

Hochschule Rhein-Waal

Analyse der potentiellen Transferpfade von  
Antibiotikaresistenzen aus der Umwelt in den Haushalt und  
Entwicklung von Verbraucherempfehlungen

Abschlussbericht über ein Förderprojekt,  
gefördert unter dem Az: 34632/01 von der  
Deutschen Bundesstiftung Umwelt

Projektbeginn: 17.12.2018

Laufzeit: 2,5 Jahre

Verlängerung bis 16.02.2022

Von

Prof. Dr. Dirk Bockmühl, Laura Schages und Thomas Tewes

Kleve, Februar 2022

**Projektkennblatt**  
der  
**Deutschen Bundesstiftung Umwelt**

Az **34632/01**Referat **36**

Fördersumme

**123.950 €**

**Antragstitel** **Analyse der potentiellen Transferpfade von Antibiotikaresistenzen aus der Umwelt in den Haushalt und Entwicklung von Verbraucherempfehlungen**

**Stichworte**

Laufzeit

**2,5 Jahre**

Projektbeginn

**17.12.2018**

Projektende

**16.02.2022**

Projektphase(n)

Zwischenberichte

April 2020

Juli 2021

**Bewilligungsempfänger**

Hochschule Rhein-Waal  
Präsident  
Herr Dr. Oliver Locker-Grütjen  
Marie-Curie-Str. 1  
47533 Kleve

Tel 02821 80673 208

Fax 02821 8067344208

Projektleitung

Prof. Dr. Dirk Bockmühl

Bearbeiter

Laura Schages, Thomas Tewes

**Kooperationspartner**

Dr. Florian Wichern, AG Bodenkunde und Pflanzenernährung, Hochschule Rhein-Waal, 47533 Kleve  
Dr. Stefanie Wieck, Umweltbundesamt, 06844 Dessau-Roßlau  
Dr. Jürgen Harlizius, Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen, 59505 Bad Sassendorf  
Philip Heldt, Verbraucherzentrale Nordrhein-Westfalen, 40215 Düsseldorf  
Dr. André Frontzek, Medizinisches Versorgungszentrum Dr. Stein + Kollegen, 41169 Mönchengladbach

**Zielsetzung und Anlass des Vorhabens**

Ein bislang vernachlässigter Bereich im Zusammenhang mit Antibiotikaresistenzen ist das häusliche Umfeld, obwohl diesem durch den Umgang mit Lebensmitteln, die mit der medizinisch und landwirtschaftlich bedingten Problematik der Antibiotikanutzung in Verbindung stehen, eine zentrale Rolle zukommt. Wasserführende Systeme (Abflüsse, Geschirrspüler, Waschmaschinen) spielen eine bislang unterschätzte Rolle. Die Analyse der möglichen Transferpfade von Antibiotikaresistenzen im häuslichen Umfeld kann helfen, die möglichen Risiken des Transfers innerhalb des Haushalts und aus dem Haushalt in die Umwelt abzuschätzen. Es soll ein vertieftes Wissen über Transferpfade erlangt werden, welches abschließend als Projektergebnis Verbrauchern und anderen Beteiligten zugänglich gemacht werden soll.

**Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden**

Im ersten Teil des Projekts erfolgte die Identifizierung von Resistenzgenen in Haushaltsproben (Waschmaschine, Duschsiphon und Geschirrspüler). Anschließend wurde die DNA aus den Proben extrahiert und mittels Real-Time PCR zum Nachweis von Resistenzgenen untersucht. Zudem wurden die Proben mit niedrigen Antibiotikakonzentrationen kultiviert, um so resistente bakterielle Spezies zu isolieren. Die-se Isolate wurden mittels VITEK 2 identifiziert und Resistenzprofile wurden erstellt. Die auftretenden antibiotikaresistenten Bakterien und Resistenzgene wurden anschließend mit denen aus Umweltproben, basierend auf Literaturdaten und bereits genommenen Proben, verglichen, um mögliche Hotspots im Haushalt identifizieren zu können. Um die potentiellen Transferpfade von Antibiotikaresistenzen bestimmen zu können, wurden neben dem Vergleich der auftretenden Resistenzgene Metagenomanalysen der Proben aus Haushalten und Umwelt (Boden und Kläranlage) durchgeführt. Diese ermöglichen es, die gesamte genetische Information aller Organismen in einer Probe zu analysieren und Übereinstimmungen zwischen den Habitaten zu ermitteln, wodurch Rückschlüsse auf einen Transfer der Antibiotikaresistenzen möglich sind. Im Zuge der anwendungsbezogenen Versuche in Waschmaschinen und Geschirrspülern wurden bereits charakterisierte, resistente Laborstämme bzw. im Rahmen des Projekts isolierte Bakterienstämme verwendet, um den Effekt der Bedingungen auf antibiotikaresistente Bakterien zu bestimmen. Basierend auf der systematischen Analyse der Ergebnisse wurden Handlungsempfehlungen zur Vermeidung/Reduktion von antibiotikaresistenten Bakterien entwickelt.

## **Ergebnisse und Diskussion**

Es wurden verschiedene Umgebungen derselben geografischen Region untersucht, um potenzielle Übertragungswege von antibiotikaresistenten Bakterien mit besonderem Fokus auf Privathaushalte zu untersuchen. Kläranlagen konnten als Hotspots für Antibiotikaresistenzen bestätigt werden. Antibiotikaresistenzgene und antibiotikaresistente Bakterien traten in Privathaushalten häufig auf, somit könnte die häusliche Umgebung auch als Reservoir für Antibiotikaresistenzen fungieren.

Die Resistenzgene und antibiotikaresistente Bakterienstämme im Haushalt weisen zum Teil die gleichen Spezies und Gene auf, die auch in der Kläranlage auftreten. Der Anteil an Resistenzen im Haushalt ist im Vergleich zu Abwasser und Klärschlamm jedoch deutlich geringer. Intrinsisch resistente Spezies sind im Haushalt stärker vertreten als im untersuchten Abwasser und Klärschlamm. Obwohl die intrinsischen Resistenzen von Natur aus bestehen, sind auch Infektionen durch solche Mikroorganismen von Bedeutung. Im Abwasser, Klärschlamm und Ablauf variieren die identifizierten bakteriellen Spezies nur geringfügig, während die Variation in den verschiedenen Haushaltsbereichen stärker ist. Der Eintrag von Mikroorganismen aus dem Haushalt in das Klärwerk und umgekehrt könnte möglich sein, da die gleichen Umweltbakterien in den jeweiligen Habitaten überleben. Die unterschiedlichen bakteriellen Zusammensetzungen und Resistome von Böden, Kläranlagen und Haushalten zeigen jedoch, dass, obwohl eine häufige Entwicklung mobiler Resistenzgene wahrscheinlich ist, nur wenige zwischen unterschiedlichen bakteriellen Gemeinschaften übertragen werden oder sich dort etablieren. Die durchgeführte Metagenomanalyse der verschiedenen Habitate zeigt, dass es charakteristische Resistome gibt und nur wenige Überschneidungen von Antibiotikaresistenzgenen zwischen den untersuchten Gebieten. Dies deutet darauf hin, dass sich Antibiotikaresistenzen vorwiegend in den jeweiligen Umgebungen entwickeln könnten, verursacht durch die unterschiedlichen Umweltbedingungen.

