichen zeigte, dass diese Targets in den langjährig Gülle-gedüngten Feldern signifikant abundanter waren als in allen 5 Vergleichsgebieten (*dfrA-1, nptIII, strB, aadA, sat-4, sul1, qacEdelta1*) bzw. abundanter als in 4 der 5 Vergleichsgebiete (*tet(A), tet(M), tet(O)*). Auch im langjährig nicht Gülle-gedüngten Feld F04 waren 9 dieser 10 Targets (alle außer *dfrA-1*) signifikant abundanter als in 1 – 4 Vergleichsgebieten. F04 unterschied sich hier immer von Wiener Becken, und nie von den Grasflächen in Wien (Abbildung 94B). Die Verteilung dieser Targets (*dfrA-1, nptIII, strB, aadA, sat-4, sul1, qacEdelta1, tet(A), tet(M), tet(O)*) war also für die in den Gesamtkennzahlen beobachteten Unterschiede zwischen HOAL-Feldern und Vergleichsstandorten (Abbildung 93) verantwortlich.

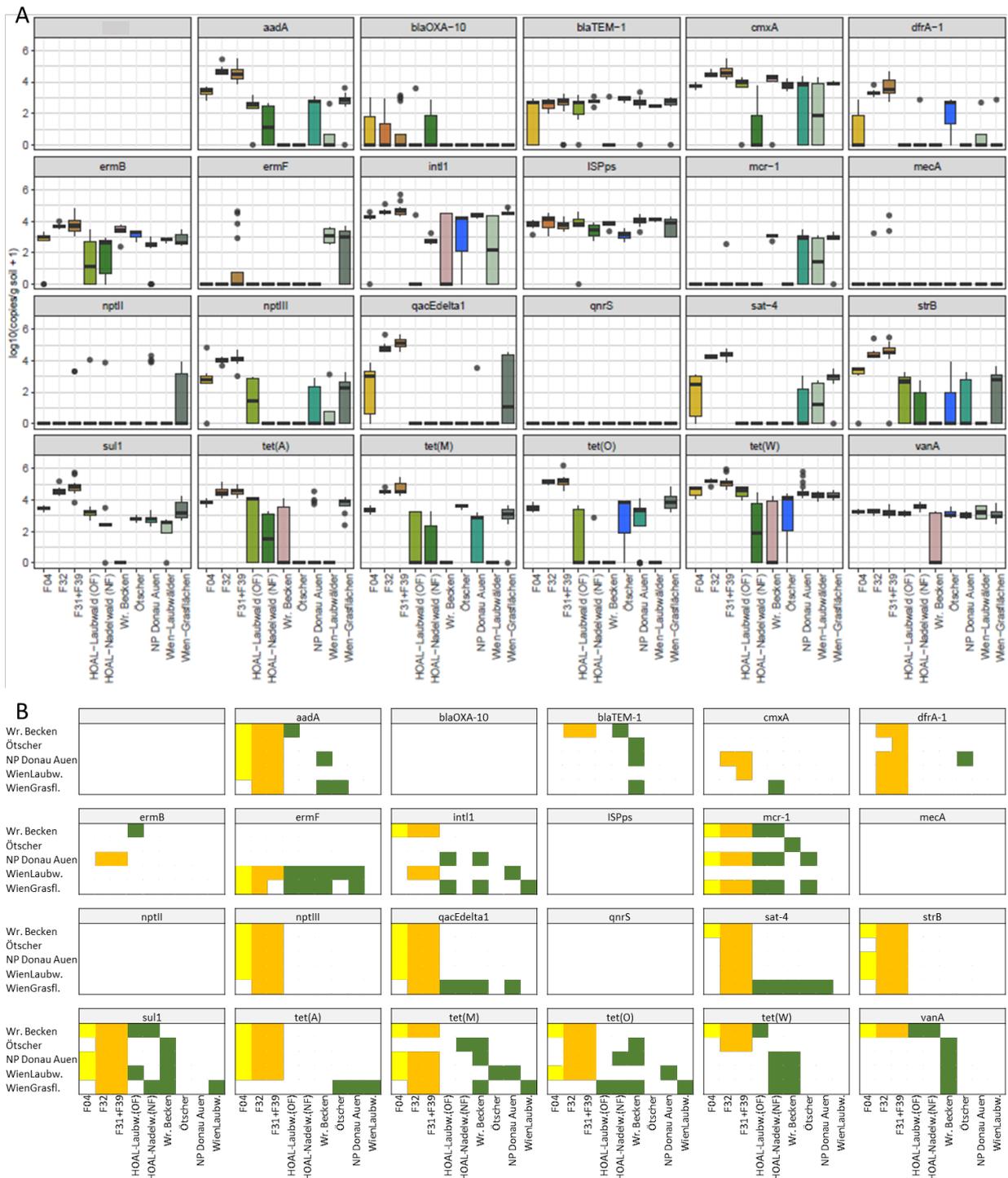


Abbildung 94. Abundanz der Targets in HOAL-Feldern und Vergleichsböden.

A) Abundanz-Boxplots. B) Ergebnis einer ANOVA mit post-hoc Vergleichen nach Tukey. Die paarweisen Vergleiche sind als Matrix angeordnet. Signifikante paarweise Unterschiede ($p < 0.05$) sind farblich markiert: **zwischen F04 und Vergleichsgebieten (gelb)**, **zwischen F32, F31+F39 und Vergleichsgebieten (orange)**, **zwischen Vergleichsflächen und HOAL-Wäldern bzw. Vergleichsgebieten untereinander (grün)**. Vergleiche der HOAL-Flächen untereinander sind nicht dargestellt, weil sie in den Abschnitten 5.1.1 und 5.1.2 behandelt wurden.

5.2.6 Vergleich Composite und Triangle Sampling

Alle bisher gezeigten qPCR Ergebnisse wurden aus Composite Samples gewonnen. Auf den vier HOAL-Feldern wurden außerdem zu allen Zeitpunkten Proben nach dem weniger aufwändigen Triangle-Prinzip gezogen. Anhand von drei Targets wurde geprüft, ob qPCR Ergebnisse von Composite und Triangle Proben übereinstimmen (Abbildung 95). Bei *16S* waren die Ergebnisse von Composite und Triangle-Proben schwach korreliert ($r=0.55$), bei *sul1* ($r=0.09$) und *tet(W)* ($r=0.22$) gar nicht. Das Triangle-Sampling kann das Composite Sampling bei zukünftigen Untersuchungen also nicht ersetzen.

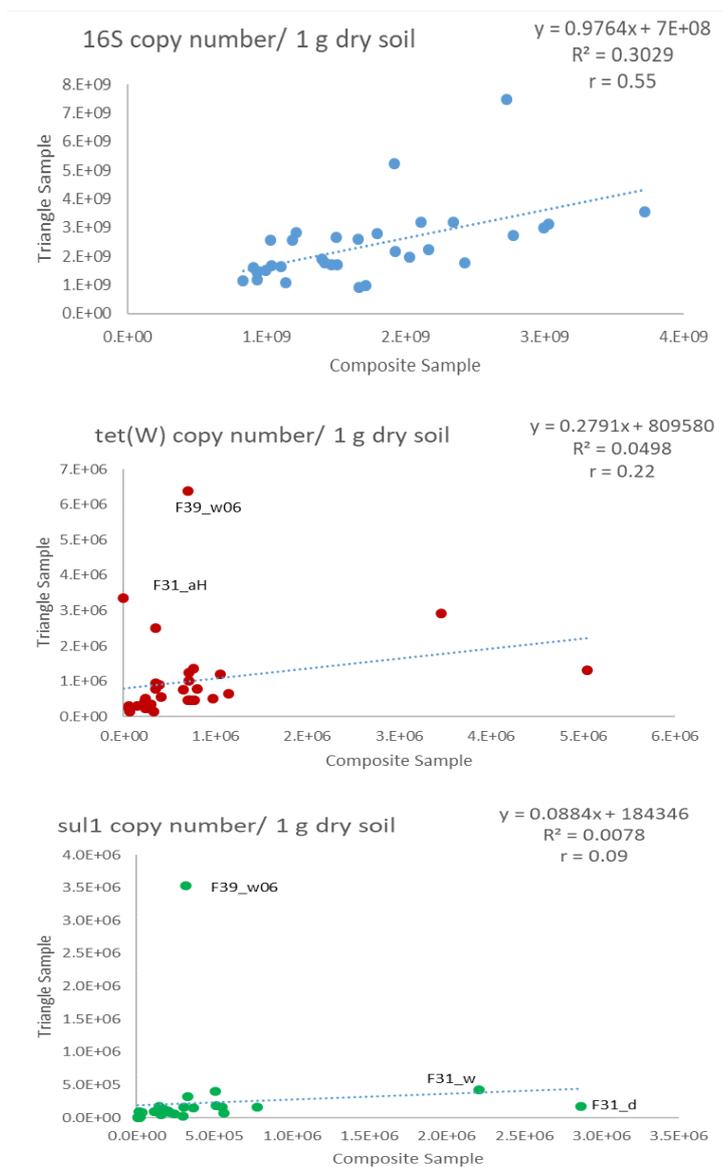


Abbildung 95. Korrelation der qPCR-Ergebnisse aus Composite- und Triangle-Proben.

5.3 Taxonomische Charakterisierung der Bodenbakterien-Population: Illumina MiSeq 16S Amplikon Sequenzierung

Bei 68 Bodenproben, 5 organischen Düngern (1x Kompost, 1x Schweinekot, 3x Schweinegülle) und 8 Wasserproben wurde eine **16S rRNA-Gen Amplikon Sequenzierung** durchgeführt. Je Probe wurden 20 000 – 40 000 auf Qualität gefilterte Sequenzen analysiert.

Die **bakterielle Diversität** war in den **Bodenproben** generell **höher** als in Wasserproben und organischen Düngematerialien. Die Genera *Clostridium sensu stricto 1*, *Terrisporobacter*, *Turicibacter* und *Romboutsia* wurden in Schweinegülle und in den Gülle-gedüngten Feldern besonders häufig detektiert, mit einem Anstieg nach der Gülle-Applikation. Diese Daten deuten darauf hin, dass Bakterien von der Gülle in den Boden eingebracht wurden. In einer Netzwerkanalyse wurde die Korrelation der Antibiotika-Resistenzgen Konzentrationen mit der Häufigkeit der Bakterien-Genera untersucht. Hierbei konnte vor allem das Bakterium ***Terrisporobacter*** als **potentieller Resistenzträger** identifiziert werden, da die Antibiotikaresistenzgene *dfrA-1*, *nptIII*, *sat-4* und das Antiseptika-Resistenzgen *qacEdelta1* positiv nach Spearman mit dieser Gattung korrelieren.

Zusätzlich wurden in den untersuchten Proben Bakterien-Spezies bzw. -Genera identifiziert, die klinisch relevant sein könnten. Dazu zählten *Aeromonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium* und *Pseudomonas*. Diese Gattungen sind sowohl als Umweltkeime wie auch als Erreger von nosokomialen Infektionen dokumentiert.

Ein weiteres Ziel des MARGINS-I Projektes war es, anhand der *16S rRNA* Sequenzdaten die taxonomische Zusammensetzung und Diversität der bakteriellen Mikroflora in den Proben zu bestimmen. Es wurden insgesamt 81 Proben aus verschiedenen Matrices (Boden, Oberflächenwasser, Kompost, Schweinegülle, Schweinekot) sequenziert. Hierbei wurden alle Proben auf 50.000 Sequenz-Reads normalisiert, von denen nach der Rohdaten-Bearbeitung (Qualitätsfilter, Zusammenführung von „paired-end“ Sequenzpaaren, Entfernung von Chimären) zwischen 20.587 bis 39.180 Reads pro Probe in die weiteren Analysen gingen.

Insgesamt konnten folgende taxonomische Einheiten identifiziert werden:

- 60 Phyla
- 148 Klassen
- 358 Ordnungen
- 446 Familien
- 1057 Genera
- 722 Spezies

Zunächst wurden die unterschiedlichen Proben-Matrices (Boden, Wasser, Schweinegülle, Schweinekot, Kompost) miteinander verglichen (Abbildung 96).

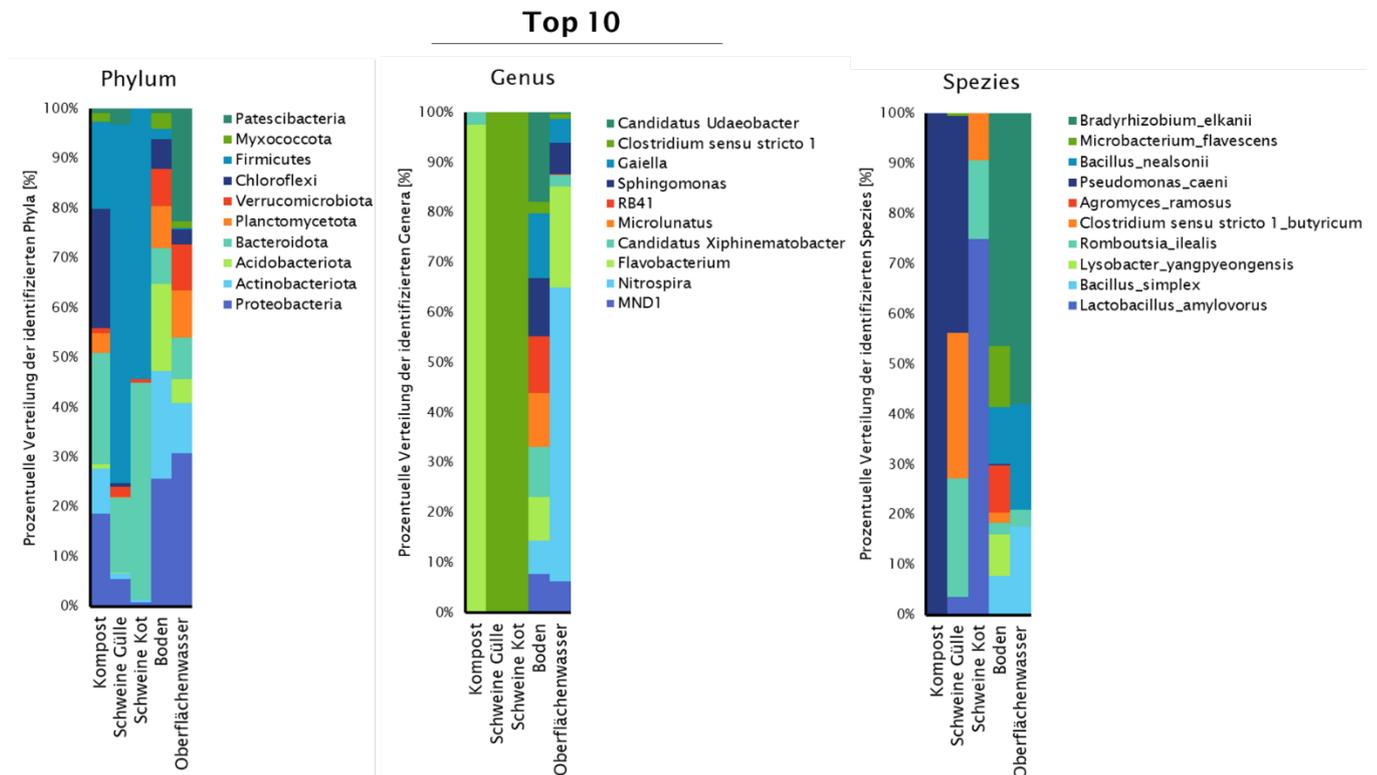


Abbildung 96. Top 10 Phyla, Genera und Spezies in den verschiedenen Probenmatrices.

Auf Phylum-Level konnten 99% der Amplicon Sequenz Varianten (ASVs) einem bestimmten Phylum zugeordnet werden. Die Oberflächenwasser-Proben (HOAL-Bach und HOAL-Drainage) zeigten eine ähnliche Zusammensetzung wie die Bodenproben, mit *Proteobacteria* an häufigster Stelle. Im Oberflächen-Wasser war auch das Phylum der *Patescibacteria* sehr dominant vertreten, während es bei den Boden-Proben erst an neunter Stelle vorkam. In den organischen Dünger-Proben

(Schweinegülle, Schweinekot und Kompost) war das Phylum *Firmicutes* dominant. An zweiter Stelle standen *Chloroflexi* bei der Kompost-Probe und *Bacteroidota* bei Schweinegülle und Schweinekot.

Auf Genus-Level konnten nur 41% der ASVs einem bestimmten Genus zugeordnet werden. Bei den 10-häufigsten Genera dominierte *Clostridium sensu stricto 1* in der Schweinegülle und im Schweinekot, während im Kompost *Flavobacterium* dominierte. Die Bodenproben zeigten eine diversere und ausgewogenere Zusammensetzung mit *Candidatus Udaeobacter* an erster Stelle. In den Oberflächenwasser-Proben war *Nitrospira* die häufigste Gattung.

Auf Spezies-Level konnten nur 4 % der Sequenzen sicher identifiziert werden. Die am häufigsten identifizierte Arten waren *Pseudomonas caeni* in der Schweinegülle und im Kompost, *Lactobacillus amylovorus* im Schweinekot und *Bradyrhizobium elkanii* in Böden und Oberflächen-Wasser.

Unterschiede in der Struktur der bakteriellen Mikroflora zwischen den einzelnen Proben wurden als Bray-Curtis Distanzen berechnet und in Nicht-metrisch Multi-Dimensionalen Skalen- (NMDS-) Plots dargestellt. Bodenproben und Oberflächenwasser-Proben formten separate Cluster, Schweinegülle und Schweinekot bildeten ein gemeinsames Cluster und die Kompostprobe ordnete sich getrennt von allen anderen Proben in die Skalierung ein (Abbildung 97).

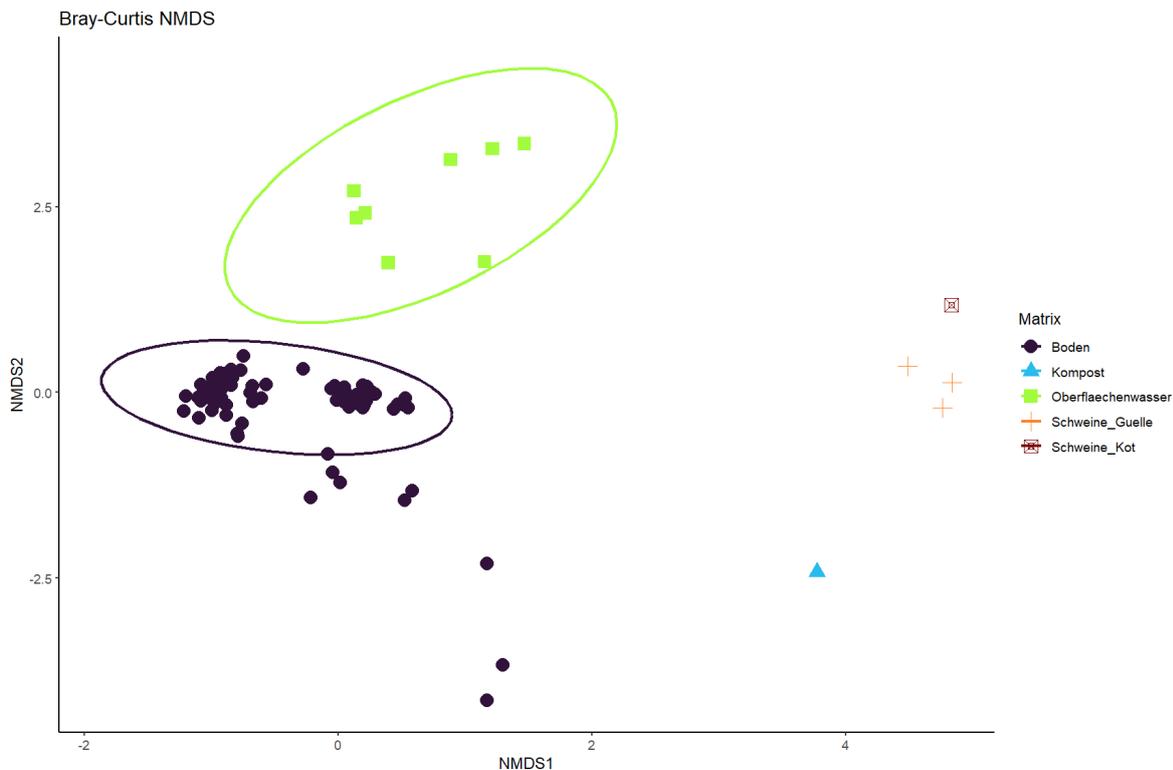


Abbildung 97. NMDS: Beta-Diversität in verschiedenen Proben-Matrices.

Die multivariate t-Test Verteilung im 95% Konfidenzintervall wurde als Kreis dargestellt

Abbildung 98 zeigt die alpha-Diversitätsindices „Chao1“, „Shannon-Index“ und „Inverser Simpson-Index“ für die untersuchten Proben-Matrices.

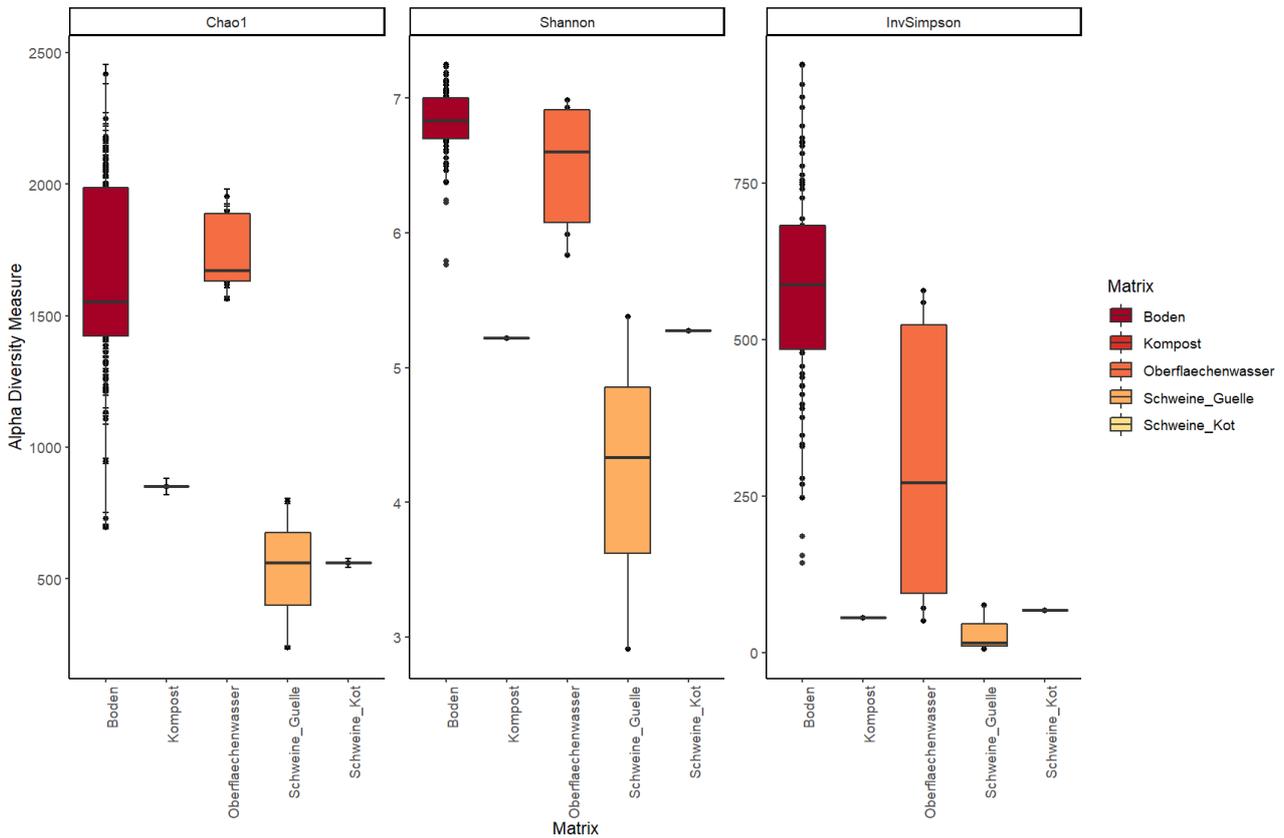


Abbildung 98. Alpha-Diversitäts-Indices für die verschiedenen Proben-Matrices.

Die horizontalen Linien in den Boxen stellen den Median dar, die Box repräsentiert den inter-quantilen Bereich (IQR), die Whisker stellen Proben im 1,5-fachen IQR von den unteren und oberen Quantilen, individuelle Punkte stellen Ausreißer dar.

Chao1, der Artenvielfalts-Index, zeigte, dass die Schweinekot- und Gülle-Proben die niedrigste Anzahl an unterschiedlichen ASVs besaßen, gefolgt von der Kompost-Probe, den 6 Wasserproben und den 68 Bodenproben. Die Artenvielfalt und die Dominanz einzelner Taxa/ASVs wurde mittels Shannon-Index und Inversem Simpson-Indices berechnet. Auch hier konnte eine ähnliche Verteilung wie bei Chao1 festgestellt werden.

Im nächsten Schritt wurde die Gruppe der Bodenproben nach ihrem Ursprung (Probenahme-Standorte) in feinere Gruppen aufgetrennt.

Top 10

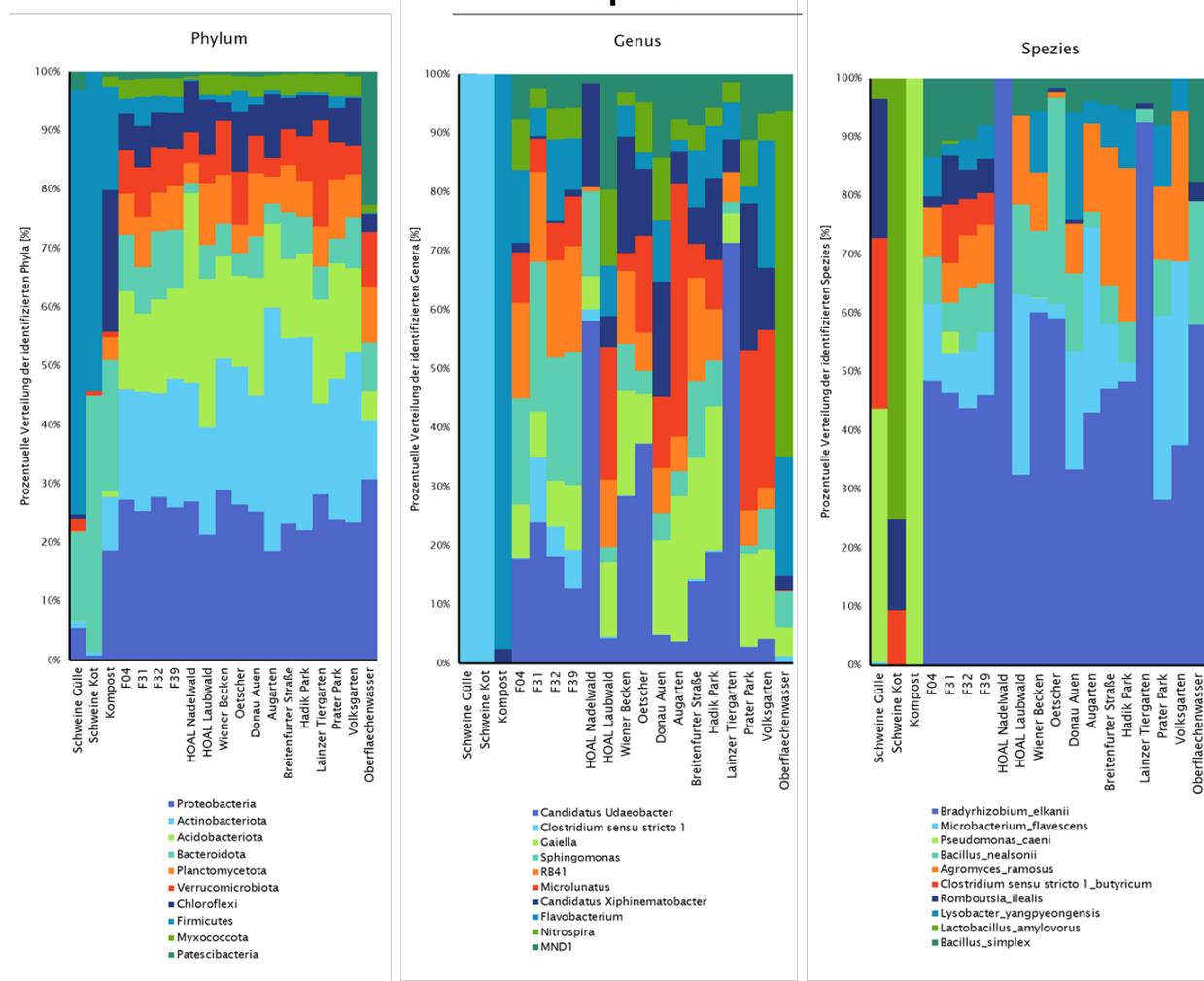


Abbildung 99. Top 10 Phyla, Genera und Spezies je Probenentnahmeort.

Die 10 am häufigsten identifizierten Phyla waren über alle Bodenproben ähnlich verteilt (Abbildung 99). Auf Genus-Ebene gab es Unterschiede zwischen den Standorten. Während in den Ackerfeldern vor allem *Candidatus Udaeobacter*, *Sphingomonas* und *RB41* vorzufinden waren, wurden in den Donau-Auen *Candidatus Xiphinematobacter* und *Gaiella* am öftesten detektiert. Auch in den Nadelwäldern und in einigen urbanen Proben (Breitenfurter Straße, Hadikpark und Lainzer Tiergarten) wurde *Candidatus Udaeobacter* am häufigsten identifiziert. Die Prater- und Volksgarten-Proben hatten *Microlunatus* und *Candidatus Xiphinematobacter* an erster Stelle. Auf Spezies-Ebene, wo nur 4% aller ASV identifiziert werden konnten, zeigte die Auftrennung nach Standorten, dass die häufigste Spezies, *Bradyrhizobium elkani*, im HOAL-Nadelwald und im Lainzer Tiergarten besonders dominant war.

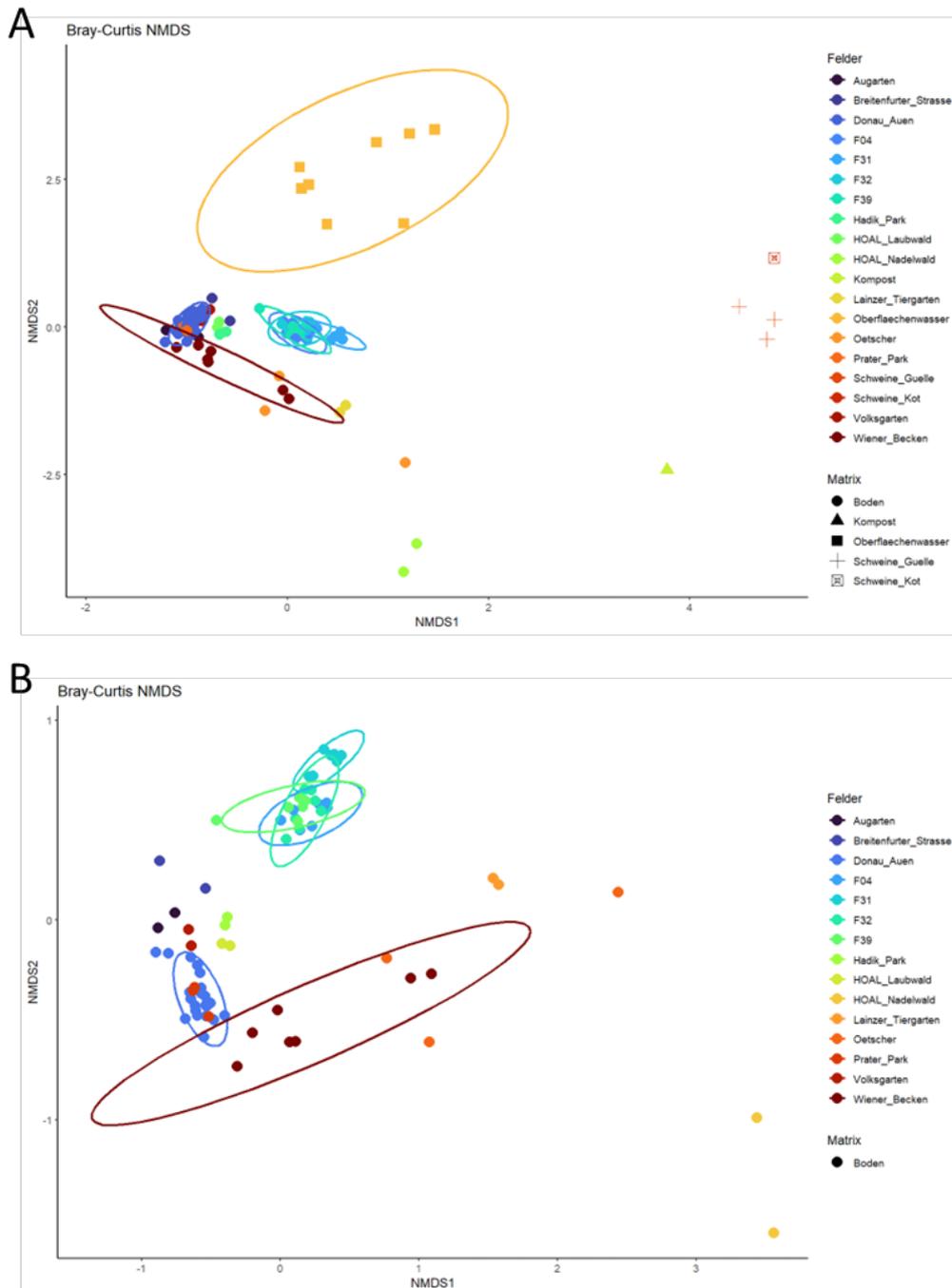


Abbildung 100. Beta-Diversität der Proben nach Ursprungsort (Bray-Curtis NMDS-Plots).

Die unterschiedlichen Orte sind in der Legende „Felder“ mit unterschiedlichen Farben gekennzeichnet. Die verschiedenen Matrices sind mit unterschiedlichen Symbolen versehen. Die multivariate t-Test Verteilung im 95% Konfidenzintervall wurde als Kreis dargestellt. In A) werden alle sequenzierten Proben, in B) alle Boden-Proben dargestellt.

Auch die Bray-Curtis NMDS-Plots zeigten, dass es Unterschiede zwischen den einzelnen Probeentnahmeorten gab. Die Feldproben F04, F31, F32 und F39 bildeten ein gemeinsames Cluster. Von den Vergleichsböden standen die Proben aus den Donau-Auen in einem Sub-Cluster dicht beisammen. Der HOAL-Nadelwald lag abseits von allen anderen Proben.

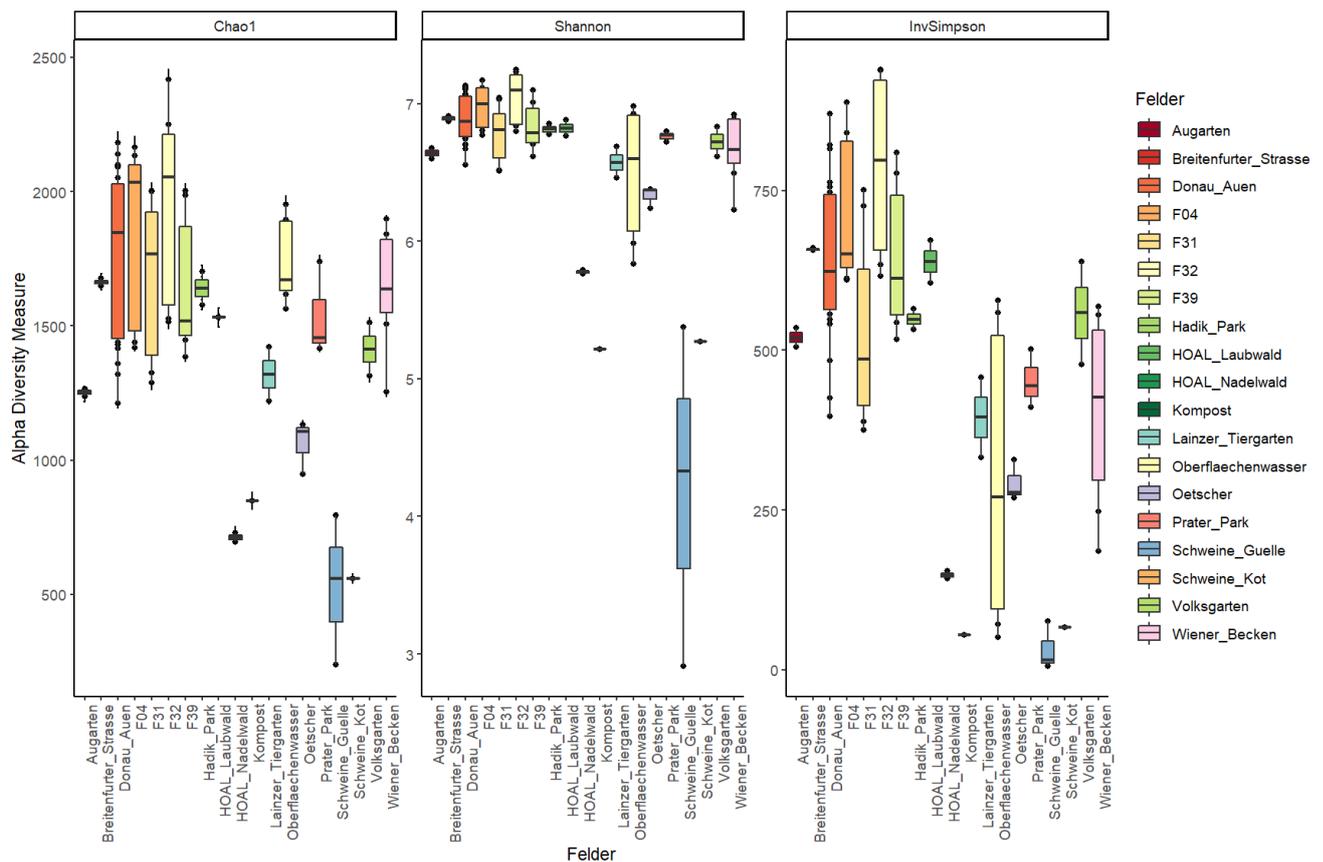


Abbildung 101. Alpha-Diversitäts-Indices je Probenentnahmeort.

Die horizontalen Linien in den Boxen zeigen den Median. Die Box repräsentiert den inter-quantilen Bereich (IQR), die Whisker stellen Proben im 1,5-fachen IQR von den unteren und oberen Quantilen dar.

Anhand der alpha-Diversitäts-Indices konnte gezeigt werden, dass die Feldproben F04, F31, F32 und F39 eine ähnliche Artenvielfalt (Chao1) aufwiesen wie die Proben von Nationalpark Donau-Auen, Wiener Becken und Prater (Abbildung 101). Für den HOAL-Nadelwald ergab sich ein niedrigerer Artenvielfaltsindex. Die Bakterienpopulation in den organischen Düngematerialien zeigte die niedrigste Artenvielfalt (Chao1) und die am wenigsten ausgewogene Zusammensetzung (Shannon, Invers Simpson), gefolgt von „HOAL-Nadelwald“ und den restlichen Nadelwäldern.

5.3.1 Bakterielle Taxa-Verteilung im HOAL-Betrieb

In diesem Kapitel wurden die verschiedenen Proben aus dem HOAL-Gebiet genauer dargestellt und verglichen. Insgesamt konnten 12 Phyla in allen HOAL Probenentnahmestellen und Proben–Matrices nachgewiesen werden:

- Proteobacteria
- Actinobacteriota
- Acidobacteriota
- Bacteroidota
- Firmicutes
- Verrucomicrobiota
- Planctomycetota
- Chloroflexi
- Patescibacteria
- Cyanobacteria
- Bdellovibrionota
- Elusimicrobiota

32 Phyla wurden in allen 4 Feldern identifiziert (F04, F31, F32 und F39), wobei 3 spezifisch nur bei F04 (*Nanoarchaeota*, *Calditrichota* und *GAL15*), 2 nur bei F31 (*Euryarchaeota* und *Caldatribacteriota*), 2 nur bei Feld F32 (*WPS-2* und *Synergistota*) und kein Phylum nur in F39 vorkam. Das Phylum *Euryarchaeota* war spezifisch für die Schweinegülle und das Gülle-gedüngte Feld F31.

Fünf Phyla wurden nur in der Schweinegülle gefunden: *Iainarchaeota*, *Fusobacteriota*, *Deferribacterota*, *Margulisbacteria* und *Cloacimonadota*. *Euryarchaeota* und *Campylobacterota* wurden sowohl in der Schweinegülle, als auch im Schweinekot und der Kompost-Probe beobachtet. Die Phyla *Halobacterota*, *Armatimonadota* und *Fibrobacterota* kamen bei den Schweinegülle-Proben und den Acker-Feldern vor, jedoch nicht in HOAL-Nadelwald und HOAL-Laubwald. Acht Phyla (*DTB120*, *WOR-1*, *Dadabacteria*, *Micrarchaeota*, *Aenigmarchaeota*, *Nitrospinota*, *Deinococcota* und *AncK6*) konnten spezifisch in den HOAL-Oberflächenwasser-Proben identifiziert werden.

Auf Genus-Level wurden vier Taxa aus dem Phylum *Firmicutes* identifiziert, welche ausschließlich in der Schweinegülle und in den Gülle-gedüngten Feldern auftraten (Abbildung 102). *Clostridium sensu stricto 1*, welches sehr dominant in der Gülle war, wurde auch mit hoher Read-Anzahl in den mit Gülle-gedüngten Feldern F31, F32 und F39 identifiziert. Im Feld F31 wurde bei diesem Genus einen Tag und eine Woche nach der Güllendüngung eine zehnfache Erhöhung der Read-Anzahl beobachtet. Im Langzeit-anorganisch gedüngten Feld F04 wurde das Genus nur zu zwei verschiedenen Zeitpunkten je einmal detektiert, im HOAL-Laubwald wurde ein einziger Read in der Winter-Probe

detektiert und im HOAL-Nadelwald 8 Reads in der Sommer-Probe. Im HOAL-Bach wurde das Genus in 75% und im Drainage-Wasser in allen sequenzierten Proben detektiert (Read-Anzahl < 30).