Die praxisnahen Versuche bei Wasch- und Spülmaschine zeigen, dass es keinen signifikanten Unterschied bei der Reduktion der mikrobiellen Belastung von antibiotikaresistenten Bakterien und nicht resistenten Stämmen gibt. Die Versuche für Waschmaschinen untermauern die Wichtigkeit der Anwendung von heißen Programmen (60 °C) und das Verwenden von bleichehaltigen Waschmitteln. Beim maschinellen Geschirrspülen sind die Keimzahlreduktionen höher als bei den Waschmaschinenversuchen. Die Ergebnisse der anwendungsbezogenen Versuche ermöglichten es fundierte Verbraucherempfehlungen für das Waschen und Geschirrspülen zu formulieren.

## **Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation**

Die Daten zu Antibiotikaresistenzen wurden im November 2020 in einem Peer-Review-Journal veröffentlicht und es wurde auf das laufende Projekt im HN21 Journal 2019 aufmerksam gemacht. Die Ergebnisse der Metagenomanalyse wurden im Mai 2021 ebenfalls in einem Peer-Review-Journal veröffentlicht. Auch eine Ende 2020 veröffentlichte Dissertation enthält entsprechende Resultate. Basierend auf den Ergebnissen wurden konkrete Verbraucherempfehlungen formuliert, welche in Kooperation mit dem „Forum Waschen“ der Öffentlichkeit zugänglich gemacht werden, in Form von Internetinformationen und einem Vortrag auf der Multiplikatorentagung im März 2022.

## **Fazit**

Die Studie liefert Hinweise darauf, dass die Übertragung von Antibiotikaresistenzen und antibiotikaresistenten Bakterien zwischen verschiedenen Umgebungen weniger wichtig sein könnte als der Fokus auf die Umsetzung von Präventionsmaßnahmen in jeder einzelnen Umgebung. Während die Metagenomstudie einen guten ersten Überblick ermöglicht, sind weitere Studien mit einer größeren Probenzahl und einer tiefgreifenden Analyse der gemeinsam genutzten Gene erforderlich. Die Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen kann begrenzt werden, indem die Entwicklung von Resistenzen in der Haushaltsumgebung reduziert wird, um ein geringes, aber dennoch mögliches Infektionsrisiko für Haushaltsmitglieder und eine Verbreitung innerhalb des Haushalts oder über häusliches Abwasser zur Kläranlage zu verhindern. Ein möglicher Transfer von Antibiotikarückständen und resistenten Bakterien aus der Kläranlage in die Umwelt sollte vermieden werden, um die Förderung der Resistenzentwicklung zu unterbinden. Dies könnte durch den Einsatz fortschrittlicher Technologien bei der Abwasserbehandlung und die Vermeidung der Verwendung von behandeltem Abwasser zur Düngung und Bewässerung erreicht werden. Es sind umfassendere Studien erforderlich, um die Resistome verschiedener Umgebungen zu vergleichen und um zu bestätigen, ob sich Antibiotikaresistenzen unabhängig in jeder Umgebung entwickeln. Basierend auf den erhobenen Daten sollten quantitative Analysen durchgeführt werden, um die Bedeutung der Unterschiede zwischen den analysierten Umgebungen weiter herauszuarbeiten.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Projektkennblatt</b> .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis .....	VI
Zusammenfassung .....	VII
1. Einleitung .....	1
1.1 Zielsetzung.....	2
1.2 Kooperationspartner .....	3
2. Methodik und Vorgehensweise .....	4
2.1 Analyse des IST-Zustandes .....	4
2.2 ABR im häuslichen Umfeld.....	6
2.3 Analyse der potentiellen Transferpfade.....	7
2.4 Modell zum Einfluss der gegebenen Bedingungen in Haushaltsgeräten.....	7
2.5 Formulierung von Verbraucherempfehlungen .....	8
3. Ergebnisse und Diskussion .....	9
3.1 Antibiotikaresistenzen im Haushalt .....	9
3.1.1 Antibiotika-Resistenzgene im Haushalt.....	9
3.1.2 Resistente bakterielle Spezies im Haushalt.....	12
3.2 Vergleich des Auftretens von Resistenzgenen in Haushalt und Klärwerk .....	16
3.3 Vergleich von Haushalten mit anderen Habitaten.....	18
3.3.1 Vergleich der bakteriellen Gemeinschaft .....	18
3.3.2 Vergleich der Antibiotikaresistenzen.....	20
3.4 Einfluss von Waschprozessen auf antibiotikaresistente Bakterien .....	24
3.4.1 Einfluss der Bedingungen in Waschmaschinen.....	24
3.4.2 Einfluss der Bedingungen in Geschirrspülern .....	27
3.5 Verbraucherempfehlungen .....	29
3.5.1 Empfehlungen für die Dusche.....	29
3.5.2 Empfehlungen für die Textilreinigung .....	29
3.5.3 Empfehlungen für das Geschirrspülen .....	30
4. Öffentlichkeitsarbeit/Veröffentlichungen/Vorträge .....	31
5. Fazit und Ausblick .....	31
6. Literaturverzeichnis .....	34

# Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Absolute **(a)** und relative **(b)** Häufigkeit der ARG in Haushaltsproben (n=152). Die Mittelwerte von je zwei Wiederholungen sind als logarithmierte Werte dargestellt. Die Gengruppen setzen sich wie folgt zusammen. Total OXA: bla<sub>OXA-58</sub> und bla<sub>OXA-23</sub>, total Carba: bla<sub>OXA-48</sub>, bla<sub>GES</sub>, bla<sub>KPC</sub> und bla<sub>VIM</sub>, total ampC: bla<sub>CMY-2</sub>, bla<sub>FOX</sub>, bla<sub>ACT/MIR</sub> und bla<sub>DHA</sub> und total CTX-M: bla<sub>CTX-M-1</sub> und bla<sub>CTX-M-9</sub>. Proben ohne ARG (rel. Häufigkeit=0) sind in **(b)** als -10 dargestellt. Signifikante Unterschiede ( $p \leq 0.05$ ) wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse bestimmt..... 10
- Abbildung 2:** Korrelation von Beta-Laktamase Genen in Duschsiphons **(A)** und Geschirrspülern **(B)**. Rot kennzeichnet eine starke positive Korrelation während blau eine starke negative Korrelation darstellt. Eine Korrelation mit  $r \geq 0.3$  gilt als statistisch signifikant. Die Beta-Laktamase Gene in Waschmaschinen zeigten keine signifikanten Korrelationen.<sup>41</sup> ..... 12
- Abbildung 3:** Prozentualer Anteil von Beta-Laktam resistenten bakteriellen Spezies **(a)** und Beta-Laktamase-Genen, die in Bakterienisolaten aus Duschsiphons, Waschmaschinen und Geschirrspülern isoliert wurden **(b)**. die Resistenzen und ESBL-Phänotypen wurden mittels VITEK 2 System ermittelt während die Klassifizierung von MDR-Bakterien nach internationalen Empfehlungen erfolgte. Signifikante Unterschiede ( $p \leq 0.05$ ) wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse bestimmt. .... 14
- Abbildung 4:** Spearman-Korrelation ( $p \leq 0.05$ ) von ARG (Carbapenemase-Gene: bla<sub>OXA-58</sub>, bla<sub>OXA-23</sub>, bla<sub>OXA-48</sub>, bla<sub>GES</sub>, bla<sub>KPC</sub> und bla<sub>VIM</sub>, ampC-Gene: bla<sub>CMY-2</sub>, bla<sub>FOX</sub>, bla<sub>ACT/MIR</sub> und bla<sub>DHA</sub> and CTX-M-Gene: bla<sub>CTX-M-1</sub> und bla<sub>CTX-M-9</sub>) mit phänotypischer Resistenz (gegen Piperacillin/Tazobactam (PIP/TAZ), Carbapeneme (Imipenem und/oder Meropenem (IPM/MEM)) und Cephalosporine (Ceftazidim und/oder Cefotaxim (CAZ/CTX)) der untersuchten Isolate aus Haushalten.<sup>41</sup> ..... 15
- Abbildung 5:** Vergleich der Häufigkeit des Klasse 1 Integrons **(a, intl1)** und der Antibiotika-Resistenzgene **(b, absolute Häufigkeit)** in Haushalt- und Klärwerkproben. Die Mittelwerte sind dargestellt und signifikant höhere Werte mit einem \* markiert ( $p \leq 0.05$ ). ..... 17
- Abbildung 6:** Hauptkomponentenanalyse der Betadiversität (Bray-Curtis-Index) von Haushalts- (n=6), Boden- (n=12) und Kläranlagenproben (n=13). Unit variance scaling und der NIPALS-Algorithmus (Nonlinear Iterative Partial Least Squares) wurde benutzt um die Hauptkomponenten zu berechnen. Die X- und Y-Achse zeigen Hauptkomponente 1 und 2, die 47,7% bzw. 27,0% der Gesamtvarianz erklären.<sup>52</sup> ..... 19
- Abbildung 7:** Relative Zusammensetzung der Antibiotikaresistenzfaktoren in Boden- (B1 (n=4), B2 (n=4), B3 (n=4)) (a), Klärwerk- (KZ (n=4), KS (n=5), KA (n=4)) und Haushaltsproben (DS (n=1), GS (n=1), WM (n=4)). Die DNA-Sequenzen wurden mit der mikrobiellen Virulenzdatenbank (MvirDB) abgeglichen.<sup>52</sup> ..... 20
- Abbildung 8:** Verhältnis von ARG (a) und MGE (b) pro bakterieller Spezies in verschiedener Böden (B1, B2, B3, jeweils n=4), Klärwerkzulauf (KZ, n=4), Klärschlamm (KS, n=5), Klärwerkablauf (KA, n=4) und Haushaltsproben (HH, n=6). Verschiedene Buchstaben weisen auf signifikante Unterschiede hin, die mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test berechnet wurden ( $p \leq 0.05$ ).<sup>52</sup> ..... 21
- Abbildung 9:** Hauptkomponentenanalyse auf der Grundlage der Spearman-Korrelation der Antibiotikaresistenzfaktoren. Unit variance scaling und der NIPALS-Algorithmus (Nonlinear Iterative Partial Least Squares) wurde benutzt um die Hauptkomponenten zu berechnen. Die X- und Y-Achse zeigen Hauptkomponente 1 und 2, die 57,2% bzw. 21% der Gesamtvarianz erklären.<sup>52</sup> ..... 22
- Abbildung 10:** Venn-Diagramm von Antibiotikaresistenzgenen (ARGs) (a) und mobilen genetischen Elementen (MGEs) (b) in Kläranlagen-, Boden- und Haushaltsproben. Die Zahl in der Klammer gibt die Gesamtzahl der für jeden Probenotyp annotierten Gene an.<sup>52</sup> ..... 23
- Abbildung 11:** Einfluss des Hauptwaschgangs (a) und des Spülgangs (b) des Waschprozesses simuliert in der Rotawash auf nicht-resistente und resistente Stämme von E. coli,

K .pneumoniae und S. aureus. Die Mittelwerte mit Standardfehler (n=3) sind dargestellt ( $p \leq 0.05$ ). .....	25
<b>Abbildung 12:</b> Kreuzkontamination aller Waschgänge in KbE/mL (Kolonienbildende Einheiten/mL). Während die Kreuzkontamination unabhängig von der Spezies ermittelt wurde, wurden mittels Selektivmedien zusätzlich die Kreuzkontamination mit ESBL K. pneumoniae und CPE E. coli ermittelt. ....	26
<b>Abbildung 13:</b> Einfluss eines Geschirrspülers auf nicht-resistente und resistente Stämme von E. coli, K .pneumoniae und S. aureus mit (a) und ohne (b) Geschirrspülmittel. Die Mittelwerte mit Standardfehler (n=6) sind dargestellt. Nicht-parametrischer Mann-Whitney Test zeigte keine signifikanten Unterschiede. ....	28
<b>Abbildung 14:</b> Mögliche Transferpfade von Antibiotikaresistenzen zwischen verschiedenen Umgebungen. Rote Pfeile stellen die untersuchten Routen dar und gestrichelte Linien markieren die begrenzte Übertragung. <sup>52</sup> .....	32

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Übersicht der verwendeten Beta-Laktam-Antibiotika zur Isolierung von resistenten bakteriellen Spezies. ....	5
<b>Tabelle 2:</b> Übersicht der zu betrachtenden Resistenzgene und deren hydrolytische Aktivität. ....	5
<b>Tabelle 3:</b> Überblick über die Eigenschaften der beprobten Haushalte, die in der Studie analysiert wurden. Das Alter der Kinder wurde in den Kategorien der Altersgruppen nicht berücksichtigt. ....	9
<b>Tabelle 4:</b> Auftreten von Beta-Laktamase (bla) Genen in Duschsiphons (n=54), Waschmaschinen (n=54) und Geschirrspülern (n=44). ....	11
<b>Tabelle 5:</b> Bakterielle Spezies isoliert aus Duschsiphons, Waschmaschinen und Geschirrspülern mit niedrigen Antibiotikakonzentrationen. Die Gruppe „Sonstige“ umfasst die folgenden Spezies: Achromobacter denitrificans, Achromobacter xyloxidans, Brevundimonas diminuta, Chryseobacterium indologenes, Delftia acidovorans, Ochrobactrum anthropi, Roseomonas gilardii, Shewanella putrefaciens, Sphingomonas paucimobilis. ....	13

# Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µL	Mikroliter
ABR	Antibiotikaresistenz
ARG	Antibiotika-Resistenzgene
BAC	Benzalkoniumchlorid
<i>bla</i>	Beta-Laktamase
CPE	Carbapenemase-produzierende <i>Enterobacteriaceae</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ESBL	Extended-Spectrum-Beta-Laktamase
<i>et al.</i>	(lat.) und andere
<i>int1</i>	Klasse 1 Integron-Integrase-Gen
<i>MCR</i>	Mobile Colistin-Resistenz
MGE	Mobile genetische Elemente
MRGN	Multiresistente Gramnegative
RG	Resistenzgene
sp.	<i>Species</i>
spp.	<i>Species pluralis</i>
TSA	Trypton-Soja-Agar
TSB	Trypton-Soja-Boullion

# Zusammenfassung

Im Rahmen eines Projektes der Hochschule Rhein-Waal erfolgt die Analyse von Antibiotikaresistenzen im Haushalt im Vergleich zu Umweltkompartimenten mit dem Ziel, Empfehlungen und präventive Maßnahmen zur Vermeidung bzw. Reduktion von antibiotikaresistenten Bakterien im Haushalt für Verbraucher zu entwickeln. Das Projekt wird von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt unter dem Aktenzeichen 34632/01 gefördert.

Um die Relevanz von Antibiotikaresistenzen im Haushalt zu ermitteln, erfolgt zunächst eine Analyse des IST-Zustands. Anschließend soll durch die Charakterisierung von antibiotikaresistenten Bakterien und Resistenzgenen in der Haushaltsumgebung und den Vergleich mit Umweltkompartimenten die Bedeutung des Haushalts bei der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen besser verstanden werden. Dabei sollen vor allem Gene, die eine Resistenz gegenüber Beta-Laktamen und Colistin (Polymyxin E) vermitteln, betrachtet werden, da diese Antibiotika als Reserveantibiotika gelten und eine Resistenz demnach von besonderer Bedeutung ist. Durch das vorrangige Auftreten dieser Resistenzmechanismen bei gramnegativen Spezies wird dabei ein besonderer Fokus auf multiresistente gramnegative Bakterien (MRGN) gesetzt. Zudem erfolgt die Untersuchung des Einflusses der gegebenen Umweltbedingungen in Haushaltsgeräten auf antibiotikaresistente Bakterienstämme.

Die Ergebnisse zeigen, dass Resistenzgene und resistente bakterielle Spezies auch im häuslichen Umfeld auftreten. Obwohl deren Anteil im Vergleich zu Proben aus einem Klärwerk geringer ausfällt, konnten die gleichen Antibiotika-Resistenzgene und Bakterienspezies nachgewiesen werden. Ein Transfer von resistenten Spezies aus dem Haushalt in das Klärwerk und umgekehrt könnte demnach möglich sein, da die gleichen Umweltbakterien in den jeweiligen Habitaten überleben.

Die durchgeführte Metagenomanalyse weist jedoch darauf hin, dass sich Antibiotikaresistenzen (ABR), aufgrund der unterschiedlichen Umweltbedingungen, vorrangig unabhängig voneinander in den jeweiligen Umgebungen entwickeln könnten. Die Übertragung von ABR zwischen den verschiedenen Habitaten ist eher auf direkt verbundene Umgebungen beschränkt, etwa vom Haushalt zur Kläranlage. Die untersuchten Bereiche zeigten unterschiedliche bakterielle Gemeinschaften mit ausgeprägten Unterschieden zwischen den Teilumgebungen innerhalb der Kläranlage und in den Haushalten, was die Hypothese unterstützt, dass Resistome vorwiegend durch die bakterielle Phylogenie strukturiert sind. Daher liefert unsere Studie Hinweise darauf, dass die Übertragung von Antibiotikaresistenzgenen (ARG) und antibiotikaresistenten Bakterien zwischen verschiedenen Umgebungen weniger wichtig sein könnte als die Konzentration auf die Umsetzung von Präventionsmaßnahmen in jeder einzelnen Umgebung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit ermöglichen die Formulierung von präventiven Maßnahmen zur Minimierung der Risiken für Mensch, Tier und Umwelt (One-Health). Basierend auf der Ergebnisanalyse werden Onlineinformationen bereitgestellt, die Empfehlungen und präventive Maßnahmen für Verbraucher enthalten, mit besonderem Fokus auf zu verwendende Programme für



Wasch- bzw. Reinigungsmittel, und die über Plattformen des „Forum Waschen“ oder der Verbraucherzentrale NRW zugänglich gemacht werden sollen. Die Ergebnisse des Projekts können außerdem dabei helfen, Ansatzpunkte für neue Technologien und Maßnahmen zu liefern und somit einen direkten Beitrag zur Umweltentlastung und dem Verbraucherschutz leisten.

# 1. Einleitung

Antibiotika wie Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme sind wertvolle Hilfsmittel und unerlässlich im Kampf gegen humanpathogene Bakterien. Um ihre Wirksamkeit zu wahren und die potenzielle Antibiotikakrise zu vermeiden<sup>1</sup>, bedarf es einer Reduzierung der Resistenzentwicklung bei humanpathogenen Bakterien. Durch den unsachgemäßen und übermäßigen Einsatz von Antibiotika entstehen resistente Spezies, die gegenüber antibiotikasensitiven Bakterien Selektionsvorteile besitzen<sup>2,3</sup>. Während sich ein breites Spektrum an Studien mit Antibiotikaresistenzen im klinischen Bereich beschäftigt hat, ist die aktuelle Datenlage über das Vorkommen, die Verbreitung und Arten von Antibiotikaresistenzen in anderen Bereichen sowie die damit verbundenen Risiken für Mensch, Tier und Umwelt allerdings verhältnismäßig gering und fragmentiert<sup>4,5</sup>. Zwar wurde bereits eine Vielzahl an Studien zum Auftreten von ABR im Boden, in Kläranlagen und in Lebensmitteln durchgeführt<sup>4,6-16</sup>, jedoch wurde das häusliche Umfeld in diesem Zusammenhang bisher vernachlässigt, auf dem im Projekt der Fokus liegt.

Aus der Literatur geht hervor, dass Antibiotika-Resistenzgene (ARG) in der Umgebung und in Beständen der Nutztierhaltung, im Boden, in Haustieren, in Haushaltsgeräten sowie in tierischen und pflanzlichen Lebensmitteln auftreten<sup>13,14,17-24</sup>. Demnach birgt die Resistenzentwicklung nicht nur Risiken im klinischen Bereich bei der Antibiotikatherapie, sondern kann auch direkte nachteilige Folgen durch den Eintrag in Haushalt und Umwelt für die Verbraucher- und Tiergesundheit haben<sup>25</sup>. Diese Studien legen nahe, dass ARG möglicherweise durch Lebensmittel oder auf der Haut von Menschen in den Haushalt gelangen. Darüber hinaus ist auch die Entstehung von Antibiotikaresistenzen im Haushalt vorstellbar, wenn Antibiotika ohne bzw. abweichend von der ärztlichen Verordnung eingenommen werden. Schließlich könnten Haushaltsgeräte auch beim Austrag von antibiotikaresistenten Bakterien und extrazellulären Resistenzgenen eine Rolle spielen, da deren Grauwasser als wichtige Komponente des häuslichen Abwassers berücksichtigt werden muss. Es ist durch zahlreiche Studien belegt, dass Abwasser zum einen Antibiotikarückstände und zum anderen eine Vielzahl von ARG enthält, wodurch resistente Bakterienstämme selektiert und ARG verstärkt verbreitet werden können<sup>10,26-29</sup>. Obwohl Antibiotikaresistenzen (ABR) in Teilen einen natürlichen Mechanismus in Umweltmedien (Böden, Abwasser, Klärschlamm, Biofilmen) darstellen<sup>20,21</sup>, wird das Resistenzreservoir (Resistom) der Umwelt durch die vermehrte Exposition von Bakterien mit Antibiotika stark verändert und einem Selektionsdruck ausgesetzt, der die Entstehung von neuen Resistenzgenen begünstigt und auch in der Zunahme von Resistenzen in klinisch relevanten Erregern resultieren kann<sup>22</sup>. Durch den komplexen Zusammenhang von Mensch, Tier, Umwelt und Gesundheit wird ein ganzheitlicher Ansatz benötigt, um Umwelt- und Gesundheitsproblemen entgegenzuwirken (One-Health-Ansatz)<sup>25</sup>. Dabei wurde das häusliche Umfeld jedoch bislang kaum beachtet, denn trotz der hohen Abundanz von ABR in der Umwelt erfolgte bisher keine Berücksichtigung des Haushalts als potentieller Transferpfad zwischen Umwelt und Haushalt. Die Erfassung der Verbreitung von ARG in Umwelt- und Haushaltsproben könnte

jedoch helfen, die Übertragungswege von Resistenzen und die damit verbundenen Risiken zu ergründen.

Die Übertragung von Resistenzen kann zur Entstehung von multiresistenten Erregern führen, die bei nosokomialen Infektionen eine besondere Herausforderung darstellen, da verschiedene Antibiotikaklassen ihre Wirksamkeit verlieren. In diesem Zusammenhang ist insbesondere das häusliche Umfeld relevant, da nicht nur die Übertragung von antibiotikaresistenten Bakterien in Krankenhäusern, häufig über Patienten, Besucher und Mitarbeiter erfolgt, sondern im Haushalt auch mehr und mehr gefährdete Personengruppen zu finden sind (*n.b.* häusliche Pflege)<sup>30</sup>. Zudem gewinnen resistente Umweltkeime zunehmend an Bedeutung, sodass auch deren mögliche Quellen besser untersucht werden müssen. In diesem Zusammenhang spielen wasserführende Systeme (Abflüsse, Geschirrspüler, Waschmaschinen) eine bislang unterschätzte, aber möglicherweise wichtige Rolle. Dies verdeutlicht auch eine Studie von Schmithausen *et al.* (2019), die die Übertragung eines Extended-Spectrum-Beta-Laktamase bildenden *Klebsiella oxytoca*-Stamms aus einer Waschmaschine auf die Kleidung für Säuglinge einer Säuglingsstation nachweisen konnten<sup>31</sup>. Aus Gründen der Energieeffizienz ist es außerdem gewünscht, die Waschttemperaturen so weit wie möglich abzusenken. Die Temperatur stellt jedoch eine wichtige Maßnahme dar, um in der Wäsche vorhandene Keime<sup>32</sup> inklusiver potentiell resistenter Spezies zu inaktivieren. Daher kann eine Analyse der möglichen Transferpfade von ABR im häuslichen Umfeld helfen, die möglichen Risiken des Transfers aus dem Haushalt abzuschätzen und auch bei umweltschonenden Niedrigtemperaturverfahren in Waschmaschinen und Geschirrspülern eine hygienische Sicherheit gewährleisten zu können.

## 1.1 Zielsetzung

Ziel dieses Projektes war es daher, das häusliche Umfeld und insbesondere Haushaltsgeräte wie Waschmaschinen und Geschirrspüler als mögliche Schnittstelle beim Transfer von ABR näher zu untersuchen und dadurch ein vertieftes Wissen über Transferpfade zu erlangen, das abschließend als Projektergebnis Verbrauchern und anderen Beteiligten zugänglich gemacht werden soll.

Daher wurde das Auftreten von Resistenzen gegenüber Reserveantibiotika (Beta-Laktame und Colistin) im häuslichen Umfeld (in Waschmaschinen, Geschirrspülern und Duschsiphons) analysiert. Beispielhaft wurden dazu 54 Verbraucherhaushalte betrachtet, um gegebenenfalls Hotspots im häuslichen Umfeld und potentielle Transferpfade von ABR zwischen Haushalt und Umwelt zu identifizieren. Die gefundenen Resistenzgene wurden anschließend mit Literaturdaten bzw. bereits vorhandenen Ergebnissen zu Resistenzen in der Umwelt verglichen. Des Weiteren wurde mittels genetischer Analysen (Metagenomanalysen) der Haushalts- sowie von Klärwerk- und Bodenproben die potentiellen Transferpfade analysiert und die Bedeutung des häuslichen Umfelds bei der Verbreitung von ABR ermittelt. Darüber hinaus wurde mithilfe anwendungsbezogener Versuche der Effekt der gegebenen Bedingungen in Haushaltsgeräten auf antibiotikaresistente Bakterienstämme

überprüft, um so präventive Maßnahmen formulieren zu können. Basierend auf den Ergebnissen wurden konkrete Verbrauchempfehlungen entwickelt und diese werden in Kooperation mit dem „Forum Waschen“ der Öffentlichkeit zugänglich gemacht, in Form von Internetinformationen und einem Vortrag auf der Multiplikatorenentagung im März 2022.