Terrisporobacter trat in der Schweinegülle und in den Gülle-gedüngten Feldern auf ohne ein einziges Mal im Laubwald, Nadelwald, Oberflächenwasser oder im langjährig Gülle-freien Feld F04 detektiert zu werden. Das Genus *Turicibacter* kam in allen Proben der Gülle-gedüngten Felder mit 20-100 Reads vor, mit einer Verdopplung in der Read-Anzahl einen Tag nach der Gülle-Applikation. *Turicibacter* wurde nur zweimal mit weniger als 10 Reads im nicht-Gülle gedüngten Feld F04 sowie in 2 Proben des Oberflächenwassers nachgewiesen.

Das Genus *Romboutsia* wurde in der Gülle und in den meisten Proben der langjährig Gülle-gedüngten Felder F31, F32 und F39 identifiziert. Im anorganisch gedüngten Feld F04 wurde diese Gattung nur an zwei Zeitpunkten detektiert, im Oberflächenwasser nur in drei der insgesamt 8 Proben.

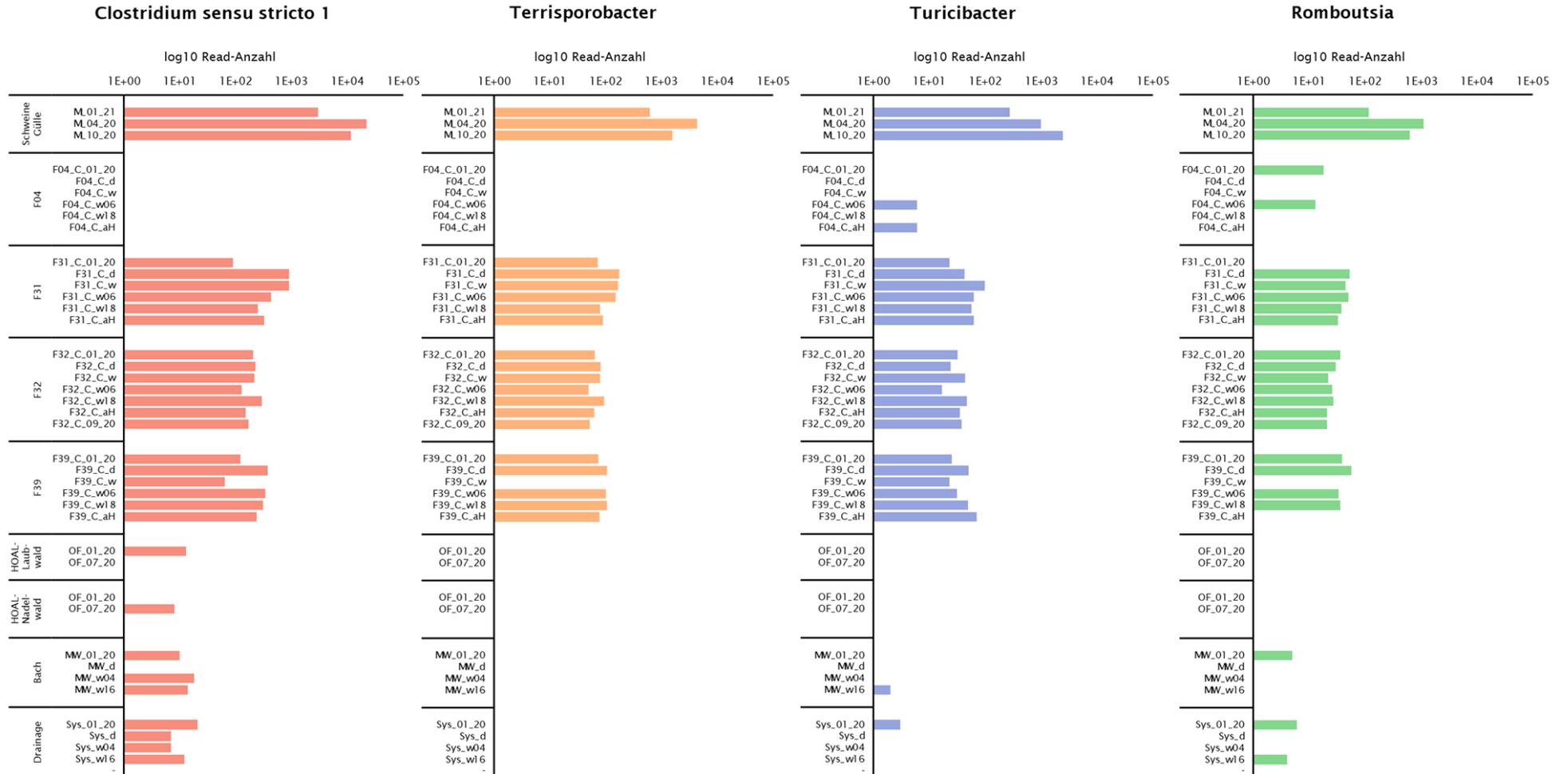


Abbildung 102. Gülle-assoziiertes Auftreten einzelner Genera.

Die vier häufigsten Genera, die ausschließlich in der Gülle und den Gülle-gedüngten Feldern identifiziert wurden Die Abundanz der Reads wurde anhand der logarithmischen Skala in Balken dargestellt.

Abbildung 103 zeigt die HOAL-Proben im NMDS. Hier ist erkenntlich, dass die 4 HOAL-Felder insgesamt einen ähnliche Populations-Zusammensetzung hatten und ein enges Cluster bildeten. Die Bakterien-Population des HOAL-Laubwaldes war jener der Ackerböden ähnlich, jene des HOAL-Nadelwaldes hingegen sehr verschieden. Die Oberflächenwasser-Proben bilden auch in dieser NMDS ein eigenes Cluster, jedoch mit stärkeren unterschieden innerhalb der Gruppe als bei den Ackerboden-Proben.

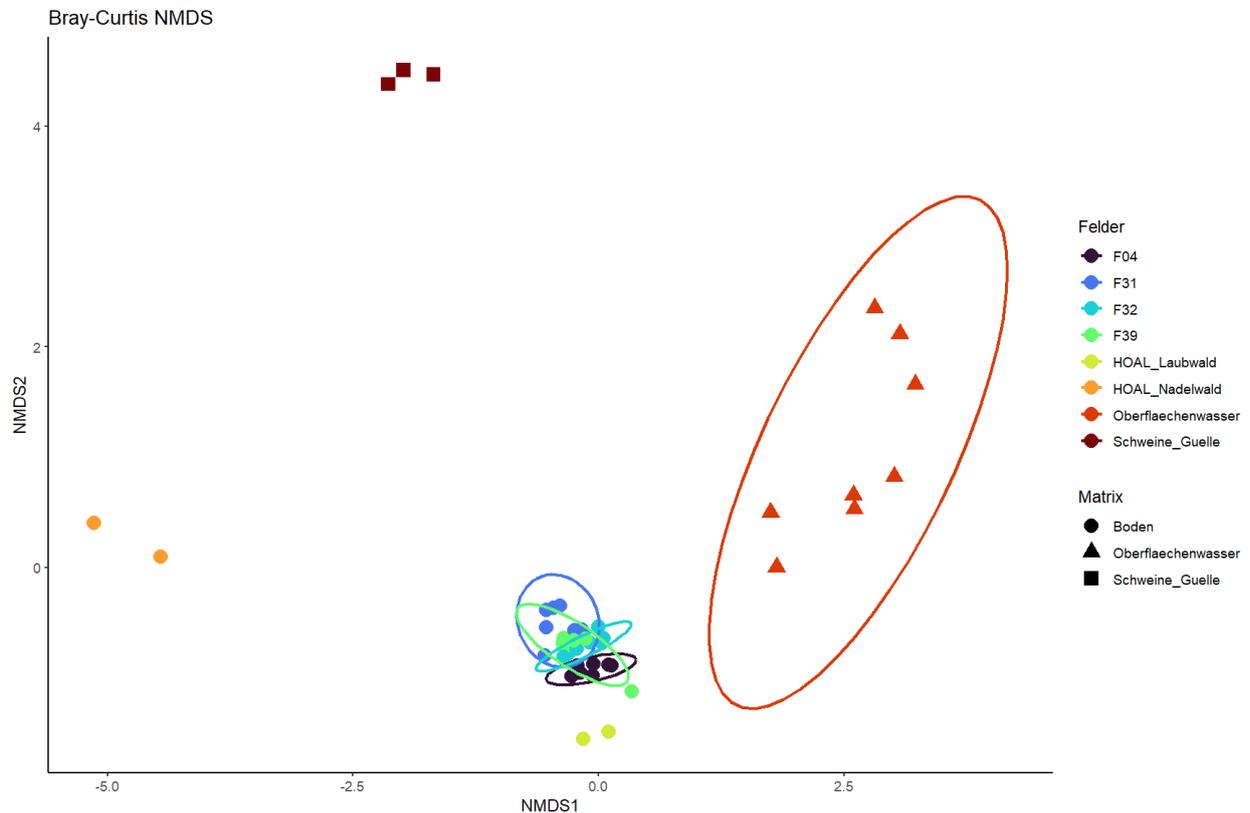


Abbildung 103. NMDS: Beta-Diversität der HOAL-Proben nach Probenentnahmeort.

Die unterschiedlichen Orte sind in der Legende „Felder“ mit unterschiedlichen Farben gekennzeichnet und die verschiedenen Matrices sind unter „Matrix“ mit unterschiedlichen Symbolen versehen. Die multivariate t-Test Verteilung im 95%-Konfidenzintervall wurde als Kreis dargestellt.

Bei der alpha-Diversitäts-Analyse anhand von Chao1, Shannon-Index und inverser Simpson Index zeigte sich, dass unter den HOAL-Proben die Ackerböden die höchste bakterielle Diversität aufwiesen, gefolgt vom Oberflächenwasser, Laubwald, Kompost, Nadelwald, Schweinegülle und Schweinekot (Abbildung 104). Des Weiteren wurden Wilcoxon-Tests ($\alpha=5\%$) durchgeführt, um das Gülle-gedüngte Feld F31 mit den restlichen HOAL-Proben zu vergleichen. Anhand des Chao1-Index wurde lediglich zur Schweinegülle ein signifikanter Unterschied festgestellt ($p=0,017$), wobei die Schweinegülle eine signifikant niedrigere Speziesdiversität aufwies als F31. Anhand des Shannon-Index wurden signifikante Unterschiede zwischen F31 und Schweinegülle ($p=0,017$) und zwischen F31 und F32 ($p=0,035$) detektiert, wobei F32 eine signifikant höhere bakterielle Diversität aufzeigte als F31. Der

Inverse Simpson-Index konnte zusätzlich auch noch eine signifikant höhere alpha-Diversität im nicht-Gülle-gedüngten Feld F04 im Vergleich zu F31 feststellen ($p=0,038$).

In gleicher Weise wurde das Feld F04 in Wilcoxon-Tests ($\alpha= 5\%$) mit den übrigen HOAL-Proben verglichen. Bei Feld F04 zeigten alle drei alpha-Diversitäts-Indices eine signifikant höhere Diversität als in der Schweinegülle an (nicht gezeigt). Ansonsten gab es keine signifikanten Unterschiede mit Ausnahme des Inversen Simpson-Index, bei welchem, wie vorhin beschrieben, eine signifikant höhere Artenvielfalt bei F04 ermittelt wurde als bei F31 (Abbildung 104).

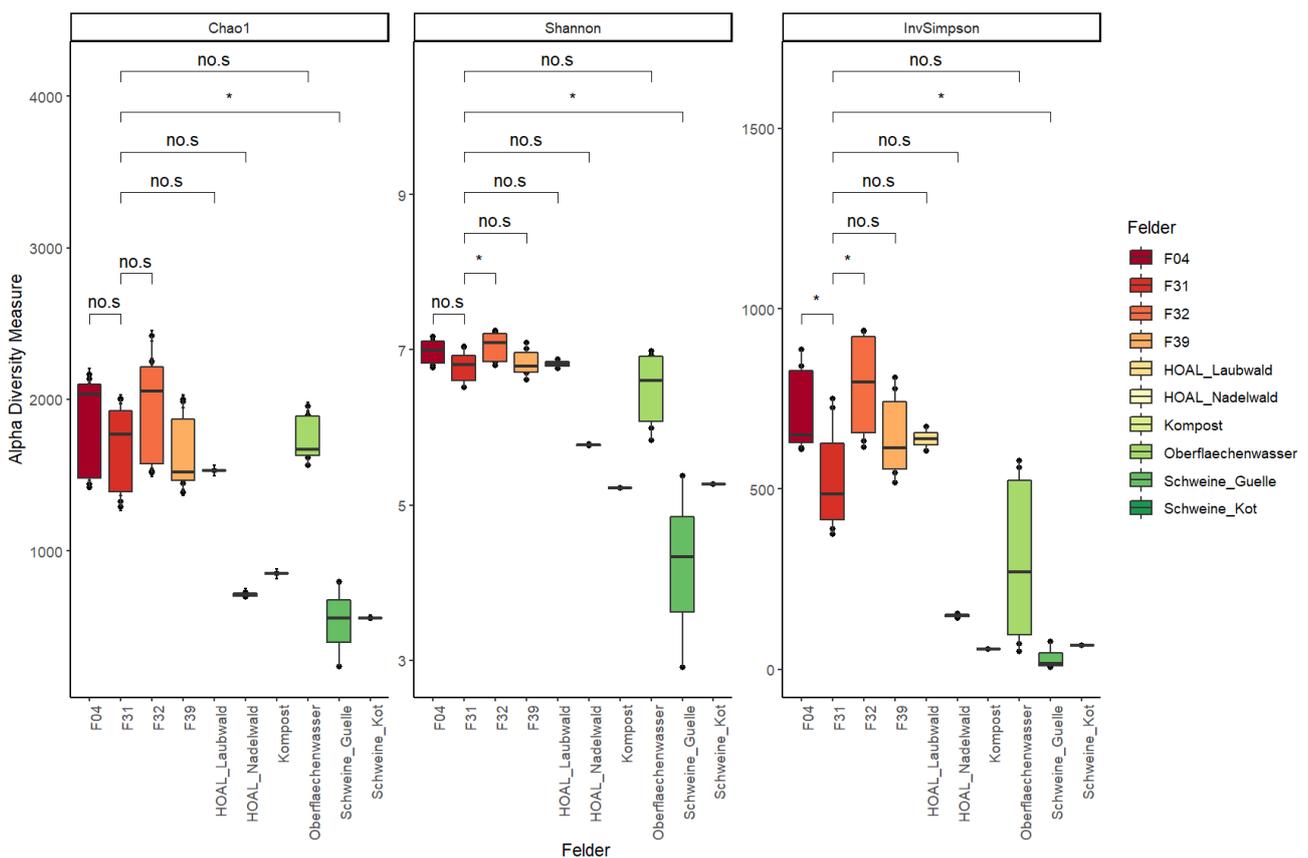


Abbildung 104. HOAL-Proben: Alpha-Diversitäts-Indices im statistischen Vergleich.

Die horizontale Linie in den Boxen stellt den Median dar. Die Box repräsentiert den inter-quantilen Bereich (IQR), die Whisker stellen Proben im 1,5-fachen IQR von den unteren und oberen Quantilen dar. Der Wilcoxon-Test wurde herangezogen um zu überprüfen, ob sich zwei Stichproben signifikant voneinander unterscheiden. Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) wurde als „*“ dargestellt, ein nicht-signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) mit „no.s“ versehen.

5.3.2 Unterschiede im bakteriellen Mikrobiom zwischen HOAL-Feldern, Donau-Auen und urbanen Regionen

Wie bei der quantitativen Bestimmung der Antibiotika-Resistenzgene, wurden auch bei der Untersuchung der Bakterienpopulation die vier Ackerfelder F04, F31, F32 und F39 mit den Nationalpark Donau-Auen und den urbanen Proben verglichen, wobei hier sowohl die Sommer- als auch die Winter-Proben miteinbezogen wurden.

Die β -Diversität, also die paarweisen Unterschiede zwischen den einzelnen Proben, wurde wieder mithilfe der Bray-Curtis-Distanz berechnet und in NMDS-Plots visualisiert (Abbildung 105). Auch bei dieser Probenauswahl bildeten die vier Ackerfelder ein Cluster. Die Proben aus dem Nationalpark Donau-Auen bildeten ein zweites Cluster, in das aber auch die beiden Proben aus dem Prater hineinfielen. Die urbanen Proben von Volksgarten, Hadikpark, Augarten und Breitenfurter Straße ordnete sich näher am Donau-Auen-Cluster ein als bei den Ackerproben. Die Proben des Lainzer Tiergartens trennten sich klar von allen anderen Proben ab.

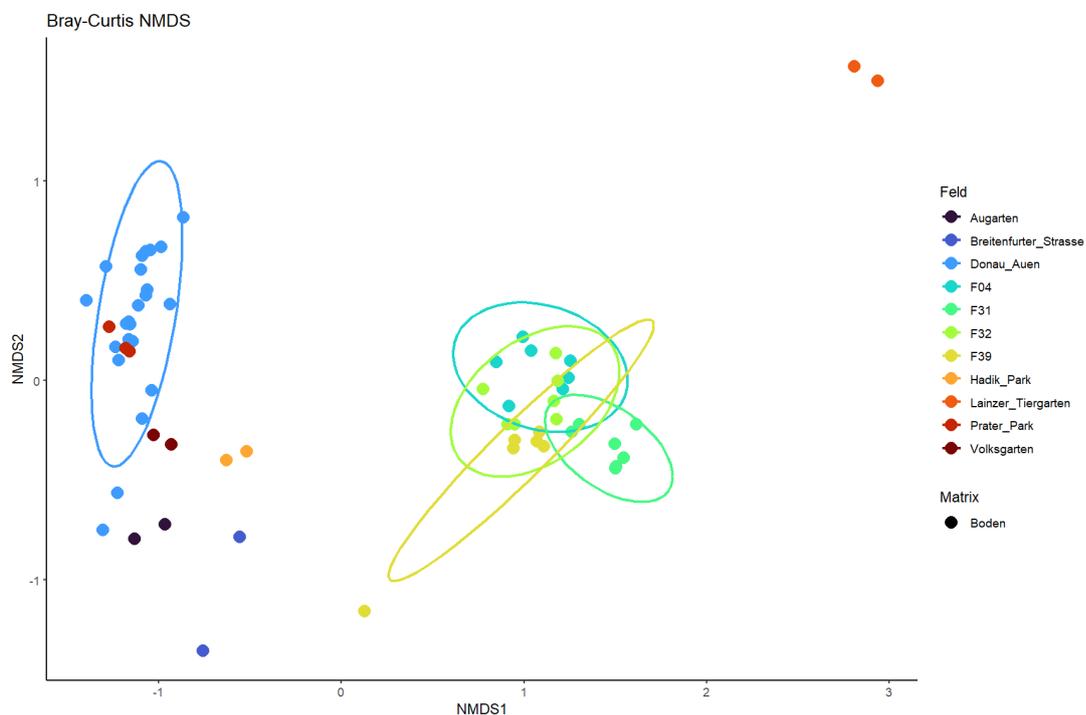


Abbildung 105. NMDS: Beta-Diversität der Proben nach Probenentnahmestellen.

Die unterschiedlichen Orte sind in der Legende „Felder“ mit unterschiedlichen Farben gekennzeichnet. Die multivariate t-Test Verteilung im 95% Konfidenzintervall wurde als Kreis dargestellt.

Abbildung 106 zeigt die bakterielle alpha-Diversität anhand der Indizes Chao1, Shannon und Inverser Simpson Index, zusammengefasst für die HOAL-Felder, den Nationalpark Donau-Auen und die 6 urbanen Standorte. Für die HOAL-Felder und den Nationalpark Donau-Auen ergaben sich bei allen drei Indizes höhere Werte als für die urbanen Standorte. Augarten und Lainzer Tiergarten wurden als Standorte mit der niedrigsten bakteriellen Vielfalt innerhalb der Vergleichsflächen identifiziert. Bei alpha-Diversitäts-Analysen muss jedoch berücksichtigt werden, dass die berechnete Alpha-Diversität mit der Anzahl der Einzelproben pro Vergleichsfläche steigt. Da für die urbanen Standorte jeweils nur eine Sommer- und Winter-Probe vorlag, von den HOAL-Feldern hingegen jeweils 6-7 Proben untersucht wurden und von den Donau-Auen sogar 20 Proben, muss die Abbildung 106 mit Vorsicht betrachtet werden.

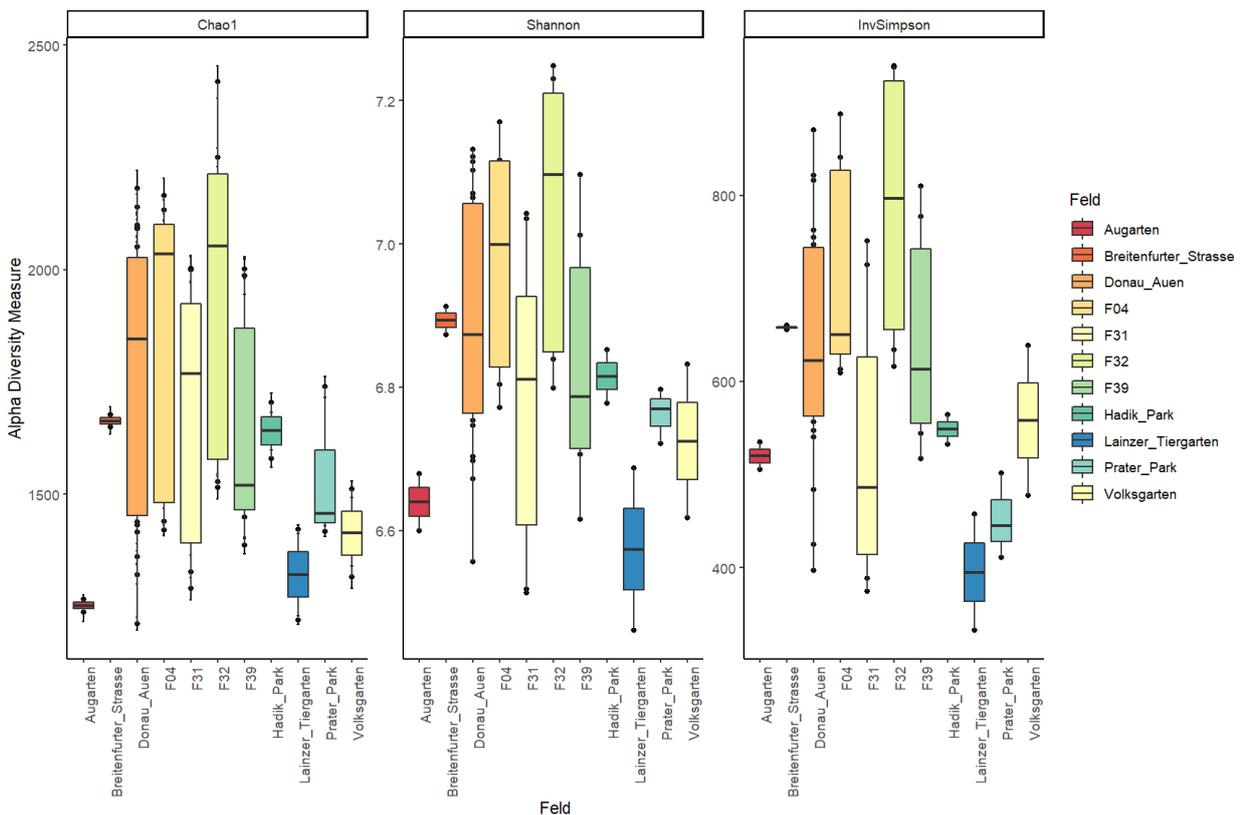


Abbildung 106. Alpha-Diversitäts-Indices für HOAL-Felder, Donau-Auen u. urbane Proben.

Die horizontalen Linien in den Boxen stellen den Median dar. Die Box repräsentiert den inter-quantilen Bereich (IQR), die Whisker stellen Proben im 1,5-fachen IQR von den unteren und oberen Quantilen.

Das Gülle-gedüngte Feld F31 wurde in Wilcoxon-Rangsummen-Tests mit den anderen Flächen verglichen (Abbildung 107). Hierfür wurden die urbanen Wiesen-Proben von Augarten, Breitenfurter Straße, Hadikpark und Volksgarten zur Kategorie „Urban“ zusammengefasst und die Laubwald-Proben Prater und Lainzer Tiergarten zur Kategorie „Suburban“. Bei diesen Vergleichen wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

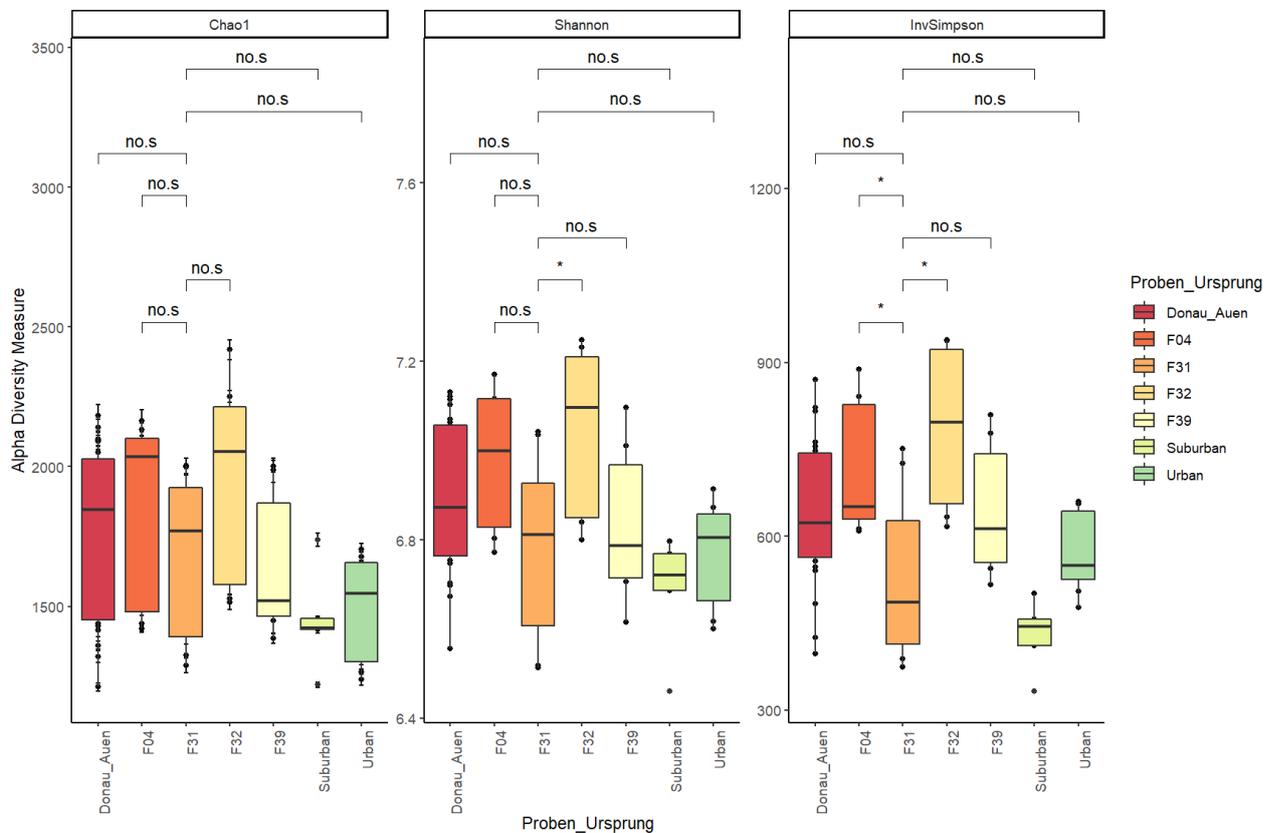


Abbildung 107. Alpha-Diversitäts-Indices HOAL-Felder und Vergleichsboden-Gruppen.

Die horizontale Linie in den Boxen stellt den Median dar. Die Box repräsentiert den inter-quantilen Bereich (IQR), die Whisker stellen Proben im 1,5-fachen IQR von den unteren und oberen Quantilen dar. Der Wilcoxon-Test wurde herangezogen um zu überprüfen, ob sich zwei Stichproben signifikant voneinander unterscheiden. Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) wurde als „*“ dargestellt, ein nicht-signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) mit „no.s“ versehen.

5.3.3 Identifizierung klinisch relevanter Bakterien in den MARGINS-I Proben

Um das Vorkommen klinisch relevanter Pathogene zu untersuchen, wurden Einträge des European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) mit den im Projekt ermittelten Genera- und Spezies-Daten abgeglichen. Es wurde nach Taxa gesucht, welche zu nosokomialen Infektionen bei Patienten auf Intensivstationen führten. 27 kritische Genera und 13 kritische Spezies wurden in den getesteten Proben identifiziert (Tabelle 40).

Tabelle 40. Humanpathogene Taxa in MARGINS-I Proben.

Genus	Spezies
<i>Achromobacter</i>	
<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Acinetobacter haemolyticus</i> <i>Acinetobacter lwoffii</i>
<i>Actinomyces</i>	
<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Aeromonas salmonicida</i> <i>Aeromonas sobria</i> <i>Aeromonas veronii</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus anthracis</i>
<i>Bordetella</i>	
<i>Campylobacter</i>	
<i>Citrobacter</i>	
<i>Corynebacterium</i>	
<i>Enterobacter</i>	
<i>Enterococcus</i>	
<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>
<i>Helicobacter</i>	
<i>Klebsiella</i>	
<i>Lactobacillus</i>	
<i>Legionella</i>	
<i>Leptospira</i>	
<i>Mycobacterium</i>	
<i>Mycoplasma</i>	
<i>Nocardia</i>	
<i>Prevotella</i>	
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Serratia</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Staphylococcus</i>	
<i>Streptococcus</i>	
<i>Treponema</i>	
<i>Yersinia</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>

Pathogene Spezies wurden sowohl auf den HOAL-Feldern als auch an naturbelassenen Standorten wie dem Nationalpark Donau-Auen oder den Nadelwaldstandorten im Wiener Becken identifiziert.

5.3.4 Netzwerk-Analyse der bakteriellen Genera und Antibiotikaresistenz-Gene

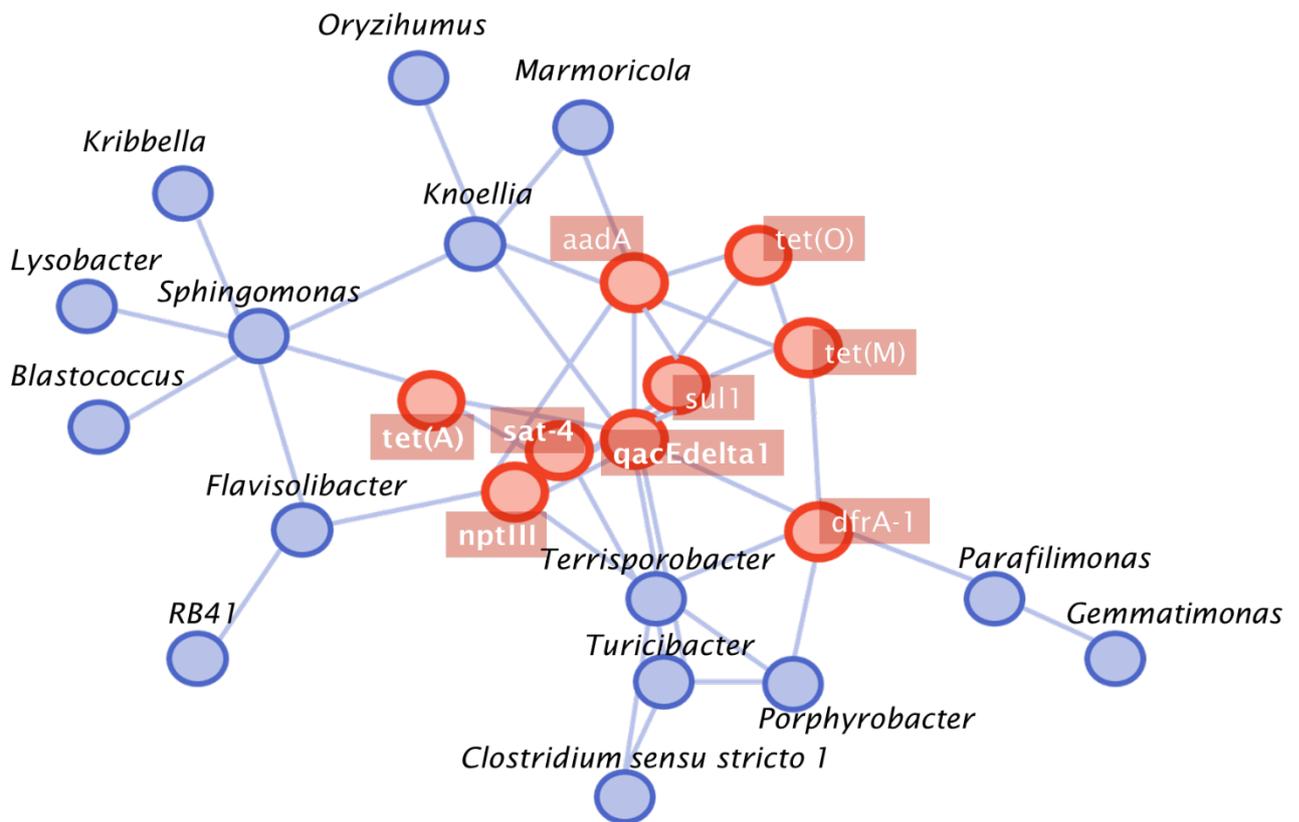


Abbildung 108. Netzwerk-Analyse: Korrelationen zwischen ARGs und bakteriellen Genera.

Netzwerk-Analyse der Antibiotikaresistenzgene, welche mit Bakterien aus der taxonomischen Stufe "Genus" positiv korrelieren.

Um Zusammenhänge zwischen der Verteilung bakterieller Taxa und der Verbreitung von ARGs zu untersuchen, wurde eine Co-Occurrence Netzwerk-Analyse durchgeführt (Abbildung 108). Dabei wurden Spearman-Rangkorrelationen zwischen der Read-Anzahl bakterieller Genera und der mittels qPCR ermittelten absoluten Konzentrationen verschiedener ARGs berechnet und in einem Netzwerk dargestellt.

Diese Analyse konnte 9 Antibiotikaresistenzgene und 15 bakterielle Genera positiv korrelieren, mit einem Rang ρ größer oder gleich 0,8. Die Netzwerkgrafik zeigt Genus-ARG-Korrelationen sowie Korrelationen zwischen den ARG-Targets untereinander. In gleichem Ausmaß konnten neun weitere Genera untereinander korreliert werden (nicht gezeigt).

Das in der Grafik abgebildete Netzwerk stellt eine stark positive Korrelation zwischen dem Aminoglykosid-Target **aadA** und den Genera *Knoellia* ($\rho=0,80$) und *Marmoricola* ($\rho=0,84$) dar. Zusätzlich konnte das Target mit einem weiteren Aminoglykosid-Gen, **nptIII**, positiv korreliert werden, sowie mit dem Multipass Membran Transporter **qacEdelta1** ($\rho=0,83$), dem Sulfonamid-

Resistenzgen *sul1* ($\rho = 0,82$) und zwei Tetrazyklin-Resistenzgenen (*tet(M)*, $\rho = 0,82$; *tet(O)*, $\rho = 0,84$). Das Diaminopyrimidin-Resistenzgen *dfrA-1* war mit *Parafilimonas* ($\rho = 0,80$), *Porphyrobacter* ($\rho = 0,84$) und am stärksten mit *Terrisporobacter* ($\rho = 0,89$) korreliert und außerdem mit den Resistenzgen-Targets *qacEdelta1* ($\rho = 0,84$) und *tet(M)* ($\rho = 0,83$). Das Aminoglykosid-Resistenzgen *nptIII* konnte den Genera *Flavisolibacter* ($\rho = 0,81$) und *Terrisporobacter* ($\rho = 0,81$) korreliert werden, außerdem mit *qacEdelta1* ($\rho = 0,84$), *sul1* ($\rho = 0,80$).

Das Streptothricin-Target *sat-4* wurde mit *Terrisporobacter* ($\rho = 0,81$) korreliert, sowie mit *sul1* ($\rho = 0,82$) und *tet(A)* ($\rho = 0,84$). Das Tetrazyklin-Resistenzgen *tet(A)* war mit dem Genus *Sphingomonas* korreliert ($\rho = 0,82$). Das Sulfonamid-Resistenzgen *sul1* konnte vor allem mit *tet(M)* in Verbindung gesetzt werden ($\rho = 0,82$).

Terrisporobacter war das Bakterium, welches am häufigsten mit den untersuchten ARGs korreliert wurde. Gleichzeitig standen andere Genera in Korrelation mit *Terrisporobacter*, wie beispielsweise *Clostridium sensu stricto I* ($\rho = 0,86$), *Porphyrobacter* ($\rho = 0,92$) und *Turicibacter* ($\rho = 0,92$).

Von den **bakteriellen Genera**, die stark mit ARG-Targets korreliert waren, wurden *Clostridium sensu stricto 1*, *Terrisporobacter* und *Turicibacter* vor allem in der Gülle und Gülle-gedüngten Feldern beobachtet (Abbildung 109). Die Genera *Knoellia*, *Blastococcus*, *Flavisolibacter*, *Kribbella*, *Lysobacter*, *Marmoricola*, *Oryzihumus* und *Parafilimonas* vor hingegen kamen in den Feldern häufiger vor als in den Vergleichsböden, jedoch nicht in den organischen Düngern.

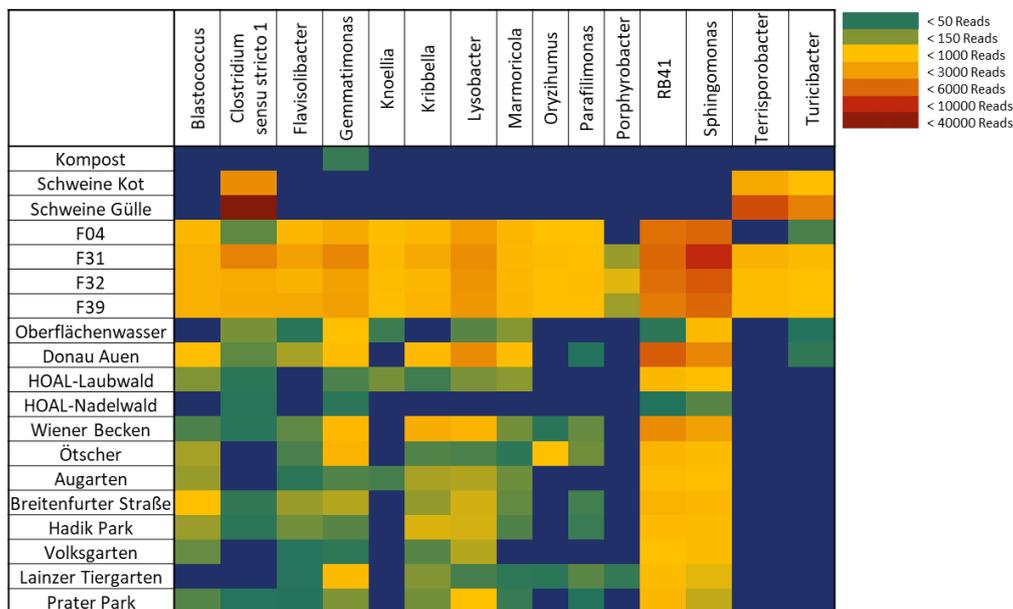


Abbildung 109. Vorkommen der ARG-korrelierten Bakterien in den Vergleichsflächen.

Die Abundanz der Reads wurde farblich laut Legende dargestellt.

5.4 ARG-Screening mit dem SmartChip qPCR Array

Dreißig Proben (Schweinekot, Schweinegülle, 2 Proben von jedem HOAL-Feld und 20 Vergleichsböden) wurden mit dem Resistomap-Smartchip auf **95 ARG-Targets** untersucht. Dieses Screening zeigte eindrucksvoll die **hohe ARG-Diversität** in **Böden**. In den Vergleichsböden variiert die Anzahl der detektierten Targets pro Probe zwischen 37 und 62. Die HOAL-Felder F04 und F32 lagen mit 55-60 detektierten Targets innerhalb dieses Schwankungsbereichs, die frisch Gülle-gedüngten Felder F31 und F39 mit 60-69 lagen darüber. Auffallend am Resistomap-Ergebnis war ein über alle Bodenproben konstantes Ranking von abundanten zu seltenen Targets. Die abundantesten Targets in den Böden waren *intl1*, *mexF*, *ermE* und *vanA*. Während in den Bodenproben je nach Standort und Zeitpunkt einzelne Targets fehlen, wurde in Schweinekot und Schweinegülle das ganze Spektrum in einer einzigen Probe detektiert, und es bestand ein anderes Abundanzranking als im Boden. In der **Gülle** dominierten vor allem **Tetrazyklin-Resistenzgene**, die in den Böden selten waren. In Gülle/Kot und Ackerböden wurden 15 gemeinsame ARG identifiziert, die in den Vergleichsböden nicht gefunden wurden (*ermF*, *blaTEM_1*, *tet(Q)*, *tet(M)*, *tetA(P)*, *tetO_1*, *tetM_2*, *tetO_2*, *tet(X)*, *qacEdelta1_1*, *qacEdelta1_3*, *fosX*, *aadE*, *aphA3_1*, *tnpA_1*). In 12 Vergleichsböden aus den Donau-Auen und dem Ötscher-Gebiet wurden 48 zusätzliche Targets untersucht. Dies führte zur Detektion von weiteren 13-25 Targets pro Probe und verdeutlichte noch einmal die hohe ARG-Diversität in naturnahen Böden.

Bei 30 Proben wurde ein ARG-Screening mit dem SmartChip-System von Resistomap durchgeführt. Diese Proben stammten von vier verschiedenen Umweltkompartimenten: Gülle/Kot, Ackerböden, urbane Vergleichsböden und naturnahe Vergleichsböden. Auf einem SmartChip können mehrere Proben parallel analysiert werden. Mit steigender Probenanzahl sinkt die Anzahl der ARGs, die untersucht werden können. Daher wurden die Proben auf zwei SmartChips verteilt (Tabelle 41). Alle 30 Proben wurden auf 95 verschiedene ARG gescreent (Abschnitt 5.4.1). Darunter waren jene 27 Targets (ARGs, MGE, 16S rRNA), die in Kapitel 4.6.3 mit dem TaqMan qPCR System genauer untersucht wurden. Dabei ist zu beachten, dass beim SmartChip andere Primer für diese ARGs verwendet wurden, und dass die Sensitivität im SmartChip-system wesentlich geringer ist. Die Proben von Chip-2 wurden auf 48 zusätzliche ARG gescreent, da die geringere Probenanzahl auf dem Chip-2 Raum für weitere ARGs ließ (Abschnitt 5.4.2).

Tabelle 41. Resistomap: untersuchte Proben und Kurzbezeichnungen.