## 1.2 Kooperationspartner

### Dr. Florian Wichern, AG Bodenkunde und Pflanzenernährung, Hochschule Rhein-Waal

Die Arbeitsgruppe Hygiene und Mikrobiologie arbeitet eng mit der AG Bodenkunde und Pflanzenernährung zusammen. Dr. Florian Wichern war daher direkt an dem beantragten Projekt beteiligt und stand bei Fragen hinsichtlich räumlichen Transfers von Bodenmikroorganismen und deren mikrobiellen Aktivität im Boden zur Verfügung. Zudem wurden die mit einbezogenen Bodenproben im Rahmen seiner AG genommen und analysiert.

### Dr. Stefanie Wieck, Umweltbundesamt

Dr. Stefanie Wieck arbeitet am Umweltbundesamt in der Fachgruppe IV „Biozide“. In ihrer Dissertation hat sie sich mit der Biozidnutzung in Privathaushalten und deren Eintrag ins Abwasser beschäftigt und war im Projekt daher beratend an der Schnittstelle Umwelt – Haushalt tätig.

### Dr. Jürgen Harlizius, Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen

Dr. Jürgen Harlizius stand als Fachtierarzt für Schweine der Landwirtschaftskammer NRW als Experte für Fragen im Hinblick auf Nutztierhaltung und Veterinärmedizin zur Verfügung und deckt somit die Schnittstelle Landwirtschaft – Haushalt ab.

### Philip Heldt, Verbraucherzentrale Nordrhein-Westfalen

Philip Heldt unterstützte als wissenschaftlicher Mitarbeiter der Verbraucherzentrale das Projekt beratend hinsichtlich Nachhaltigkeit und Verbrauchersicherheit. Über die Plattform der Verbraucherzentrale können Empfehlungen und präventive Maßnahmen für die Verbraucher zugänglich gemacht werden, wodurch die Schnittstelle Verbraucher – Forschung abgedeckt wird.

### Dr. André Frontzek, Medizinisches Versorgungszentrum Dr. Stein + Kollegen

Dr. André Frontzek stand bei Fragen bezüglich der molekularen Diagnostik und im Bereich der Entwicklung von PCR-basierten Testsystemen zur Verfügung. Zudem besitzt er Expertise auf dem

Gebiet der Antibiotikaresistenzen (insbesondere Beta-Laktamasen) hinsichtlich klinischer Relevanz, Epidemiologie und medizinischer Diagnostik. Demnach wurde mit ihm als beratendem Projektpartner die Schnittstelle Klinik – Haushalt abgedeckt.

## 2. Methodik und Vorgehensweise

### 2.1 Analyse des IST-Zustandes

Im ersten Teil des Projektes erfolgte zunächst eine Analyse des IST-Zustandes. Zu diesem Zweck wurde aufbauend auf den bisherigen Erfahrungen in der Arbeitsgruppe Hygiene und Mikrobiologie ein Real-Time PCR Test verwendet, um die in den Proben vorhandenen Resistenzgene zu identifizieren. In einem weiteren Schritt wurden resistente bakterielle Spezies mithilfe von niedrigen Antibiotikakonzentrationen isoliert und anschließend charakterisiert.

#### Probenaufbereitung und DNA-Extraktion

Es wurden Duschsiphons, Geschirrspüler und Waschmaschinen von 54 Haushalten aus Nordrhein-Westfalen untersucht. Die meisten Proben wurden in Haushalten ohne häusliche Pflegeeinrichtungen genommen, die zu Wohnhäusern und auch zu Einfamilienhäusern gehörten. Die Proben wurden von den Innenrohren von Duschsiphons, dem Pumpensumpf von Geschirrspülern oder der Einspülkammer und Gummitürdichtung von Waschmaschinen mittels Tupfverfahren in dreifacher Wiederholung entnommen.

Nach der Entnahme wurden die Proben sofort bei 4 °C gelagert und innerhalb von 24 h bearbeitet. Die entnommenen Proben wurden in 1000 µL sterilem 0,9%igem Natriumchlorid suspendiert (je drei Abstriche wurden entnommen und gepoolt). Nach der Zentrifugation bei 4.800 U/min/8 °C/15 min wurde der Überstand verworfen und das resultierende Pellet in 500 µL sterilem 0,9%igem Natriumchlorid erneut suspendiert. Zur Selektion der antibiotikaresistenten Stämme wurden die Proben in TSB (Trypton-Soja-Bouillon) mit niedrigen Antibiotikakonzentrationen (2 µg/mL Carbapenem, 6 µg/mL Cefotaxim und 10 µg/mL Colistin) kultiviert. Es wurden subinhibierende bzw. niedrige Konzentrationen verwendet, da Antibiotika normalerweise nicht in letalen Konzentrationen in der Umwelt vorkommen und auf diese Weise das Wachstum anfälliger Stämme gehemmt wird während Stämme mit nur verminderter Anfälligkeit und Resistenzen noch isoliert werden.

Für die Aufreinigung der Gesamt-DNA wurde das Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Bio, Santa Ana, CA, USA) gemäß der Herstellerangaben mit den folgenden Anpassungen verwendet. Statt 500 mg festem Material wurden 250 µL der suspendierten Probe verwendet. Die Proben wurden zweimal im Gerät FastPrep-24™ für 60 Sekunden bei 6,0 m/s homogenisiert. Alle Proben wurden zweimal mit der SEWS-M-Lösung des Kits gewaschen.

**Tabelle 1:** Übersicht der verwendeten Beta-Laktam-Antibiotika zur Isolierung von resistenten bakteriellen Spezies.

<b>Antibiotikagruppe</b>	<b>Antibiotika</b>
Carbapeneme	Imipenem Meropenem
Cephalosporine	Cefotaxim Ceftazidim
Polymyxin	Colistin

### Nachweis von Antibiotikaresistenz-Genen

Der Nachweis der ARG erfolgte mittels quantitativer Real-Time PCR, die die Detektion der Menge der PCR-Produkte in Echtzeit und somit eine Quantifizierung ermöglicht. Dabei wurde der Fokus auf die in Tabelle 2 dargestellten Resistenzgene gesetzt. Bei dem verwendeten Test handelt es sich um ein TaqMan<sup>®</sup> Assay, der bereits erfolgreich in der Arbeitsgruppe Hygiene und Mikrobiologie zum Einsatz kam<sup>23</sup>. Bei diesem werden mit verschiedenen Farbstoffen markierte Sonden in jedem Primer-Mix verwendet, wodurch der Subtyp der entsprechenden Gruppe der Beta-Laktamasen bzw. das spezifische Colistin-Resistenzgen direkt bestimmt werden kann.

**Tabelle 2:** Übersicht der zu betrachtenden Resistenzgene und deren hydrolytische Aktivität.

<b>Typen</b>	<b>Gene</b>	<b>Hydrolytische Aktivität</b>
<u>Carbapenemasen</u>		
	GES, KPC, OXA-48	Penicilline, Cephalosporine der 1. & 3. Generation, Carbapeneme
Metallo- $\beta$ -Laktamasen	VIM, NDM	alle Beta-Laktame außer Monobactame
OXA- $\beta$ -Laktamasen	OXA-23, OXA-58	Penicilline (Oxacilline), Cephalosporine, teilweise Carbapeneme
<u>Cephalosporinasen</u>		
ampC	CMY-2, FOX, ACT, MIR, DHA	alle Beta-Laktame außer Carbapeneme
ESBL	CTX-M1, CTX-M2, CTX-M9	Penicilline, Cephalosporine der 1. & 3. Generation
mobile Colistin-Resistenz	MCR-1, MCR-2	Colistin

Die PCR wurde mit einem LightCycler 480 (Roche Life Sciences, Mannheim) unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: 95 °C für 15 min, 45 Zyklen mit Denaturierung (95°C; 10s), Annealing (60°C; 20s), Elongation (72°C; 10s) und ein letzter Zyklus bei 30°C für 30 s. Eine Probe wurde als

positiv gewertet, wenn sie den Schwellenwert vor dem Zyklus 40 erreichte oder wenn die durch die Standardkurve bestimmten Kopien/ $\mu$ L größer als fünf Kopien/ $\mu$ L waren.

### Identifizierung der bakteriellen Spezies und Erstellung der Resistenzprofile

Nach Wachstum in TSB wurden die Proben auf MacConkey-Agar (Selektivmedium besonders für gramnegative Bakterien) und Carbapenemase- bzw. ESBL-selektivem Medium für die spätere Identifizierung ausplattiert. Zur Bestimmung der Bakterienspezies und der Antibiotikaresistenz wurde das VITEK 2 Kompaktsystem (bioMérieux, Nürtingen) verwendet. Die klinische Resistenz wurde auf der Grundlage von EUCAST-Richtlinien bewertet<sup>33</sup>. Nach der Bestimmung der Antibiotikaresistenzen wurde aus den identifizierten Isolaten die DNA extrahiert, um zu ermitteln ob die resistenten Bakterienspezies über die entsprechenden ARG verfügten.

## 2.2 ABR im häuslichen Umfeld

Die im ersten Teil ermittelten Ergebnisse werden mit bereits gewonnenen Daten (Klärwerk) und Literaturdaten verglichen, um potentielle Transferwege in den Haushalt und aus dem Haushalt ermitteln zu können. Die Daten der Haushalts- und Klärwerkproben wurden mittels GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.) statistisch ausgewertet und mittels nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests miteinander verglichen.

### Nachweis des Integron-Integrase Gens

Da viele der betrachteten Resistenzgene auf Klasse 1 Integrons zu finden sind und das Auftreten des Integron-Integrase-Gens (*intI1*) als Marker für einen erhöhten Selektionsdruck durch Stoffe anthropogenen Ursprungs wie Biozide, Schwermetalle oder Antibiotika dient<sup>34</sup>, erfolgte dessen Nachweis in den untersuchten Proben mittels Real-Time PCR. Dabei wurde die Kopienzahl/mL der *16S rDNA* und des *intI1*-Gens jeder Probe quantifiziert und das Verhältnis von *intI1* und *16S rDNA* bestimmt, um die relative Häufigkeit des Klasse 1 Integrons (relative prevalence) zu ermitteln.

Bei dem Test handelt es sich um ein SYBR Green Assay, der bereits erfolgreich zum Einsatz kam<sup>24</sup>. Die PCR wurde mit einem LightCycler 480 (Roche Life Sciences, Mannheim, Deutschland) unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: 95°C/10 min, 35 Zyklen (95°C/15 s Denaturierung, 68°C/15 s Annealing, 72°C/15 s Elongation), 72°C/90 s finale Elongation und einer abschließenden Schmelzkurvenanalyse (60°C - 95°C bei 5 s/1°C).

Basierend auf den PCR-Ergebnissen des *intI1*- und des *16S rDNA*-Gens, erfolgte die Berechnung der relativen Prävalenz % (RP) mittels der folgenden Formel<sup>24,35</sup>:

$$RP = \left( \frac{\frac{\text{Kopien of ARG}}{\text{mL}}}{\frac{\text{Kopien of 16S rDNA}}{\text{mL}}} \right) * 2.5 * 100$$

### 2.3 Analyse der potentiellen Transferpfade

Die Untersuchung der potentiellen Transferpfade erfolgte mittels Metagenomanalysen, da dabei die gesamte genetische Information aller Organismen in einer Probe analysiert werden kann. Das Metagenom stellt die Gesamtheit der genetischen Information von Mikroorganismen eines Lebensraums dar. Generell kann mittels Sequenzierung die Basenabfolge der DNA ermittelt werden. Um ein breiteres Spektrum zu erfassen, wurden Proben von den gleichen Probenahmestellen gepoolt, also die DNA-Konzentration eingestellt und gleiche Teile jeder Probe sorgfältig miteinander vermischt. Die analysierten Pools setzen sich wie folgt zusammen: Duschsiphons (DS, n=5), Waschmaschinen (WM, n=5), Geschirrspüler (GS, n=5), Waschmaschinen aus Haushalten von pflegebedürftigen Personen (HWM, n=5), Klärwerkzulauf (KZ, n=5), Klärschlamm (KS, n=5), Klärwerkablauf (KA, n=5), Boden mit mineralischer Düngung (B1, n=5), Boden mit Stallmistdüngung (B2, n=5) und Boden mit Gülledüngung (B3, n=5). Leider ist bei je vier Proben aus Duschsiphons, Geschirrspülern und Waschmaschinen aus Haushalten von pflegebedürftigen Personen sowie einer Klärwerkzulauf- und einer Klärwerkablaufprobe die Analyse fehlgeschlagen. Daher wurde die Probe aus Waschmaschinen aus Haushalten von pflegebedürftigen Personen den anderen WM-Proben zugeordnet. Das Analysepaket beinhaltete sowohl die taxonomische Analyse (Häufigkeit verschiedener mikrobieller Spezies) als auch eine funktionelle Analyse (u.a. ARG), sodass die Haushaltsproben mit den verschiedenen Bereichen verglichen werden konnten. Die Metagenomanalysen dienten somit zum einen zur Ermittlung der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften in den einzelnen Probenpools und zum anderen zur Bestimmung von Unterschieden bzw. Gemeinsamkeiten der Proben aus den verschiedenen Habitaten, um so die potentiellen Transferpfade von Resistenzen und resistenten bakteriellen Spezies erörtern zu können.