Probe	Kurzbezeichnung	Chip
Schweinegülle - April 2020	M_04_20	1
Schweinekot - Juli 2020	F_07_20	1
HOAL Feld F04 – 3 Tage nach mineralischer Düngung	F04_C_d	1
HOAL Feld F04 – 6 Wo nach mineralischer Düngung	F04_C_w06	1
HOAL Feld F32 – 3 Tage nach mineralischer Düngung	F32_C_d	1
HOAL Feld F32 – 6 Wo nach mineralischer Düngung	F32_C_w06	1
HOAL Feld F39 – 1 Tag nach Gülledüngung	F39_C_d	1
HOAL Feld F39 – 6 Wo nach Gülledüngung	F39_C_w06	1
HOAL Feld F31 – 1 Tag nach Gülledüngung	F31_C_d	1
HOAL Feld F31 – 6 Wo nach Gülledüngung	F31_C_w06	1
Breitenfurter Straße - Juli 2020	BS_07_20	1
Hadikpark - Juli 2020	HP_07_20	1
Augarten - Februar 2020	AG_02_20	1
Augarten - Juli 2020	AG_07_20	1
Prater - Juli 2020	PP_07_20	1
Volksgarten - Juli 2020	VG_07_20	1
HOAL-Nadelwald NF - Juli 2020	NF_07_20	1
HOAL-Laubwald OF - Juli 2020	OF_07_20	1
NP Donau-Auen 1/S - Laubwald (9.6.2020)	DA01_06_20	2
NP Donau-Auen 2/S - Wiese (9.6.2020)	DA02_06_20	2
NP Donau-Auen 3/S - Mischwald (9.6.2020)	DA03_06_20	2
NP Donau-Auen 4/S - Laubwald (9.6.2020)	DA04_06_20	2
NP Donau-Auen 5/S - Laubwald (9.6.2020)	DA05_06_20	2
NP Donau-Auen 6/N - Laubwald (9.6.2020)	DA06_06_20	2
NP Donau-Auen 7/N - Laubwald (9.6.2020)	DA07_06_20	2
NP Donau-Auen 8/N - Wiese (9.6.2020)	DA08_06_20	2
NP Donau-Auen 9/N - Laubwald (9.6.2020)	DA09_06_20	2
NP Donau-Auen 10/N - Laubwald (9.6.2020)	DA10_06_20	2
Ötscher 1 - Nadelwald (9.7.2020)	Oe1_07_20	2
Ötscher 2 - Wiese (9.7.2020)	Oe2_07_20	2

5.4.1 Untersuchung von 95 ARGs in 30 Proben

Alle 30 Proben aus der (Tabelle 41) wurden auf 95 verschiedene ARGs untersucht. Die Heatmap in Abbildung 110 zeigt alle 30x95= 2850 Ergebnisse auf einen Blick.

In allen untersuchten Proben wurden zahlreiche ARGs detektiert (Abbildung 111A). In Schweinegülle und Schweinekot wurde die höchste Anzahl an unterschiedlichen ARGs nachgewiesen (78 bzw. 77 ARG). Bei den Bodenproben war die ARG-Anzahl in Gülle-gedüngten Ackerböden am höchsten, mit 67 bzw. 69 ARGs am Tag nach der Düngung. Die übrigen Proben von Ackerböden und urbanen Vergleichsböden lagen im Bereich von 50-60 ARGs. Unter den naturnahen Vergleichsböden variierte die ARG-Anzahl zwischen 37 und 62 ARG vergleichsweise stark. Die 95 untersuchten Gene gehörten

16 verschiedenen ARG Klassen an. In jeder Klasse gab es häufige und seltene Gene, sodass in jeder Probe ARGs aus 12-14 Klassen nachgewiesen wurden und das Detektionsmuster auf ARG-Klassen-Ebene überall ähnlich aussah.

Resistomap ist ein Miniatur-qPCR System, das Proben nicht nur auf die Präsenz von ARGs screenet, sondern auch quantitative Informationen liefert. Auf jedem Chip wurde neben den zahlreichen ARGs auch das *16S rRNA* Gen als Referenzgen mitgemessen. Das *16S rRNA* Gen ist ein Marker für die Gesamtabundanz von Bakterien in einer Probe. So konnte die **relative Abundanz** der einzelnen ARGs als Kopienanzahl ARG / Kopienanzahl *16S rRNA* Gen bestimmt werden. Je höher die relative Abundanz eines ARG, desto größer ist der Anteil an Zellen mit diesem ARG in der bakteriellen Gesamtpopulation.

Abbildung 111B wurde die relative Abundanz aller detektierten ARGs summiert. Unter den 28 Bodenproben war die summierte relative Abundanz mit der Anzahl der detektierten ARG positiv korreliert ($r=0,87$). Unverhältnismäßig hoch war die summierte relative Abundanz im naturnahen Vergleichsboden HOAL-Nadelwald (N_NF_07). In Gülle und Kot war die summierte relative Abundanz geringer als in den Bodenproben. Dabei ist zu beachten, dass die bakterielle Gesamtabundanz gemessen am *16S rRNA* Gen in allen Boden-DNA Proben sehr ähnlich war, in Kot- und Gülleproben jedoch viermal bzw. achtmal höher (Abbildung 111C). In Gülle und Kot hatten Tetrazyklin-Resistenzgene den größten Anteil an der summierten relativen Abundanz, in den Bodenproben das Integron *int1_1*, gefolgt von MDR-, MLSB- und Beta Laktam-Resistenzgenen.



Abbildung 110. Resistomap: relative Abundanz (ARG/16S) von 95 ARGs in 30 Proben.

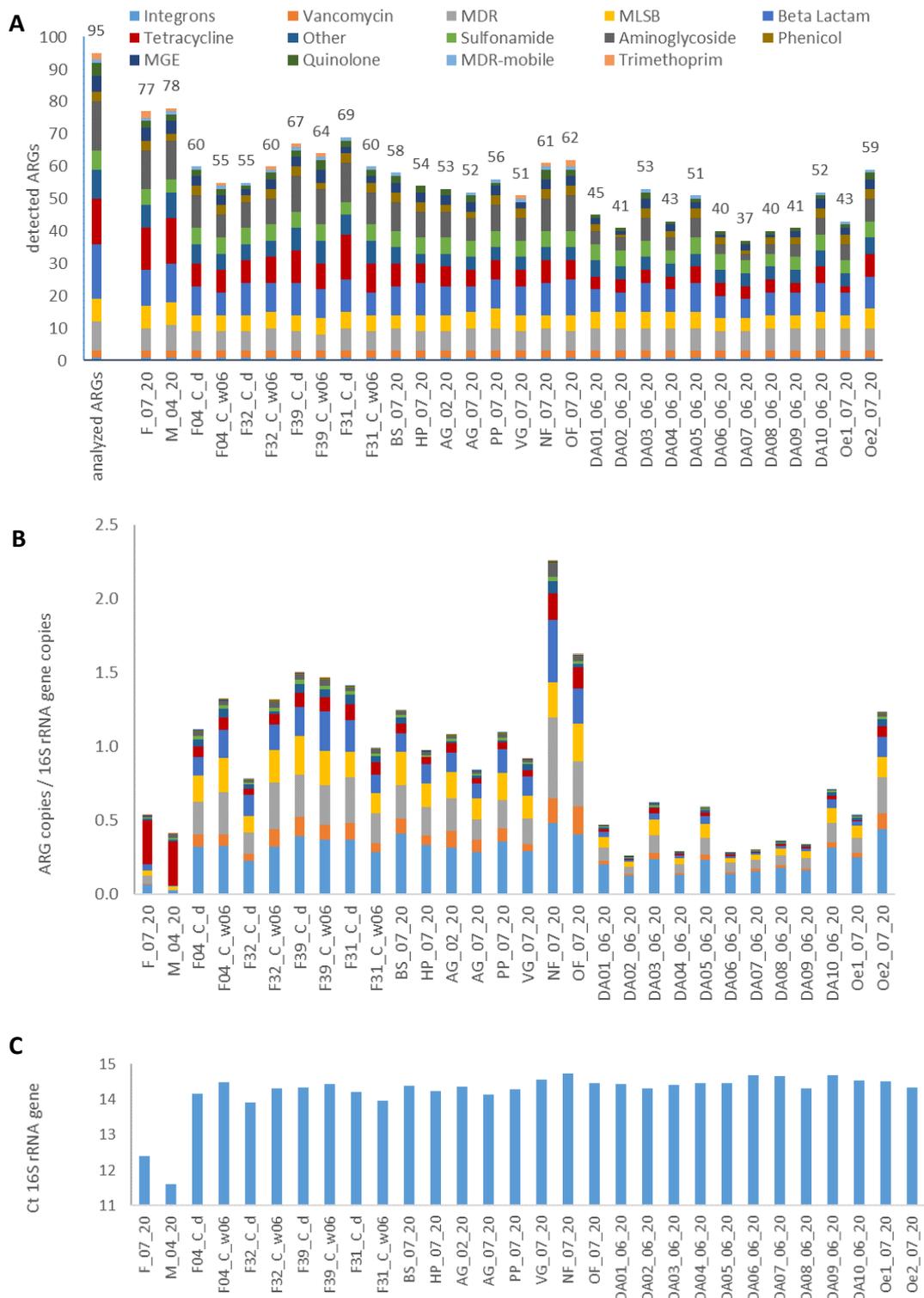


Abbildung 111. Resistomap: Anzahl und Abundanz der detektierten ARGs.

Anzahl der detektierten ARG (A); summierte relative Abundanz (B); Ct-Werte der 16S rRNA Gen Quantifizierung als Kennzahl für die bakterielle Gesamtabundanz (C).

Abbildung 112 zeigt die relative Abundanz aller detektierten ARGs in den 30 verschiedenen Proben als Punkt-Serien. Insgesamt variierte die relative Abundanz der einzelnen detektierbaren ARGs zwischen $10^{-4,8}$ und $10^{-0,3}$ Kopien pro *16S rRNA* Gen Kopie. Punkte, die ein- und dasselbe ARG in verschiedenen Proben darstellen, sind durch Linien verbunden. Durch die 28 untersuchten Bodenproben hindurch verlaufen viele Linien parallel. Das bedeutet, dass an allen Standorten ein ähnliches Ranking von abundanten und seltenen ARGs vorlag. Die parallele Verteilung vieler ARGs deutet auch auf Koppelungen hin. Links in Abbildung 112, zwischen Kot, Gülle und der ersten Bodenprobe kreuzen sich viele Linien. In Kot und Gülle bestand also ein anderes Abundanzranking als in den Bodenproben. Einzelne Gene wurden in dieser Übersichtsgraphik nicht gekennzeichnet, die Zugehörigkeit zu ARG-Klassen wurde jedoch farblich dargestellt. In Kot und Gülle waren Tetrazyklin-Resistenzgene dominant, während in den Bodenproben ein Integron und ein MDR-Gen die Abundanzränge 1 und 2 einnahmen.

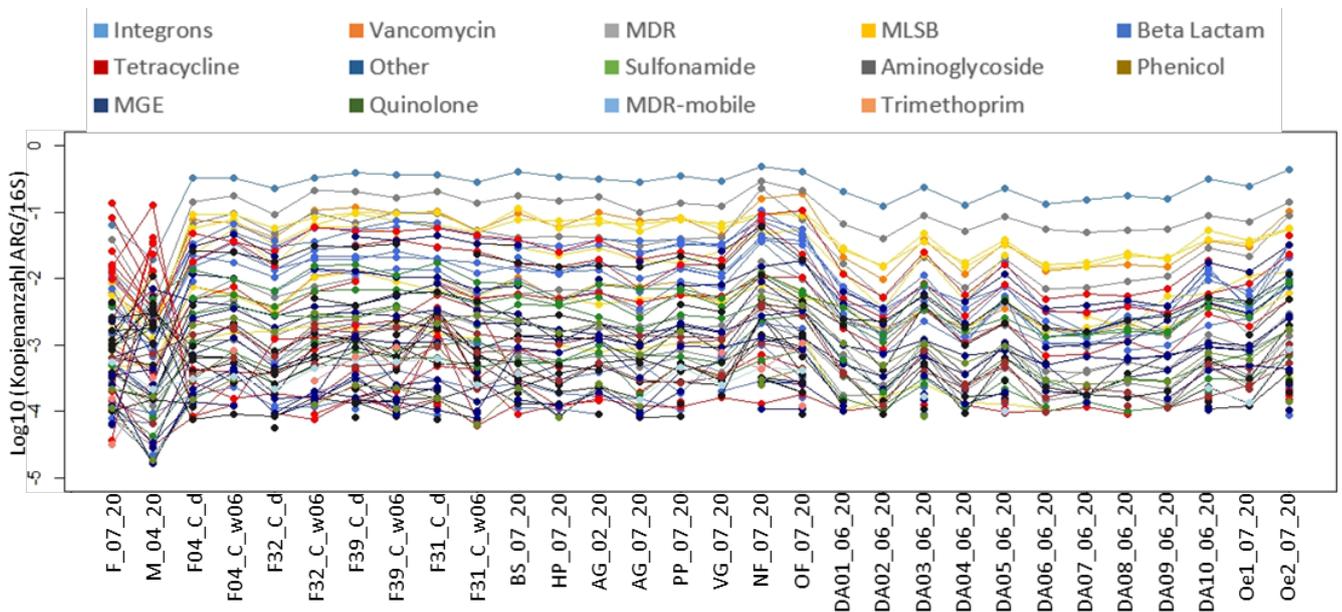


Abbildung 112. Relative Abundanz der detektierten ARGs.

Von den 95 untersuchten ARGs waren 61 ARG „ubiquitär“ vorhanden. Das heißt, sie wurden in zumindest einer Probe aus jedem Umweltkompartiment detektiert (Abbildung 113). Nur 2 ARGs zeigten sich „endemisch“ in Gülle/Kot. In Ackerböden, urbanen Vergleichsböden und naturnahen Vergleichsböden wurden keine „endemischen“ ARG gefunden. In Gülle/Kot und Ackerböden wurden 15 gemeinsame ARGs identifiziert, die in den Vergleichsböden nicht gefunden wurden. Sieben dieser Gene waren Tetrazyklin-Resistenzgene.

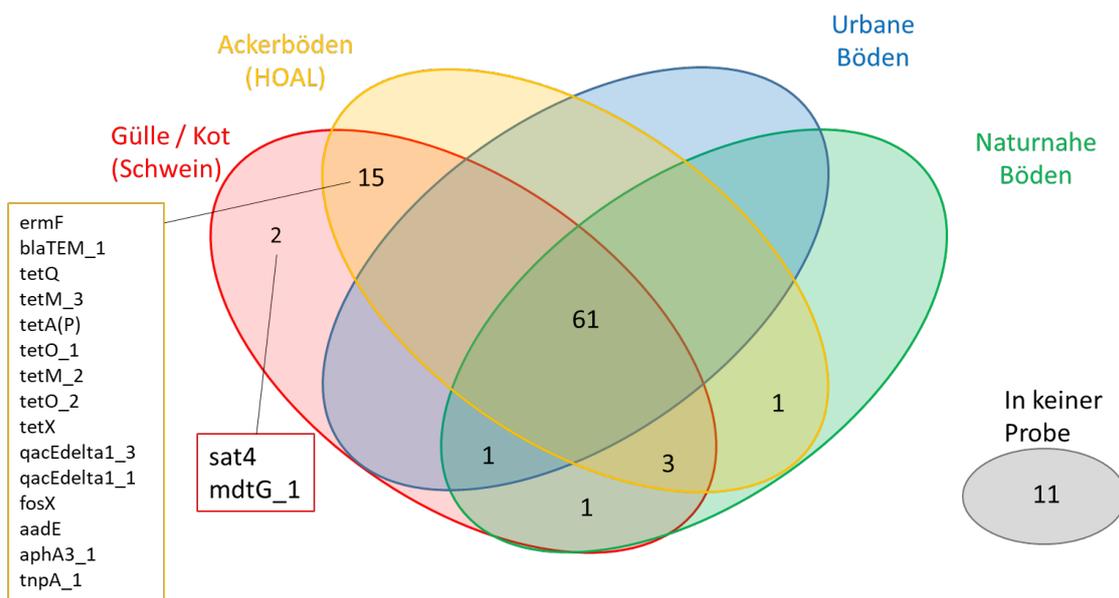


Abbildung 113. Umweltkompartimente: Gemeinsame und endemische ARGs.

Aus den relativen Abundanz der untersuchten ARGs, ergab sich für jede Probe ein eigenes ARG-Profil, das in den vertikalen Spalten der Heatmap (Abbildung 110) direkt sichtbar ist. In Abbildung 114 A wurden die untersuchten Proben anhand der Ähnlichkeit ihrer ARG-Profile geclustert. Die Bodenproben aus den Donau-Auen bildeten ein Cluster mit der Ötscher-Probe Oe1_07_20. Alle diese Bodenproben zeichneten sich durch geringe summierte relative Abundanzwerte aus (Vergl. Abbildung 112B). Sonst ergab sich keine klare Gruppierung nach Standorten, Umweltkompartiment oder Düngung. Auffallend zeigte sich, dass sich die ARG-Profile von Gülle und Kot nicht nur von den Bodenproben, sondern auch von einander deutlich unterschieden.

In Abbildung 114B wurden die quantitativen ARG-Profile für das Clustering zu binären Präsenz-Absenz-Profilen vereinfacht. Bei dieser Analyse bildeten Kot und Gülle und ein Cluster mit den Gülle-gedüngten Ackerböden F39 und F31. Dies ist auf die gemeinsamen ARG zurückzuführen, die in diesen Proben detektiert wurden und in den anderen Bodenproben fehlten (vergl. Abbildung 113). Andererseits bildete sich ein Cluster aus einer Ötscher-Probe (Oe1_07_20) und sieben Proben aus den Donau-Auen. In diesen Proben wurden weniger ARGs detektiert als in den übrigen Böden (Abbildung 111A) und das Clustering deutet darauf hin, dass hier überall dieselben ARGs fehlten.

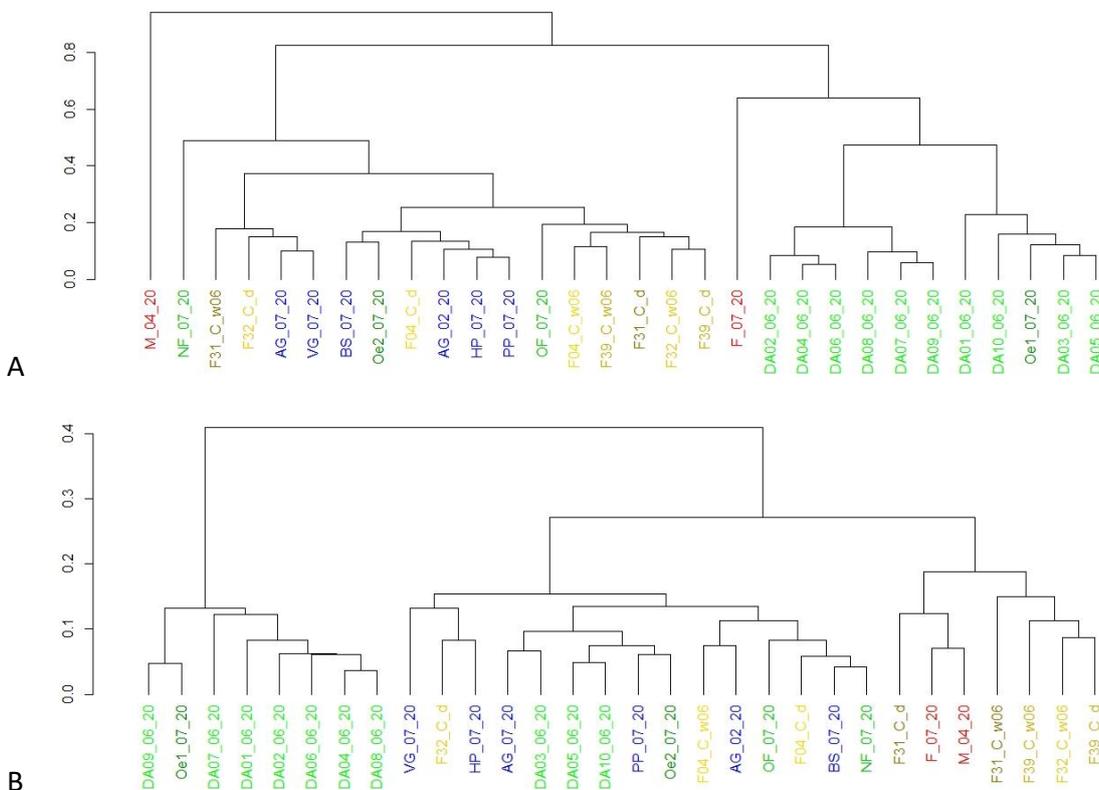


Abbildung 114. Ähnlichkeit der ARG-Profile. Bray-Curtis Distanz.

A) anhand der relativen Abundanz, für nicht detektierte ARG wurde der Wert 0 eingesetzt. B) anhand der Detektion / nicht-Detektion von ARGs.

In Abbildung 115 wurden die Verteilungsprofile der ARGs (Zeilen der Heatmap) in gleicher Weise geclustert, wie in Abbildung 110 die ARG Profile der Proben (Spalten) geclustert worden waren. Es ergaben sich sechs ARG-Cluster, von denen drei aus häufigen ARGs gebildet wurden, die in 17 – 28 Bodenproben detektiert wurden, mit hoher (Cluster 4), mittlerer (Cluster 1) und geringer (Cluster 2) relativer Abundanz. Cluster 3 versammelte ARGs mit geringer relativer Abundanz, die in den meisten Ackerböden und urbanen Vergleichsböden detektiert wurden, in vielen naturnahen Vergleichsböden jedoch fehlten. Die relative Abundanz der ARGs der Cluster 1-4 war in Gülle und Kot gleich hoch wie in den Bodenproben oder geringer.

Cluster 5 umfasste seltene ARGs die in Gülle und Kot mit geringer relativer Abundanz detektiert wurden und vereinzelt auch in Ackerböden oder Vergleichsböden auftraten.

Die ARGs von Cluster 6 hatten eine höhere relative Abundanz in Gülle und Kot als in den Bodenproben. Außerdem waren sie in den Ackerböden häufiger und/oder abundanter als in urbanen und naturnahen Vergleichsböden (mit Ausnahme von ermB_2 und qacEdelta1_1). Hier fanden sich 11 der 15 ARGs wieder, die ausschließlich in Gülle/Kot und Ackerböden detektiert worden waren (vergl. Abbildung 113). Viele ARGs in Cluster 6 hatten eine besonders hohe relative Abundanz in den Gülle-gedüngten Feldern unmittelbar nach der Düngung (Proben F31_C_d und F39_C_d). Dieses Verteilungsmuster deutet darauf hin, dass die ARGs bei der Güllendüngung in die Ackerböden eingebracht wurden. Zehn ARGs in Cluster 6 waren Tetrazyklin-Resistenzgene.

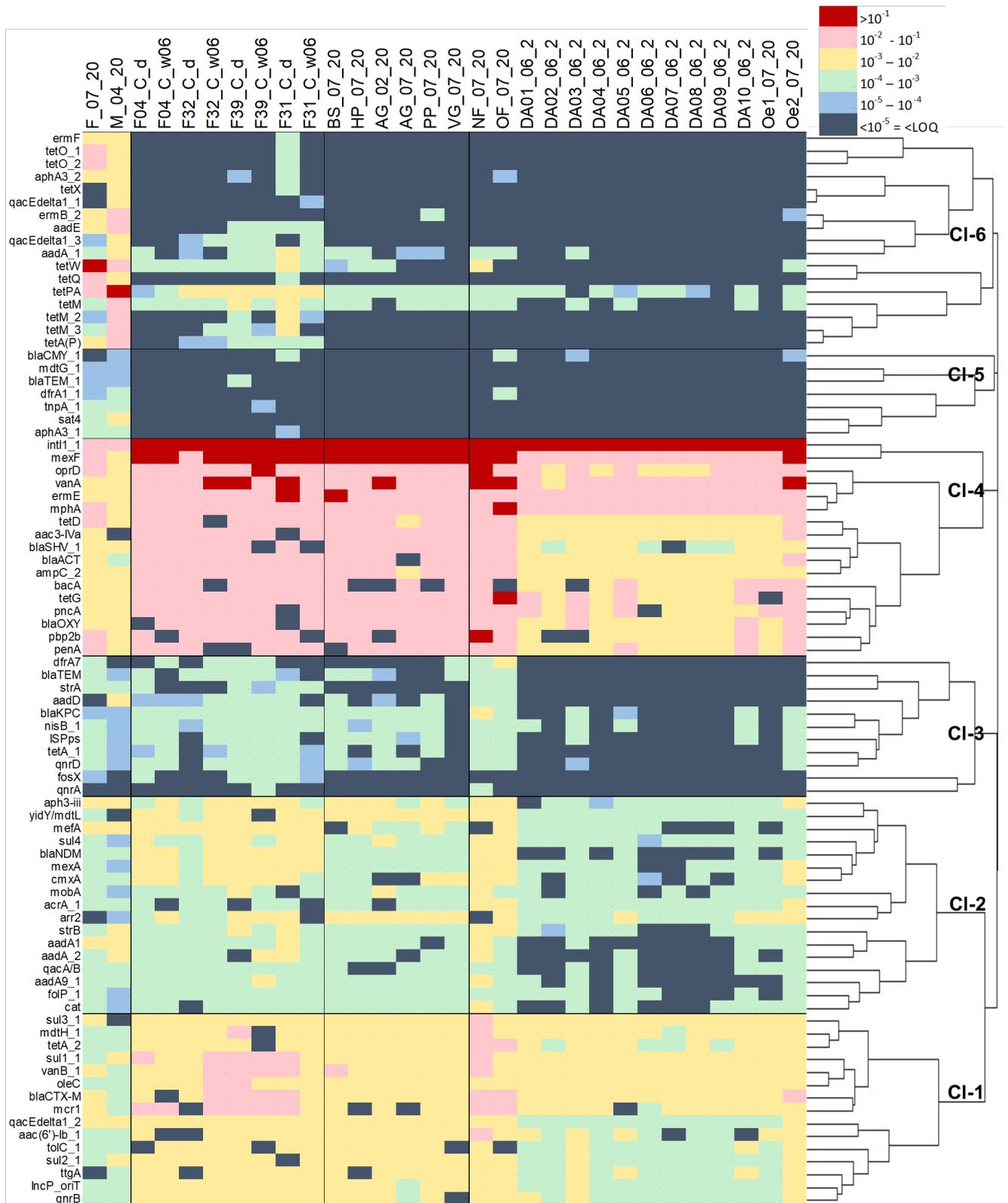


Abbildung 115. Ähnlichkeit der Verteilungsprofile anhand der Bray-Curtis Distanz.

Nicht dargestellt sind jene 11 ARGs, die in keiner Probe detektiert wurden (Cluster 0).

Tabelle 42 fasst Kennzahlen über die Verteilung aller 95 untersuchten ARGs zusammen. Als Kennzahl für die Häufigkeit im Boden ist die Anzahl der Bodenproben angegeben, in denen jedes ARG detektiert wurde. ARGs, die nur in Gülle/Kot und Ackerböden auftraten, sind mit Sternchen gekennzeichnet. Als einfache Kennzahl für die Abundanz im Boden wurde der „Abundanz Rang“ ermittelt. Dazu wurde aus allen Bodenproben, in denen ein ARG detektiert wurde, der Median der relativen Abundanz ermittelt, anschließend wurden die Mediane aller ARGs gerankt. Dies erschien zulässig, da in allen Bodenproben ein ähnliches Abundanzranking beobachtet worden war (Abbildung 112). Zusätzlich sind die Abundanz-Ränge in Gülle und Kot angegeben. Da hier jeweils nur eine Probe untersucht wurde, ist das Abundanz-Ranking in Gülle und Kot nicht sehr zuverlässig. Die Tabelle 42 kann jedoch dazu dienen, ARGs für zukünftige Monitoring-Ansätze auszuwählen. Interessant sind ARG, die in der Gülle abundant und im Boden selten waren. Die zehn abundantesten ARGs im Boden bzw. in der Gülle sind farblich hervorgehoben. Einzig das Integron *int11_1* war in beiden Habitaten sehr abundant. In den Böden dominierten ARGs aus verschiedenen Klassen, die in der Gülle im Abundanz-Mittelfeld lagen. In der Gülle dominierten vor allem Tetrazyklin-Resistenzgene, die im Abundanzranking der Böden sehr weit hinten lagen. Schließlich enthält die Tabelle zur Beschreibung des Verteilungsmusters jedes ARG, das Cluster aus Abbildung 115. Cluster 0 bezeichnet ARGs, die in keiner Probe detektiert wurden.

Insgesamt zeigten die Ergebnisse des Resistomap-Experiments, dass sowohl in den Ackerböden als auch in den urbanen und naturnahen Vergleichsböden eine hohe Diversität an ARGs vorhanden war (Cluster 1-4). Mögliche ARG-Einträge aus der Gülle in Ackerböden (Cluster 6) fanden vor diesem „Hintergrundresistom“ statt.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse erscheinen alle ARGs von Cluster 6 und alle, die in Tabelle 42 mit Sternchen gekennzeichnet sind, als interessante Kandidaten für ein ARG-Monitoring. Insgesamt sind das 23 ARGs.

Tabelle 42. Häufigkeit und Abundanz-Ranking und Verteilungstyp von 95 ARGs.

ARG Klasse	Gen	Assay ¹	positive Bodenproben ²	Abundanz Rang Boden ³	Abundanz Rang Gülle	Abundanz Rang Kot	Cluster
Integrans	<i>intl1 1</i>	AY293	28	1	6	3	4
Vancomycin	<i>vanA</i>	AY595	28	4	25	16	4
Vancomycin	<i>vanB 1</i>	AY159	28	21	50	34	1
MDR	<i>mexF</i>	AY229	28	2	15	4	4
MDR	<i>oprD</i>	AY224	28	6	22	11	4
MDR	<i>mdtH 1</i>	AY214	27	22	48	38	1
MDR	<i>ttgA</i>	AY226	26	29	62	-	1
MDR	<i>tolC 1</i>	AY235	24	32	59	48	1
MDR	<i>mexA</i>	AY215	26	40	65	56	2
MDR	<i>acrA 1</i>	AY207	24	41	63	53	2
MDR	<i>mdtG 1</i>	AY212	- **	-	72	72	5
MDR	<i>qac</i>	AY238	-	-	-	-	0
MLSB	<i>ermE</i>	AY544	28	3	33	17	4
MLSB	<i>mphA</i>	AY539	28	5	34	8	4
MLSB	<i>pncA</i>	AY73	26	11	42	18	4
MLSB	<i>oleC</i>	AY91	28	23	46	51	1
MLSB	<i>mefA</i>	AY538	22	35	35	28	2
MLSB	<i>ermB 2</i>	AY533	2	78	8	32	6
MLSB	<i>ermF</i>	AY535	1 *	76	41	14	6
Beta Lactam	<i>pbp2b</i>	AY151	23	8	23	12	4
Beta Lactam	<i>blaOXY</i>	AY108	26	7	32	24	4
Beta Lactam	<i>penA</i>	AY138	25	10	21	9	4
Beta Lactam	<i>blaSHV 1</i>	AY104	25	17	36	20	4
Beta Lactam	<i>blaACT</i>	AY444	27	15	45	15	4
Beta Lactam	<i>ampC 2</i>	AY100	28	16	37	31	4
Beta Lactam	<i>blaCTX-M</i>	AY432	27	20	43	23	1
Beta Lactam	<i>blaNDM</i>	AY152	20	38	56	49	2
Beta Lactam	<i>blaKPC</i>	AY440	19	54	75	71	3
Beta Lactam	<i>blaTEM</i>	AY439	12	74	64	65	3
Beta Lactam	<i>blaCMY 1</i>	AY99	4	71	74	-	5
Beta Lactam	<i>blaTEM 1</i>	AY136	1 *	77	68	72	5
Beta Lactam	<i>blaIMP 1</i>	AY130	-	-	-	-	0
Beta Lactam	<i>blaVEB</i>	AY105	-	-	-	-	0
Beta Lactam	<i>blaOXA1/blaO</i>	AY120	-	-	-	-	0
Beta Lactam	<i>blaGES</i>	AY125	-	-	-	-	0
Beta Lactam	<i>blaOXA58</i>	AY145	-	-	-	-	0
Tetracycline	<i>tetG</i>	AY572	27	9	25	13	4
Tetracycline	<i>tetD</i>	AY571	27	13	29	10	4
Tetracycline	<i>tetPA</i>	AY575	25	70	1	7	6
Tetracycline	<i>tetW</i>	AY263	13	56	7	1	6
Tetracycline	<i>tetA 2</i>	AY254	27	24	51	40	1
Tetracycline	<i>tetQ</i>	AY259	1 *	42	11	2	6
Tetracycline	<i>tetM</i>	AY574	19	47	2	62	6
Tetracycline	<i>tetM 3</i>	AY368	4 *	58	3	61	6
Tetracycline	<i>tetA(P)</i>	AY369	6 *	57	4	26	6
Tetracycline	<i>tetO 1</i>	AY253	1 *	68	18	5	6
Tetracycline	<i>tetM 2</i>	AY281	3 *	53	5	76	6
Tetracycline	<i>tetO 2</i>	AY264	1 *	62	16	6	6
Tetracycline	<i>tetA 1</i>	AY248	13	60	71	59	3
Tetracycline	<i>tetX</i>	AY267	1 *	73	27	-	6
Other	<i>bacA</i>	AY465	22	12	38	21	4
Other	<i>mcr1</i>	AY466	24	18	53	27	1
Other	<i>qacEdelta1 2</i>	AY220	28	28	10	29	1
Other	<i>arr2</i>	AY471	26	33	73	-	2

ARG Klasse	Gen	Assay ¹	positive Bodenproben ²	Abundanz Rang Boden ³	Abundanz Rang Gülle	Abundanz Rang Kot	Cluster
Other	<i>qacEdelta1 3</i>	AY236	5 *	66	12	75	6
Other	<i>nisB 1</i>	AY186	20	55	77	67	3
Other	<i>qacEdelta1 1</i>	AY218	1 *	79	28	-	6
Other	<i>sat4</i>	AY204	- **	-	39	42	5
Other	<i>fosX</i>	AY469	5 *	75	-	74	3
Sulfonamide	<i>sul1 1</i>	AY242	28	19	13	41	1
Sulfonamide	<i>sul3 1</i>	AY244	28	25	-	22	1
Sulfonamide	<i>sul2 1</i>	AY243	27	27	30	37	1
Sulfonamide	<i>sul4</i>	AY241	28	43	66	50	2
Sulfonamide	<i>folP 1</i>	AY246	23	46	69	66	2
Sulfonamide	<i>folA 1</i>	AY247	-	-	-	-	0
Aminoglycoside	<i>aac3-IVa</i>	AY388	27	14	-	19	4
Aminoglycoside	<i>aac(6')-Ib 1</i>	AY8	24	26	58	52	1
Aminoglycoside	<i>aph3-iii</i>	AY420	27	36	19	25	2
Aminoglycoside	<i>aadA1</i>	AY20	19	50	17	35	2
Aminoglycoside	<i>strB</i>	AY24	25	44	20	55	2
Aminoglycoside	<i>aadA 2</i>	AY16	17	45	24	36	2
Aminoglycoside	<i>aadE</i>	AY21	4 *	67	9	33	6
Aminoglycoside	<i>aadA9 1</i>	AY15	20	48	60	60	2
Aminoglycoside	<i>aadA 1</i>	AY10	13	69	14	39	6
Aminoglycoside	<i>aphA3 2</i>	AY332	3	81	31	30	6
Aminoglycoside	<i>aadD</i>	AY13	12	65	40	-	3
Aminoglycoside	<i>strA</i>	AY23	7	63	61	70	3
Aminoglycoside	<i>aphA3 1</i>	AY7	1 *	82	47	44	5
Aminoglycoside	<i>spcN 1</i>	AY26	-	-	-	-	0
Aminoglycoside	<i>aph</i>	AY14	-	-	-	-	0
Phenicol	<i>gidY/mdtL</i>	AY33	27	34	-	43	2
Phenicol	<i>cmxA</i>	AY37	23	37	44	47	2
Phenicol	<i>cat</i>	AY555	21	51	67	64	2
MGE	<i>IncP oriT</i>	AY318	28	30	55	46	1
MGE	<i>mobA</i>	AY522	24	49	78	57	2
MGE	<i>ISPps</i>	AY309	16	64	70	67	3
MGE	<i>tnpA 1</i>	AY299	1 *	80	49	54	5
MGE	<i>Tn5</i>	AY315	-	-	-	-	0
Quinolone	<i>qnrB</i>	AY96	27	31	57	58	1
Quinolone	<i>qnrD</i>	AY459	15	61	76	69	3
Quinolone	<i>qnrA</i>	AY95	2	59	-	-	3
Quinolone	<i>qnrS 1</i>	AY460	-	-	-	-	0
MDR-mobile	<i>qacA/B</i>	AY488	19	52	54	45	2
Trimethoprim	<i>dfrA7</i>	AY588	7	39	-	63	3
Trimethoprim	<i>dfrA1 1</i>	AY284	1	72	52	77	5

¹Assay-Bezeichnung der Firma Resistomap für das verwendete Primer-Paar. ²Anzahl der Bodenproben, in denen das ARG detektiert wurde, von insgesamt 28 Bodenproben. ³Aus allen Bodenproben, in denen ein ARG detektiert wurde, wurde der Median der relativen Abundanz ermittelt, anschließend wurden die Mediane der der ARG gerankt. Rang 1 bezeichnet die größte relative Abundanz. **Grün: die 10 abundantesten ARG in den Böden. Rot: die 10 abundantesten ARG in der Schweinegülle.** *ARG wurde nur in Gülle/Kot und Ackerböden detektiert (vergl. Abbildung 113). **ARG wurde nur in Gülle und Kot detektiert.

5.4.2 Untersuchung von weiteren 48 ARGs in 12 Proben

Die Untersuchung von 48 zusätzlichen ARGs in 12 Vergleichsböden führte zur Detektion von weiteren 25 ARGs (Abbildung 116). In den einzelnen Proben kamen 13-25 positive Assays hinzu (Abbildung 117). Dieses Ergebnis illustriert noch einmal die hohe ARG-Diversität in Böden. Das abundanteste Gen der zusätzlichen 48 ARGs fiel im Gesamtranking auf Rang 15. Die grün markierten ARGs in Tabelle 42 waren also auch im erweiterten Screening die 10 häufigsten ARGs.

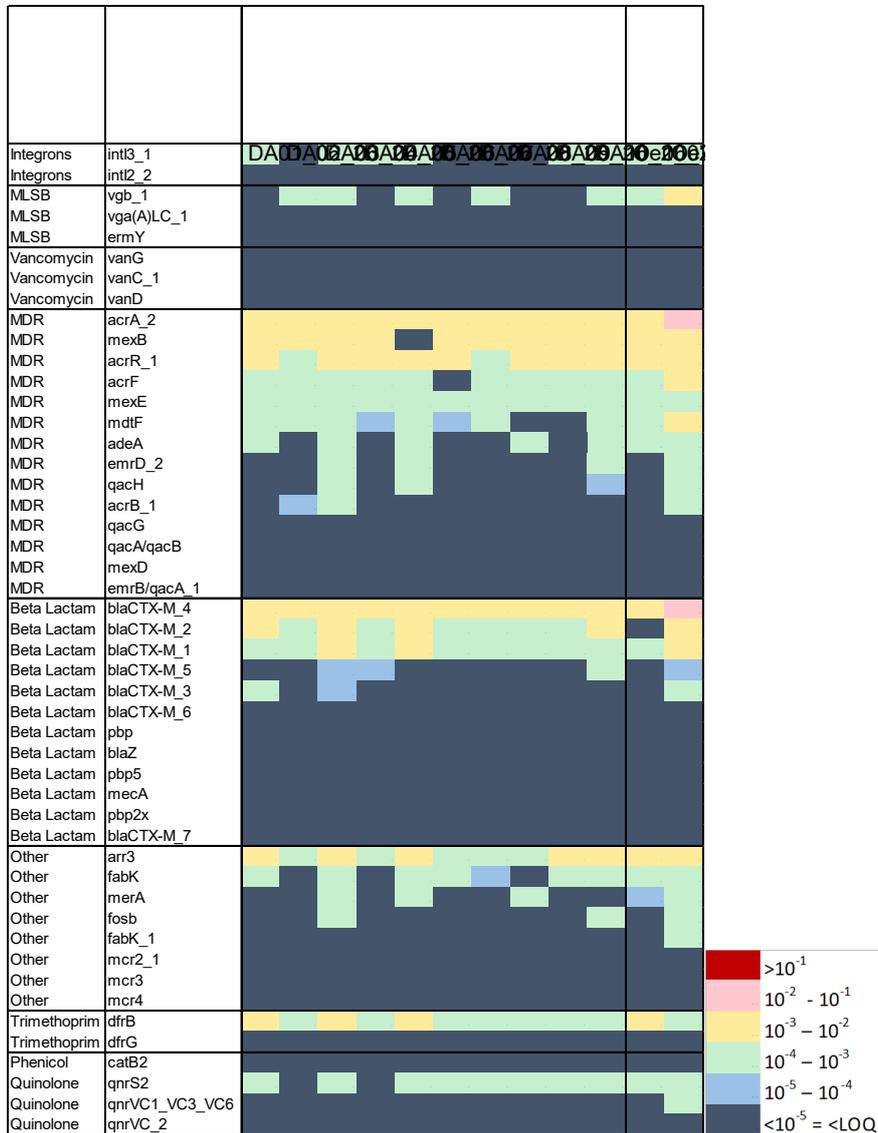


Abbildung 116. Relative Abundanz (ARG/16S) von zusätzlichen 48 ARGs in 12 Proben.

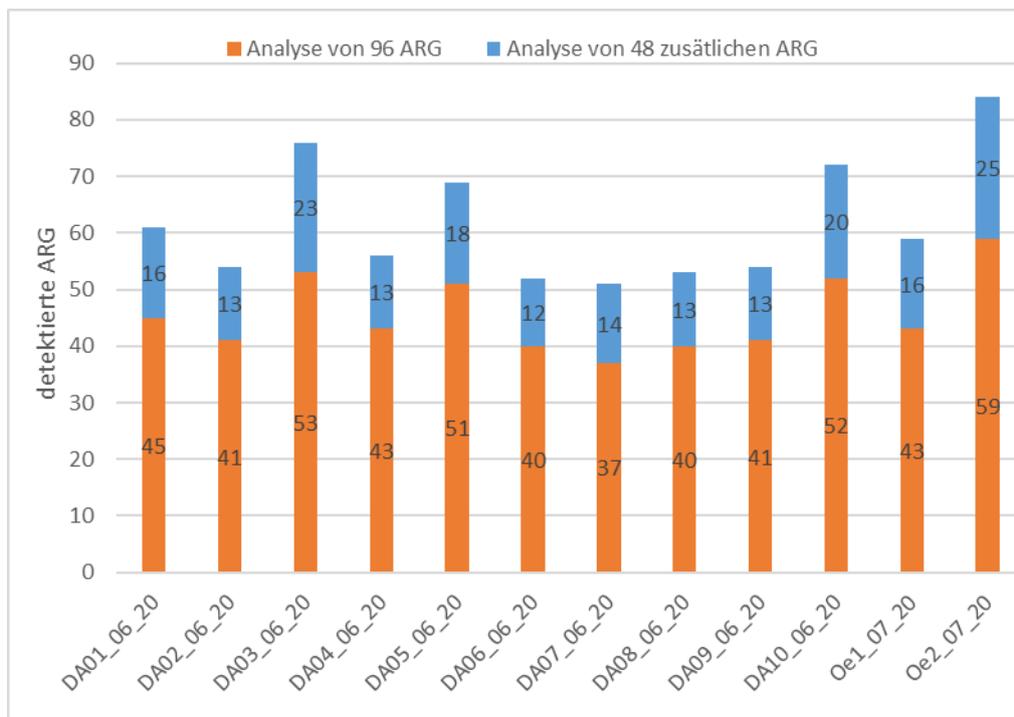


Abbildung 117. Screening auf 143 ARGs - Anzahl der detektierten ARGs.

95 dieser ARGs sind in Abbildung 111 A erfasst. 48 ARGs wurden in den hier dargestellten Proben zusätzlich untersucht.

5.5 Kultivierung antibiotikaresistenter Bakterien aus Boden- und Gülleproben: Bestimmung der Resistenzraten

Kultivierbare Bakterien aus jeweils einer Probe vom langjährig Gülle-freien Feld F04, vom Gülle-gedüngten Feld F31, von 2 Standorten im Nationalpark Donau-Auen sowie von einer Gülleprobe wurden auf Resistenz gegen **Vancomycin, Kanamycin, Sulfadiazin, Ampicillin, Erythromycin** und **Tetrazyklin** getestet. In allen Proben wurden für jedes dieser Antibiotika resistente kultivierbare Bakterien detektiert. Die Resistenzraten wurden als Anteil an resistenten Bakterien an der Gesamtanzahl kultivierbarer Bakterien bestimmt. Bei Vancomycin und Kanamycin waren die Resistenzraten in den Donau-Auen-Böden (DA01 und DA10) und im nicht Gülle-gedüngten Feld (F04) am höchsten. Die Sulfadiazin-Resistenzrate war in einer der Donau-Auen Probe (DA10) erhöht und in allen anderen Proben gering. Bei Ampicillin war die Resistenzrate in allen Bodenproben ähnlich und in der Gülle sehr gering. Die Erythromycin-Resistenzrate war in allen Proben gering. Die Tetrazyklin-Resistenzrate war ebenfalls in allen Proben gering, mit dem höchsten Wert im Gülle-gedüngten Feld F31. In der Gülle war die Gesamtanzahl an kultivierbaren Bakterien 10-fach bzw. 100-fach höher als in den Bodenproben.

Zur Identifikation potentieller Resistenzgenträger wurden aus jeder der 5 Proben Vancomycin-, Kanamycin-, Sulfadiazin-, Ampicillin-, Erythromycin- und Tetrazyklin-**resistente Bakterien isoliert**. Insgesamt 213 Isolate wurden anhand von *16S rRNA* Gen Sequenzen identifiziert. Die häufigsten Genera bei den resistenten Bodenisolaten waren ***Pseudomonas, Pedobacter, Variovorax*** und ***Stenotrophomonas***, bei den Schweinegülle-Isolaten waren es ***Brevibacterium, Enterococcus*** und ***Bavariicoccus***.

Ziel dieser Experimente war die Bestimmung der Resistenzrate bei kultivierbaren Bakterien, um diese mit den qPCR Ergebnissen zu vergleichen. Dazu wurden Suspensionen aus 5 unterschiedlichen Umweltproben auf 2 verschiedenen Nährmedien ausplattiert (Minimalmedium R2A Agar und Vollmedium Standard I Nutrient Agar) jeweils mit 6 verschiedenen Antibiotika sowie ohne Antibiotikum.

Um einen Überblick über die Resistenzraten der Bakterien in verschiedenen Umweltkompartimenten mit unterschiedlicher anthropogener Belastung zu erlangen, wurden zwei Waldbodenproben aus den Donau-Auen (DA01_11_20 und DA10_11_20), eine Probe von einem nicht mit Gülle (M_01_21) gedüngtem landwirtschaftlich genutzten Feld (F04_C_01_20), eine Probe von einem mit Gülle gedüngtem landwirtschaftlich Feld (F31_C_aH) und eine Gülleprobe, untersucht (Tabelle 43).

Tabelle 43. Proben zur Bakterienkultivierung und Bestimmung der Resistenzrate

Probe	Probeziehung	Anthropogener Einfluss
F04_C_01_20	27.01.21	landwirtschaftlich genutztes Feld
F31_C_aH	Okt.20	landwirtschaftlich genutztes Feld und mit Gülle gedüngt
DA01_11_20	02.11.20	Laubwaldbodenprobe unter geringem anthropogenen Einfluss
DA10_11_20	02.11.20	Laubwaldbodenprobe unter geringem anthropogenen Einfluss
Gülle	27.01.21	-

In der Tabelle 44 werden die detaillierten Ergebnisse der Bakterienkultivierung auf beiden Nährmedien jeweils mit und ohne Antibiotika dargestellt. Wird ein Abschnitt mit * gekennzeichnet, so handelt es sich um eine Agarplatte, die aufgrund von Pilzkontaminationen nicht ausgewertet werden konnte.

Tabelle 44. Antibiotikaresistenzraten in Acker- und Waldbodenproben sowie Gülle.

Probe	Vollmedium Nutrient Agar / Sulfadiazin				Minimalmedium R2A / Sulfadiazin			
	KBE/g Probe	+ Sulfadiazin (KBE/g Probe)	Index	Sulfadiazin Resistenz (%)	KBE/g Probe	+ Sulfadiazin (KBE/g Probe)	Index	Sulfadiazin Resistenz (%)
F04_C_01_20	5,9E+05	-	-	-	1,0E+06	4,3E+04	23,0	4,4
F31_C_aH	5,4E+06	-	-	-	1,0E+07	2,8E+05	36,0	2,8
DA01_11_20	2,3E+06	-	-	-	5,0E+06	9,9E+04	48,9	2,1
DA10_11_20	4,5E+06	9,6E+05	4,7	21,3	3,0E+06	6,8E+05	3,8	26,7
Gülle	1,3E+09	-	-	-	3,0E+07	1,4E+06	103,0	3,9
Probe	Vollmedium Nutrient Agar / Erythromycin				Minimalmedium R2A / Erythromycin			
	KBE/g Probe	+ Erythromycin (KBE/g Probe)	Index	Erythromycin Resistenz (%)	KBE/g Probe	+ Erythromycin (KBE/g Probe)	Index	Erythromycin Resistenz (%)
F04_C_01_20	5,9E+05	3,6E+04	16,3	6,2	1,0E+06	4,5E+04	21,8	4,6
F31_C_aH	5,4E+06	2,6E+04	208,7	0,5	1,0E+07	5,2E+04	192,3	0,5
DA01_11_20	2,3E+06	1,8E+04	116,7	0,8	4,8E+06	3,9E+04	122,9	0,8
DA10_11_20	4,5E+06	2,3E+04	200,0	0,5	3,0E+06	3,0E+04	72,6	1,4
Gülle	1,3E+09	3,6E+05	5972,2	0,0	3,0E+07	1,3E+05	1056,0	0,4

Probe	Vollmedium Nutrient Agar / Vancomycin				Minimalmedium R2A / Vancomycin			
	KBE/g Probe	+ Vancomycin (KBE/g Probe)	Index	Vancomycin Resistenz (%)	KBE/g Probe	+ Vancomycin (KBE/g Probe)	Index	Vancomycin Resistenz (%)
F04_C_01_20	5,9E+05	1,8E+05	3,3	30,0	1,0E+06	2,8E+05	3,5	28,6
F31_C_aH	5,4E+06	2,7E+05	9,5	10,6	1,0E+07	5,4E+05	18,4	5,4
DA01_11_20	2,3E+06	1,4E+06	1,5	61,0	5,0E+06	2,6E+06	1,9	54,0
DA10_11_20	4,5E+06	1,2E+06	3,7	26,8	3,0E+06	7,2E+05	3,5	28,4
Gülle	1,3E+09	-	-	-	3,0E+07	1,9E+05	753,4	0,5
Probe	Vollmedium Nutrient Agar / Kanamycin				Minimalmedium R2A / Kanamycin			
	KBE/g Probe	+ Kanamycin (KBE/g Probe)	Index	Kanamycin Resistenz (%)	KBE/g Probe	+ Kanamycin (KBE/g Probe)	Index	Kanamycin Resistenz (%)
F04_C_01_20	5,9E+05	7,9E+04	7,4	13,5	1,0E+06	2,7E+04	36,4	2,8
F31_C_aH	5,4E+06	5,3E+05	10,2	9,8	1,0E+07	2,2E+05	46,1	2,2
DA01_11_20	2,3E+06	1,1E+06	1,9	49,0	5,0E+06	6,8E+04	71,7	1,4
DA10_11_20	4,5E+06	1,1E+06	4,0	25,0	3,0E+06	2,3E+05	11,3	8,9
Gülle	1,3E+09	3,6E+05	5972,2	0,0	3,0E+07	-	-	-
Probe	Vollmedium Nutrient Agar / Tetrazyklin				Minimalmedium R2A / Tetrazyklin			
	KBE/g Probe	+ Tetrazyklin (KBE/g Probe)	Index	Tetrazyklin Resistenz (%)	KBE/g Probe	+ Tetrazyklin (KBE/g Probe)	Index	Tetrazyklin Resistenz (%)
F04_C_01_20	5,9E+05	9,0E+03	65,0	1,5	1,0E+06	4,5E+03	218,3	0,5
F31_C_aH	5,4E+06	5,3E+05	10,2	9,8	1,0E+07	4,5E+05	22,1	4,5
DA01_11_20	2,3E+06	3,6E+04	58,3	1,6	5,0E+06	2,0E+04	238,9	0,4
DA10_11_20	4,5E+06	1,6E+04	285,7	0,4	3,0E+06	3,3E+04	77,6	1,3
Gülle	1,3E+09	*	*	*	3,0E+07	5,3E+05	262,9	1,5
Probe	Vollmedium Nutrient Agar / Ampicillin				Minimalmedium R2A / Ampicillin			
	KBE/g Probe	+ Ampicillin (KBE/g Probe)	Index	Ampicillin Resistenz (%)	KBE/g Probe	+ Ampicillin (KBE/g Probe)	Index	Ampicillin Resistenz (%)
F04_C_01_20	5,9E+05	1,3E+05	4,4	22,7	1,0E+06	2,0E+05	4,9	20,6
F31_C_aH	5,4E+06	5,7E+05	9,5	10,6	1,0E+07	1,3E+06	7,7	13,0
DA01_11_20	2,3E+06	2,5E+05	8,3	11,2	5,0E+06	4,7E+05	10,2	9,8
DA10_11_20	4,5E+06	4,3E+05	10,5	9,5	3,0E+06	3,1E+05	8,3	12,1
Gülle	1,3E+09	1,4E+05	15925,9	0,0	3,0E+07	-	-	-

Abbildung 118 zeigt die Gesamt-KBE Werte sowie Resistenzraten für die 6 Antibiotika in Nutrient Agar und R2A. Bei allen Bodenproben lag die Gesamtzahl an kultivierbaren Bakterien auf beiden Medien bei ca. 10^6 KBE pro Gramm Probe. Bei der Gülle lag diese Gesamtzahl bei ca. 3×10^7 (R2A) bzw. 1×10^9 (Nutrient Agar) KBE pro Gramm Probe.

In allen Proben wurden für jedes Antibiotikum resistente kultivierbare Bakterien detektiert. Die mit den verschiedenen Nährmedien gewonnenen Ergebnisse stimmten überein. R2A erwies sich als geeignet für alle 6 Antibiotika, Nutrient Agar förderte besonders das Wachstum Kanamycin-resistenter Bakterien, war jedoch mit Sulfadiazin anfällig für Kontaminationen.

Bei **Vancomycin** und **Kanamycin** waren die Resistenzraten in den naturnahen Waldböden (Donau-Auen 1 und 10) und im nicht Gülle-gedüngten Feld (F04_C_01_20) hoch, im Gülle-gedüngten Feld niedrig und in der Gülle sehr gering. Die **Sulfadiazin**-Resistenzrate war in einer der Waldproben (DA10_11_20) erhöht und in allen anderen Proben gering. Bei **Ampicillin** war die Resistenzrate in allen Bodenproben ähnlich und in der Gülle sehr gering. Die **Erythromycin**-Resistenzrate war in allen Proben gering, mit dem höchsten Wert im nicht Gülle-gedüngten Feld F04_C_01_20. Die **Tetrazyklin**-Resistenzrate war ebenfalls in allen Proben gering, mit dem höchsten Wert im Gülle-gedüngten Feld F31_C_aH.

Insgesamt auffällig ist der hohe Prozentsatz an Vancomycin- und Kanamycin-resistenten kultivierbaren Bakterien in den naturnahen Waldböden. Ebenso auffällig ist bei allen 6 Antibiotika der sehr geringe Anteil an resistenten Bakterien an der Gesamtheit der kultivierbaren Bakterien in der Gülle. Bei der Gülle ist die 10-fach bzw. 100-fach höhere Gesamtanzahl an kultivierbaren Bakterien zu beachten.

Die Resistenzraten von Kanamycin in Bodenproben liegt bei unter 10% und ist mit der Literatur (63) vergleichbar. Ebenso kann man in der Literatur vergleichbare Werte zur ermittelten Ampicillinresistenzrate finden (74).

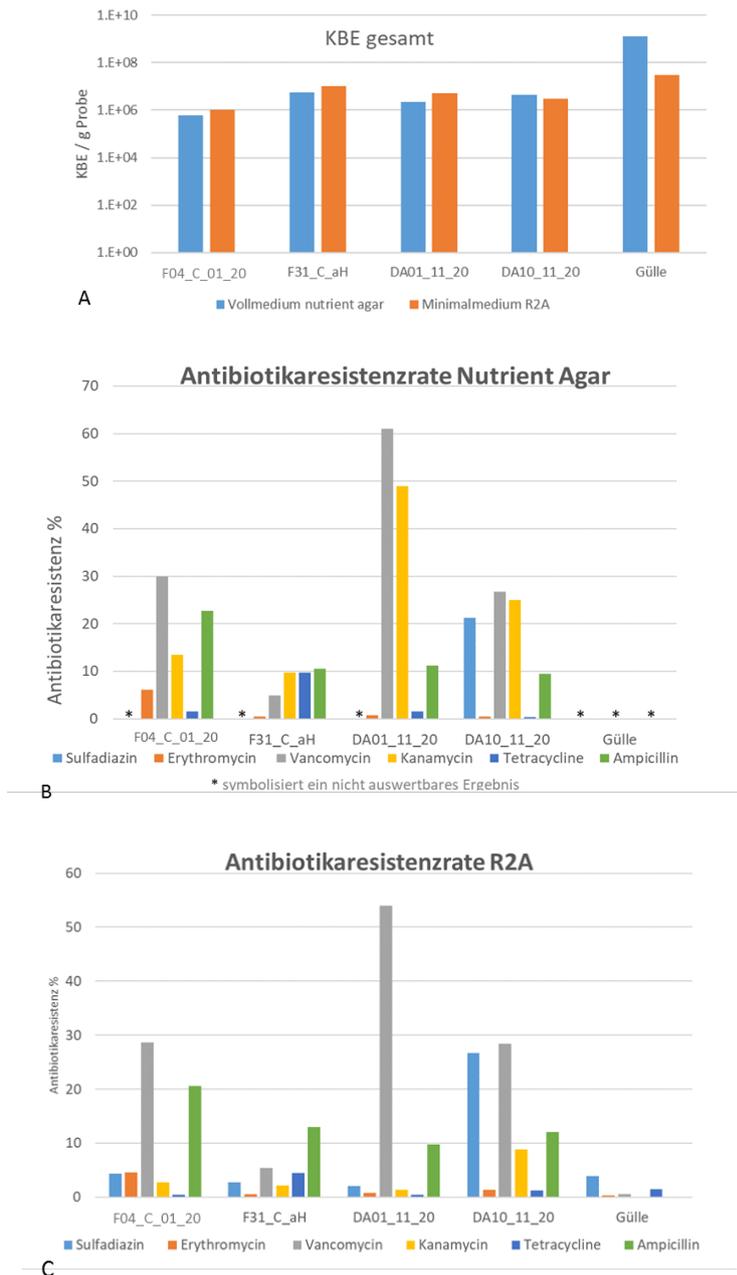


Abbildung 118. Antibiotikaresistenzraten (%) auf Nutrient Agar und R2A.

A) Gesamtanzahl kultivierbare Bakterien je Medium. B) Antibiotikaresistenzrate auf Vollmedium. C. Resistenzrate auf Minimalmedium. Bodenprobe mit landwirtschaftlicher Nutzung (F04_C_01_20), mit landwirtschaftlicher Nutzung und Gülledüngung (F31_C_aH), zwei Waldböden (DA01_11_20 und 10) und der Gülleprobe. * nicht auswertbare Ergebnisse aufgrund von Pilzkontaminationen.

5.6 Sequenzierung der antibiotikaresistenten Bakterien aus Boden- und Gülleproben

Zur Identifikation potentieller Resistenzträger wurden aus jeder der fünf, in Kapitel 5.5 beschriebenen Proben Vancomycin-, Kanamycin-, Sulfadiazin-, Ampicillin-, Erythromycin- und Tetrazyklin-resistente Bakterien isoliert. Insgesamt 213 Isolate wurden anhand von *16S rRNA* Gen Sequenzen identifiziert. Die häufigsten Genera bei den **resistenten Bodenisolaten** waren *Pseudomonas*, *Pedobacter*, *Variovorax* und *Stenotrophomonas*, bei den **Schweinegülle-Isolaten** waren es *Brevibacterium*, *Enterococcus* und *Bavariicoccus*.

Die in Kapitel 5.5 kultivierten Antibiotika-resistenten Bakterien wurden auf LB Agar mit dem jeweiligen Antibiotikum als Reinkulturen isoliert und mittels 16S Amplikon Sequenzierung identifiziert. Insgesamt konnten 213 Reinkulturen sequenziert werden, von denen 192 (90%) auf Genus-Level und 108 (51%) auf Spezies-Level identifiziert wurden. Die Stammsammlung umfasste Isolate aus allen 5 in Kapitel 5.5 untersuchten Proben (National Park Donau-Auen (DA01 und DA10), Gülle-gedüngtes Feld (F31), nicht-Gülle-gedüngtes Feld (F04) und Schweinegülle). 110 Isolate stammten von Nutrient Agar (NA)-Platten, 103 Isolate vom nährstoffreduzierten R2A-Medium. 70 Isolate waren resistent gegenüber Kanamycin (KA), 41 gegen Tetrazyklin-, 74 gegen Erythromycin-, 26 gegen Vancomycin- und 2 gegen Ampicillin. Eine genaue Auflistung ist in der nachfolgenden Tabelle 45 zu sehen.

Tabelle 45. Anzahl der isolierten Bakterien.

Antibiotika	DA01	DA10	F04	F31	Schweine Gülle	Summe Antibiotika	Summe NA
	NA						
Ampicillin	-	-	2	-	-	2	
Erythromycin	10	10	9	9	3	41	
Kanamycin	8	4	10	8	5	35	110
Tetrazyklin	3	3	1	8	2	17	
Vancomycin	7	7	-	-	1	15	
Antibiotika	R2A					Summe Antibiotika	Summe R2A
	Ampicillin	-	-	-	-		
Erythromycin	7	-	8	10	8	33	
Kanamycin	10	10	8	7	-	35	103
Tetrazyklin	6	4	1	5	8	24	
Vancomycin	5	6	-	-	-	11	
Summe	56	44	39	47	27		

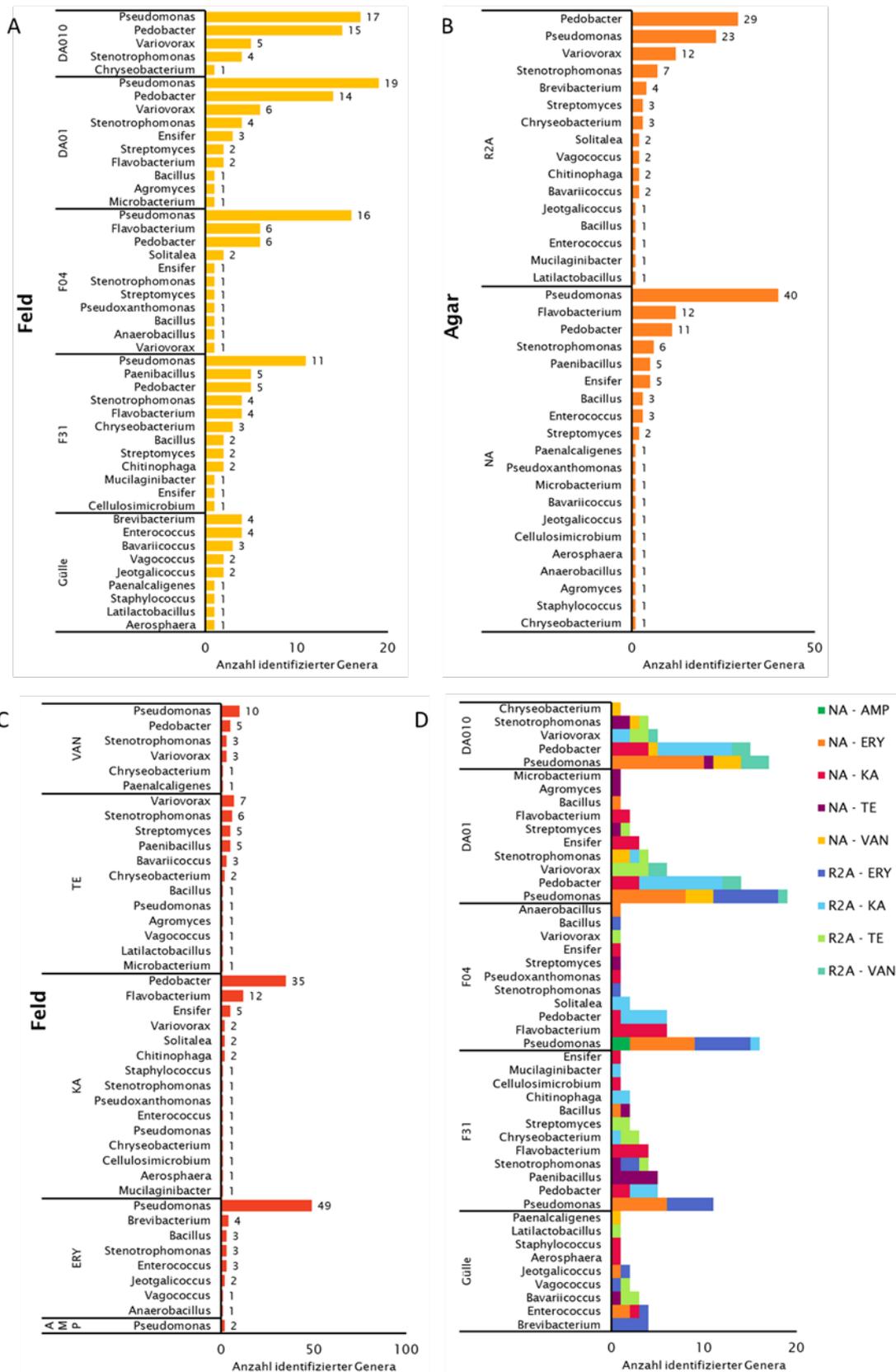


Abbildung 119. Detektierte kultivierbare Genera.

Dargestellt nach A) dem Probeentnahme-Ort, B) dem Kultivierungs-Agar und C) nach den eingesetzten Antibiotika. In D) wurden die Ergebnisse kombiniert und prozentuell in gestapelten Säulen dargestellt. NA=Nutrient Agar, R2A=Minimal Agar, AMP=Ampicillin, ERY= Erythromycin, KA=Kanamycin, TE=Tetrazyklin, VAN=Vancomycin.

In Abbildung 119A ist zu erkennen, dass aus Schweinegülle vorwiegend *Brevibacterium*, verschiedene Kokken (*Enterococcus*, *Bavariicoccus*, *Vagococcus*, *Geotgliaococcus*, *Staphylococcus*), *Paenicaligenes*, *Lactobacillus* und *Aerosphaera* isoliert wurden, aus den Bodenproben hingegen *Pseudomonas*, *Pedobacter* und *Stenotrophomonas*. Es gab keine Genera, die sowohl in Bodenproben als auch in der Gülle kultiviert wurden. Die Bodenproben waren untereinander ähnlich bei den abundantesten Genera. Die Proben aus den Donau-Auen und von F04 zeichneten sich durch 1-2 sehr dominante Genera bei den kultivierbaren Bakterien aus, die Isolate von F31 verteilten sich ausgewogener auf verschiedene Genera.

Abbildung 118B zeigt, dass mehr Bakterien auf dem nährstoffreichen Agar NA gewachsen sind, wobei *Pseudomonas* am häufigsten auf NA angereichert werden konnte und *Pedobacter* auf R2A.

Abbildung 118C zeigt die Verteilung der identifizierten Genera auf die 5 verschiedenen Antibiotika, die sowohl dem R2A als auch NA Agar hinzugefügt wurden. Auf dem Ampicillin-haltigen Agar konnten nur 2 *Pseudomonas* Stämme isoliert werden. Bei Vancomycin kamen auch *Pseudomonas* Stämme am öftesten vor, gefolgt von *Pedobacter*, *Stenotrophomonas* und *Variovorax*. Bei Kanamycin konnte *Pedobacter* 35x festgestellt werden, gefolgt von *Flavobacterium* und *Ensifer*. Bei Erythromycin wurden ebenfalls Pseudomonaden am öftesten isoliert (49x), gefolgt von *Brevibacterium*, *Bacillus* und *Enterococcus*. Auf Tetrazyklin-haltigem Agar konnten vor allem *Variovorax*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces* und *Paenibacillus* identifiziert werden.

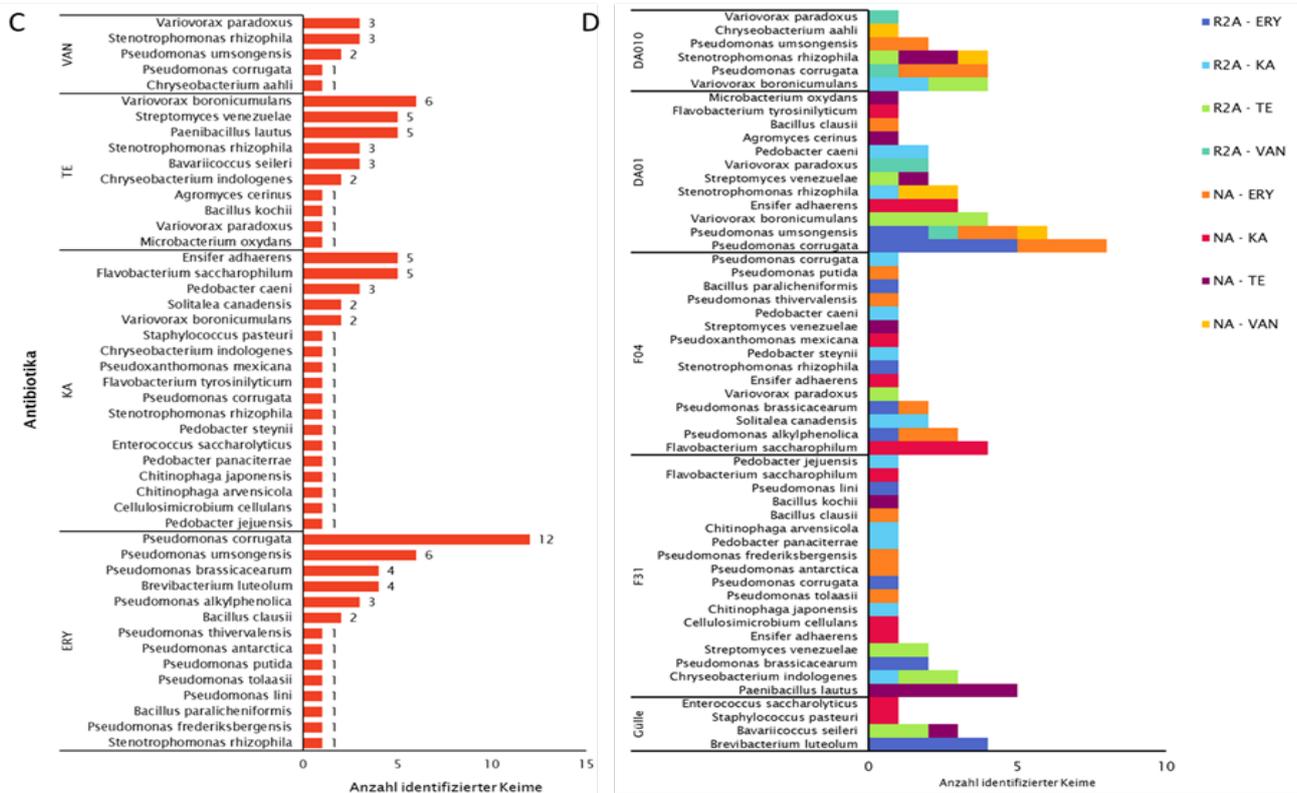
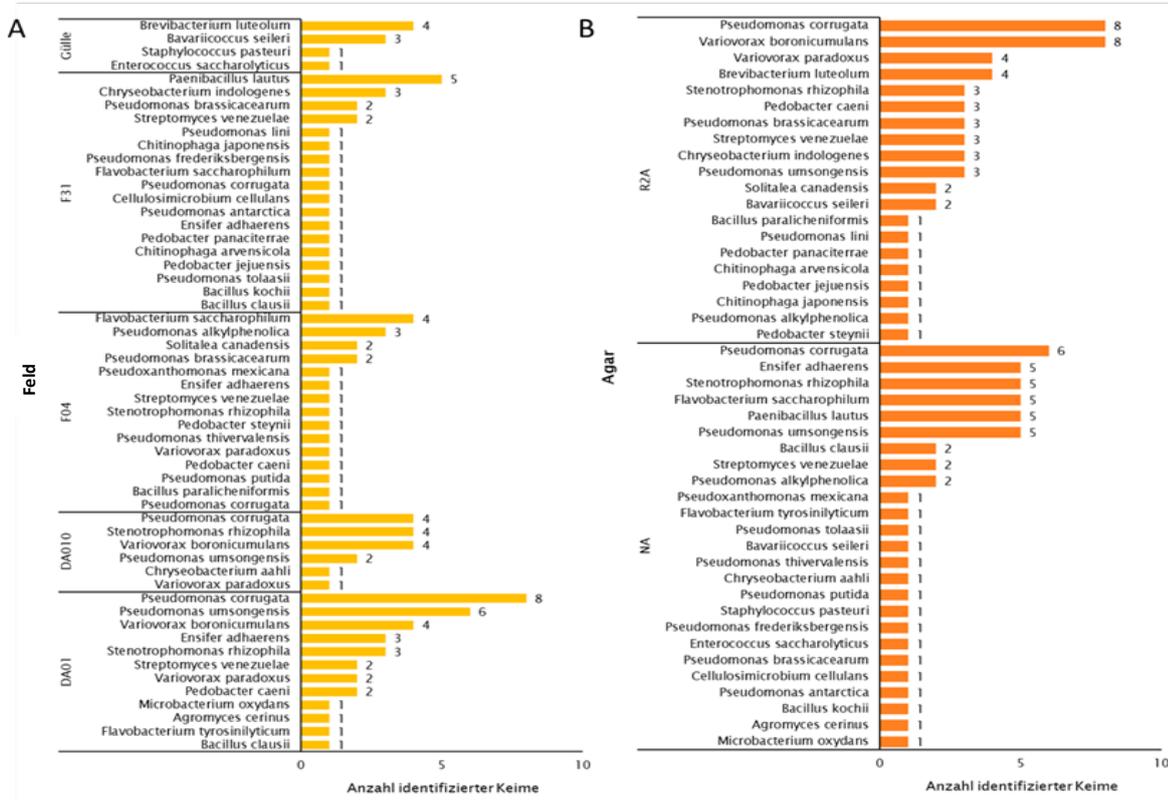


Abbildung 120. Detektierte kultivierbare Spezies.

Dargestellt nach A) dem Probenentnahme-Ort, B) dem Kultivierungs-Agar und C) nach den eingesetzten Antibiotika. In D) wurden die Ergebnisse kombiniert und prozentuell in gestapelten Säulen dargestellt. NA=Nutrient Agar, RZA= minimal medium, ERY=Erythromycin, KA=Kanamycin, TE= Tetracyclin, VAN= Vancomycin

Auf Spezies-Level konnten nur 51% der sequenzierten Proben identifiziert werden. In den Proben DA01 und DA10 wurde am öftesten *Pseudomonas corrugata*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Variovorax boronicumulans* und *Pseudomonas umsogensis* isoliert. Bei dem nicht-Gülle-gedüngten Feld F04 konnten *Flavobacterium saccharophilum*, *Pseudomonas alkylphenolica*, *Pseudomonas brassicacearum* und *Solitalea canadensis* am öftesten ermittelt werden. Im Gülle-gedüngten Feld F31 konnten *Paenibacillus lautus*, *Chryseobacterium indologenes*, *Streptomyces venezuelae* und *Pseudomonas brassicacearum* am häufigsten isoliert werden. Aus der Gülle konnten vor allem *Brevibacterium luteolum* und *Bavariicoccus seileri* identifiziert werden. Insgesamt konnten 18 verschiedene Bakterien-Spezies aus der Probe F31 isoliert werden, gefolgt von F04 (15), DA01 (12x), DA10 (6) und Gülle (5) (Abbildung 120A).

Beim Vergleich der zwei Medien zeigte sich, dass *Pseudomonas corrugata*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Pseudomonas umsogenesis* und *Streptomyces venezuelae* sowohl auf R2A als auch auf NA kultivierbar waren. Einige Spezies wuchsen nur auf R2A, wie beispielsweise *Pedobacter spp.*, *Chitinophaga spp.*, *Variovorax spp.*, *Solitalea canadensis* und *Brevibacterium luteolum*. Die Bakterienarten, die nur auf dem nährstoffreichen NA gewachsen sind, waren *Paenibacillus lautus*, *Microbacterium oxydans*, *Flavobacterium spp.*, *Enterococcus saccharolyticus*, *Ensifer adhaerens*, *Cellulosemicrobium cellulans* und *Agromyces cerinus* (Abbildung 120B).

Wenn man die unterschiedlichen Antibiotika verglich, konnte nur *Stenotrophomonas rhizophila* auf Erythromycin-, Kanamycin-, Tetrazyklin- und Vancomycin-haltigem Medium wachsen (jedoch nicht auf Ampicillin). Die zwei auf Ampicillin-haltigem Medium isolierten *Pseudomonas* Stämme konnten nicht auf Spezies-Level identifiziert werden. Die meisten verschiedenen identifizierten Spezies wurden auf Kanamycin-haltigem Agar kultiviert (18 Spezies), gefolgt von Erythromycin (14 Spezies), Tetrazyklin (10 Spezies) und Vancomycin (6 Spezies).

Insgesamt war *Pseudomonas* der am öftesten kultivierbare Stamm (63x), der auf Genus-Level identifizierbar war, sowie *Pedobacter* (40x) und *Stenotrophomonas* (13x). *Pseudomonas* Stämme (vor allem *P. aeruginosa*) sind bekannt für ihre intrinsische Resistenz gegenüber Aminoglykosiden, Quinolonen und beta-Laktamen. *Pedobacter spp.* wurde als intrinsisch multi-resistent beschrieben wurde (75). Die Autoren nahmen an, dass dieses Phänomen auf die Ausbreitung von Antibiotika in die Umwelt zurückzuführen ist, da *Pedobacter spp.* bei erhöhten Antibiotikakonzentrationen angereichert werden kann. Auch *Stenotrophomonas spp.* wurden dank ihrer Effluxpumpen und Antibiotika-inaktivierenden Enzyme als intrinsisch resistent gegenüber einer Vielzahl an Antibiotika (Fluorochinolone, Tetrazykline, Doxorubicin und beta-Laktame) klassifiziert (76). Die vorliegenden Projektergebnisse bestätigen diese Beobachtung: *Stenotrophomonas rhizophila* ist gegen 4 von 5 getesteten Antibiotika resistent.

Diese Ergebnisse stellen einen Überblick über jene Bakterien dar, die aus dem Boden und Schweinegülle isoliert und auf Agar-Platten mit verschiedenen Nährstoffen und Antibiotika kultiviert

werden können. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die meisten identifizierten Spezies aus dem Gülle-gedüngten Boden F31, auf dem Nährmedium mit Kanamycin isoliert werden konnten.

5.7 Antibiotikakonzentrationen

Keine der 29 analysierten Verbindungen (Tabelle 46), konnte in den 14 untersuchten Bodenproben nachgewiesen werden (Tabelle 47). Nur in Gülle konnte ein Fluorochinolon (Marbofloxacin: 20,8 µg/kg) und ein Tetrazyklin-Derivat (Doxycyclin: 102,0 µg/kg) nachgewiesen werden. Diese nachgewiesenen Konzentrationen liegen über der für einige Bakterien/Antibiotikumskombinationen berichteten minimal selektiven Konzentration und könnten somit einen Selektionsdruck in Richtung Resistenzentwicklung im getesteten Habitat vermitteln (46, 77, 78).

In HOAL Wasserproben konnte ein Sulfonamid (Sulfadimidin: < 0,0010 µg/L) qualitativ nachgewiesen, aber nicht quantifiziert werden (Tabelle 49). Die in den Wasserproben getesteten Antibiotika sind in Tabelle 48 dargestellt.

Tabelle 46. Untersuchte Antibiotika in Bodenproben, Gülle und Kot und ihre LOQs.

No.	Substanz	Antibiotika-Klasse	LOQ ¹⁾
1	Azithromycin	Makrolide	< 1,0 µg/kg
2	Erythromycin	Makrolide	< 10,0 µg/kg
3	Josamycin	Makrolide	< 5,0 µg/kg
4	Spiramycin	Makrolide	< 10,0 µg/kg
5	Tulathromycin	Makrolide	< 20,0 µg/kg
6	Tilmicosin	Makrolide	< 5,0 µg/kg
7	Tylosin	Makrolide	< 5,0 µg/kg
8	Trimethoprim	Diaminopyrimidine	< 10,0 µg/kg
9	Chlortetrazyklin	Tetrazykline	< 10,0 µg/kg
10	Doxyzyklin	Tetrazykline	< 5,0 µg/kg
11	Oxytetrazyklin	Tetrazykline	< 10,0 µg/kg
12	Tetrazyklin	Tetrazykline	< 5,0 µg/kg
13	Danofloxacin	Fluorochinolone	< 10,0 µg/kg
14	Difloxacin	Fluorochinolone	< 10,0 µg/kg
15	Ciprofloxacin	Fluorochinolone	< 20,0 µg/kg
16	Enrofloxacin	Fluorochinolone	< 10,0 µg/kg
17	Flumequine	Fluorochinolone	< 5,0 µg/kg
18	Nalidixinsäure	Fluorochinolone	< 5,0 µg/kg
19	Oxolinsäure	Fluorochinolone	< 5,0 µg/kg
20	Marbofloxacin	Fluorochinolone	< 20,0 µg/kg
21	Norfloxacin	Fluorochinolone	< 20,0 µg/kg
22	Sarafloxacin	Fluorochinolone	< 20,0 µg/kg
23	Sulfadiazin	Sulfonamide	< 5,0 µg/kg
24	Sulfadimethoxin	Sulfonamide	< 5,0 µg/kg
25	Sulfamerazin	Sulfonamide	< 5,0 µg/kg
26	Sulfamethazin	Sulfonamide	< 5,0 µg/kg
27	Sulfamethoxazol	Sulfonamide	< 5,0 µg/kg
28	Sulfamonomethoxin	Sulfonamide	< 5,0 µg/kg
29	Sulfathiazol	Sulfonamide	< 5,0 µg/kg

1) Bestimmungsgrenze laut National Veterinary Research Institute, Pulawy, Polen.

Tabelle 47. Antibiotika-Konzentrationen in Bodenproben, Gülle und Kot.

Sample No. ¹⁾	Standort	Probenmaterial	Anthropogener Einfluss	Detektierte Antibiotika ²⁾	Antibiotic concentrations ³⁾
1	Nationalpark Donau-Auen 2 (Südbereich) Juni 2020	Waldboden	Gering	-	Negativ (< LOD)
2	Nationalpark Donau-Auen 8 (Nordbereich) Juni 2020	Waldboden	Gering	-	Negativ (< LOD)
3	Prater Park Juli 2020	Suburban; Wien Waldboden	Gering	-	Negativ (< LOD)
4	Volksgarten Juli 2020	Park im Stadtgebiet, Wien; Boden	Gering	-	Negativ (< LOD)
5	Ötscher 1 Juli 2020	Alpiner Boden	Gering	-	Negativ (< LOD)
6	Mischwald Juli 2020	HOAL; Waldboden	Gering	-	Negativ (< LOD)
7	Augarten Park Juli 2020	Park im Stadtgebiet, Wien; Boden	Mittel	-	Negativ (< LOD)
8	Laubwald Juli 2020	HOAL; Waldboden	Mittel	-	Negativ (< LOD)
9	Hadikpark Juli 2020	Park im Stadtgebiet, Wien; Boden	Hoch	-	Negativ (< LOD)
10	Breitenfurter Straße Juli 2020	Straßenrand, Wien; Boden	Hoch	-	Negativ (< LOD)
11	F32: 18 Wo nach IF	HOAL; Ackerboden	Hoch	-	Negativ (< LOD)
12	F31: 18 Wo nach OF	HOAL; Ackerboden	Hoch	-	Negativ (< LOD)
13	F39: 18 Wo nach OF	HOAL; Ackerboden	Hoch	-	Negativ (< LOD)
14	F04: 18 Wo nach IF	HOAL; Ackerboden	Hoch	-	Negativ (< LOD)

Sample No. ¹⁾	Standort	Probenmaterial	Anthropogener Einfluss	Detektierte Antibiotika ²⁾	Antibiotic concentrations ³⁾
15	Gülle April 2020	HOAL; Schwein	-	Marbofloxacin	20,8 µg/kg (+/- 6,2 µg/kg)
				Doxycyclin	102,0 µg/kg (+/- 30,6 µg/kg)
16	Kot Juli 2020	HOAL; Schwein	-	-	Negativ (< LOD)

1) Proben 1-10: Vergleichsböden zu HOAL-Ackerböden

2) Für getestete Antibiotika siehe Tabelle 46

3) < LOD: unter der Nachweisgrenze

Tabelle 48. Untersuchte Antibiotika in HOAL-Wasserproben (inkl. LOQs und LODs).

Nummer	Substanz	Antibiotika-Klasse	LOQ ¹⁾ (µg/L)	LOD ²⁾ (µg/L)
1	Ampicillin	Penicilline	0,01	0,005
2	Amoxicillin	Penicilline	0,01	0,005
3	Azithromycin	Makrolide	0,01	0,005
4	Clarithromycin	Makrolide	0,01	0,005
5	Clindamycin	Makrolide	0,01	0,005
6	Doxycyclin	Tetrazykline	0,01	0,005
7	Erythromycin	Makrolide	0,01	0,005
8	Josamycin	Makrolide	0,01	0,005
9	Metronidazol	Nitroimidazole	0,001	0,0005
10	Oxytetrazyklin	Tetrazykline	0,01	0,005
11	Penicillin G	Penicillin	0,01	0,005
12	Penicillin V	Penicillin	0,01	0,005
13	Roxithromycin	Makrolide	0,01	0,005
14	Sulfadiazin	Sulfonamide	0,001	0,0005
15	Sulfadimethoxin	Sulfonamide	0,001	0,0005
16	Sulfadimidin (= Sulfamethazin)	Sulfonamide	0,001	0,0005
17	Sulfadoxin	Sulfonamide	0,001	0,0005
18	Sulfamethoxazol	Sulfonamide	0,001	0,0005
19	Sulfathiazol	Sulfonamide	0,001	0,0005
20	Trimethoprim	Diaminopyrimidine	0,001	0,0005

1) Bestimmungsgrenze laut Prüfstelle für Umwelt-, GVO- & Treibstoff-Analytik; Umweltbundesamt, Wien

2) Nachweisgrenze laut Prüfstelle für Umwelt-, GVO- & Treibstoff-Analytik; Umweltbundesamt, Wien.

Tabelle 49. Antibiotika-Konzentrationen in HOAL-Wasserproben.

Sample No. ¹⁾	Standort	Probenmaterial	Detektierte Antibiotika ²⁾	Antibiotika-Konzentrationen ³⁾ (µg/L)
1	MW-1 Baseline 21.1.2020	HOAL Bachwasser	-	Negativ (< LOD)
2	MW-5 2 Wochen nach Gülledüngung F39 23.4.2020	HOAL Bachwasser	-	Negativ (< LOD)
3	MW-9 4 Wochen nach Gülledüngung F39 8.5.2020	HOAL Bachwasser	-	Negativ (< LOD)
4	MW-17 16 Wochen nach Gülledüngung F39 3.8.2020	HOAL Bachwasser	Sulfadimidin (=Sulfamethazin)	< 0,0010
5	Sys-10 4 Wochen nach Gülledüngung F39 8.5.2020	HOAL Drainage	-	Negativ (< LOD)

- 1) Bach- und Drainagewasser zu verschiedenen Zeitpunkten relativ zur gülledüngung von Feld F39 gezogen.
- 2) Für getestete Antibiotika siehe Tabelle 48
- 3) < LOD: unter der Nachweisgrenze

5.8 Korrelation der ARG-Konzentrationen mit Abiotischen Standortfaktoren

5.8.1 Korrelation der ARG-Konzentrationen mit Wetterdaten

Das HOAL verfügt über eine eigene Wettermessstation, in der zahlreiche Parameter aufgezeichnet werden. Für einige Parameter stehen stündliche Werte zur Verfügung. Andererseits gab es im Beobachtungszeitraum lange Zeitfenster, in denen Sensoren ausgefallen waren. Hier wurde auf die Daten der nächstgelegenen ZAMG-Wetterstation in Wieselburg zurückgegriffen. Für die Vergleichsstandorte wurden die Tagesberichte bzw. Monatsberichte der nächstgelegenen ZAMG Wetterstationen herangezogen. Zu den Proben wurden Informationen bezüglich Lufttemperatur, Bodentemperatur, Niederschlag, relativer Luftfeuchtigkeit, Wind und Luftdruck gesammelt. Für die ARG-Konzentrationen und die Wetterparameter wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman berechnet. Dieser hat den Vorteil gegenüber dem Pearson-Korrelationskoeffizienten, dass er invariant gegen monotone Transformationen ist und den gleichen Wert bei Betrachtung der Konzentration auf Originalskala bzw. auf der logarithmierten Skala ergibt.

Tabelle 50 zeigt die Spearman Rang-Korrelationskoeffizienten für alle ARGs und alle Wetterparameter, bei denen ein Ranking möglich war. Überall negative ARGs und immer gleiche Jahreswetterwerte fehlen daher in der Tabelle. Schaut man, mit welcher Wettervariable es je Target die "stärkste" Spearman-Korrelation gibt, dann ist das am häufigsten (für 9 Targets) die Variable `rain_mm_d`. Der Zusammenhang ist meist ein negativer: je höher die Niederschlagsmenge am Tag des Samplings desto geringer die ARG-Konzentrationen. Hoch positiv korreliert die mittlere Windstärke am Bodenprobenentnahmetag mit *bla_{TEM-1}*. *ErmF* korreliert ebenfalls positiv mit der mittleren Monatstemperatur, aber stark negativ mit der relativen Luftfeuchtigkeit und der Regenmenge. *Tet(W)* korreliert vergleichsweise stark negativ mit den ermittelten Boden- und Lufttemperaturen. Ein ähnliches Verhalten kann bei *mecA* beobachtet werden.

Tabelle 50. Spearman Rang-Korrelationskoeffizienten für alle detektierten ARGs und alle Wetterparameter.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
16S	0.12	0.14	0.12	-0.21	-0.10	0.17	-0.28	-0.18	0.12	0.02	-0.01	0.12	0.10	0.16	-0.34	0.06	-0.15	-0.17	-0.33	-0.20	-0.32
aadA	0.14	-0.15	-0.23	-0.18	-0.03	0.02	-0.43	0.01	0.25	-0.16	0.08	-0.04	-0.12	-0.40	-0.40	0.02	-0.30	-0.02	-0.28	-0.13	-0.20
bla _{OX} A-10	0.25	-0.15	-0.23	-0.18	-0.03	0.02	-0.43	0.01	0.25	-0.16	0.08	-0.04	-0.12	-0.40	-0.40	0.02	-0.30	-0.02	-0.28	-0.13	-0.20
bla _{TEM} -1	0.08	-0.25	0.08	0.07	-0.28	0.11	-0.04	-0.36	0.25	-0.28	-0.53	-0.08	-0.08	0.34	0.07	-0.13	-0.19	-0.11	-0.25	-0.06	-0.30
cmxA	-0.40	0.02	-0.40	0.47	-0.26	0.40	-0.33	-0.42	-0.49	-0.26	-0.33	-0.42	0.49	0.07	-0.35	-0.35	-0.40	-0.40	-0.12	-0.30	-0.30
dfrA-1	-0.19	-0.10	-0.10	0.14	-0.10	-0.08	-0.21	-0.42	-0.19	0.06	-0.17	-0.42	-0.10	-0.03	0.19	0.19	-0.20	0.08	-0.23	0.05	-0.23
ermB	0.00	-0.06	-0.19	0.26	0.26	0.05	-0.56	-0.41	-0.38	-0.06	-0.35	-0.41	0.00	0.03	0.18	0.18	-0.26	-0.08	-0.29	-0.01	-0.28
ermF	-0.06	-0.29	0.10	-0.06	0.21	0.32	-0.53	-0.57	-0.37	-0.29	-0.53	-0.57	-0.02	0.18	-0.05	-0.05	-0.48	-0.32	-0.50	-0.26	-0.50
int11	0.22	0.24	0.12	0.38	0.38	0.37	-0.33	-0.33	-0.27	-0.55	-0.75	-0.33	-0.01	0.55	-0.15	-0.15	-0.40	-0.37	-0.40	-0.28	-0.40
ISPPs	0.02	-0.18	0.10	-0.25	0.04	0.06	-0.45	-0.27	0.02	0.12	-0.18	-0.08	-0.08	-0.08	0.12	0.12	-0.06	-0.30	-0.30	0.00	-0.33
mecA	0.13	-0.41	-0.34	-0.06	0.11	-0.39	0.09	0.32	0.13	0.05	0.15	-0.04	0.13	0.05	0.04	0.04	0.26	0.39	0.17	0.31	0.15
nptIII	0.05	0.46	0.22	0.13	-0.31	0.53	-0.17	-0.04	0.22	0.05	0.13	-0.48	-0.39	-0.53	-0.48	-0.48	-0.48	-0.53	-0.39	-0.48	-0.39
qacEdelta1	0.13	0.05	0.46	0.13	0.05	0.37	-0.17	0.02	0.11	-0.19	-0.29	0.09	-0.48	-0.39	-0.11	-0.11	-0.29	-0.23	-0.37	-0.11	-0.38
sat-4	-0.41	0.23	0.36	-0.41	-0.17	0.23	-0.02	-0.26	0.11	-0.19	-0.29	-0.12	-0.48	-0.39	-0.11	-0.11	-0.29	-0.23	-0.37	-0.11	-0.38
strB	-0.09	-0.09	-0.01	0.04	0.04	0.08	-0.06	-0.14	-0.20	-0.01	-0.17	-0.08	-0.14	0.07	0.13	0.13	-0.35	-0.32	-0.08	-0.33	-0.35
sull	0.29	-0.11	-0.13	0.29	0.29	0.12	-0.41	-0.41	-0.22	-0.11	-0.37	-0.40	0.07	0.13	0.13	0.13	-0.35	-0.32	-0.08	-0.33	-0.35
tet(A)	0.04	-0.09	0.12	0.07	0.07	0.11	-0.45	-0.41	-0.44	-0.44	-0.44	-0.45	-0.44	-0.44	-0.31	-0.31	-0.45	-0.41	-0.19	-0.43	-0.44
tet(M)	-0.05	-0.04	-0.05	-0.05	0.07	0.11	-0.45	-0.41	-0.44	-0.44	-0.44	-0.45	-0.44	-0.44	-0.31	-0.31	-0.45	-0.41	-0.19	-0.43	-0.44
tet(O)	0.35	-0.11	-0.21	0.35	0.35	0.21	-0.61	-0.53	-0.50	-0.21	-0.51	-0.40	0.16	0.16	0.19	0.19	-0.42	-0.21	-0.39	-0.24	-0.38
tet(W)	-0.40	-0.02	0.02	-0.40	-0.02	-0.07	-0.33	-0.20	0.17	-0.20	-0.09	-0.33	-0.21	-0.07	0.38	0.38	-0.42	-0.21	-0.39	-0.24	-0.38
vanA	0.11	-0.06	-0.05	0.11	0.11	0.00	-0.54	-0.44	-0.13	-0.39	-0.51	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.42	-0.21	-0.39	-0.24	-0.38
aPr_14h_hPa_d	0.28	0.02	0.02	0.17	-0.06	0.17	-0.20	-0.33	0.17	-0.20	-0.09	-0.33	-0.21	-0.07	0.38	0.38	-0.42	-0.21	-0.39	-0.24	-0.38
aPr_14h_hPa_14d	0.52	-0.31	-0.31	0.49	-0.16	-0.09	-0.53	-0.44	-0.13	-0.39	-0.51	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.42	-0.21	-0.39	-0.24	-0.38
aPr_14h_hPa_M	0.49	-0.31	-0.31	0.49	-0.16	-0.09	-0.53	-0.44	-0.13	-0.39	-0.51	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.42	-0.21	-0.39	-0.24	-0.38
wind_ms_d	0.49	-0.31	-0.31	0.49	-0.16	-0.09	-0.53	-0.44	-0.13	-0.39	-0.51	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.42	-0.21	-0.39	-0.24	-0.38
wind_ms_14d	0.49	-0.31	-0.31	0.49	-0.16	-0.09	-0.53	-0.44	-0.13	-0.39	-0.51	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.42	-0.21	-0.39	-0.24	-0.38
wind_ms_M	0.49	-0.31	-0.31	0.49	-0.16	-0.09	-0.53	-0.44	-0.13	-0.39	-0.51	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.42	-0.21	-0.39	-0.24	-0.38
rain_mm_d	0.49	-0.31	-0.31	0.49	-0.16	-0.09	-0.53	-0.44	-0.13	-0.39	-0.51	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.42	-0.21	-0.39	-0.24	-0.38
rain_mm14d	0.49	-0.31	-0.31	0.49	-0.16	-0.09	-0.53	-0.44	-0.13	-0.39	-0.51	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.42	-0.21	-0.39	-0.24	-0.38
rain_mm_M	0.49	-0.31	-0.31	0.49	-0.16	-0.09	-0.53	-0.44	-0.13	-0.39	-0.51	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.42	-0.21	-0.39	-0.24	-0.38
RH%_14h_d	0.49	-0.31	-0.31	0.49	-0.16	-0.09	-0.53	-0.44	-0.13	-0.39	-0.51	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.42	-0.21	-0.39	-0.24	-0.38
RH%_14h_14d	0.49	-0.31	-0.31	0.49	-0.16	-0.09	-0.53	-0.44	-0.13	-0.39	-0.51	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.42	-0.21	-0.39	-0.24	-0.38
RH%_14h_M	0.49	-0.31	-0.31	0.49	-0.16	-0.09	-0.53	-0.44	-0.13	-0.39	-0.51	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.42	-0.21	-0.39	-0.24	-0.38
T_14h_d	0.49	-0.31	-0.31	0.49	-0.16	-0.09	-0.53	-0.44	-0.13	-0.39	-0.51	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.42	-0.21	-0.39	-0.24	-0.38
T_14h_14d	0.49	-0.31	-0.31	0.49	-0.16	-0.09	-0.53	-0.44	-0.13	-0.39	-0.51	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.42	-0.21	-0.39	-0.24	-0.38
T_14h_M	0.49	-0.31	-0.31	0.49	-0.16	-0.09	-0.53	-0.44	-0.13	-0.39	-0.51	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.42	-0.21	-0.39	-0.24	-0.38
T_d	0.49	-0.31	-0.31	0.49	-0.16	-0.09	-0.53	-0.44	-0.13	-0.39	-0.51	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.42	-0.21	-0.39	-0.24	-0.38
T_14d	0.49	-0.31	-0.31	0.49	-0.16	-0.09	-0.53	-0.44	-0.13	-0.39	-0.51	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.42	-0.21	-0.39	-0.24	-0.38
T_M	0.49	-0.31	-0.31	0.49	-0.16	-0.09	-0.53	-0.44	-0.13	-0.39	-0.51	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.42	-0.21	-0.39	-0.24	-0.38
T_soil_20cm_d	0.49	-0.31	-0.31	0.49	-0.16	-0.09	-0.53	-0.44	-0.13	-0.39	-0.51	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.42	-0.21	-0.39	-0.24	-0.38
T_soil_20cm_14d	0.49	-0.31	-0.31	0.49	-0.16	-0.09	-0.53	-0.44	-0.13	-0.39	-0.51	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.42	-0.21	-0.39	-0.24	-0.38
T_soil_5cm_d	0.49	-0.31	-0.31	0.49	-0.16	-0.09	-0.53	-0.44	-0.13	-0.39	-0.51	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.42	-0.21	-0.39	-0.24	-0.38
T_soil_5cm_14d	0.49	-0.31	-0.31	0.49	-0.16	-0.09	-0.53	-0.44	-0.13	-0.39	-0.51	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.42	-0.21	-0.39	-0.24	-0.38
T_soil_sampling	0.49	-0.31	-0.31	0.49	-0.16	-0.09	-0.53	-0.44	-0.13	-0.39	-0.51	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.42	-0.21	-0.39	-0.24	-0.38
T_sampling	0.49	-0.31	-0.31	0.49	-0.16	-0.09	-0.53	-0.44	-0.13	-0.39	-0.51	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.44	-0.42	-0.21	-0.39	-0.24	-0.38

Getestete Parameter:

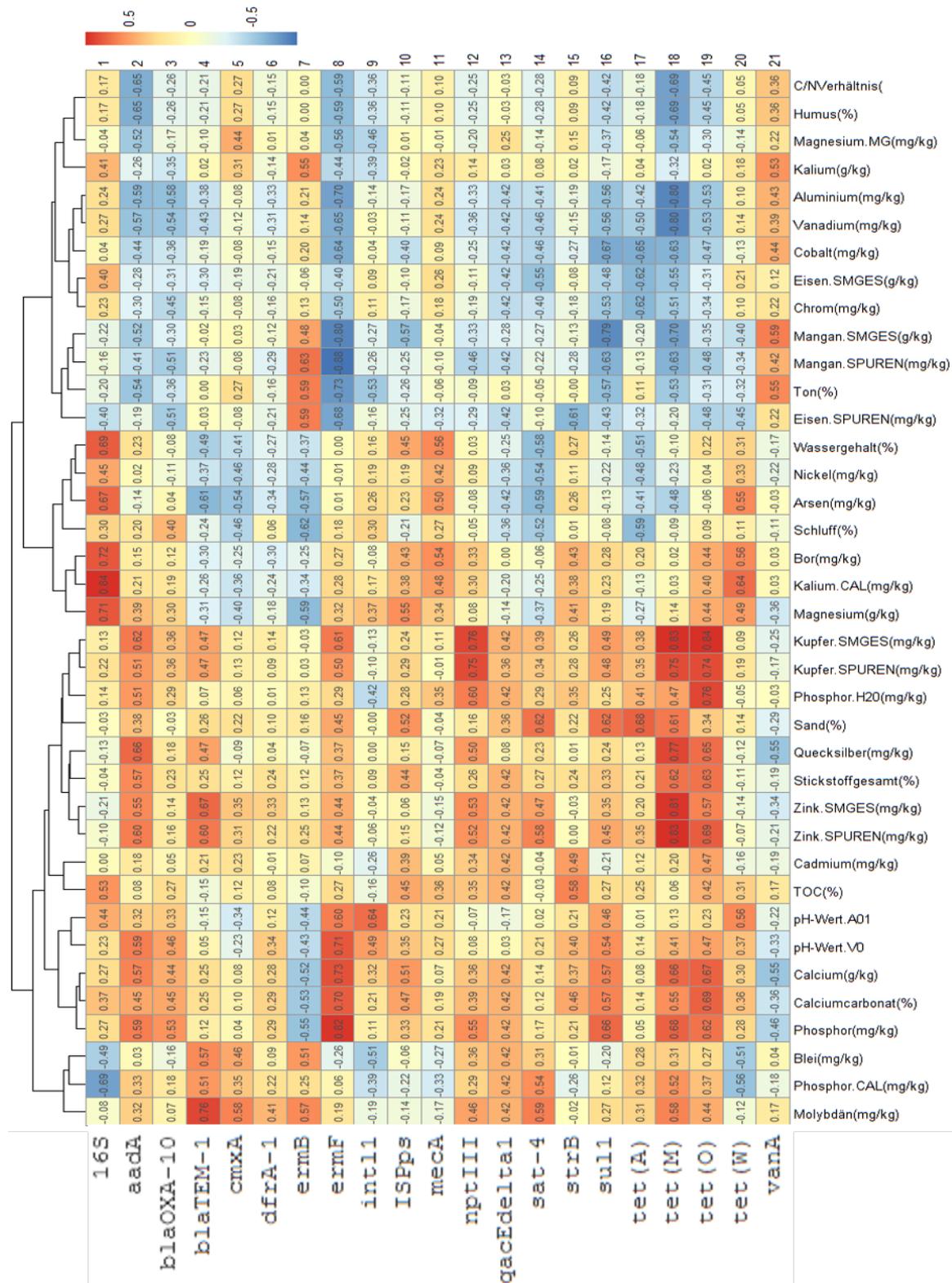
T_d: Temperatur-Tageswert am Bodenprobeentnahmetag; **T_14d**: Mittelwert der letzten 14 Tage vor Bodenprobenentnahme; **T_M**: Monatsmittelwert; **aPr_14h**: Luftdruck gemessen in hPa (hecto Pascal) um 14h; **wind_ms**: Windgeschwindigkeit (m/s); **rain_mm**: Niederschlag (mm); **RH%**: relative Luftfeuchtigkeit (%); **T_14**: Lufttemperatur gemessen in Grad Celsius um 14h; **T_sampling**: Lufttemperatur zum Probenentnahmezeitpunkt; **T_soil_20 cm**: Mittlere Bodentemperatur in 20 cm Tiefe; **T_soil_5 cm**: Mittlere Bodentemperatur in 5 cm Tiefe; **T_soil sampling**: Temperatur direkt zum Probenentnahmezeitpunkt gemessen

5.8.2 Korrelation der ARG-Konzentrationen mit Bodencharakterisierungsdaten (Selektionsdruck)

Die wichtigsten Bodenparameter (pH-Wert, Calciumcarbonat (%), Phosphor (mg/kg), Kalium (mg/kg), Magnesium (mg/kg), TOC(%), Humus (%), Stickstoff gesamt (%), C/N Verhältnis, Partikelgröße: Sand (%), Schluff (%), Ton (%), Eisen SPUREN (mg/kg), Mangan SPUREN (mg/kg), Kupfer SPUREN (mg/kg), Zink SPUREN (mg/kg), Bor (mg/kg), Arsen (mg/kg); Blei (mg/kg), Cadmium (mg/kg), Kobalt (mg/kg), Chrom (mg/kg), Kupfer SMGES (mg/kg), Nickel (mg/kg), Molybdän (mg/kg), Zink SMGES (mg/kg), Vanadium (mg/kg), Quecksilber (mg/kg), Phosphor (mg/kg), Aluminium (mg/kg), Calcium (g/kg), Kalium (g/kg), Magnesium (g/kg), Eisen SMGES (g/kg), Mangan SMGES (g/kg) und Wassergehalt (%)) wurden in mindestens einer repräsentativen Probe von jedem Standort untersucht. Auffallend waren die Quecksilberwerte. Diese waren in den HOAL Feldern niedriger als in allen anderen Böden. Bei den Proben aus dem Nationalpark Donau-Auen zeigte sich eine Zweiteilung mit höheren Werten an den Probepunkten 1-5 im Überschwemmungsgebiet und niedrigeren Werten an den Probepunkten 6-10 in weiter Entfernung von Ufer nördlich des Dammes.

Schaut man in Tabelle 51, mit welcher Bodenvariable es je Target die "stärkste" Spearman-Korrelation gibt, dann sind das am häufigsten (für jeweils 3 Targets) die Variablen „Mangan.SMGES(g/kg)“ und „Molybdän(mg/kg)“. Der Zusammenhang bei „Mangan.SMGES(g/kg)“ ist meist ein negativer (je höher desto niedriger die ARG-Konzentration), bei „Molybdän(mg/kg)“ ein positiver (je höher desto höher ist die ARG-Konzentration).

Tabelle 51. Spearman Korrelationskoeffizienten für alle detektierten ARGs und alle Bodenparameter.



SPUREN: pflanzenbioverfügbare Menge; SMGES: gesamte anorganisch vorhandene Menge.

Die stärksten positiven und negativen Korrelationen zwischen ARG-Konzentrationen und Bodenparameterwerten sind Tabelle 52 zu entnehmen.

Tabelle 52. Bodenparameter mit Auswirkung auf Resistenzgenkonzentrationen in Böden.

Resistenzgene	Spearman Rangkorrelation / Parameter	
	Positiv ($\geq 0,6$)	Negativ ($\leq -0,7$)
16S	Kalium, Bor , Magnesium, Arsen, Wassergehalt	
aadA	Quecksilber, Kupfer, Zink	
bla_{TEM-1}	Molybdän, Zink	
ermB	Mangan	
ermF	Molybdän, Phosphor, Calciumcarbonat, Calcium, pH, Kupfer	Ton, Mangan, Aluminium
intl1	pH-Wert	
nptIII	Kupfer, Phosphor	
sat-4	Sand	
sul1	Phosphor, Sand	Mangan
tet(A)	Sand	
tet(M)	Phosphor, Calcium, Zink, Stickstoff (ges), Kupfer, Quecksilber	Vanadium, Aluminium, Mangan
tet(O)	Phosphor, Calcium, Zink, Quecksilber, Stickstoff (ges), Kupfer, Phosphor	
tet(W)	Kalium	

Es sind nur jene ARGs gelistet, die die angeführten Schwellenwerte übersteigen.

5.8.3 Korrelation der ARG-Konzentrationen mit mikrobieller Biodiversität

Das Ergebnis ist in Kapitel 5.3.4 als Netzwerkanalyse dargestellt.

6 Modul 2: Erfassung potentieller ARG-Ausbreitungswege in einem HOAL-Schweinezuchtbetrieb

6.1 Überblick

Antibiotikaresistenzen gefährden die individuelle Gesundheit und stellen ein massives globales Problem für die Öffentliche Gesundheit dar. Schätzungen gehen davon aus, dass Antibiotikaresistenzen im Jahr 2050 weltweit bis zu 10 Millionen Todesopfer jährlich fordern werden, sollte die Ausbreitung von Resistenzen nicht eingedämmt werden können (79). Zahlreiche, gegenwärtig in der Therapie von Infektionskrankheiten problematische Resistenzgene stammen aus Umweltquellen wie Gewässer und Böden oder aus der Lebens- und Futtermittelkette (24). Agroökosysteme spielen daher eine Rolle bei der Ausbreitung - aber auch bei der Eindämmung - von Resistenzen. Das Problem muss im globalen Kontext von Mensch, Tier und Umwelt gemäß des One Health Konzeptes (Abbildung 121) behandelt werden (80).

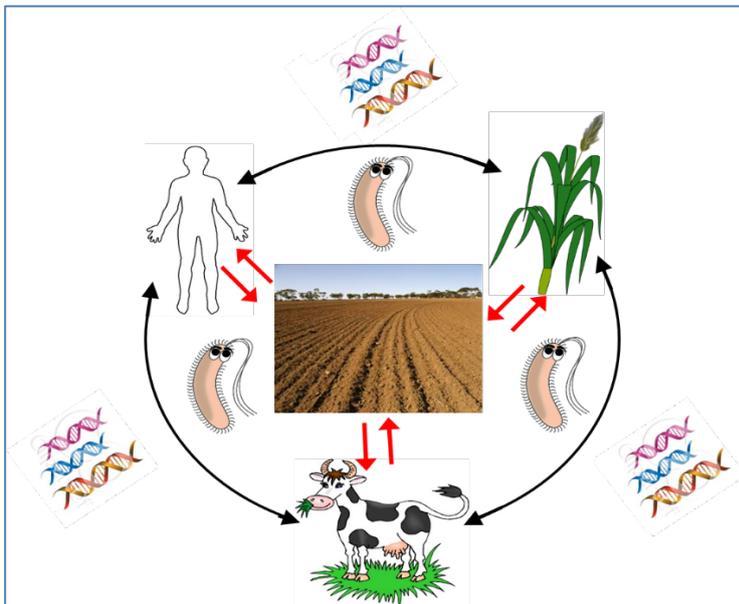


Abbildung 121. Ackerböden als Genaustauschplattformen im One Health-Konzept.

Antibiotikaresistenzgene als auch resistente Bakterien können bidirektional zwischen Mensch, Tier und Umwelt verbreitet werden. Ackerböden fungieren als Quelle, aber auch als Empfänger von ARGs und ARBs und bilden eine Kontaktzone für Umweltkeime und bakterielle Pathogene. Landwirtschaftlich genutzte Böden stehen unter starkem anthropogenen Einfluss durch die angewandten Bodenbearbeitungsmethoden. Der dadurch verursachte Selektionsdruck führt auch zu einer Erhöhung der horizontalen Gentransferrate (24).

6.2 Einleitung

Der Boden stellt ein nahezu unerschöpfliches Reservoir an natürlich vorkommenden Antibiotika-Resistenzgenen (ARG) dar (33). Gleichzeitig fungieren landwirtschaftlich genutzte Böden als Genaustauschplattformen, da über Ausscheidungen und pathogene und nicht-pathogene Bakterien aus dem Säugetierdarm mit Umweltbakterien (und vice versa) in Kontakt treten und Antibiotikaresistenzen neu kombiniert und bidirektional verbreitet werden können (20).

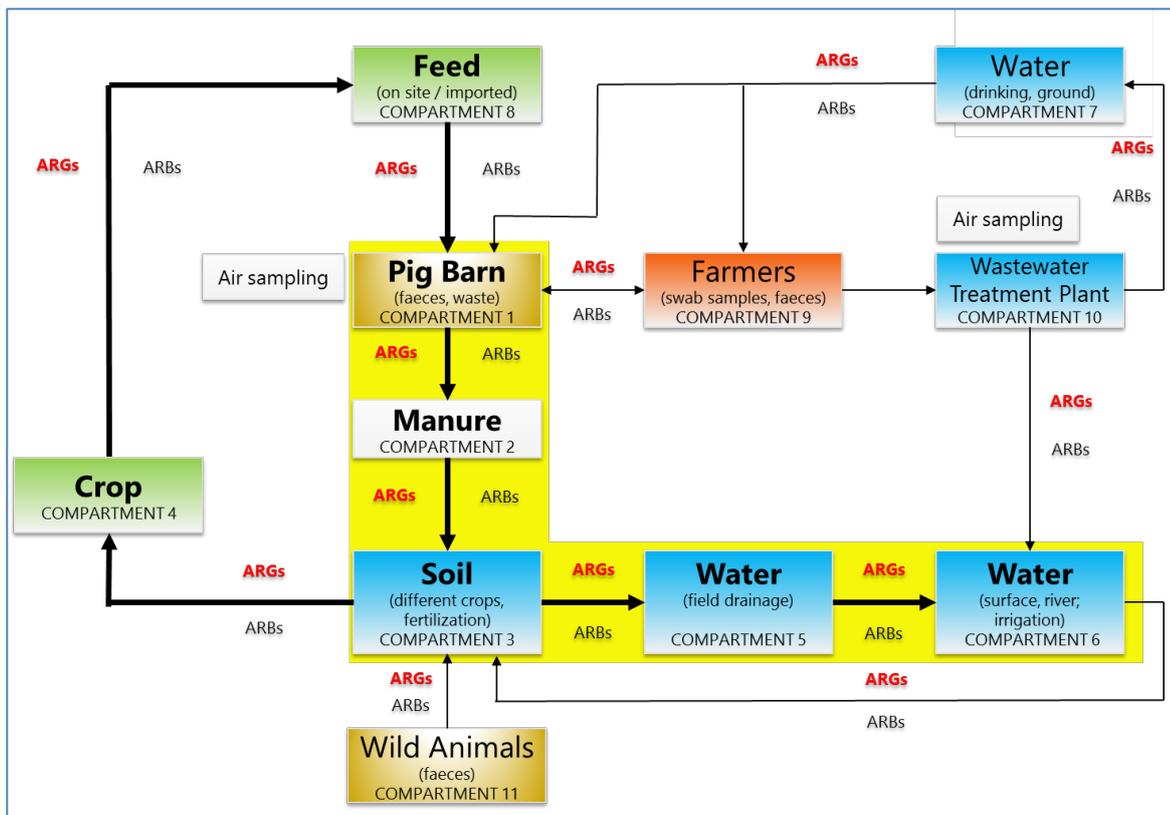


Abbildung 122. Ausbreitungswege von AR über Ökosystemgrenzen am Beispiel HOAL.

Für das vorliegende Projekt wurde die Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen vom Schweinedarm („Compartment 1“) über die Gülle („Compartment 2“) in den Ackerboden („Compartment 3“) und von dort ein Weitertransport in Drainage („Compartment 5“) und/oder Oberflächengewässer („Compartment 6“) im Hydrological Open Air Laboratory (HOAL) analysiert (gelb hinterlegt). Repräsentation des „One Health“ Konzeptes: Mensch (rot) – Tier (gold) – Umwelt (Böden, Wasser: blau; Pflanzen: grün); ARGs: Antibiotikaresistenzgene; ARB: antibiotikaresistente Bakterien.

In unberührter Natur und unter geringem anthropogenem Einfluss stehenden Gebieten ist die ARG-Konzentration gewöhnlich niedriger als in landwirtschaftlich genutzten Ökosystemen unter starkem Selektionsdruck (24). Die in der Landwirtschaft als organischer Dünger eingesetzte Gülle ist eine Quelle für antibiotikaresistente Bakterien, Resistenzgene, aber auch unter Umständen für Antibiotika, da diese von Säugetieren in hohem Maß in aktiver Form über Kot und Urin wieder ausgeschieden werden (39). Die global am häufigsten in Gülle-gedüngten Ackerböden anzutreffenden Antibiotika sind Tetracykline, Fluoroquinolone, Sulfonamide und Makrolide, wobei

das Kontaminationsprofil stark von regionalen Gegebenheiten abhängt und Mengen unter dem Detektionslimit bis zu Milligramm-Konzentrationen/kg Boden zu beobachten sind (81). Die österreichische Situation wird im Ergebnisteil kurz erläutert. Gülleapplikation verursacht gewöhnlich eine Erhöhung der Konzentration von Resistenzgenen in Böden (34, 43). Horizontaler Gentransfer vor allem unter Mitwirkung von mobilen genetischen Elementen führt zusätzlich zu einer Resistenzgenamplifikation in Bodenbakterienpopulationen (82).

6.3 Zielsetzung und Fragestellung

Die Ausbringung von Gülle führt typischerweise zum Anstieg der Konzentrationen einiger im Boden vorkommender Resistenzgene (45). Ein in engem zeitlichen Zusammenhang mit der Güllendüngung stehender Anstieg bei gewissen ARG-Bodenkonzentrationen kann als Surrogatmarker für einen Transfer von Resistenzen von Ökosystem A (= Gülle) in ein Ökosystem B (= güllegedüngtes Feld) – und damit für die Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen - dienen. Es ist von hohem Interesse, jene klinisch relevanten Resistenzgene zu ermitteln, deren Menge durch diese landwirtschaftliche Bearbeitungsmethode steigt, sowie zu überprüfen, ob es sich bei dem Anstieg um ein temporäres Phänomen oder um eine dauerhafte Veränderung im Bodenmikrobiom handelt, das zur Fixierung und Vermehrung von Antibiotikaresistenzgenen in den exponierten Bodenbakterienpopulationen führt.

Überdies wird versucht, als Nachweis einer Übertragung güllespezifische Bakterien und Pathogene in Bodenproben via 16S Illumina MiSeq Amplikon Sequenzierung zu detektieren. Folgende Fragestellungen werden behandelt: 1. Welche klinisch relevanten Resistenzgene werden über Ökosystemgrenzen übertragen? 2. Sind die bei gewissen ARGs im Boden induzierten Konzentrationsveränderungen permanent oder vorübergehend? 3. Sind Gülle-exponierte Felder anhand ihres Resistenzgenprofils zu erkennen?

6.4 Durchführung

Die Konzentrationsveränderungen von 24 klinisch relevanten Antibiotika-Resistenzgenen (Aminoglykoside: *ant(3'')-Ia/aadA*, *aph(3')-IIa/nptII*, *aph(3')-IIIa/nptIII*, *aph(6)-Id/strB*; β -Lactame: *bla_{CTX-M-1-15}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM-1}*, *bla_{OXA-10}*, *bla_{TEM-1}*, *mecA*; Phenicol: *cmxA*; Diaminopyrimidine: *dfrA1*; Makrolide: *ermB*, *ermF*; Polypeptide: *mcr-1*; Biozide: *qacEdelta1*; Fluorochinolone: *qnrS*; Nukleoside: *sat-4*; Sulfonamide: *sul1*; Tetrazykline: *tet(A)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(W)*; Glykopeptide: *vanA*, 2 mobile genetische Elemente (MGEs): *int11*, *ISPPs*) und dem 16S rRNA-Target wurden in drei mit Schweinegülle exponierten Feldern über eine Vegetationsperiode (ca. 1 Jahr) in definierten zeitlichen Abständen mittels TaqMan qPCR gemessen und mit den Werten aus Schweinekot und -gülle und

einem nicht gedüngten Feld-, einem Laub- und einem Nadelwaldboden verglichen. Die Studie fand im Hydrological Open Air Laboratory (HOAL; Petzenkirchen) statt (50) (Abbildung 123). Auf einem vor dem Projektstart mit Gülle exponierten Testfeld (F32) wurde Winterweizen, auf den anderen Testfeldern (F04, F31, F39) konventionell Mais angebaut. Die Gülle stammt von einem HOAL-Schweinezuchtbetrieb. Die Durchführung der 16S Amplikon Sequenzierungen wird im Kapitel 4.4 beschrieben.

Das Hydrological Open Air Laboratory (HOAL) (50) in Petzenkirchen, Niederösterreich, bietet österreichweit einzigartig die Möglichkeit, unter kontrollierten Bedingungen die Ausbreitung von ARGs aus dem Schweinedarm in die Gülle, von dort in den Ackerboden und eine eventuelle Ausschwemmung von Antibiotikaresistenzen in ein naheliegendes Oberflächengewässer (Bach/Drainage) zu dokumentieren (Abbildung 122). Kritische Kontrollpunkte, die eine Eindämmung der Resistenzgenausbreitung ermöglichen, werden aufgrund der im Testgelände anzutreffenden Ökosysteme (Tier/Tierkot-Gülle-Ackerboden-Oberflächengewässer) identifizierbar.



Abbildung 123. HOAL Testgelände (Foto aus (50); Blickrichtung nach Südosten).

Das Gelände wird in Richtung Waldgrenze entwässert (Bach).

Auf dem HOAL-Testgelände befinden sich eine Schweinezucht, mehrere Felder mit unterschiedlicher Fruchtfolge und organischer (Schweinegülle) oder Kunstdüngung. Das Areal wird in Richtung eines Baches entwässert. Zusätzlich stehen unbearbeitete Wiesen und Waldflächen zur Probenentnahme von Kontrollen zur Verfügung. Mehrere unterschiedliche Bodentypen machen das Gelände besonders attraktiv für die geplante Pilotstudie.

Im HOAL-Testgelände besteht somit die Möglichkeit, den Weg von Antibiotikaresistenzgenen aus anthropogener Quelle vom Tierdarm (Schweinefaeces) über die Düngung (Schweinegülle/-mist) in

den Boden sowie eventuelle Ausschwemmung via Entwässerung in ein nahegelegenes Oberflächengewässer über den Anbauzyklus eines Jahres hinweg zu verfolgen. Dies ermöglicht die Etablierung der im Jahresverlauf maximal zu erwartenden ARG-Konzentrationschwankungen inklusive Erfassung der Reaktion auf anthropogene Einwirkungen (Düngung, Bodenbearbeitung etc.).

6.5 Ergebnisse

6.5.1 Selektionsdruck – Antibiotikamengen

Unter den am häufigsten im Jahr 2020 in Österreich an Schweinezuchtbetriebe abgegebenen Antibiotika befanden sich (unter anderen, in absteigender Reihenfolge) Tetrazykline (14,6 Tonnen), Breitspektrum-Penicilline (4,3 Tonnen), Makrolide (1,6 Tonnen), Sulfonamide (1,3 Tonnen) und Polymyxine (ca. 1 Tonne) (83). Die in der HOAL-Schweinezucht tatsächlich applizierten Antibiotika und deren Mengen konnten für den Testzeitraum nicht eruiert werden. Repräsentativ ausgewählte HOAL-Boden-, Kot-, Gülle- und Wasser-Proben wurden daher auf Antibiotikarückstände getestet. Nur in Gülleproben konnte ein Fluorochinolon- (Marbofloxacin: 20,8 µg/kg) und ein Tetrazyklin-Derivat (Doxycyclin: 102,0 µg/kg) nachgewiesen werden. Eine im Jahr 2007 veröffentlichte Studie hat in österreichischen Gülleproben 46 mg/kg Chlortetrazyklin, 29 mg/kg Oxytetrazyklin, 23 mg/kg Tetrazyklin und 20 mg/kg Sulfamidine dokumentiert. Chlortetrazyklin, Enrofloxacin und Ciprofloxacin konnten in Bodenproben nachgewiesen werden (84). Im exponierten Boden wurden damals Maximalwerte von 0,81 mg/kg Chlortetrazyklin, 0,20 mg/kg Enrofloxacin und 0,37 mg/kg Ciprofloxacin ermittelt (85).

Außerdem wurde in einer HOAL Wasserprobe (MW-17) ein Sulfonamid (Sulfadimidin: < 0,001 µg/L) qualitativ detektiert, konnte aber nicht quantifiziert werden, da sich die Konzentration weit unter der Bestimmungsgrenze des Systems befand. Alle im HOAL ermittelten Antibiotika-Konzentrationen liegen unter klinisch relevanten minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) (86). Die beobachtete Menge an Marbofloxacin übersteigt die minimal selektive Konzentration (MSC), die für eine Ciprofloxacin/E. coli Kombination (46) ermittelt worden ist, um das ca. 180-Fache. Die ermittelte Doxycyclin-Konzentration übersteigt die MSC, die für eine Tetrazyklin/Salmonella Kombination (46) ermittelt worden ist, um das ca. 6-Fache. Der PNEC (predicted no effect concentration) - Level für Resistenzselektion beträgt für Doxycyclin 2 µg/L, für Ciprofloxacin 0,064 µg/L (87). Es ist daher möglich, dass beide beobachteten Substanzen in Konzentrationen in der Gülle vorliegen, die einen leichten Selektionsdruck ausüben und dadurch resistenten Stämmen einen Wachstumsvorteil bieten (88). Der PNEC-Wert für Sulfamethoxazol beträgt 16 µg/L (87). Die in der Wasserprobe gefundene Sulfonamid Menge dürfte somit mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht selektiv wirken. Schwermetallkonzentrationen als Surrogatmarker für potentiell mögliche Co-Selektion von ARGs in

Abwesenheit der korrespondierenden Antibiotika wurden in den HOAL-Bodenproben bestimmt. Keine Probe zeigte auffällig hohe Werte. Bei Quecksilber waren die HOAL-Ackerflächen unter denjenigen Proben, die am geringsten damit belastet waren.

6.5.2 ARG Profile in Schweinekot und Schweinegülle (TaqMan qPCR)

Die höchste Konzentration von allen in der Gülle getesteten Antibiotika-Resistenzgenen wies *tet(M)* (1,70E+09 Kopien/g) auf. Sie lag damit um ca. das 3500-fache höher als im Kot (Tabelle 53). *Tet(O)* lieferte die höchste Konzentration im Kot (1,10E+09 Kopien/g), wobei kein weiterer Anstieg in der Gülle zu verzeichnen war. Keine wesentliche Konzentrationsänderung konnte für das in hohen Konzentrationen vorliegende *tet(W)* zwischen Kot (8,40E+08 Kopien/g) und Gülle (5,20E+08 Kopien/g) beobachtet werden. Dies entspricht vorangegangenen Untersuchungen (45). Die HOAL-Schweinegülle war somit erwartungsgemäß am stärksten mit Tetrazyklin-Resistenzgenen belastet (83), gefolgt von den Aminoglykosid-Resistenzgenen *strB* (3,60E+08 Kopien/g) und *aadA* (2,20E+08 Kopien/g) sowie dem Diaminopyrimidin-Resistenzgen *dfrA-1* (1,50E+08 K/g) und der Makrolid-Resistenzdeterminante *ermF* (1,40E+08 K/g). Hohe Amplifikationsraten in der Gülle konnten bei *dfrA-1*, *strB* und *intI1* beobachtet werden (Tabelle 53). Am niedrigsten belastet war Kot mit dem mobilen genetischen Element *ISPPs* (9,50E+03 K/g) und Gülle mit der Penicillin-Resistenz *mecA* (9,60E+02 K/g). Sowohl in Gülle als auch in Kot waren *nptII*, *mcr-1* sowie die Beta-Laktamase-Gene *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM-1}* nicht nachweisbar. Nur in Kot konnten *vanA*, *bla_{OXA-10}* und *mecA* nicht detektiert werden (Tabelle 53).

Tabelle 53. ARG-Konzentrationen in HOAL-Kot- und Gülleproben (TaqMan qPCR).

No.	Target	Kot Kopien/g	Gülle Kopien/g	ARG-Konzentrationsanstieg in Gülle (x-fach)
1	16S	1,30E+10	2,50E+10	1,9
2	<i>intI1</i>	1,40E+04	2,90E+06	207,1
3	<i>ISPPs</i>	9,50E+03	2,50E+04	2,6
4	<i>qacEdelta1</i>	3,60E+05	3,10E+07	86,1
5	<i>aadA</i>	2,80E+06	2,20E+08	78,6
6	<i>aph(3')-IIa/nptII</i>	-	-	-
7	<i>aph(3')-IIIa/nptIII</i>	9,60E+06	4,40E+07	4,6
8	<i>strB</i>	6,10E+05	3,60E+08	590,2
9	<i>dfrA-1</i>	4,80E+04	1,50E+08	3125,0
10	<i>cmxA</i>	4,30E+05	1,00E+06	2,3
11	<i>qnrS</i>	1,90E+04	1,70E+04	0,9
12	<i>vanA</i>	-	1,30E+04	-
13	<i>ermB</i>	2,80E+06	3,70E+07	13,2
14	<i>ermF</i>	4,00E+07	1,40E+08	3,5
15	<i>sat-4</i>	9,50E+06	5,30E+07	5,6

No.	Target	Kot Kopien/g	Gülle Kopien/g	ARG-Konzentrationsanstieg in Gülle (x-fach)
16	<i>mcr-1</i>	-	-	-
17	<i>sul1</i>	4,50E+05	1,60E+07	35,6
18	<i>tet(A)</i>	1,00E+06	5,80E+06	5,8
19	<i>tet(M)</i>	4,90E+05	1,70E+09	3469,4
20	<i>tet(O)</i>	1,10E+09	1,00E+09	0,9
21	<i>tet(W)</i>	8,40E+08	5,20E+08	0,6
22	<i>bla_{OXA-10}</i>	-	4,30E+03	-
23	<i>bla_{TEM-1}</i>	1,30E+05	3,40E+05	2,6
24	<i>mecA</i>	-	9,60E+02	-
25	<i>bla_{CTX-M-15}</i>	-	-	-
26	<i>bla_{KPC}</i>	-	-	-
27	<i>bla_{NDM-1}</i>	-	-	-
	Minimum	9,50E+03	9,60E+02	0,6
	Maximum	1,10E+09	1,70E+09	3469,4
	Mittelwert	1,12E+08	2,04E+08	424,1
	Standardabweichung	3,16E+08	4,19E+08	1056,4
	Median	5,50E+05	3,10E+07	5,7

6.5.3 Zeitliche Veränderungen der ARG Profile im Boden nach Gülleapplikation

Wie Abbildung 125A zeigt, beträgt in der Gülle der relative Anteil von Tetrazyklin-Resistenzgenen an allen gemessenen Resistenzen mehr als 75%. Relativ am höchsten ist hier der Anteil an *tet(M)* gefolgt von *tet(O)* und *tet(W)* Resistenzdeterminanten. *Tet(A)* spielt in der Gülle keine wesentliche Rolle. Auffällig hohe Anteile weisen auch die Aminoglykosid-Resistenzen *strB* und *aadA*, gefolgt vom Makrolid-Resistenzgen *ermF* und dem Diaminopyrimidin-Inaktivator *dfrA-1* auf. Bemerkenswert ist der relativ geringe Anteil an *sul1* und *int1* Genen in der Gülle angesichts der massiven Erhöhung der Konzentration im Gülle-gedüngten Acker (Abbildung 124B). ErmF ist im nicht mit Gülle gedüngten Boden nicht detektierbar (Abbildung 125B). Auffällig ist überdies der hohe relative Anteil an mobilen genetischen Elementen (*int1*, *ISPs*) in dieser Probe (Abbildung 125B; F04).

Direkt nach der Gülleapplikation ist in der Bodenprobe eine starke relative Expansion der Tetrazyklino-gene zu beobachten, die im Wesentlichen auf einer Anreicherung von *tet(W)* und *tet(M)* im exponierten Boden beruht (Abbildung 124B). Überdies steigt der relative Anteil der Class 1-Integron-Integrase *int1* massiv an. Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass *int1* als Marker für durch den Menschen verursachte Umweltkontaminationen (z.B. durch Einbringung von mit ARGs belasteter Gülle) herangezogen werden kann (65). Ebenso steigt der Anteil an Sulfonamid *sul1*- als auch am Makrolid *ermB*-Resistenzgenen, wie in anderen Studien beobachtet werden konnte (45, 49).

ErmF war ausschließlich nach der Gülleapplikation detektierbar, verschwand aber kurz darauf wieder unter die Nachweisgrenze (Abbildung 31).

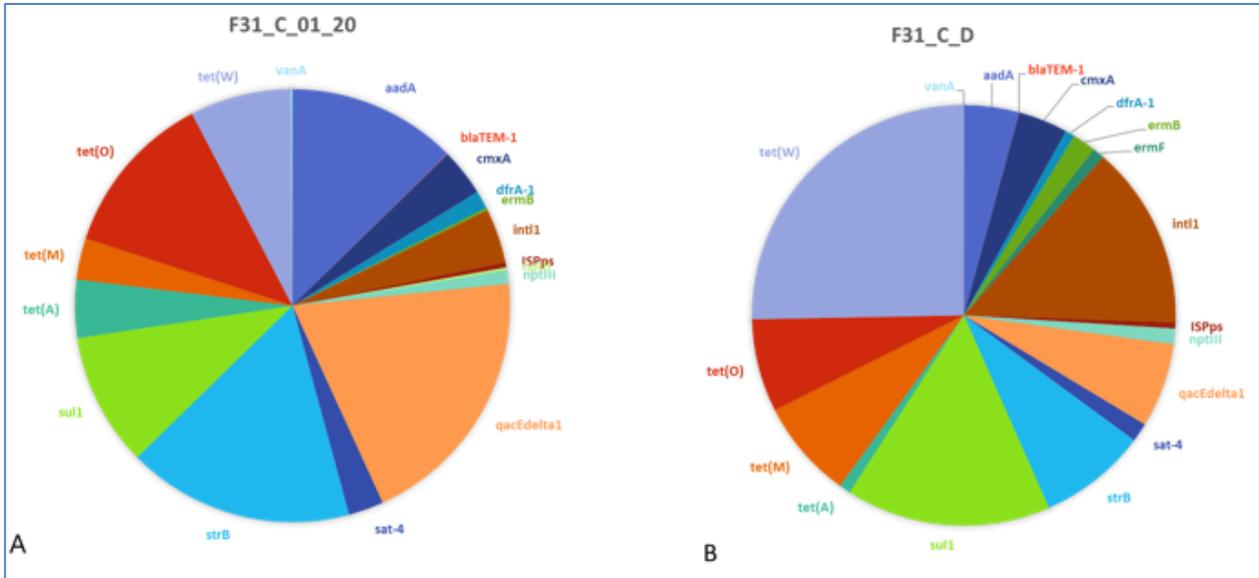


Abbildung 124. ARG-Mengenverteilung im HOAL-Ackerboden vor (A) und nach (B) Gülleapplikation.

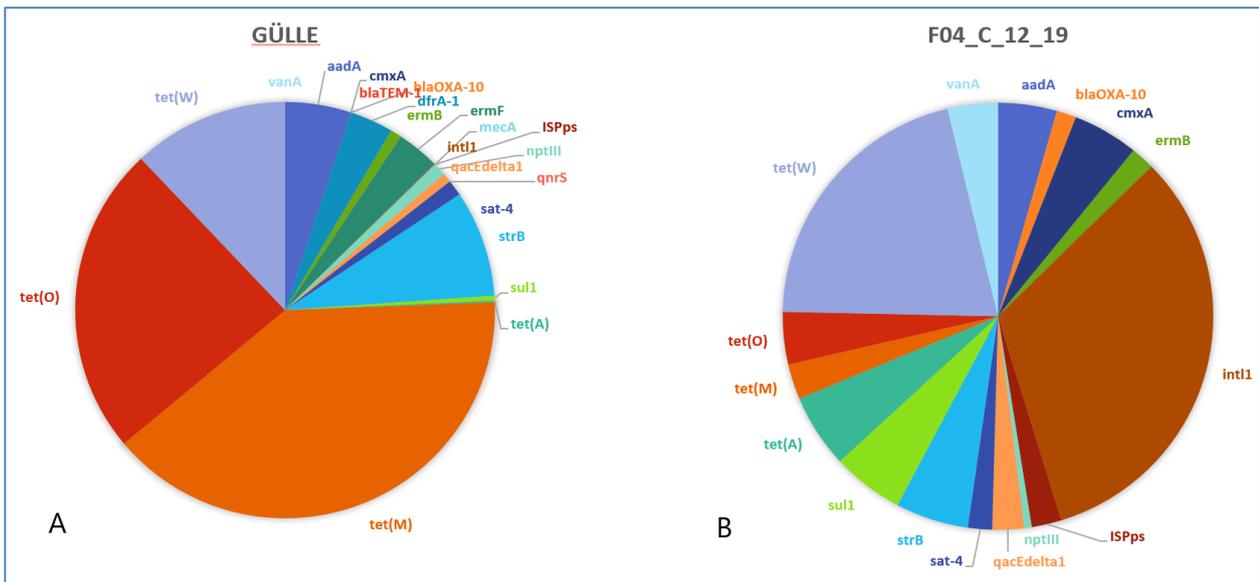


Abbildung 125. ARG-Mengenverteilung in Gülle (A) und einem nicht Gülle-gedüngten HOAL-Feld (B).

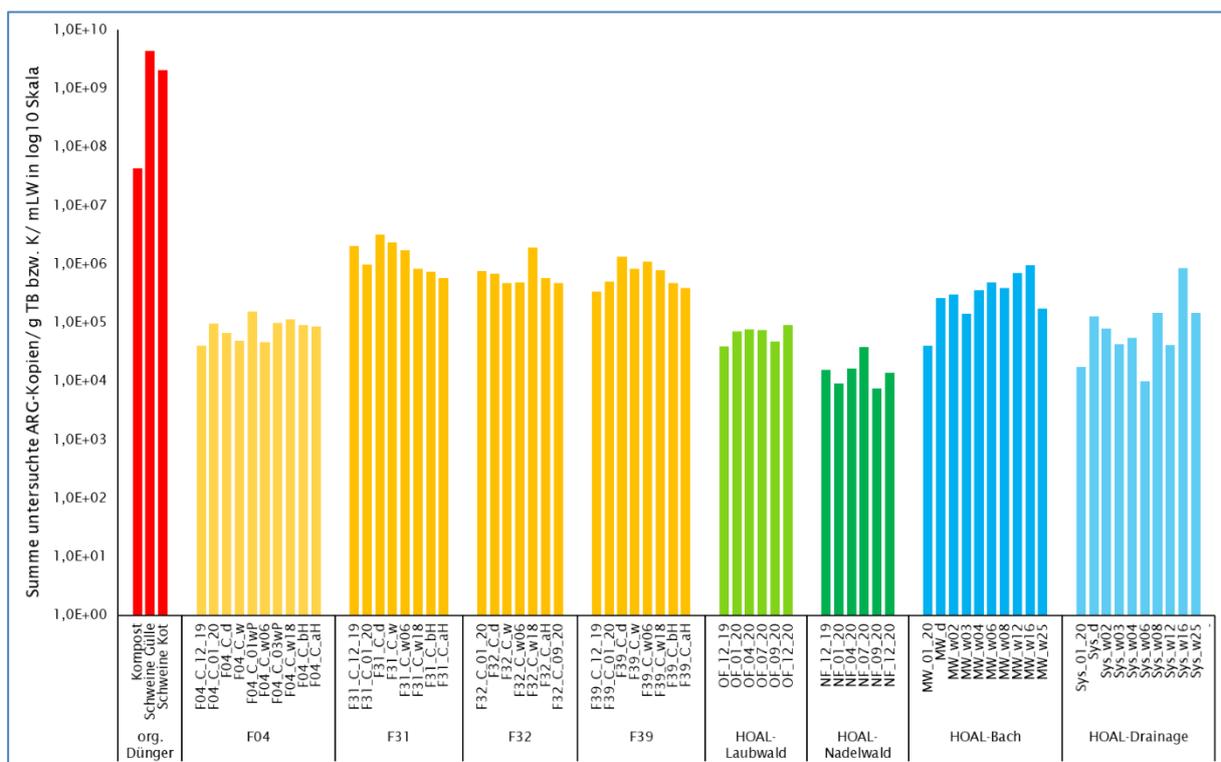


Abbildung 126. Gesamt-ARG-Konzentrationen in HOAL-Proben im Jahresverlauf.

Rot: Kompost, Gülle, Kot; Hellgelb: nicht-Gülle-gedüngtes Feld F04; Gelb: Gülle-gedüngte Ackerfelder F31, F32, F39; Hellgrün: Laubwald-Bodenproben; Dunkelgrün: Nadelwald-Bodenproben; Hell-Blau: Drainage-Wasser (Sys); Blau: Bachwasser (MW). TB: Trockengewicht Boden, mLW: Milliliter gefiltertes Wasser. Die absoluten ARG-Konzentrationen werden in einer logarithmischen Skalierung dargestellt.

Die absoluten Gesamtmengen aller 26, mittels TaqMan qPCR gemessenen ARGs und MGEs pro Bodenprobe sind in Abbildung 126 dargestellt. Gülle-induzierte ARG-Peaks (F31_C_d, F39_C_d) und ein darauffolgender Rückgang der ARG-Konzentrationen sind in den Gülle-gedüngten HOAL-Ackerproben (F31, F39) gut erkennbar (Abbildung 126). F32 wurde im Projektzeitraum nicht mit Gülle gedüngt, war jedoch in den vorangegangenen Jahren mit Schweinegülle exponiert. Keine signifikanten ARG Peaks sind in den Proben aus dem nicht mit Gülle gedüngten Feld (F04) zu erkennen. Die Gesamtbelastung mit ARGs ist hier deutlich geringer verglichen mit den kurz- oder langfristig mit Schweinegülle exponierten Feldern (F31-F39) und weist ähnliche ARG-Konzentrationen mit dem benachbarten HOAL Laubwald (OF) auf. Die niedrigste Gesamtbelastung mit ARGs zeigt die Analyse des HOAL-Nadelwalds (NF). Die im Jahresverlauf dokumentierten ARG-Gesamtkonzentrationen pro Probe in Drainage (Sys)- und Bachwasser (MW) zeigen ein uneinheitliches Bild und korrelieren nicht mit der Gülleapplikation in F31 und F39. Der hohe Wert bei F32_C_W18 könnte durch die kurz vor der Probenentnahme stattgefundenen Ernte des Winterweizens verursacht worden sein.

Folgende einzelne TaqMan qPCR Targets produzieren einen Gülle-induzierten Peak zeitnah (1 – 7 Tage) nach Ausbringung des organischen Düngers (siehe Kapitel 5.2.1): *intl1*, *qacEdelta1*, *aph(3')-IIIa/nptIII*, *strB*, *dfrA-1*, *cmxA*, *ermB*, *ermF*, *sat-4*, *sul1*, *tet(A)*, *tet(M)*, *tet(W)*. Diese Gene werden mit hoher Wahrscheinlichkeit via ARBs oder als freie DNA direkt ins Bodenökosystem übertragen. Dieser Anstieg verursacht jedoch keine permanente Erhöhung der entsprechenden Resistenzgenkonzentrationen, da sich die ARG-Menge im Verlauf der Vegetationsperiode im Ackerboden wieder reduzierte und sich am Ende des Beobachtungszeitraumes bei der zu Versuchsbeginn herrschenden Ausgangskonzentration einpendelte. Ackerböden dürften somit resilient gegenüber extern eingebrachte Antibiotikaresistenzen sein. Trotzdem sind Böden, die akut oder über einen längeren Zeitraum hinweg mit Gülle in Kontakt gekommen sind, eindeutig - im Vergleich zu nicht mit Gülle gedüngten Feldern, Nadel- und Laubwaldböden – klar zu identifizieren, da sie eine grundsätzlich höhere Hintergrundbelastung mit spezifischen Resistenzgenen zeigen (Abbildung 126 und Abbildung 88). Keine wesentlichen Konzentrationsveränderungen in Bodenproben konnten nach Gülleapplikation bei *ISPPs*, *aadA*, *vanA*, *mcr-1*, *tet(O)*, *bla_{OXA-10}*, *bla_{TEM-1}*, *mecA* beobachtet werden. Unter dem Detektionslimit befanden sich die Konzentrationen von *qnrS*, *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{KPC}* und *bla_{NDM-1}*.

6.5.4 Detektion von Gülle-assoziierten Bakteriengruppen in HOAL-Ökosystemen

Um abschätzen zu können, welche Bakterien als potentielle Träger für die untersuchten qPCR Resistenzgen-Targets dienen könnten, wurde bei repräsentativ ausgewählten HOAL-Proben die mikrobielle Biodiversität via 16S Amplikon Sequenzierung bestimmt (Kapitel 5.3). Die erhaltenen taxonomischen Daten wurden zusätzlich auf bakterielle Genera und Species gefiltert, die sowohl in Gülle-Proben und zeitnah in den Gülle-gedüngten Feldern F31 und F39 aufgetaucht sind, aber selten bzw. nicht in den Baseline-Proben vor Gülleapplikation zu finden waren. Diese Herangehensweise erlaubt die Identifikation von Bakteriengattungen, die mit einer hohen Wahrscheinlichkeit aus der Gülle in Boden- und/oder Wasserökosysteme übertragen worden sein könnten. Die so identifizierten Taxa wurden daraufhin auch im nicht-Gülle-gedüngten Feld F04, den HOAL-Laub- und Nadelwäldern sowie dem Bach- und Drainage-Wasser gesucht.

Die folgenden Heatmaps enthalten alle Genera und Spezies aus dem beschriebenen Abgleich (Abbildung 127).

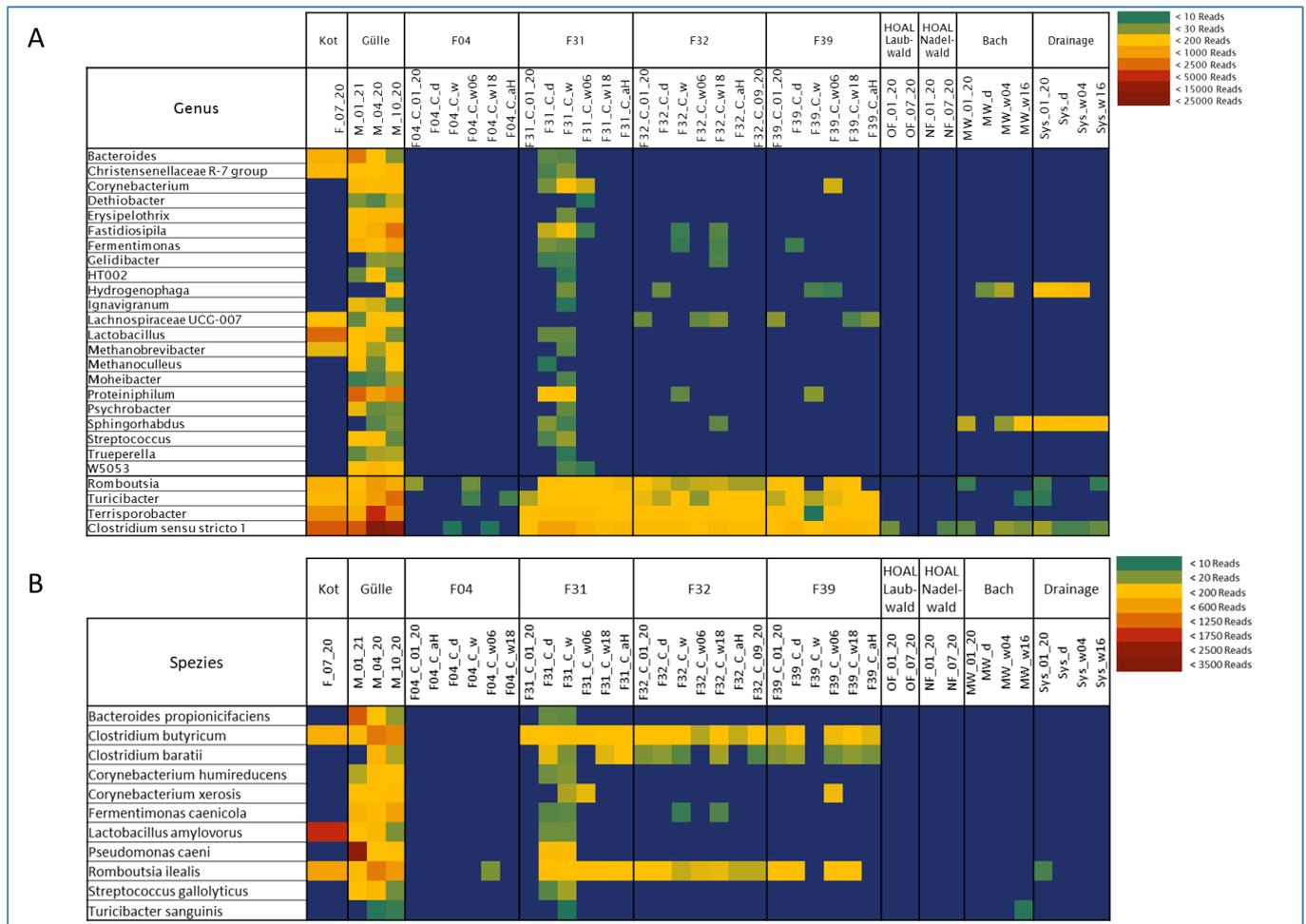


Abbildung 127. In HOAL-Gülle und Gülle-gedüngten Feldern vorkommende Genera und Spezies.

Die Häufigkeit der sequenzierten Reads wurde farblich dargestellt und ist der Farbskala zu entnehmen. In Dunkelblau werden die Proben dargestellt, bei welchen die entsprechenden Genera/Spezies nicht detektiert werden konnten.

Im Filterverfahren wurden 26 Genera und 11 Spezies identifiziert, die in mindestens einer Gülle-Probe und einer Gülle-gedüngten Feldprobe detektiert wurden. Die Abundanz der sequenzierten Reads ist farblich in der Heatmap dargestellt (Abbildung 127). Hierbei konnte man vor allem einen Tag und eine Woche nach der Gülle-Applikation am Feld F31 Reads detektieren, welche jedoch nach wenigen Wochen nicht mehr ermittelbar waren.

Von den 26 Genera zeigten 4 einen deutlichen Unterschied zwischen dem langjährig Gülle-freien Feld F04 und den langjährig Gülle-gedüngten Feldern F31, F32 und F39. Es handelte sich um die Gattungen *Clostridium sensu stricto 1*, *Terrisporobacter*, *Turicibacter* und *Romboutsia*. In F04 wurden sie selten

detektiert mit Read-Zahlen unter 30, in den Feldern F31, F32 und F39 wurden sie zu fast jedem Zeitpunkt mit mehr als 200 Reads detektiert. In der Schweinekot-Probe hatten diese 4 Genera hohe Read Counts. In den HOAL-Laub- und Nadelwäldern wurde lediglich *Clostridium sensu stricto 1* zu je einem Zeitpunkt mit weniger als 30 Reads identifiziert. In Wasserproben (Drainage und Bach) wurden *Romboutsia* und *Turicibacter* selten und *Clostridium sensu stricto 1* häufig mit geringen Read Counts detektiert.

Einen Tag und eine Woche nach der Gülledüngung des Feldes F31 wurde bei *Clostridium sensu stricto 1* eine zehnfach höhere Read-Anzahl detektiert. Dieser hohe Read Count ging nach einigen Monaten wieder zurück. Das Genus *Romboutsia* konnte in der Baseline-Probe F31 gar nicht detektiert werden, jedoch einen Tag nach der Gülledüngung bis zur letzten Beobachtungs-Probe gemessen werden mit Reads zwischen 55 (einen Tag nach der Düngung) bis 33 (nach der Ernte 9 Monate später).

Terrisporobacter wurde in der Netzwerk-Analyse (Kapitel 5.3.4) besonders mit den Resistenz-Genen *dfrA-1*, *nptIII*, *qacEdelta1* und *sat-4* positiv korreliert. Zusätzlich konnte eine Spearman-Korrelation ebenso zeigen, dass *Terrisporobacter* positiv mit den Genera *Clostridium sensu stricto 1* und *Turicibacter* korreliert, was durch das in der Heatmap dargestellte Ergebnis bestätigt wird. Diese Bakteriengattung kann somit das Risiko für die Ausbreitung von Diaminopyrimidin (*dfrA-1*), Aminoglykosid (*nptIII*), Biozide (*qacEdelta1*) und Streptothricin (*sat-4*) inaktivierende Antibiotika-Resistenzgenen in den Feldeböden erhöhen.

Dieselbe Prozedur wurde für den taxonomischen Rang „Spezies“ durchgeführt. Hierbei konnten nur 11 Spezies ermittelt werden, bei welchen es eine Assoziation zwischen Gülle und deren Applikation auf den Feldern geben könnte. Hierbei konnten vor allem die Spezies *Romboutsia ilealis* und *Clostridium butyricum* im Schweine Kot nachgewiesen werden mit einer Read-Erhöhung in den Gülle-Proben und Read-Detektion in den drei Langzeit-Gülle-gedüngten Feldern. *Romboutsia ilealis* konnte nur einmal in der Drainage-Probe Sys_01_20 mit weniger als 10 Reads nachgewiesen werden. Die restlichen 9 Spezies konnten nur im Ackerfeld F31 einen Tag und eine Woche nach der Gülledüngung detektiert werden. Hierbei konnten vor allem *Pseudomonas caeni* und *Clostridium baratii* angereichert werden, wobei es zu einem Signal-Ausfall wenige Woche nach dem Düngungs-Event gab.

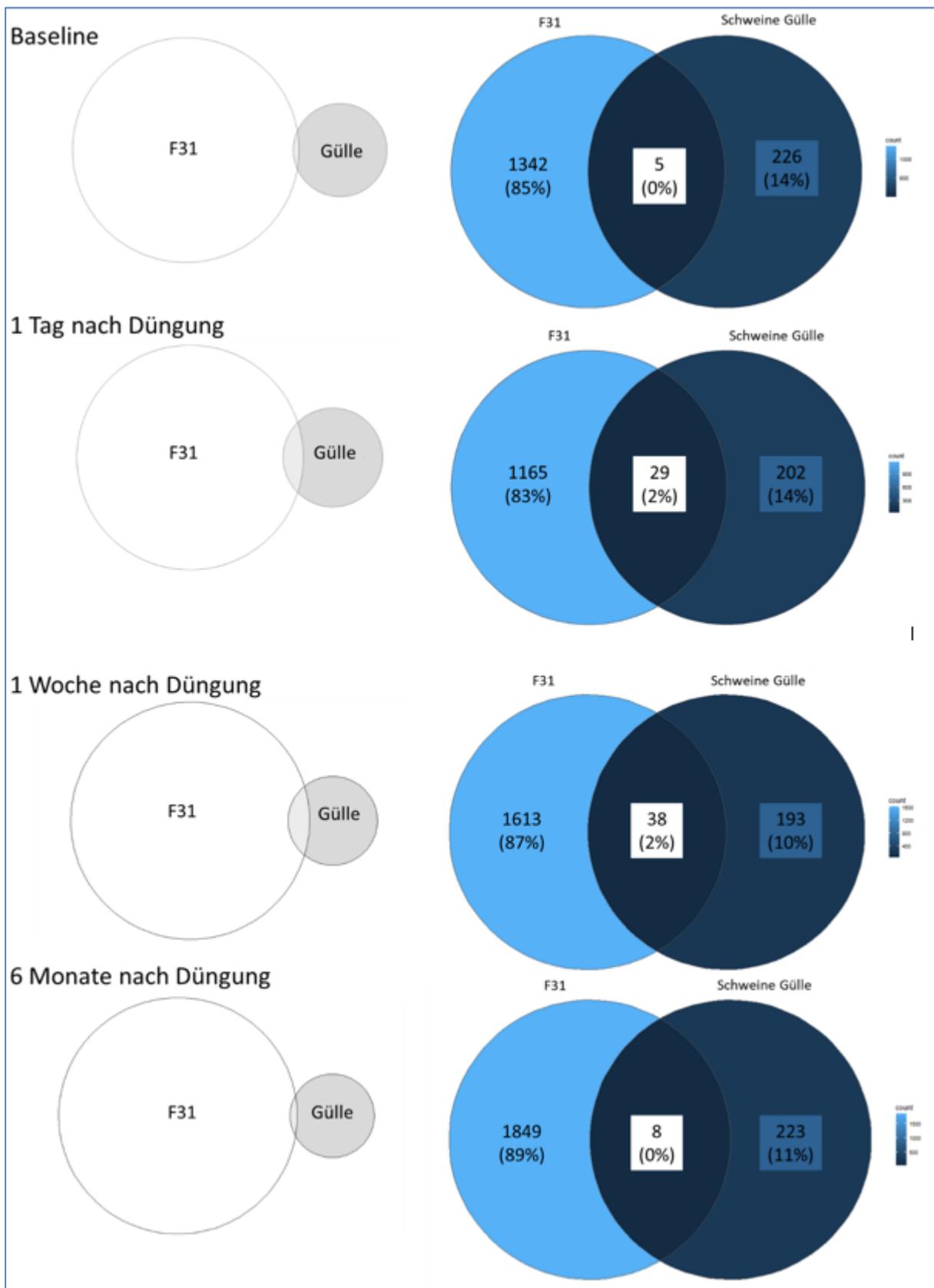


Abbildung 128. Bakterientaxa (ASVs) - Vergleich des Feldes F31 mit der Schweinegülle. Die Zeitpunkte vor (Baseline) sowie ein Tag, 1 Woche und 6 Monate nach Gülle-Applikation wurden analysiert. Prozentwerte sind abgerundet.

Die Übertragung von Bakteriengruppen aus der Gülle in den exponierten Boden wird in Abbildung 128 illustriert. Man erkennt, dass sich vor der Güllendüngung („Baseline“) Boden- und Gülle-Mikrobiota kaum gemeinsame Bakterientaxa teilen (5 ASVs = 0,3 % Gesamtanteil). Nach Güllendüngung steigt der Anteil an in beiden Ökosystemen gemeinsam vorkommenden Bakterientaxa auf 29.

Da der Anstieg zeitnah nach Exposition erfolgt und der Anteil an gemeinsamen Taxa im Verlauf der Vegetationsperiode wieder zurückgeht (Abbildung 127A; F31) ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass tatsächlich ein Transfer von Bakteriengruppen von der Gülle in den Boden stattgefunden hat.

Aus den insgesamt 26 mit Gülle-assoziierten Genera konnten vier identifiziert werden, welche durchgängig stark in den Kompartimenten Schweinekot – Schweinegülle und in den gedüngten Ackerböden vertreten waren. Das Kompartiment Wasser schien nicht von der Güllendüngung der Felder betroffen zu sein.

Aus diesen vier Genera konnte *Terrisporobacter* als das Bakterium mit dem höchsten ARG-Verbreitungspotential ermittelt werden, da es mit den Resistenzgenen *dfrA-1*, *nptIII*, *qacEdelta1* und *sat-4* positiv korreliert vorkommt und somit eine potentielle Ausbreitungsquelle – auch durch horizontalen Gentransfer - darstellen kann.

6.6 Diskussion

Relative ARG-Konzentrationen im Bereich zwischen 10^{-9} und 10^{-1} sind im güllgedüngten Ackerboden von verschiedenen Arbeitsgruppen dokumentiert worden (34). Sie variieren stark für unterschiedliche ARG-Klassen (36). Die in den mit Gülle exponierten HOAL-Feldern anzutreffenden relativen ARG-Konzentrationen bewegen sich zwischen 10^{-6} und 10^{-3} (Kapitel 5.1.1). Heuer et al. haben gezeigt, dass Gülle-assoziierte ARGs in exponierte Böden übertragen werden können (43, 44). Eingebachte und autochthone antibiotikaresistente Bakterien und Resistenzgene können von Nutzpflanzen aus dem Boden oder über die Phyllosphäre aufgenommen und über die Lebens- und Futtermittelkette mit dem Mikrobiom von Menschen und Tieren und den entsprechenden pathogenen Keimen in Kontakt gebracht werden (89, 90). Der Eintrag von großen Mengen an fremden Bakterien führt zumindest vorübergehend zu ARG-Konzentrationspeaks im Boden, die jedoch wieder zurückgehen (47) und zu Perturbationen in der Zusammensetzung der Bakterienpopulationen im Boden und der exponierten Vegetation (57, 91). Obwohl mehrere Studien zeigen, dass sich ARGs durch wiederholte Gülleapplikationen im Boden anreichern können (20, 47, 92-94) scheint der Boden jedoch eine initiale Resilienz gegen bakterielle Invasoren zu haben (45, 94).

Folgende Parameter haben laut einer kürzlich veröffentlichten Metastudie einen Einfluss auf die durch Gülleapplikation induzierten Veränderungen im Bodenresistom (49): Gülleart (unbehandelt oder kompostiert), -typ (Schwein, Rind, Geflügel etc.) -ausbringungsrate und

Gesamtexpositionsdauer des Feldes, Art der Feldfrucht, des Anbausystems; Bodentyp, –textur, und -pH-Wert; klimatische Faktoren wie mittlere jährliche Niederschlagsmenge und Lufttemperatur, aber auch Selektionsdruck durch Antibiotika und Schwermetall-Kontaminationen. Die Metastudie (49) dokumentiert, dass global betrachtet Gülleapplikation in den analysierten Studien zu einer durchschnittlichen ARG-Konzentrationserhöhung im Boden von 591% geführt hat. Sulfonamid-Resistenzgene zeigten den stärksten Anstieg (1121%), gefolgt von Aminoglykosid- (852%) und Tetracyclin-Resistenzgenen (763%). Die MGE-Menge stieg um durchschnittlich 351%. Im HOAL kommt es in Gülle-gedüngten Feldern zu einem ca. 11-fachen Anstieg des Sulfonamid-Resistenzgens *su1* im Vergleich zur Baseline (Kapitel 5.1.1). Die getesteten Aminoglykosid-Resistenzgene steigen um ca. das 10-fache an, während die Tetracyclin-Resistenzen sich um das 14 – 20-fache erhöhen. Die Konzentration des Makrolid-Resistenzgens *ermB* steigt um das 50-fache über die Baseline, *ermF* kann nur kurzfristig nach Gülle-Applikation in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden und verschwindet unter die Nachweisgrenze, während sich die Menge an *dfrA-1* um das 78-fache erhöht.

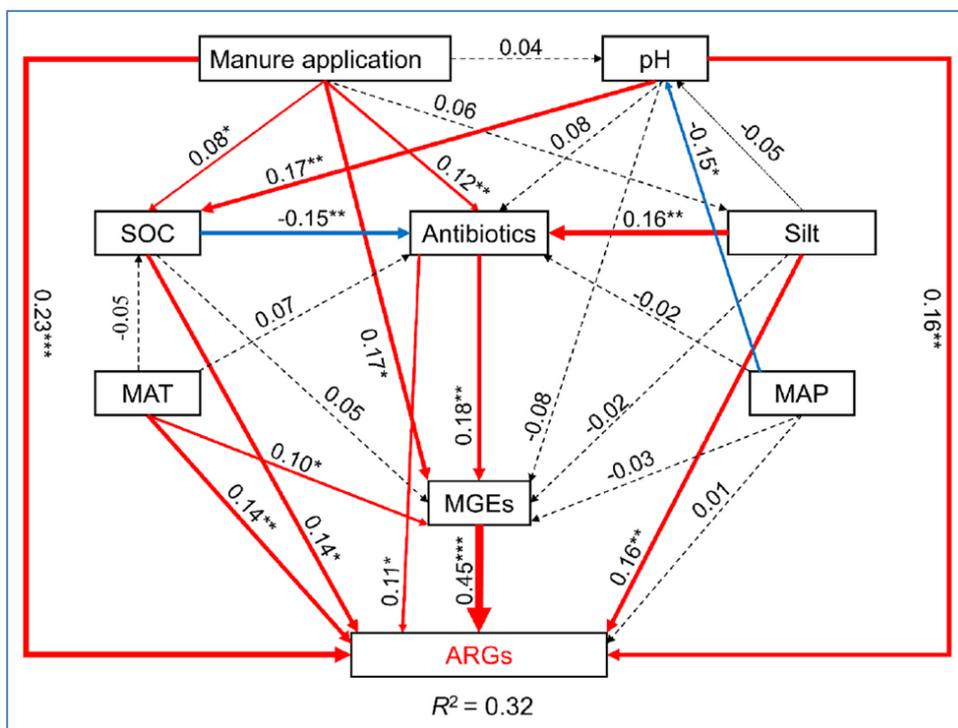


Abbildung 129. Treiber ARG-Konzentrationen in Gülle-gedüngten Böden.

Abbildung aus (49). Darstellung der wesentlichen Parameter mit Einfluss auf Antibiotikaresistenzgenkonzentrationen in Ackerböden. Die Stärke der Pfeile (rot: positiver Effekt; blau: negativer Effekt) entspricht der Effektstärke. Punktierter Pfeile zeigen nicht-signifikante Interaktionen. Die Zahlenwerte über den Pfeilen sind die im Strukturgleichungsmodell errechneten Weg-Koeffizienten. R^2 bezeichnet den erklärten Anteil der Varianz. Signifikanzlevels: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Der Anteil an organischem Kohlenstoff im Boden (SOC) korreliert in der Metastudie (49) negativ, der Schluff-Gehalt positiv mit Antibiotika-Konzentrationen (Abbildung 129). Die Resistenzgenhäufigkeiten korrelieren positiv mit Schluff-Gehalt, Antibiotika-Konzentrationen, der mittleren Jahrestemperatur, SOC, MGEs und dem pH-Wert. Diese Faktoren dürften das ARG Profil in Gülle-gedüngten Böden maßgeblich bestimmen (49).

In den HOAL-Bodenproben konnten keine Antibiotika detektiert werden. Die meisten der getesteten Antibiotika-Resistenzgenkonzentrationen im HOAL korrelieren mit dem SOC im Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman schwach positiv ($\leq 0,6$), ebenso mit dem Schluffgehalt ($\leq 0,4$) und dem pH-Wert ($\leq 0,7$) (Tabelle 51). Nur *ermF* korreliert positiv (0,6) mit der mittleren Monatstemperatur. Alle anderen Resistenzdeterminanten zeigen kaum eine positive Korrelation mit der Temperatur (siehe Tabelle 50).

Tabelle 54. Parameter, die ARG-Mengen im Gülle-gedüngten Boden beeinflussen.

Tabelle modifiziert nach(49).

Treiber	Effekt auf ARG-Konzentrationen in Gülle-gedüngten Böden	Weg-Koeffizient	Signifikanz-niveau P
MGEs (mobile genetische Elemente)	stark positiv	0,45	<0,001
Gülleausbringung	stark positiv	0,23	<0,001
pH	positiv	0,16	<0,01
Schluff	positiv	0,16	<0,01
MAT (mittlere Jahrestemperatur)	positiv	0,14	<0,01
SOC (Organischer Kohlenstoffgehalt im Boden)	positiv	0,14	<0,05
Antibiotika	positiv	0,11	<0,05
MAP (mittlere jährliche Regenmenge)	minimal positiv	0,01	-

Interessanterweise scheint die Anwesenheit von Antibiotika nicht der ausschlaggebende Parameter für hohe ARG-Konzentrationen in Gülle-exponierten Böden zu sein (Tabelle 54). Einen viel stärkeren und hoch-signifikanten Effekt zeigen in der Metastudie die Anwesenheit von MGEs und die Gülleausbringung an sich zu haben. Eine weniger prononcierte Wirkung auf Resistenzgenkonzentrationen scheint der Boden-pH Wert und die Bodenstruktur (Schluff) aufzuweisen. Ebenso stellen die mittlere Jahrestemperatur und der Anteil an organischem Kohlenstoff im Boden in dieser globalen Analyse einen stärkeren Treiber für Resistenzgene dar als Antibiotika (Tabelle 54).

Unter den in der Tabelle 54 dargestellten Parametern befinden sich somit einige, deren Veränderung eine stärkere Wirkung auf Resistenzgenkonzentrationen zeigen könnte, als im Vergleich dazu eine Senkung des Antibiotika-Einsatzes bewirken würde (49). Die Ausbringung von mit Antibiotika verunreinigter Gülle steigert vor allem in Entwicklungsländern die Konzentration von ARGs im Boden signifikant, weil dort mehr und unkontrollierter Antibiotika in der Tierzucht verwendet werden (49).

Von einer Reduzierung der Abhängigkeit vom Einsatz von Antibiotika zur Bekämpfung von Infektionen und von verbesserten AMR Überwachungssystemen könnten vor allem Landwirte in diesen Teilen der Welt profitieren (95). Gülle-Kompostierung könnte in gewissen Fällen zu einer Reduzierung der Belastung mit Antibiotika und Antibiotika-resistenten Bakterien führen (96), trotzdem werden mit dieser Methode nicht alle Antibiotika und ARGs aus der Gülle entfernt. Literaturdaten zeigen, dass ARG-Konzentrationen im Boden sukzessive anstiegen, je mehr Gülle (> 10 Tonnen/Jahr/Feld) und je länger die Gülledüngung pro Feld angewendet wurde (49). Das deutet darauf hin, dass durch eine Reduktion der Gesamtgüllemenge und durch Anwendung eines Rotationssystems, bei dem Felder nicht jedes Jahr mit Gülle gedüngt werden, die ARG-Belastung reduziert werden könnte (49). Warum einzelne Resistenzgen-Typen sich jedoch besonders stark in Gülle-exponierten Böden anreichern, andere ARGs aber nicht, ist gegenwärtig noch nicht schlüssig verstanden. Als besonderes Problemfeld kristallisiert sich die hochintensive Landwirtschaft in Glashäusern unter künstlicher Bewässerung mit geklärtem Abwasser und/oder Gülle-Fertilisation heraus, wobei vor allem die Gemüse-Produktion besonders stark mit ARGs belastet wird und damit eine besondere Gefahrenquelle für die Verbreitung von Resistenzen darstellt (97, 98). Gleichzeitig erweisen sich die ARG-Abbauraten im Glashaus relativ zum offenen Feld ebenfalls als niedriger (99).

6.7 Beobachtungen und Schlussfolgerungen

1. Die im HOAL landwirtschaftlich genutzten Böden zeigen Resilienz gegenüber durch Gülledüngung eingebrachte Antibiotikaresistenzen: Nach initialem Anstieg sinken im Verlauf der Anbauperiode die ARG-Konzentrationen wieder auf das Ausgangsniveau vor Gülledüngung. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Literaturdaten (45, 100).
2. Ein güllebedingter Anstieg ist nicht bei allen getesteten ARGs im HOAL-Boden zu erkennen (45, 100).
3. Klar erkennbar anhand ihrer erhöhten ARG Hintergrundrate sind alle HOAL-Felder, die über einen längeren Zeitraum mit Gülle gedüngt wurden. Auch wenn im Testzeitraum akut keine Gülledüngung durchgeführt worden ist, ist die ARG Belastung dieses Feldes (F32) vergleichbar mit den akut güllegedüngten Feldern (F31, F39) mit Ausnahme der Gülle-induzierten Maximalwerte (Peaks). Diese Beobachtungen sind in der Literatur dokumentiert (49, 91).
4. Eine Übertragung von Resistenzgenen aus der Gülle in den Boden konnte im HOAL-Testgelände nachgewiesen werden. Diese Beobachtung steht in Einklang mit Daten aus der rezenten Literatur (49, 101). Ebenso war der Transfer von Bakteriengenera mit Primärhabitat Säugetierdarm (z.B. Clostridium) und die Anwesenheit von bakteriellen Pathogenen in HOAL-Böden beobachtbar. Ähnliche Beobachtungen wurden von anderen Autoren gemacht (100).

5. Eine Ausschwemmung von Gülle-assoziierten Resistenzen in zeitlichem Kontext aus Gülle-exponierten Feldern in Drainage und Bachwasser konnte im vorgegebenen HOAL-Setting nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden.
6. Die Analyse der taxonomischen Zusammensetzung der bakteriellen Mikroflora deutet darauf hin, dass auch gewisse bakterielle Taxa aus der Gülle in den exponierten HOAL-Boden übertragen wurden. Eine Überschreitung von mehreren Ökosystemgrenzen (Kot – Gülle – Boden) durch potentiell Resistenzgen-tragende, aus dem Säugetierdarm stammende Bakterien ist somit nicht auszuschließen. Die Einbringung von Gülle-assoziierten Bakterien kann die Zusammensetzung der vorhandenen Bodenbakterienpopulation massiv verändern und damit auch die ARG-Belastung modulieren (57, 91).
7. Gülle-Applikation führt oft zu einem vorübergehenden ARG-Anstieg im Bodenresistom, der wieder abnimmt. Dabei dürfte es sich um ein kritisches Zeitfenster handeln, in dem es bevorzugt zur Übertragung von exogenen ARGs auf Bakterien in den entsprechenden ökologischen Nischen kommt (47, 48).
8. Wichtiger dürfte die Langzeit- und wiederholte Applikation von Gülle sein, da dadurch höhere ARG-Levels im Boden dauerhaft hochgehalten werden (34).
9. Multiresistente Bakterien, deren ARGs in der Gülle angereichert worden sind, können durch konkurrierende Bakterien im Boden ausgelöscht werden (47). Andere ARG können durch HGT auf Bodenbakterien weiter existieren (43, 102).
10. Es gibt im Wesentlichen 3 Möglichkeiten wie Gülle-Applikation ARGs im Boden anreichern kann: a) die Anzahl von natürlich im Boden vorkommenden Bakterien, die Träger von intrinsischen ARGs sind, erhöht sich durch den Eintrag von Nährstoffen; b) Resistenzgene werden durch das Überleben von Trägerbakterien aus der Gülle oder durch HGT auf Bodenbakterien im Bodenmikrobiom vermehrt (34); c) Selektion und Anreicherung intrinsisch in Bodenmikroorganismen vorkommender oder durch Mutation neu entstandener Resistenzen durch über die Gülle eingebrachte Antibiotika (46). Eine Identifikation jener ARGs, die über die Gülle neu eingebracht, und jener, die durch Amplifikation bereits intrinsisch im Boden vorhanden sind und durch Selektion vermehrt werden, ist wichtig. Sie bilden in Bezug auf Resistenzvermittlung, Potential zur ARG-Verbreitung via HGT und der Verursachungswahrscheinlichkeit von resistenten Infektionen unterschiedliche Risikoklassen (34).
11. Während der Güllelagerung im HOAL werden einige Resistenzdeterminanten, die im Kot kaum nachweisbar waren, massiv amplifiziert (beobachteter Faktor im HOAL: bis zu 3500-

fach). Andere Resistenzgene zeigen wiederum nach Güllelagerung keine wesentlichen Konzentrationsänderungen im Vergleich zur detektierten Initialmenge im Schweinekot (45).

12. Unterschiedliche DNA-Aufreinigungskits können zu unterschiedlichen DNA-Ausbeuten und damit zu einem Bias bei den detektierten ARG-Mengen führen. Die tatsächlich in Bodenproben vorhandenen ARG-Konzentrationen könnten unterschätzt werden (49).
13. Abwasser und Gülle sind die wichtigsten Quellen für fäkale Kontaminationen in der Umwelt (23).
14. Das Risiko für eine Mobilisierung und Anreicherung neuer ARGs in einem Ökosystem ist proportional zum dort herrschenden Selektionsdruck (82).
15. Das Übertragungsrisiko für ARGs auf Pathogene ist dort erhöht, wo mit einer erhöhten die Anwesenheit von Fäkalbakterien erhöht ist.
16. Der Boden ist ein Reservoir für natürlich vorkommende Antibiotika und Antibiotikaresistenzgene (34).
17. Die eingesetzten Bodenbearbeitungsmethoden haben eine massive Auswirkung auf die Zusammensetzung der Bodenbakterienpopulation und der entsprechenden Resistenzprofile im Boden (49). Ebenso spielen Bodentypen (36) sowie der Bewuchs eine Rolle, da das Rhizom die Zusammensetzung der Bodenbakterienpopulationen prägt (37, 38).
18. Von zentraler Bedeutung ist die Information über die Zusammensetzung der mikrobiellen Populationen im Boden (103), da Bakterien ARG-Träger sind und somit wesentlich lokale ARG Profile und somit das Bodenresistom bestimmen (57, 91).
19. Das Bodenresistom wird entweder durch die Einbringung neuer Resistenzen oder durch die Erhöhung der Häufigkeiten der bereits vorhandenen ARGs über die Gülle-Applikation moduliert (57, 104).
20. Geringe Antibiotika-Konzentrationen können resistente Bakterien selektieren. In vielen natürlichen Ökosystemen spielen sub-inhibitorische Antibiotika-Konzentrationen eine wichtige Rolle bei der Erhaltung und Anreicherung von AMR in der Umwelt (102, 105).
21. Bodenbakterien sind nicht nur eine wichtige Quelle für Antibiotika, sondern auch Träger von natürlich vorkommenden Resistenzgenen (35).

22. Antibiotika-resistente Bakterien findet man in unberührten Gebieten, die kaum oder nicht unter anthropogenem Einfluss stehen, was darauf hinweist, dass es sich bei AMR um ein evolutionär altes Phänomen handelt, das nicht erst durch den massiven industriellen Einsatz von Antibiotika generiert worden ist (17).
23. Gülle-Applikation bringt (zusätzlich) Antibiotika ins Bodenökosystem ein und reichert das ARG-Vorkommen über zahlreiche Mechanismen an (34).
24. Der horizontale Gentransfer spielt eine zentrale Rolle bei der Ausbreitung von ARGs aus Güllequellen (34).
25. Striktere Regulierungsmaßnahmen sind notwendig, um die Ausbreitung von ARGs aus tierischen Quellen zu reduzieren (34).
26. Zahlreiche klinisch relevante ARGs dürften ursprünglich aus Umweltbakterien stammen (5, 6).
27. Nachweise für einen direkten ARG-Transfer aus Bodenökosystemen auf humanpathogene Bakterien ist rar (42).
28. Zahlreiche Flaschenhälse, die einen ARG-Transfer über Ökosystemgrenzen verhindern könnten, wurden beschrieben (29).
29. Eine niedrige HGT-Rate ist nicht gleichbedeutend damit, dass kein Risiko für negative Effekte auf die Gesundheit von Mensch und Tier besteht (29).
30. Ein plausibler Übertragungsweg von ARGs aus güllegedüngten Böden könnte der Konsum von rohem Gemüse darstellen (106, 107).
31. Es gibt Hinweise darauf, dass die Lebensmittelkette bei der Verbreitung von ARGs eine Rolle spielt (34).

7 Modul 3: Handlungsempfehlungen

1. Es ist Konsensus, dass angesichts der kritischen Antibiotikaresistenzsituation die Kontamination der Umwelt mit Antibiotika und Antibiotikaresistenzen reduziert werden soll (108-112).
2. Zur Eindämmung der Ausbreitung von AMR aus und über Umweltquellen sind folgende Schritte notwendig: Etablierung eines international akkordierten Rahmens zur Risikobewertung des Phänomens, Ausarbeitung eines entsprechenden Regelwerks und dessen Umsetzung, Definition einer gut funktionierenden Kreislaufwirtschaft (analog zur Good Laboratory Practice; Good Agricultural Practice), Aufbau einer guten sanitären Infrastruktur (113).
3. Um dem globalen Phänomen der Antibiotikaresistenzausbreitung über große Ökosysteme hinweg Rechnung zu tragen wurde das One Health Konzept entwickelt, in dem Resistenzdeterminanten zwischen Mensch, Tier und Umwelt wechselseitig ausgetauscht werden (80, 114, 115).
4. Um das dem One Health-Konzept zugrundeliegende Ziel der Eindämmung der AMR Ausbreitung zu erreichen, müssen Veterinärmediziner, Ärzte, Experten für Lebensmittelsicherheit, Kläranlagenbetreiber, Umweltexperten und Risikomanager zusammenarbeiten (116).
5. Zu diesem Zweck wurden die Nationalstaaten aufgefordert, für ihre Länder Nationale Aktionspläne auszuarbeiten, die zu einer Reduktion der Entstehungs- und Ausbreitungsgeschwindigkeit von AMR führt (117).
6. Die derzeitige Herausforderung liegt darin, geeignete Kontroll- und Überwachungssysteme zu etablieren, die die Effektivität der im „One Health Konzept“ und den nationalen Aktionsplänen zur Antibiotikaresistenz vorgeschlagenen Strategien zu evaluieren helfen (116).
7. Von hoher Priorität in diesem Zusammenhang ist eine verbesserte Reinigung von mit Antibiotikaresistenzen kontaminierten Abwässern aus industriellen, städtischen oder tierischen Quellen. Dieser Ansatz würde zusätzlich zur Verringerung der AMR-Belastung der Abwasserströme auch zu einer Verringerung der Übertragungshäufigkeiten von Pathogenen und zu einem verbesserten Schutz wertvoller Wasserressourcen führen (118).

8. Empfohlen wird der konsequente Einsatz von modernen Abwasseraufreinigungstechnologien, bei denen in einem zusätzlichen Bearbeitungsschritt Ozonierung oder aktivierter Kohlenstoff verwendet wird, was nicht nur Antibiotika, sondern auch eine Vielzahl anderer Kontaminanten und Pathogene eliminieren würde (119). Dieser Zusatznutzen ist ein nicht zu unterschätzender Anreiz für Investitionen in eine Modernisierung der Abwasserreinigung (24).
9. Im Fokus stehen sollen Maßnahmen, die das Risiko für eine Übertragung von resistenten Bakterien über Ökosystemgrenzen hinweg verringern. Das kann entweder über eine Reduktion der Emissionen oder eine Reduktion der Exposition erreicht werden (120).
10. Überdies sollten Maßnahmen in Betracht gezogen werden, die das Risiko für die Entstehung neuer Resistenzen – also für die Evolution von ARGs – minimieren, obwohl es auf diesem Gebiet noch große Unsicherheiten und Wissenslücken gibt. Zu diesem Zweck ist eine Priorisierung auf Eingriffe notwendig, die leicht und in einem überschaubaren Zeitrahmen durchführbar sind. Der Fokus für Interventionen liegt hier auf bekannten Hot Spots für AMR-Evolution wie Kläranlagen und das vorgeschaltete städtische oder Krankenhaus-Abwassersystem (24).
11. Die Priorisierung der Maßnahmen sollte idealerweise im globalen Kontext stattfinden, da im Falle der Ignorierung des Problems alle von den Konsequenzen betroffen sind, egal wo eine neue Resistenzdeterminante entstanden ist (24).
12. Eine interessante Option bezüglich Überwachung der Entstehung und Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen bietet ein verstärkter Einsatz der bereits erfolgreich in der Abwasserepidemiologie angewandten Methoden (vgl. SARS-Cov-2, Polio-Eradikationsprogramm), obwohl sich dieser Ansatz noch in den Kinderschuhen befindet (24, 121).
13. Von zentraler Bedeutung ist jedoch, dass alle aus der Umwelt gewonnenen Resistenzdaten, sei es aus Bakterienisolaten oder über Metagenomsequenzierungen, konsequent mit qualitativ hochwertigen klinischen Daten in Beziehung gesetzt werden (24).
14. Um die Kontamination von Umweltkompartimenten (d.h. Ackerböden) mit Antibiotikaresistenzen aus der Gülledüngung zu reduzieren wäre es im Sinne des Vorsorgeprinzips empfehlenswert, die ARG-Belastung von Schweinegülle vor deren Ausbringung in die Umwelt zu reduzieren (24).
15. Eine Verringerung der Gesamtausbringungsmenge von Gülle pro Feld und Jahr durch Kombination mit anorganischem Dünger sowie eine Reduzierung der

Gesamtexpositionsdauer einzelner Felder mit Gülle könnte die ARG-Belastung im Boden reduzieren (49).

16. Für ARG-Monitoring Ansätze ist unbedingt der Probenentnahmezeitpunkt zu beachten und zu standardisieren. Geringe Unterschiede zwischen Gülleapplikation und Bodenprobenentnahme können massive Auswirkungen auf die detektierte ARG-Menge haben (39, 43) und zu Fehlinterpretationen führen.
17. Ein routinemäßig durchgeführtes ARG-Bodenproben-Monitoring hat sich im MARGINS-I Projekt als sehr aufwändig herausgestellt. Ein daher zum Standardverfahren zusätzlich entwickeltes vereinfachtes Bodenprobenziehungsschema (Probenentnahme an einer einzigen, verkehrstechnisch gut erreichbaren Stelle am Feldrand (= Triangel-Ansatz)) liefert ARG-Konzentrationsergebnisse, die nicht zufriedenstellend mit den Werten, die für das gesamte Feld repräsentativ erhoben worden waren, korrelieren.
18. Alternativ wäre ein ARG-Monitoring der Gülle empfehlenswert, bei dem die ARG-Einträge überwacht werden können.
19. Zur Reduktion von eventuell vorhandenen Antibiotika-Kontaminationen könnte der organische Kohlenstoffanteil (SOC) im Boden erhöht werden, da er negativ mit den gefundenen Antibiotikamengen korreliert (49).
20. Kompostierung könnte zur Reduzierung einiger Antibiotika und der ARG-Belastung in Gülle führen (96). Die Gesamt-ARG- und MGE-Mengen sind generell niedriger, wenn der Boden mit kompostierter Gülle gedüngt worden ist (49, 122).
21. Die Kontrolle des Boden pH-Wertes könnte sich als Mittel zur Reduktion der ARG-Bodenbelastung erweisen, da er positiv mit der ARG-Menge korreliert (49).
22. Eine weitere Möglichkeit zur Reduzierung der Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen ist eine konsequente Reduzierung des Feststoff-Partikelanteils in Kot, Gülle und Abwasser (123). Partikeloberflächen begünstigen ein Anhaften von Bakterien und die Bildung von Biofilmen, was die Ausbreitung von AMR unterstützt (124).
23. Die Entfernung von Partikel mit Bakterienbewuchs aus aquatischen Ökosystemen ist ein essentieller Schritt zur AMR-Dekontamination in der Umwelt (124). Erfolge wurden bei der Reduzierung von AMR in Kläranlagen (125) und in Abwässern von Schweinezuchtbetrieben erzielt (126).

24. Der Einsatz folgender klassischer Technologien zur Entfernung oder Deaktivierung von partikulärem Material aus einer wässrigen Matrix wurde empfohlen: Sedimentation, Flokkulation, Koagulation, Desinfektion, Filtration, Ultrafiltration (127), sowie Kaltluftplasma-Technologie (128), hydrodynamische Vortex-Separatoren (129), Aufschwemmung mit gelöster Luft (130).
25. Neue Perspektiven bei der AMR-Reduktion via Entfernung von Partikeln bietet der Einsatz von Nanotechnologie (124): Nanopartikel können so konstruiert werden, dass sie bei der mikrobiologischen Koagulation und Partikelaggregatbildung interferieren und gezielt die mikrobiologische Fraktion abtöten. Eine kombinierte Anwendung von auf Zink- oder Titandioxid basierenden Nanopartikel mit halophilen Bakterien, die den Nährstoffgehalt des Mediums reduzieren, wurde vorgeschlagen (131).
26. Der Einsatz von „Umwelt-Präbiotika“ wie der von *Pseudoalteromonas*-Stämmen mit Anti-Biofilm-Aktivität (132) und die Applizierung von Tonmineralien, die ebenfalls gegen die Ausbildung von Biofilmen wirksam sind und antibakteriell wirken könnte auch ein Option zur Reduzierung der Ausbreitung von AMR über Mikropartikel sein (133).
27. Beobachtungen zeigen, dass im globalen Vergleich das Vorhandensein einer optimalen sanitären Infrastruktur höchstwahrscheinlich eine stärkere Auswirkung auf die Reduktion von Antibiotikaresistenzraten hat, als ein reduzierter Antibiotikaverbrauch (134).
28. Die derzeitige karge Datenlage erschwert eine objektive und quantitative Abschätzung von Gesundheitsrisiken, die von Antibiotika-resistenten Umweltkeimen ausgehen. Es ist daher schwierig Grenzwerte für eine Maximalbelastung von Abwasser, Klärschlamm und Gülle in der Landwirtschaft anzuführen (116).
29. Die Klimakrise verbunden mit einem steigenden Bedarf an Trinkwasser und geklärtem Abwasser für die Bewässerung und Düngung bei der Pflanzenproduktion führt zu einem vermehrten Einsatz von Gülle und aufbereitetem Wasser, was höchstwahrscheinlich den Eintrag von ARBs und ARGs in den Boden erhöhen wird (116).
30. Austausch und Transport von Lebens- und Futtermitteln aber auch der Reiseverkehr zwischen Low-Income und High-Income Ländern befeuert die Transmission von Resistenzdeterminanten befeuern (116).
31. Die Umwelt wird durch anthropogene Aktivitäten, im Besonderen durch die Landwirtschaft, stark beeinflusst. Es bestehen aber Wissenslücken darüber, welche Praktiken an sich und in welchem Ausmaß ein Gesundheitsrisiko für die Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen im Boden, Wasser und in der Luft darstellen (116).

32. Ein besseres Verständnis dafür, wie sich mikrobielle und chemische Kontaminanten im Boden und Wasser in Zusammenhang mit Klimaschwankungen und Temperatur und Niederschlagsextremen verhalten, ist notwendig (116).
33. Ein großer Schritt in Richtung Eindämmung von AMR war das Verbot zum Einsatz von Antibiotika als Wachstums promotoren in der Tierzucht (EU: seit 2006; USA: 2017) (116).
34. Der Antibiotikaverbrauch in der Humanmedizin und Tierzucht muss überwacht werden. Dazu sind die verantwortlichen nationalen Behörden aufgerufen, ein dichtes Überwachungs- und Monitoring-System für den Antibiotikaverbrauch und die Resistenzlage aufzubauen (34).
35. Die Einführung von Antibiotic Stewardship-Programmen hat sich als sehr positiv für das AMR Management erwiesen (135).
36. Etablierung von ARG Monitoringsystemen in diversen Umweltkompartments, um ARG-Belastungen zu ermitteln und deren Dynamik zu überwachen.
37. Ermittlung von lokalen ARG-Hotspots in der Umwelt, Lebens- und Futtermittelkette, um effiziente Interventionspunkte zu identifizieren.
38. Aufbau von nationalen ARG-Datenbanken, die neben quantitativen Informationen auch Prävalenz-, Sequenz- und Metadaten, sowie Informationen zur bakteriellen Biodiversität im getesteten Habitat enthalten.
39. Internationale Abstimmung der Vorgangsweisen zur Reduzierung der Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen.
40. Verknüpfung der molekularbiologischen ARG-Daten mit Bakterienkultivierungsdaten und/oder Resistenzprofilen.
41. Verknüpfung der molekularbiologischen ARG Daten aus Umweltkompartments mit human- und veterinärmedizinischen epidemiologischen Daten. Strikte Verfolgung des One Health Ansatzes (Einbeziehung von Umwelt, human- und veterinärmedizinischen Aspekten in die ARG-Eindämmungsstrategie) bei der Gefährdungs- und Risikobewertung.
42. Integration des molekularbiologischen Ansatzes zum Screening auf ARGs in bestehende phänotypische Pathogen-Monitoringprogramme (z.B. EARS).
43. Harmonisierung der eingesetzten molekularbiologischen Methodik (qPCR, high throughput qPCR, Metagenomik) um internationale Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erleichtern.

8 Anhang

8.1 Factsheet – MARGINS-I

MARGINS-I: Identifizierung und Quantifizierung der Antibiotikaresistenzgen-Hintergrundbelastung von Böden in Österreich

Verfasser*innen: Sonia Galazka MSc. (AGES), Dr. Melanie Kuffner (AGES) – Projektmitarbeiterinnen MARGINS-I.
Ass. Prof. Dr. Julia Vierheilig, Ass. Prof. Dr. Norbert Kreuzinger (TU Wien) und Dr. Markus Wögerbauer (AGES) - Projektleiter*innen der Projekte MARGINS-I & II.

Worum handelt es sich bei MARGINS-I?

Im MARGINS-I Projekt wurde erstmals in Österreich die Antibiotikaresistenzgen(ARG)-Belastung von Böden systematisch erfasst. Ausgewählte Agrarböden, sowie naturbelassene und urbane Wiesen-, Laub- und Nadelwaldböden wurden untersucht, um quantitative Daten zur ARG-Verbreitung zu erhalten. Zudem wurden in einem definierten Agroökosystem mögliche Antibiotikaresistenz-Übertragungswege von ihrem Ursprung (wie Schweinegülle, -Kot und Kompost) über das exponierte Feld bis ins Drainage-Wasser beobachtet.

Was bedeutet "MARGINS"?

= Monitoring of Antibiotic Resistance Genes in Soils

Die Forschungsarbeiten wurden in Kooperation mit der Technischen Universität Wien (Institut für Wassergüte und Ressourcenmanagement) durchgeführt, die die gleichen Fragestellungen im Abwasser und in Oberflächengewässern untersucht hat. Bodenspezifische ARG-Daten wurden von der AGES (Abteilung für Risikobewertung) ermittelt und im MARGINS-I Bericht veröffentlicht. Abwasserspezifische Ergebnisse sind dem MARGINS-II Bericht zu entnehmen.

Warum ist dieses Projekt relevant?

Antimikrobielle Resistenz wurde von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als eines der Top 10 globalen Gesundheitsprobleme deklariert.

Antibiotikaresistenzgene (ARGs), die aus Umweltquellen wie Böden, Gewässern aber auch aus Lebens- und Futtermittelketten stammen, können problematisch für die Behandlung von bakteriellen Infektionskrankheiten sein. Anthropogene Einflüsse wie landwirtschaftliche Gülledüngung können zu einer Erhöhung der bereits natürlich im Boden vorkommenden ARG-Konzentrationen oder zur Einbringung von neuen ARGs führen. Deshalb spielen Agroökosysteme nicht nur eine Rolle bei der Ausbreitung – sondern auch bei der Eindämmung – von Antibiotikaresistenzen.

Was waren die Ziele des Projektes?

Da bisher weder quantitative noch qualitative Daten zur ARG-Belastung von österreichischen Böden erhoben wurden, hat das MARGINS-I Projekt versucht, diese Datenlücke zu füllen.

Ziele dieses Projektes umfassten:

- die quantitative Datenerfassung von ARGs in österreichischen Böden unter unterschiedlich starken anthropogenen Einflüssen (starker Selektionsdruck: Gülle-gedüngte Agrarfelder; schwacher Selektionsdruck: naturbelassene alpine Nadelwaldböden)
- die Auswirkung von Gülledüngung auf die ARG-Konzentration in Ackerböden des österreichischen Freiluft-Versuchsgeländes (HOAL; Petzenkirchen, Niederösterreich) im Jahresverlauf zu beobachten
- die möglichen Ausbreitungswege von ARGs innerhalb des HOALs (aus Kompost, Schweinekot, Schweine-Gülle über Böden bis hin zum Drainage-Wasser) zu erfassen

Wie wurde das Projekt umgesetzt?

Insgesamt wurden 110 Proben untersucht, welche sich aus 85 Bodenproben, 20 Wasserproben und 3 organischen Düngerproben (Kompost, Schweinekot, Schweinegülle) zusammensetzten.

Das zentrale Element von MARGINS-I war die Erfassung der Kopienzahl von 24 ARGs und 2 mobilen genetischen Elementen in Böden, Drainage- und Bachwasser sowie in Schweinekot, Schweinegülle und Kompost mittels quantitativer PCR (TaqMan qPCR).

Die ARG-qPCR Ergebnisse (absolute Quantifizierung) wurden überdies in Relation zur Anzahl der ermittelten *16S rRNA Gene* der Bodenmikroflora am Probenentnahmestandort gesetzt (relative Quantifizierung: deltaCt Methode).

Zusätzlich durchgeführte, ergänzende Untersuchungen:

- **16S Metagenomsequenzierung:** Bestimmung der mikrobiellen Diversität und Abundanz sowie deren Korrelationen mit ARG-Konzentrationen anhand von Netzwerkanalysen (81 Proben) zur Ermittlung von Bakterienarten, die als potentielle Resistenzträger fungieren könnten
- **Resistomap/SmartChip high-throughput qPCR:** Analyse eines erweiterten Spektrums von 95 ARGs (30 Proben)
- **Bestimmung der Resistenzraten kultivierbarer Bakterien:** 6x Antibiotika, 5x Bodenproben (Agar-Voll- und Minimalmediumplatten). Taxonomische Identifikation von 213 antibiotikaresistenten Bakterieneinzelisolaten (16S Amplikon Sequenzierung)
- **Antibiotika-Quantifizierung:** 16x Boden-, Gülle- und Kotproben (29 Antibiotika); 5x Wasserproben (20 Antibiotika) mittels LC-MS/MS
- **Geochemische Bodenparameter-Analyse an den Probenentnahmestellen:** Korrelationen mit qPCR-Ergebnissen
- **Sammlung von Wetter-/Klimadaten im Bereich der Probenentnahmestellen:** HOAL- und ZAMG-Wetterstationen. Korrelation mit den beobachteten ARG-Mengen.

Welche Proben wurden getestet?

Agroökosystem HOAL/Probenentnahmestellen:

- 2x langjährig Gülle-gedüngte Felder mit Gülldüngung im Beobachtungszeitraum (F31, F39)
- 1x langjährig Gülle-gedüngtes Feld ohne Gülldüngung im Beobachtungszeitraum (F32)
- 1x langfristig Gülle-freies Feld (F04)
- 1x Laub- und Nadelwaldboden
- Organische Dünger (1x Kompost, 1x Schweinekot, 3x Schweinegülle)
- 1x Bachwasser und 1x Drainagewasser

Nicht landwirtschaftlich genutzte Vergleichsböden:

- 4x urbane - und 2x naturbelassene Wiesen (Donau Auen)
- Naturbelassene Laubwaldböden (8x Donau Auen, 1x Prater Park, 1x Lainzer Tiergarten)
- Naturbelassene Nadelwaldböden (Alpin: Ötscher – 3 Höhenstufen; 5x Wiener Becken)

Im HOAL-Gelände wurden innerhalb des Beobachtungszeitraumes (= Longitudinalstudie über eine Vegetationsperiode: Herbst 2019-Herbst 2020) je Probenentnahmestelle an 7-10 Zeitpunkten Bodenproben entnommen. Im gleichen Zeitraum wurden 10 Bach- und Drainagewasserproben im Entwässerungsbereich der getesteten HOAL-Felder gezogen. Im Fall der urbanen- und naturbelassenen Wiesen sowie Laubwaldböden wurden Proben jeweils zur warmen und kalten Jahreszeit gezogen.

Welche Antibiotika-Resistenzgene wurden getestet?

Die getesteten 24 ARGs inaktivieren 12 Antibiotikaklassen:

- Aminoglykoside (*aadA*, *aph(3')-IIa*, *aph(3')-IIIa*, *strB*)
- β -Laktame (*bla_{CTX-M-15}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM-1}*, *bla_{OXA-10}*, *bla_{TEM-1}*, *mecA*)
- Phenicole (*cmxA*)
- Diaminopyrimidine (*dfrA-1*)
- Makrolide (*ermB*, *ermF*)
- Polypeptide (*mcr-1*)
- Biozide (*qacEdelta1*)
- Fluorochinolone (*qnrS*)
- Nukleoside (*sat-4*)
- Sulfonamide (*sul1*)
- Tetracykline (*tet(A)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(W)*)
- Glykopeptide (*vanA*)

Welche Ergebnisse wurden im Rahmen des Projekts erzielt?

ARG-Konzentrationen in unterschiedlichen Ökosystemen

- Die Abundanz der detektierbaren Targets variierte in den verschiedenen Matrizen und Proben (Kopien pro Gramm Trockengewicht Boden (K/g TB)):
 - langjährig güllegedüngte Felder: $10^2 - 10^6$ K/ g TB
 - langjährig Gülle-freies Feld: $10^2 - 10^5$ K/ g TB
 - Vergleichsböden (Nadel-, Laubwälder, Wiesen): $10^2 - 10^5$ K/ g TB (mit vielen Targets unter der Nachweisgrenze bei naturnahen Proben)
- Schweinegülle: $10^6 - 10^9$ K/g

Einfluss von Gülledüngung auf ARGs in Ackerböden:

- Die Untersuchung von Schweinegülle und der Agrarfelder zeigte, dass die Konzentrationen von insgesamt 15 ARGs und MGEs in Ackerböden durch die Gülledüngung erhöht wird: ***ermF*, *ermB*, *dfrA-1*, *sat-4*, *nptIII*, *strB*, *aadA*, *cmxA*, *sul1*, *qacEdelta1*, *tet(A)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(W)*** und ***intl1***
- Ein Gülle-bedingter Maximalwert trat einen Tag- bis eine Woche nach Düngung bei 13 ARGs auf: ***ermF*, *ermB*, *dfrA-1*, *sat-4*, *nptIII*, *strB*, *cmxA*, *sul1*, *qacEdelta1*, *tet(A)*, *tet(M)*, *tet(W)*** und ***intl1***
- Diese ARG-Konzentrationen flachten bis Ende der Vegetationsperiode wieder auf den Ursprungswert ab.
- Über den Beobachtungszeitraum hinweg waren 13 Targets in den langjährig Gülle-gedüngten Feldern statistisch signifikant häufiger: ***ermB*, *dfrA-1*, *sat-4*, *nptIII*, *strB*, *aadA*, *cmxA*, *sul1*, *qacEdelta1*, *tet(A)*, *tet(M)*, *tet(O)*** und ***tet(W)***
- Antibiotika konnten lediglich in Gülle nachgewiesen werden (Marbofloxacin/Fluorochinolon und Doxycyclin/Tetrazyklin-Derivat), jedoch nicht in den Böden. Die Konzentrationen waren gering, könnten jedoch minimal selektiv wirksam sein.
- Die Genera *Clostridium sensu stricto 1*, *Terrisporobacter*, *Turicibacter* und *Romboutsia* wurden in Schweinegülle und in den Gülle-gedüngten Feldern besonders häufig detektiert, mit einem starken Anstieg nach Gülle-Applikation.

ARG-Belastung bei Vergleichsstandorten und HOAL-Feldern:

- Die niedrigsten ARG-Belastungen wurden an Nadelwaldstandorten ermittelt, die höchsten in Wiener Grasflächen
- Ubiquitär detektierte Targets: ***bla_{TEM-1}*, *vanA*, *ISPps*, *intl1*, *ermB*** und ***cmxA***
- Eine hohe ARG-Diversität in allen Böden zeigte das Resistomap-Screening auf 95 ARG-Targets:
 - 55-69 detektierte Targets in den Gülle-gedüngten Böden
 - 55-60 detektierte Targets im Gülle-freien Feld
 - 52-58 detektierte Targets in urbanen Wiesenböden
 - 37-53 detektierte Targets in naturbelassenen Laub- und Nadelwaldböden
- Die Bakteriengattung *Terrisporobacter* korrelierte mit den ARGs ***dfrA-1*, *nptIII*, *sat-4*** und ***qacEdelta1*** positiv nach Spearman in Gülle-gedüngten Feldern.

Einfluss von abiotischen Faktoren auf ARG-Konzentrationen:

- **Regen:** Negative Korrelation zwischen Regenmenge am Tag der Probenahme und dem ARG *ermF*
- **Boden- und Lufttemperatur:** Negative Korrelation mit *tet(W)*
- **Kupfer:** Positive Korrelation mit *aph(3')-IIIa*, *tet(M)* und *tet(O)*
- **Molybdän:** Positive Korrelation mit *bla_{TEM-1}*, *cmxA*, *ermF*, *tet(M)*
- **Zink:** Positive Korrelation mit *aadA*, *bla_{TEM-1}*, *aph(3')-IIa*, *tet(M)*
- **Mangan:** Negative Korrelation mit *tet(M)*, *sul1*, *ermF*

Was bedeuten die gesammelten Ergebnisse?

- Deutlicher Hinweis auf die Übertragung von ARGs und assoziierten Bakterien aus Gülle in österreichische Ackerböden
- **Resilienz** von Ackerböden gegenüber frisch über Gülle eingebrachte ARGs: verursachte ARG-Konzentrationserhöhungen nicht permanent
- Gülle-bedingter Konzentrationsanstieg im Boden nicht bei allen getesteten ARGs nachweisbar
- ARG-Hintergrundkonzentrationen jedoch in **langfristig** Gülle-gedüngten Ackerböden höher als im Gülle-freien Feld
- Naturnahe Böden und landwirtschaftliche Nutzflächen zeigen ein ähnliches Spektrum an ARGs. Die Anzahl der detektierten ARGs und die ermittelten Konzentrationen sind jedoch in naturnahen Böden in der Regel geringer.
- Die ermittelten Antibiotika-Konzentrationen in Gülle vermitteln eventuell in dieser Matrix einen Selektionsdruck, jedoch nicht im Boden (keine Antibiotika detektierbar).
- Abiotische Faktoren können positiv (Kupfer, Molybdän, Zink) oder negativ (Regen, Boden- und Lufttemperatur) mit bestimmten ARGs korrelieren.

Was kann unternommen werden, um die Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen über Ökosystemgrenzen zu verringern?

- Etablierung von ARG Monitoringsystemen in diversen Umweltkompartments, um ARG-Belastungen zu ermitteln und deren Dynamik zu überwachen
- Ermittlung von lokalen ARG-Hotspots in der Umwelt, Lebens- und Futtermittelkette, um effiziente Interventionspunkte zu identifizieren
- Aufbau von nationalen ARG-Datenbanken, die neben quantitativen Informationen auch Prävalenz-, Sequenz- und Metadaten, sowie Informationen zur bakteriellen Biodiversität im getesteten Habitat enthalten
- Internationale Abstimmung der Vorgangsweisen zur Reduzierung der Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen
- Verknüpfung der molekularbiologischen ARG-Daten mit Bakterienkultivierungsdaten und/oder Resistenzprofilen
- Verknüpfung der molekularbiologischen ARG-Daten aus Umweltkompartments mit human- und veterinärmedizinischen epidemiologischen Daten. Strikte Verfolgung des One Health Ansatzes (Einbeziehung von Umwelt, human- und veterinärmedizinischen Aspekten in die ARG-Eindämmungsstrategie) bei der Gefährdungs- und Risikobewertung.
- Integration des molekularbiologischen Ansatzes zum Screening auf ARGs in bestehende phänotypische Pathogen-Monitoringprogramme (EARS)
- Harmonisierung der eingesetzten molekularbiologischen Methodik (qPCR, high throughput qPCR, Metagenomik) um internationale Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erleichtern.

- Eindämmung der Ausbreitung von ARGs und assoziierter Bakterien aus und über Umweltquellen notwendig
- Reduzierung der ARG-Belastung von Schweinegülle vor deren Ausbringung in die Umwelt empfehlenswert
- Verbesserte Reinigung von mit ARG und ARB kontaminierten Abwässern aus industriellen, städtischen, landwirtschaftlichen und klinischen Quellen
- **One Health-Konzept:** Zusammenarbeit von Veterinärmedizinern, Ärzten, Experten für Lebensmittelsicherheit, Kläranlagenbetreibern, Umweltexperten und Risikomanagern

Referenzen

1. European Commission. 2017. A European One Health Action Plan, Against Antimicrobial Resistance (AMR). https://ec.europa.eu/health/amr/sites/amr/files/amr_action_plan_2017_en.pdf.
2. European Council. 2012. Council conclusions of 22 June 2012 on the impact of antimicrobial resistance in the human health sector and in the veterinary sector — a 'One Health' perspective. (2012/C 211/02). [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:52012XG0718\(01\)&from=EN](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:52012XG0718(01)&from=EN).
3. European Council. 2016. Council conclusions on the next steps under a One Health approach to combat antimicrobial resistance. <http://www.consilium.europa.eu/en/press/press-releases/2016/06/17/epsco-conclusions-antimicrobial-resistance/pdf>.
4. BMASGK. 2021. Nationaler Aktionsplan zur Antibiotikaresistenz - NAP-AMR. <https://www.sozialministerium.at/dam/sozialministeriumat/Anlagen/Themen/Gesundheit/Antimikrobielle-Resistenzen-und-Gesundheitssystem-assoziierte-Infektionen/Antimikrobielle-Resistenzen/NAP-AMR.pdf>.
5. Forsberg KJ, Reyes A, Wang B, Selleck EM, Sommer MO, Dantas G. 2012. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science* 337:1107-11.
6. Crofts TS, Gasparrini AJ, Dantas G. 2017. Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. *Nat Rev Micro* 15:422-434.
7. Wright GD. 2010. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Current Opinion in Microbiology* 13:589-594.
8. Olson AB, Silverman M, Boyd DA, McGeer A, Willey BM, Pong-Porter V, Daneman N, Mulvey MR. 2005. Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extended-spectrum beta-lactamases from *Kluyvera georgiana* isolated in Guyana. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49:2112-5.
9. Poirel L, Kampfer P, Nordmann P. 2002. Chromosome-encoded Ambler class A beta-lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46:4038-40.
10. Liakopoulos A, Mevius DJ, Olsen B, Bonnedahl J. 2016. The colistin resistance *mcr-1* gene is going wild. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 71:2335-6.
11. Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Mammeri H, Liard A, Nordmann P. 2005. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant *QnrA*. *Antimicrob Agents Chemother* 49:3523-5.
12. Davies J, Davies D. 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74:417-433.
13. D'Costa VM, Griffiths E, Wright GD. 2007. Expanding the soil antibiotic resistome: exploring environmental diversity. *Current Opinion in Microbiology* 10:481-9.
14. D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD. 2006. Sampling the antibiotic resistome. *Science* 311:374-7.
15. Marti E, Variatza E, Balcazar JL. 2014. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends in Microbiology* 22:36-41.
16. Muziasari WI, Pitkänen LK, Sørnum H, Stedtfeld RD, Tiedje JM, Virta M. 2017. The Resistome of Farmed Fish Feces Contributes to the Enrichment of Antibiotic Resistance Genes in Sediments below Baltic Sea Fish Farms. *Frontiers in Microbiology* 7:2137.
17. D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, Schwarz C, Froese D, Zazula G, Calmels F, Debruyne R, Golding GB, Poinar HN, Wright GD. 2011. Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477:457-61.

18. Gillings MR, Paulsen IT, Tetu SG. 2017. Genomics and the evolution of antibiotic resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1388:92-107.
19. Surette M, Wright GD. 2017. Lessons from the Environmental Antibiotic Resistome. *Annual Review of Microbiology* 71:309-329.
20. Chee-Sanford JC, Mackie RI, Koike S, Krapac IG, Lin YF, Yannarell AC, Maxwell S, Aminov RI. 2009. Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste. *Journal of Environmental Quality* 38:1086-108.
21. Heuer H, Kopmann C, Binh CT, Top EM, Smalla K. 2009. Spreading antibiotic resistance through spread manure: characteristics of a novel plasmid type with low %G+C content. *Environ Microbiol* 11:937-49.
22. Rizzo L, Manaia C, Merlin C, Schwartz T, Dagot C, Ploy MC, Michael I, Fatta-Kassinos D. 2013. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Science of The Total Environment* 447:345-360.
23. Huijbers PMC, Flach C-F, Larsson DGJ. 2019. A conceptual framework for the environmental surveillance of antibiotics and antibiotic resistance. *Environment International* 130:104880.
24. Larsson DGJ, Flach C-F. 2022. Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology* 20:257-269.
25. Martínez JL, Coque TM, Lanza VF, de la Cruz F, Baquero F. 2017. Genomic and metagenomic technologies to explore the antibiotic resistance mobilome. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1388:26-41.
26. Wuijts S, van den Berg HH, Miller J, Abebe L, Sobsey M, Andremont A, Medlicott KO, van Passel MW, de Roda Husman AM. 2017. Towards a research agenda for water, sanitation and antimicrobial resistance. *Journal of Water and Health* 15:175-184.
27. WHO. 2015. Global action plan on antimicrobial resistance. <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>
28. Martínez JL. 2012. Bottlenecks in the transferability of antibiotic resistance from natural ecosystems to human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology* 2.
29. Martínez JL, Coque TM, Baquero F. 2015. What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nature Reviews Microbiology* 13:116-123.
30. BMASGK. 2018. Nationaler Aktionsplan zur Antibiotikaresistenz NAP-AMR. Wien: Bundesministerium für Arbeit, Soziales, Gesundheit und Konsumentenschutz. [https://www.bmgf.gv.at/cms/home/attachments/2/.../nap-amr\(stand_maerz_2018\).pdf](https://www.bmgf.gv.at/cms/home/attachments/2/.../nap-amr(stand_maerz_2018).pdf).
31. Manaia CM. 2017. Assessing the Risk of Antibiotic Resistance Transmission from the Environment to Humans: Non-Direct Proportionality between Abundance and Risk. *Trends in Microbiology* 25:173-181.
32. Manaia CM, Rocha J, Scaccia N, Marano R, Radu E, Biancullo F, Cerqueira F, Fortunato G, Iakovides IC, Zammit I, Kampouris I, Vaz-Moreira I, Nunes OC. 2018. Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: Tackling the black box. *Environment International* 115:312-324.
33. Forsberg KJ, Patel S, Gibson MK, Lauber CL, Knight R, Fierer N, Dantas G. 2014. Bacterial phylogeny structures soil resistomes across habitats. *Nature* 509:612-616.
34. Xie WY, Shen Q, Zhao FJ. 2018. Antibiotics and antibiotic resistance from animal manures to soil: a review. *European Journal of Soil Science* 69:181-195.
35. Lang KS, Anderson JM, Schwarz S, Williamson L, Handelsman J, Singer RS. 2010. Novel Florfenicol and Chloramphenicol Resistance Gene Discovered in Alaskan Soil by Using Functional Metagenomics. *Applied and Environmental Microbiology* 76:5321-5326.
36. Wang L, Wang J, Wang J, Zhu L, Conkle JL, Yang R. 2020. Soil types influence the characteristic of antibiotic resistance genes in greenhouse soil with long-term manure application. *Journal of Hazardous Materials* 392:122334.
37. Berg G, Smalla K. 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* 68:1-13.

38. Shintani M, Nour E, Elsayed T, Blau K, Wall I, Jechalke S, Spröer C, Bunk B, Overmann J, Smalla K. 2020. Plant Species-Dependent Increased Abundance and Diversity of IncP-1 Plasmids in the Rhizosphere: New Insights Into Their Role and Ecology. *Frontiers in Microbiology* 11.
39. Jechalke S, Heuer H, Siemens J, Amelung W, Smalla K. 2014. Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends in Microbiology* 22:536-545.
40. Gaze WH, Krone SM, Larsson DG, Li XZ, Robinson JA, Simonet P, Smalla K, Timinouni M, Topp E, Wellington EM, Wright GD, Zhu YG. 2013. Influence of humans on evolution and mobilization of environmental antibiotic resistome. *Emerging Infectious Diseases* 19: e120871.
41. Thomas CM, Nielsen KM. 2005. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 3:711-21.
42. Luby E, Ibekwe AM, Zilles J, Pruden A. 2016. Molecular Methods for Assessment of Antibiotic Resistance in Agricultural Ecosystems: Prospects and Challenges. *Journal of Environmental Quality* 45:441-453.
43. Heuer H, Schmitt H, Smalla K. 2011. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr Opin Microbiol* 14:236-43.
44. Heuer H, Solehati Q, Zimmerling U, Kleinedam K, Schloter M, Muller T, Focks A, Thiele-Bruhn S, Smalla K. 2011. Accumulation of sulfonamide resistance genes in arable soils due to repeated application of manure containing sulfadiazine. *Appl Environ Microbiol* 77:2527-30.
45. Radu E, Woegerbauer M, Rab G, Oismüller M, Strauss P, Hufnagl P, Gottsberger RA, Krampe J, Weyermair K, Kreuzinger N. 2021. Resilience of agricultural soils to antibiotic resistance genes introduced by agricultural management practices. *Science of The Total Environment* 756:143699.
46. Gullberg E, Cao S, Berg OG, Ilbäck C, Sandegren L, Hughes D, Andersson DI. 2011. Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations. *PLoS Pathogens* 7:e1002158.
47. Marti R, Tien Y-C, Murray R, Scott A, Sabourin L, Topp E. 2014. Safely coupling livestock and crop production systems: how rapidly do antibiotic resistance genes dissipate in soil following a commercial application of swine or dairy manure? *Applied and environmental microbiology* 80:3258-3265.
48. Muurinen J, Stedtfeld R, Karkman A, Parnanen K, Tiedje J, Virta M. 2017. Influence of Manure Application on the Environmental Resistome under Finnish Agricultural Practice with Restricted Antibiotic Use. *Environmental Science & Technology* 51:5989-5999.
49. Zhang Y, Cheng D, Xie J, Zhang Y, Wan Y, Zhang Y, Shi X. 2022. Impacts of farmland application of antibiotic-contaminated manures on the occurrence of antibiotic residues and antibiotic resistance genes in soil: A meta-analysis study. *Chemosphere* 300:134529.
50. Blöschl G, Blaschke AP, Broer M, Bucher C, Carr G, Chen X, Eder A, Exner-Kittridge M, Farnleitner A, Flores-Orozco A, Haas P, Hogan P, Kazemi Amiri A, Oismüller M, Parajka J, Silasari R, Stadler P, Strauss P, Vreugdenhil M, Wagner W, Zessner M. 2016. The Hydrological Open Air Laboratory (HOAL) in Petzenkirchen: a hypothesis-driven observatory. *Hydrol Earth Syst Sci* 20:227-255.
51. Scott HM, Acuff G, Bergeron G, Bourassa MW, Gill J, Graham DW, Kahn LH, Morley PS, Salois MJ, Simjee S, Singer RS, Smith TC, Storrs C, Wittum TE. 2019. Critically important antibiotics: criteria and approaches for measuring and reducing their use in food animal agriculture. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1441:8-16.
52. WHO. 2019. Critically important antimicrobials for human medicine. 6th revision. <https://www.who.int/foodsafety/publications/antimicrobials-sixth/en/>.
53. Fuchs R, Fuchs K. 2019. Bericht über den Vertrieb von Antibiotika in der Veterinärmedizin in Österreich 2014 - 2018. https://www.ages.at/download/0/0/6f1155fcb47fa14603ac337b0a5db7fff5bab32/fileadmin/AG_ES2015/Themen/Arzneimittel_Medizinprodukte_Dateien/AB_Mengen_AUT_Bericht_2018.pdf.
54. Blau K, Jacquiod S, Sørensen SJ, Su J-Q, Zhu Y-G, Smalla K, Jechalke S. 2019. Manure and Doxycycline Affect the Bacterial Community and Its Resistome in Lettuce Rhizosphere and Bulk Soil. *Frontiers in Microbiology* 10:725-725.

55. Peng S, Feng Y, Wang Y, Guo X, Chu H, Lin X. 2017. Prevalence of antibiotic resistance genes in soils after continually applied with different manure for 30 years. *Journal of Hazardous Materials* 340:16-25.
56. Guo T, Lou C, Zhai W, Tang X, Hashmi MZ, Murtaza R, Li Y, Liu X, Xu J. 2018. Increased occurrence of heavy metals, antibiotics and resistance genes in surface soil after long-term application of manure. *Science of The Total Environment* 635:995-1003.
57. Udikovic-Kolic N, Wichmann F, Broderick NA, Handelsman J. 2014. Bloom of resident antibiotic-resistant bacteria in soil following manure fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111:15202-15207.
58. Qu T-t, Zhang J-l, Zhou Z-h, Wei Z-q, Yu Y-s, Chen Y-g, Li L-j. 2009. Heteroresistance to Teicoplanin in *Enterococcus faecium* Harboring the vanA Gene. *Journal of Clinical Microbiology* 47:4194-4196.
59. Gonzalez-Zorn B, Courvalin P. 2003. VanA-mediated high level glycopeptide resistance in MRSA. *Lancet Infectious Diseases* 3:67-8.
60. Klare I, Heier H, Claus H, Reissbrodt R, Witte W. 1995. vanA-mediated high-level glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from animal husbandry. *FEMS Microbiology Letters* 125:165-71.
61. Miki B, McHugh S. 2004. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *Journal of Biotechnology* 107:193-232.
62. Miki B, Abdeen A, Manabe Y, MacDonald P. 2009. Selectable marker genes and unintended changes to the plant transcriptome. *Plant Biotechnology Journal* 7:211-8.
63. Woegerbauer M, Zeinzinger J, Gottsberger RA, Pascher K, Hufnagl P, Indra A, Fuchs R, Hofrichter J, Kopacka I, Korschineck I, Schleicher C, Schwarz M, Steinwider J, Springer B, Allerberger F, Nielsen KM, Fuchs K. 2015. Antibiotic resistance marker genes as environmental pollutants in GMO-pristine agricultural soils in Austria. *Environmental Pollution* 206:342-351.
64. Woegerbauer M, Zeinzinger J, Springer B, Hufnagl P, Indra A, Korschineck I, Hofrichter J, Kopacka I, Fuchs R, Steinwider J, Fuchs K, Nielsen KM, Allerberger F. 2014. Prevalence of the aminoglycoside phosphotransferase genes aph(3')-IIIa and aph(3')-IIa in *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* and *Staphylococcus aureus* isolates in Austria. *J Med Microbiol* 63:210-7.
65. Gillings MR, Gaze WH, Pruden A, Smalla K, Tiedje JM, Zhu YG. 2015. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *ISME J* 9:1269-79.
66. Stedtfeld RD, Guo X, Stedtfeld TM, Sheng H, Williams MR, Hauschild K, Gunturu S, Tift L, Wang F, Howe A, Chai B, Yin D, Cole JR, Tiedje JM, Hashsham SA. 2018. Primer set 2.0 for highly parallel qPCR array targeting antibiotic resistance genes and mobile genetic elements. *FEMS Microbiol Ecol* 94.
67. Muziasari WI, Parnanen K, Johnson TA, Lyra C, Karkman A, Stedtfeld RD, Tamminen M, Tiedje JM, Virta M. 2016. Aquaculture changes the profile of antibiotic resistance and mobile genetic element associated genes in Baltic Sea sediments. *FEMS Microbiology Ecology* 92:fiw052.
68. Wang C, Gong B, Bushel PR, Thierry-Mieg J, Thierry-Mieg D, Xu J, Fang H, Hong H, Shen J, Su Z, Meehan J, Li X, Yang L, Li H, Labaj PP, Kreil DP, Megherbi D, Gaj S, Caiment F, van Delft J, Kleinjans J, Scherer A, Devanarayan V, Wang J, Yang Y, Qian H-R, Lancashire LJ, Bessarabova M, Nikolsky Y, Furlanello C, Chierici M, Albanese D, Jurman G, Riccadonna S, Filosi M, Visintainer R, Zhang KK, Li J, Hsieh J-H, Svoboda DL, Fuscoe JC, Deng Y, Shi L, Paules RS, Auerbach SS, Tong W. 2014. The concordance between RNA-seq and microarray data depends on chemical treatment and transcript abundance. *Nat Biotech* 32:926-932.
69. Zhu Y-G, Johnson TA, Su J-Q, Qiao M, Guo G-X, Stedtfeld RD, Hashsham SA, Tiedje JM. 2013. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110:3435-40.
70. Schmittgen TD, Livak KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3:1101-8.

89. Chen Q-L, Cui H-L, Su J-Q, Penuelas J, Zhu Y-G. 2019. Antibiotic Resistomes in Plant Microbiomes. *Trends in Plant Science* 24:530-541.
90. Chen Q-L, An X-L, Zheng B-X, Ma Y-B, Su J-Q. 2018. Long-term organic fertilization increased antibiotic resistome in phyllosphere of maize. *Science of The Total Environment* 645:1230-1237.
91. Shawver S, Wepking C, Ishii S, Strickland MS, Badgley BD. 2021. Application of manure from cattle administered antibiotics has sustained multi-year impacts on soil resistome and microbial community structure. *Soil Biology and Biochemistry* 157:108252.
92. Wu N, Qiao M, Zhang B, Cheng WD, Zhu YG. 2010. Abundance and diversity of tetracycline resistance genes in soils adjacent to representative swine feedlots in China. *Environmental Science and Technology* 44:6933-6939.
93. Binh CT, Heuer H, Kaupenjohann M, Smalla K. 2009. Diverse aadA gene cassettes on class 1 integrons introduced into soil via spread manure. *Res Microbiol* 160:427-33.
94. Yao Q, Zeng Z, Hou J, Deng Y, He L, Tian W, Zheng H, Chen Z, Liu JH. 2011. Dissemination of the rmtB gene carried on IncF and IncN plasmids among Enterobacteriaceae in a pig farm and its environment. *J Antimicrob Chemother* 66:2475-9.
95. Tiseo K, Huber L, Gilbert M, Robinson TP, Van Boeckel TP. 2020. Global Trends in Antimicrobial Use in Food Animals from 2017 to 2030. *Antibiotics* 9:918.
96. Oliver JP, Gooch CA, Lansing S, Schueler J, Hurst JJ, Sassoubre L, Crossette EM, Aga DS. 2020. Invited review: Fate of antibiotic residues, antibiotic-resistant bacteria, and antibiotic resistance genes in US dairy manure management systems. *Journal of Dairy Science* 103:1051-1071.
97. Hu W, Huang B, Tian K, Holm PE, Zhang Y. 2017. Heavy metals in intensive greenhouse vegetable production systems along Yellow Sea of China: Levels, transfer and health risk. *Chemosphere* 167:82-90.
98. Shakoor A, Shakoor S, Rehman A, Ashraf F, Abdullah M, Shahzad SM, Farooq TH, Ashraf M, Manzoor MA, Altaf MM. 2021. Effect of animal manure, crop type, climate zone, and soil attributes on greenhouse gas emissions from agricultural soils—A global meta-analysis. *Journal of Cleaner Production* 278:124019.
99. Fang H, Wang H, Cai L, Yu Y. 2015. Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial pathogens in long-term manured greenhouse soils as revealed by metagenomic survey. *Environmental Science and Technology* 49:1095-1104.
100. Van den Meersche T, Rasschaert G, Vanden Nest T, Haesebrouck F, Herman L, Van Coillie E, Van Weyenberg S, Daeseleire E, Heyndrickx M. 2020. Longitudinal screening of antibiotic residues, antibiotic resistance genes and zoonotic bacteria in soils fertilized with pig manure. *Environ Sci Pollut Res Int* 27:28016-28029.
101. Sanz C, Casadoi M, Tadic Đ, Pastor-López EJ, Navarro-Martin L, Parera J, Tugues J, Ortiz CA, Bayona JM, Piña B. 2022. Impact of organic soil amendments in antibiotic levels, antibiotic resistance gene loads, and microbiome composition in corn fields and crops. *Environmental Research* 214:113760.
102. You Y, Silbergeld EK. 2014. Learning from agriculture: understanding low-dose antimicrobials as drivers of resistome expansion. *Front Microbiol* 5:284.
103. Bahram M, Hildebrand F, Forslund SK, Anderson JL, Soudzilovskaia NA, Bodegom PM, Bengtsson-Palme J, Anslan S, Coelho LP, Harend H, Huerta-Cepas J, Medema MH, Maltz MR, Mundra S, Olsson PA, Pent M, Polme S, Sunagawa S, Ryberg M, Tedersoo L, Bork P. 2018. Structure and function of the global topsoil microbiome. *Nature* 560:233-237.
104. Yu Z, Gunn L, Wall P, Fanning S. 2017. Antimicrobial resistance and its association with tolerance to heavy metals in agriculture production. *Food Microbiology* 64:23-32.
105. Andersson DI, Hughes D. 2012. Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. *Drug Resistance Updates* 15:162-172.
106. Zhu B, Chen Q, Chen S, Zhu Y-G. 2017. Does organically produced lettuce harbor higher abundance of antibiotic resistance genes than conventionally produced? *Environment International* 98:152-159.

107. Wang FH, Qiao M, Chen Z, Su JQ, Zhu YG. 2015. Antibiotic resistance genes in manure-amended soil and vegetables at harvest. *Journal of Hazardous Materials* 299:215-221.
108. United Nations Environment Programme. 2017. *Frontiers 2017: emerging issues of environmental concern*. <https://www.unenvironment.org/resources/frontiers-2017-emerging-issues-environmental-concern>.
109. Access to Medicines Foundation. 2020. 2020 antimicrobial resistance benchmark, <https://accesstomedicinefoundation.org/publications/2020-antimicrobial-resistance-benchmark>.
110. Review on Antimicrobial Resistance. 2015. Antimicrobials in agriculture and the environment: reducing unnecessary waste, <https://amr-review.org/Publications.html>.
111. European Parliament. 2020. Strategic approach to pharmaceuticals in the environment, https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/TA-9-2020-0226_EN.pdf.
112. WHO. 2020. WHO. Technical brief on water, sanitation, hygiene (WASH) and wastewater management to prevent infections and reduce the spread of antimicrobial resistance (AMR)., https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/wash-wastewatermanagement-to-prevent-infections-and-reduce-amr/en/.
113. Pruden A, Larsson DG, Amezquita A, Collignon P, Brandt KK, Graham DW, Lazorchak JM, Suzuki S, Silley P, Snape JR, Topp E, Zhang T, Zhu YG. 2013. Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. *Environ Health Perspect* 121:878-85.
114. Mackenzie JS, Jeggo M. 2019. The One Health Approach-Why Is It So Important? *Trop Med Infect Dis* 4:88.
115. Baquero F, Coque TM, Martínez J-L, Aracil-Gisbert S, Lanza VF. 2019. Gene Transmission in the One Health Microbiosphere and the Channels of Antimicrobial Resistance. *Frontiers in Microbiology* 10:2892.
116. Tiedje JM, Wang F, Manaia CM, Virta M, Sheng H, Ma L, Zhang T, Topp E. 2019. Antibiotic Resistance Genes in the Human-Impacted Environment: A One Health Perspective. *Pedosphere* 29:273-282.
117. WHO. 2017. Tackling antimicrobial resistance: Supporting national measures to address infection prevention and control and water, sanitation and hygiene in health care settings. http://www.who.int/entity/water_sanitation_health/facilities/amr-ipc-wash-flyer-nov16.pdf?ua=1.
118. Graham DW, Giesen MJ, Bunce JT. 2019. Strategic Approach for Prioritising Local and Regional Sanitation Interventions for Reducing Global Antibiotic Resistance. *Water* 11:27.
119. Margot J, Kienle C, Magnet A, Weil M, Rossi L, de Alencastro LF, Abegglen C, Thonney D, Chèvre N, Schärer M, Barry DA. 2013. Treatment of micropollutants in municipal wastewater: Ozone or powdered activated carbon? *Science of The Total Environment* 461-462:480-498.
120. Larsson DGJ, Andreumont A, Bengtsson-Palme J, Brandt KK, de Roda Husman AM, Fagerstedt P, Fick J, Flach C-F, Gaze WH, Kuroda M, Kvint K, Laxminarayan R, Manaia CM, Nielsen KM, Plant L, Ploy M-C, Segovia C, Simonet P, Smalla K, Snape J, Topp E, van Hengel AJ, Verner-Jeffreys DW, Virta MPJ, Wellington EM, Wernersson A-S. 2018. Critical knowledge gaps and research needs related to the environmental dimensions of antibiotic resistance. *Environment International* 117:132-138.
121. Aarestrup FM, Woolhouse MEJ. 2020. Using sewage for surveillance of antimicrobial resistance. *Science* 367:630-632.
122. Xie S, Wu N, Tian J, Liu X, Wu S, Mo Q, Lu S. Review on the removal of antibiotic resistance genes from livestock manure by composting. *In* (ed), *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 237:052010.
123. Perkins TL, Perrow K, Rajko-Nenow P, Jago CF, Jones DL, Malham SK, McDonald JE. 2016. Decay rates of faecal indicator bacteria from sewage and ovine faeces in brackish and freshwater microcosms with contrasting suspended particulate matter concentrations. *Science of The Total Environment* 572:1645-1652.

124. Baquero F, Coque TM, Guerra-Pinto N, Galán JC, Jiménez-Lalana D, Tamames J, Pedrós-Alió C. 2022. The Influence of Coalescent Microbiotic Particles From Water and Soil on the Evolution and Spread of Antimicrobial Resistance. *Frontiers in Environmental Science* 10: fenvs.2022.824963
125. Kumar A, Pal D. 2018. Antibiotic resistance and wastewater: Correlation, impact and critical human health challenges. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 6:52-58.
126. Liang C, Wei D, Zhang S, Ren Q, Shi J, Liu L. 2021. Removal of antibiotic resistance genes from swine wastewater by membrane filtration treatment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 210:111885.
127. Lawler DF. 1986. Removing particles in water and wastewater. *Environmental Science and Technology* 20:856-861.
128. El-Kalliny AS, Abd-Elmaksoud S, El-Liethy MA, Abu Hashish HM, Abdel-Wahed MS, Hefny MM, Hamza IA. 2021. Efficacy of Cold Atmospheric Plasma Treatment on Chemical and Microbial Pollutants in Water. *ChemistrySelect* 6:3409-3416.
129. Gronowska-Szneler MA, Sawicki JM. 2014. Simple design criteria and efficiency of hydrodynamic vortex separators. *Water Science and Technology* 70:457-463.
130. Han M, Kim T-i, Kim J. 2007. Effects of floc and bubble size on the efficiency of the dissolved air flotation (DAF) process. *Water Science and Technology* 56:109-115.
131. Weber V, Kamika I, Momba MNB. 2021. Comparing the effect of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles on the ability of moderately halophilic bacteria to treat wastewater. *Scientific Reports* 11:16969.
132. Dheilly A, Soum-Soutéra E, Klein GL, Bazire A, Compère C, Haras D, Dufour A. 2010. Antibiofilm Activity of the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas* sp. Strain 3J6. *Applied and Environmental Microbiology* 76:3452-3461.
133. Behroozian S, Svensson SL, Li LY, Davies JE, Cossart PF. 2020. Broad-Spectrum Antimicrobial and Antibiofilm Activity of a Natural Clay Mineral from British Columbia, Canada. *mBio* 11:e02350-20.
134. Collignon P, Beggs JJ, Walsh TR, Gandra S, Laxminarayan R. 2018. Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: a univariate and multivariable analysis. *The Lancet Planetary Health* 2:e398-e405.
135. Graham DW, Knapp CW, Christensen BT, McCluskey S, Dolfing J. 2016. Appearance of beta-lactam Resistance Genes in Agricultural Soils and Clinical Isolates over the 20th Century. *Sci Rep* 6:21550.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. HOAL-Felder: Versuchsanordnung.	22
Tabelle 2. Standorte und Termine der Probenziehung.	26
Tabelle 3. Untersuchte TaqMan qPCR Targets.	29
Tabelle 4. 16S Sequenzierungsprimer (V3-V4 Region).	35
Tabelle 5. Temperaturprofil der spezifischen 16S PCR.	35
Tabelle 6. Temperaturprofil der Index-PCR.	36
Tabelle 7. Ampifikationsbedingungen für die TaqMan qPCR (LightCycler 480).	38
Tabelle 8. TaqMan qPCR Validierungsergebnisse für ARG und MGE Targets.	41
Tabelle 9. Fungizide und Antibiotika: Lösungsmittel und Arbeitskonzentrationen.	43
Tabelle 10. Modifizierte 16S NGS Primersequenzen.	46
Tabelle 11. <i>16S-rRNA</i> Gen-Kopienanzahl in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.	49
Tabelle 12. <i>Int1</i> und <i>ISPPs</i> in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.	52
Tabelle 13. <i>QacEdelta1</i> in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.	53
Tabelle 14. <i>AadA</i> , <i>nptII</i> , <i>nptIII</i> und <i>strB</i> in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.	55
Tabelle 15. <i>DfrA-1</i> in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.	58
Tabelle 16. <i>CmxA</i> in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.	59
Tabelle 17. <i>QnrS</i> in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.	60
Tabelle 18. <i>VanA</i> in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.	61
Tabelle 19. <i>ErmB</i> und <i>ermF</i> in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.	62
Tabelle 20. <i>Sat-4</i> in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.	64
Tabelle 21. <i>Mcr-1</i> in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.	65
Tabelle 22. <i>Sul1</i> in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.	67
Tabelle 23. <i>Tet(A)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(O)</i> u. <i>tet(W)</i> in HOAL-Bodenproben u. organischem Dünger.	69
Tabelle 24. <i>Bla_{OXA-10}</i> , <i>bla_{TEM-1}</i> , <i>mecA</i> in HOAL-Bodenproben u. organischem Dünger.	72
Tabelle 25. <i>16S rRNA</i> –Genkonzentrationen in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen u. urbanen Böden.	75
Tabelle 26. <i>Int1</i> und <i>ISPPs</i> in HOAL-Äckern, Donau-Auen und urbanen Böden.	77
Tabelle 27. <i>QacEdelta1</i> in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.	78
Tabelle 28. <i>AadA</i> , <i>nptII</i> , <i>nptIII</i> und <i>strB</i> in HOAL-Feldern, Donau-Auen und urbanen Böden.	81
Tabelle 29. <i>DfrA-1</i> in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.	82
Tabelle 30. <i>CmxA</i> in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.	83
Tabelle 31. <i>VanA</i> in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.	84
Tabelle 32. <i>ErmB</i> und <i>ermF</i> in HOAL-Äckern, Donau-Auen und urbanen Böden.	86
Tabelle 33. <i>Sat-4</i> in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.	87
Tabelle 34. <i>Mcr-1</i> in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.	88
Tabelle 35. <i>Sul1</i> in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.	90

Tabelle 36. <i>Tet(A)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(O)</i> , <i>tet(W)</i> in HOAL-Äckern, Donau-Auen und urbanen Böden.	92
Tabelle 37. <i>bla_{OXA-10}</i> , <i>bla_{TEM-1}</i> , <i>mecA</i> in HOAL-Äckern, Donau-Auen und urbanen Böden.	93
Tabelle 38. Zusammenfassung der ANOVA mit Post-Hoc Vergleichen nach Tukey.	154
Tabelle 39. Matrix: Probe mit Maximalwert für jedes Target in jedem HOAL-Feld.	156
Tabelle 40. Humanpathogene Taxa in MARGINS-I Proben.	182
Tabelle 41. Resistomap: untersuchte Proben und Kurzbezeichnungen.	186
Tabelle 42. Häufigkeit und Abundanz-Ranking und Verteilungstyp von 95 ARGs.	196
Tabelle 43. Proben zur Bakterienkultivierung und Bestimmung der Resistenzrate	201
Tabelle 44. Antibiotikaresistenzraten in Acker- und Waldbodenproben sowie Gülle.	201
Tabelle 45. Anzahl der isolierten Bakterien.	205
Tabelle 46. Untersuchte Antibiotika in Bodenproben, Gülle und Kot und ihre LOQs.	211
Tabelle 47. Antibiotika-Konzentrationen in Bodenproben, Gülle und Kot.	212
Tabelle 48. Untersuchte Antibiotika in HOAL-Wasserproben (inkl. LOQs und LODs).	214
Tabelle 49. Antibiotika-Konzentrationen in HOAL-Wasserproben.	215
Tabelle 50. Spearman Rang-Korrelationskoeffizienten für alle detektierten ARGs und alle Wetterparameter.	217
Tabelle 51. Spearman Korrelationskoeffizienten für alle detektierten ARGs und alle Bodenparameter.	219
Tabelle 52. Bodenparameter mit Auswirkung auf Resistenzgenkonzentrationen in Böden.	220
Tabelle 53. ARG-Konzentrationen in HOAL-Kot- und Gülleproben (TaqMan qPCR).	226
Tabelle 54. Parameter, die ARG-Mengen im Gülle-gedüngten Boden beeinflussen.	236

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Verbreitung von Antibiotika, antibiotikaresistenten Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen im globalen mikrobiellen Ökosystem.	18
Abbildung 2. HOAL: Beprobungsplan und durchgeführte Analysen.	24
Abbildung 3. HOAL Testgelände: Bodentypen und Probenahme in einem HOAL Feld.	31
Abbildung 4. Aufreinigungsprozess der Amplikons mittels AMPure XP Beads.	39
Abbildung 5. <i>16S rRNA</i> -Gene in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.	49
Abbildung 6. <i>Int11</i> und <i>ISPps</i> in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.	51
Abbildung 7. <i>QacEdelta1</i> in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.	53
Abbildung 8. <i>AadA</i> , <i>nptII</i> , <i>nptIII</i> und <i>strB</i> in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.	56
Abbildung 9. <i>DfrA-1</i> in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.	57
Abbildung 10. <i>CmxA</i> in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.	59
Abbildung 11. <i>QnrS</i> in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.	60
Abbildung 12. <i>VanA</i> in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.	61
Abbildung 13. <i>ErmB</i> und <i>ermF</i> in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.	63
Abbildung 14. <i>Sat-4</i> in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.	64
Abbildung 15. <i>Mcr-1</i> in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.	65
Abbildung 16. <i>Sul1</i> in HOAL-Bodenproben und organischem Dünger.	66
Abbildung 17. <i>Tet(A)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(O)</i> , <i>tet(W)</i> in HOAL-Bodenproben u. organischem Dünger.	68
Abbildung 18. <i>Bla_{OXA-10}</i> , <i>bla_{TEM-1}</i> und <i>mecA</i> in HOAL-Bodenproben u. org. Dünger.	71
Abbildung 19. Heatmap: 26 Targets in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen u. urbanen Böden.	74
Abbildung 20. <i>16S rRNA</i> -Gene in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen u. urbanen Böden.	75
Abbildung 21. <i>Int11</i> in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.	76
Abbildung 22. <i>ISPps</i> in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.	77
Abbildung 23. <i>QacEdelta1</i> in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.	78
Abbildung 24. <i>NptII</i> in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.	79
Abbildung 25. <i>NptIII</i> in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.	80
Abbildung 26. <i>StrB</i> in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.	81
Abbildung 27. <i>DfrA-1</i> in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.	82
Abbildung 28. <i>CmxA</i> in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.	83
Abbildung 29. <i>VanA</i> in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.	84
Abbildung 30. <i>ErmB</i> in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.	85
Abbildung 31. <i>ErmF</i> in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.	86
Abbildung 32. <i>Sat-4</i> in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.	87
Abbildung 33. <i>Mcr-1</i> in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.	88
Abbildung 34. <i>Sul1</i> in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.	89
Abbildung 35. <i>Tet(A)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(O)</i> und <i>tet(W)</i> in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.	91

Abbildung 36. <i>Bla</i> _{OXA-10} , <i>bla</i> _{TEM-1} und <i>mecA</i> in HOAL-Ackerböden, Donau-Auen und urbanen Böden.	94
Abbildung 37. <i>16S rRNA</i> -Gen Konzentrationen in den Donau-Auen im Sommer und Winter.	96
Abbildung 38. <i>Int1</i> in den Donau-Auen im Sommer und Winter.	97
Abbildung 39. <i>ISPPs</i> in den Donau-Auen im Sommer und Winter.	97
Abbildung 40. <i>AadA</i> -, <i>nptIII</i> , <i>nptII</i> und <i>strB</i> in den Donau-Auen im Sommer und Winter.	98
Abbildung 41. <i>VanA</i> in den Donau-Auen im Sommer und Winter.	99
Abbildung 42. <i>ErmB</i> in den Donau-Auen im Sommer und Winter.	100
Abbildung 43. <i>CmxA</i> in den Donau-Auen im Sommer und Winter.	101
Abbildung 44. <i>Sat-4</i> in den Donau-Auen im Sommer und Winter.	102
Abbildung 45. <i>Mcr-1</i> in den Donau-Auen im Sommer und Winter.	103
Abbildung 46. <i>Sul1</i> in den Donau-Auen im Sommer und Winter.	104
Abbildung 47. <i>Tet(A)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(O)</i> und <i>tet(W)</i> in den Donau-Auen im Sommer und Winter.	105
Abbildung 48. <i>Bla</i> _{TEM-1} in den Donau-Auen im Sommer und Winter.	106
Abbildung 49. <i>16S rRNA</i> -Gene in den urbanen Proben im Sommer und Winter.	108
Abbildung 50. <i>Int1</i> in den urbanen Proben im Sommer und Winter.	109
Abbildung 51. <i>ISPPs</i> in den urbanen Proben im Sommer und Winter.	110
Abbildung 52. <i>QacEdelta1</i> in den urbanen Proben im Sommer und Winter.	111
Abbildung 53. <i>AadA</i> , <i>nptII</i> , <i>nptIII</i> und <i>strB</i> in den urbanen Proben im Sommer und Winter.	112
Abbildung 54. <i>DfrA-1</i> in den urbanen Proben im Sommer und Winter.	113
Abbildung 55. <i>CmxA</i> in den urbanen Proben im Sommer und Winter.	114
Abbildung 56. <i>VanA</i> in den urbanen Proben im Sommer und Winter.	115
Abbildung 57. <i>ErmB</i> und <i>ermF</i> in den urbanen Proben im Sommer und Winter.	116
Abbildung 58. <i>Sat-4</i> in den urbanen Proben im Sommer und Winter.	117
Abbildung 59. <i>Mcr-1</i> in den urbanen Proben im Sommer und Winter.	118
Abbildung 60. <i>Sul1</i> in den urbanen Proben im Sommer und Winter.	119
Abbildung 61. <i>Tet(A)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(O)</i> und <i>tet(W)</i> in den urbanen im Sommer und Winter.	121
Abbildung 62. <i>Bla</i> _{TEM-1} in den urbanen Proben im Sommer und Winter.	122
Abbildung 63. <i>16S rRNA</i> -Gen Konzentrationen in österreichischen Nadelwäldern.	123
Abbildung 64. <i>Int1</i> in österreichischen Nadelwäldern.	124
Abbildung 65. <i>ISPPs</i> in österreichischen Nadelwäldern.	125
Abbildung 66. <i>DfrA-1</i> in österreichischen Nadelwäldern.	126
Abbildung 67. <i>CmxA</i> in österreichischen Nadelwäldern.	127
Abbildung 68. <i>VanA</i> in österreichischen Nadelwäldern.	128
Abbildung 69. <i>ErmB</i> in österreichischen Nadelwäldern.	129
Abbildung 70. <i>Mcr-1</i> in österreichischen Nadelwäldern.	130
Abbildung 71. <i>Sul1</i> in österreichischen Nadelwäldern.	131
Abbildung 72. <i>Tet(A)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(O)</i> und <i>tet(W)</i> in österreichischen Nadelwäldern.	132

Abbildung 73. <i>Bla</i> _{TEM-1} in österreichischen Nadelwäldern.	133
Abbildung 74. <i>16S rRNA</i> -Gene in Bach- und Drainage-Proben.	135
Abbildung 75. <i>Int1</i> in Bach- und Drainage-Proben.	136
Abbildung 76. <i>ISPs</i> in Bach- und Drainage-Proben.	137
Abbildung 77. <i>QacEdelta1</i> in Bach- und Drainage-Proben.	138
Abbildung 78. <i>AadA</i> , <i>nptIII</i> und <i>strB</i> in Bach- und Drainage-Proben.	139
Abbildung 79. <i>CmxA</i> in Bach- und Drainage-Proben.	140
Abbildung 80. <i>VanA</i> in Bach- und Drainage-Proben.	141
Abbildung 81. <i>ErmB</i> in Bach- und Drainage-Proben.	142
Abbildung 82. <i>Sat-4</i> in Bach- und Drainage-Proben.	143
Abbildung 83. <i>Mcr-1</i> in Bach- und Drainage-Proben.	144
Abbildung 84. <i>Sul1</i> in Bach- und Drainage-Proben.	145
Abbildung 85. <i>Tet(A)</i> , B) <i>tet(M)</i> , C) <i>tet(O)</i> und D) <i>tet(W)</i> in Bach- und Drainage-Proben.	147
Abbildung 86. <i>Bla</i> _{OXA-10} und <i>mecA</i> in Bach- und Drainage-Proben.	148
Abbildung 87. Bach- und Drainage: Anteil der Beprobungszeitpunkte mit positivem Ergebnis.	149
Abbildung 88. Heatmap: 26 Targets in HOAL Bodenproben und organischem Dünger.	151
Abbildung 89. HOAL-Flächen: Anteil der Probenahme-Zeitpunkte mit positivem Ergebnis.	153
Abbildung 90. Zeitliniendiagramm der Target-Abundanz für die HOAL-Flächen.	157
Abbildung 91. Zeitlinien der Target-Abundanz für die HOAL-Oberflächengewässer.	158
Abbildung 92. Detektierte Targets in HOAL-Bodenproben und Vergleichsstandorten.	161
Abbildung 93. Heatmap: 26 Targets in HOAL-Bodenproben und Vergleichsböden.	162
Abbildung 94. Abundanz der Targets in HOAL-Feldern und Vergleichsböden.	165
Abbildung 95. Korrelation der qPCR-Ergebnisse aus Composite- und Triangle-Proben.	166
Abbildung 96. Top 10 Phyla, Genera und Spezies in den verschiedenen Probenmatrices.	168
Abbildung 97. NMDS: Beta-Diversität in verschiedenen Proben-Matrices.	169
Abbildung 98. Alpha-Diversitäts-Indices für die verschiedenen Proben-Matrices.	170
Abbildung 99. Top 10 Phyla, Genera und Spezies je Probenentnahmeort.	171
Abbildung 100. Beta-Diversität der Proben nach Ursprungsort (Bray-Curtis NMDS-Plots).	172
Abbildung 101. Alpha-Diversitäts-Indices je Probenentnahmeort.	173
Abbildung 102. Gülle-assoziiertes Auftreten einzelner Genera.	176
Abbildung 103. NMDS: Beta-Diversität der HOAL-Proben nach Probenentnahmeort.	177
Abbildung 104. HOAL-Proben: Alpha-Diversitäts-Indices im statistischen Vergleich.	178
Abbildung 105. NMDS: Beta-Diversität der Proben nach Probenentnahmestellen.	179
Abbildung 106. Alpha-Diversitäts-Indices für HOAL-Felder, Donau-Auen u. urbane Proben.	180
Abbildung 107. Alpha-Diversitäts-Indices HOAL-Felder und Vergleichsboden-Gruppen.	181
Abbildung 108. Netzwerk-Analyse: Korrelationen zwischen ARGs und bakteriellen Genera.	183
Abbildung 109. Vorkommen der ARG-korrelierten Bakterien in den Vergleichsflächen.	184
Abbildung 110. Resistomap: relative Abundanz (ARG/16S) von 95 ARGs in 30 Proben.	188

Abbildung 111. Resistomap: Anzahl und Abundanz der detektierten ARGs.	189
Abbildung 112. Relative Abundanz der detektierten ARGs.	190
Abbildung 113. Umweltkompartimente: Gemeinsame und endemische ARGs.	191
Abbildung 114. Ähnlichkeit der ARG-Profile. Bray-Curtis Distanz.	192
Abbildung 115. Ähnlichkeit der Verteilungsprofile anhand der Bray-Curtis Distanz.	194
Abbildung 116. Relative Abundanz (ARG/16S) von zusätzlichen 48 ARGs in 12 Proben.	198
Abbildung 117. Screening auf 143 ARGs - Anzahl der detektierten ARGs.	199
Abbildung 118. Antibiotikaresistenzraten (%) auf Nutrient Agar und R2A.	204
Abbildung 119. Detektierte kultivierbare Genera.	206
Abbildung 120. Detektierte kultivierbare Spezies.	208
Abbildung 121. Ackerböden als Genaustauschplattformen im One Health-Konzept.	221
Abbildung 122. Ausbreitungswege von AR über Ökosystemgrenzen am Beispiel HOAL.	222
Abbildung 123. HOAL Testgelände (Foto aus (50); Blickrichtung nach Südosten).	224
Abbildung 124. ARG-Mengenverteilung im HOAL-Ackerboden vor (A) und nach (B) Gülleapplikation.	228
Abbildung 125. ARG-Mengenverteilung in Gülle (A) und einem nicht Gülle-gedüngten HOAL-Feld (B).	228
Abbildung 126. Gesamt-ARG-Konzentrationen in HOAL-Proben im Jahresverlauf.	229
Abbildung 127. In HOAL-Gülle und Gülle-gedüngten Feldern vorkommende Genera und Spezies.	231
Abbildung 128. Bakterientaxa (ASVs) - Vergleich des Feldes F31 mit der Schweinegülle.	233
Abbildung 129. Treiber ARG-Konzentrationen in Gülle-gedüngten Böden.	235

Abkürzungen

AMR	Antimikrobielle Resistenz
ANOVA	Analysis of variance, Varianzanalyse
AR	Antibiotikaresistenz
ARB	Antibiotikaresistente Bakterien
ARG	Antibiotikaresistenzgen
ASV	Amplikon Sequenz Variante
CARD	Comprehensive Antibiotic Resistance Database
Conda Paket	Kommandozeilentool und Paketverwaltung für beliebige Programmiersprachen
Cp	Crossing point; Synonym für Ct-Wert (Roche/LightCycler-spezifische Diktion)
Ct	Cycle threshold; qPCR-Zyklus, ab dem die Zielsequenz zu einem positiven Signal führt
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelsträngige DNA
HOAL	Hydrological Open Air Laboratory in Petzenkirchen, Niederösterreich
K/g TB	Kopien pro Gramm Trockengewicht Boden
K/LW	Kopien pro Liter Wasser
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie
LOD	Limit of detection; Nachweisgrenze
LOQ	Limit of quantification; Bestimmungsgrenze
MGE	Mobiles genetisches Element
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MSC	Minimal selektive Konzentration
MSC	Minimal selektive Konzentration
NMDS	Non-metric multidimensional scaling
o.Ä.	oder Ähnliches
OTU	Operational taxonomic unit
PNEC	Predicted no effect concentration
qPCR	Quantitative PCR

rpm	Umdrehungen pro Minute (Zentrifugation)
SOC	Soil organic carbon
TOC	Total organic carbon; Bodenparameter
u.A.	unter Anderem
WHO	World Health Organization
ZAMG	Zentralanstalt für Meteorologie und Geodynamik

Projektnehmer

AGES – Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit

Department für Integrative Risikobewertung/Daten-Statistik-Risikobewertung (DSR)

Adresse: Spargelfeldstrasse 191, A-1220 Wien

www.ages.at