### 2.4 Modell zum Einfluss der gegebenen Bedingungen in Haushaltsgeräten

Ein weiterer Aspekt stellte die Untersuchung des Einflusses der gegebenen Bedingungen in Waschmaschinen und Geschirrspülern auf antibiotikaresistente Keime dar. Für die Untersuchung wurden ein antibiotikaresistenter Stamm und ein nicht-resistenter Stamm von *Escherichia coli* (nicht-resistenter Stamm ATTC10536 und resistenter Stamm, isoliert aus einem Duschsiphon), *Klebsiella pneumoniae* (nicht-resistenter Stamm ATCC13883 und ESBL-Stamm, isoliert aus einer Kläranlage) und *Staphylococcus aureus* (nicht-resistenter Stamm ATTC6538 und MRSA-Stamm CCUG35601) verwendet. Die Keimzahl der Keimträger/Biomonitore wird vor (Ausgangskeimzahl)



und nach dem Waschen ermittelt, sodass anhand der Differenz die logarithmische Reduktion (LR) ermittelt werden kann:

$$LR = \text{Log}_{10}(\text{Ausgangskeimzahl}) - \text{Log}_{10}(\text{Keimzahl nach dem Waschen/Spülen})$$

### Anwendungsbezogene Waschversuche

Für die Analyse des Einflusses von Waschprozessen auf antibiotikaresistente Stämme wurden nach Honisch *et al.* (2014) Baumwoll-Teststäbchen von 1 cm<sup>2</sup> artifiziell kontaminiert<sup>32</sup>. Die Testläufe wurden in einer Waschmaschine im Labormaßstab (Rotawash) nach der Methode von Schages *et al.* (2019) durchgeführt<sup>36</sup>. Alle Tests wurden in dreifacher Wiederholung durchgeführt und ein Hauptwaschgang von 30 min bzw. 60 min wurde bei jeweils 30 °C und 40 °C unter Verwendung von Waschmittel A\*-Basispulver (wfk testgewebe, Brüggen, Deutschland) als bleichfreies Waschmittel getestet. Neben dem Hauptwaschgang wurde außerdem die Wirkung des Spülgangs mit und ohne Zusatz von quartären Ammoniumverbindungen (QACs) unter Verwendung von Benzalkoniumchlorid (BAC) untersucht.

### Anwendungsbezogene Geschirrspüler-Versuche

Für die Geschirrspüler-Versuche wurden die nach Brands *et al.* (2020) beschriebenen künstlich kontaminierten Edelstahl-Biomonitore nach DIN EN 10088-3 verwendet<sup>37</sup>. Die Versuche wurden in einem Geschirrspüler (GSL-2, Miele & Cie. KG, Gütersloh, Deutschland) durchgeführt, wobei folgende Bedingungen getestet wurden: 5 min Hauptwaschgang bei 45 °C + Spülgang bei 50 °C (ähnlich Kurzprogramm), 15 min Hauptwaschgang bei 60 °C + Spülgang bei 50 °C (ähnlich Standardprogramm) und 90 min Hauptwaschgang bei 45 °C + Spülgang bei 50 °C (ähnlich Eco-Programm).

## 2.5 Formulierung von Verbraucherempfehlungen

Die systematische Analyse der Ergebnisse und eine darauf basierende Entwicklung von Handlungsempfehlungen zur Vermeidung bzw. Reduktion von antibiotikaresistenten Bakterien soll die Erarbeitung von Onlineinformationen mit Empfehlungen und präventiven Maßnahmen für Verbraucher ermöglichen, etwa im Hinblick auf zu verwendende Programme und Wasch- bzw. Reinigungsmittel. Informationen werden auch auf der Multiplikatorentagung des Forum Waschens im März 2022 präsentiert.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Antibiotikaresistenzen im Haushalt

Zur Bestimmung möglicher Transferpfade von Antibiotikaresistenzen zwischen Umwelt und Haushalt wurde zunächst eine Analyse des Vorkommens von ARG und resistenten bakteriellen Spezies im Haushalt durchgeführt, da wenige Daten im Hinblick auf Antibiotikaresistenzen im häuslichen Umfeld vorliegen. Daher wurden 54 Privathaushalte beprobt und die Proben sowohl mikrobiologisch als auch molekularbiologisch untersucht. In Tabelle 3 sind Eigenschaften der beprobten Haushalte aufgeführt.

**Tabelle 3:** Überblick über die Eigenschaften der beprobten Haushalte, die in der Studie analysiert wurden. Das Alter der Kinder wurde in den Kategorien der Altersgruppen nicht berücksichtigt.

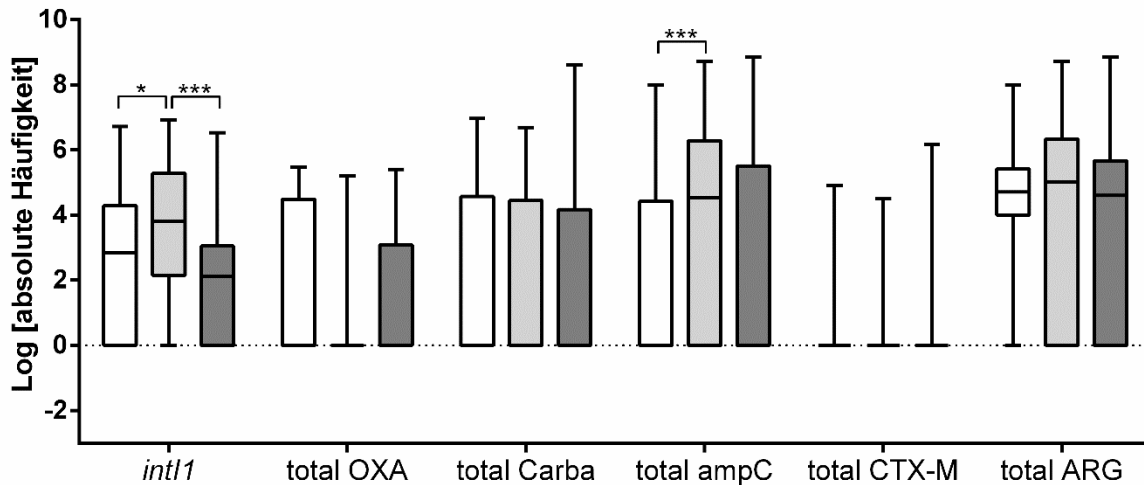
Eigenschaften	Anzahl der Haushalte
Einfamilienhaus	21
Wohnungen (Mehrfamilienhaus)	33
Haushalte mit 1-2 Personen	29
Haushalte mit > 2 Personen	25
Haushalte mit Personen zwischen 20 und 40 Jahren	32
Haushalte mit Personen zwischen 40 und 60 Jahren	13
Haushalte mit Personen zwischen 60 und 90 Jahren	9
Haushalte mit Kindern	9

##### 3.1.1 Antibiotika-Resistenzgene im Haushalt

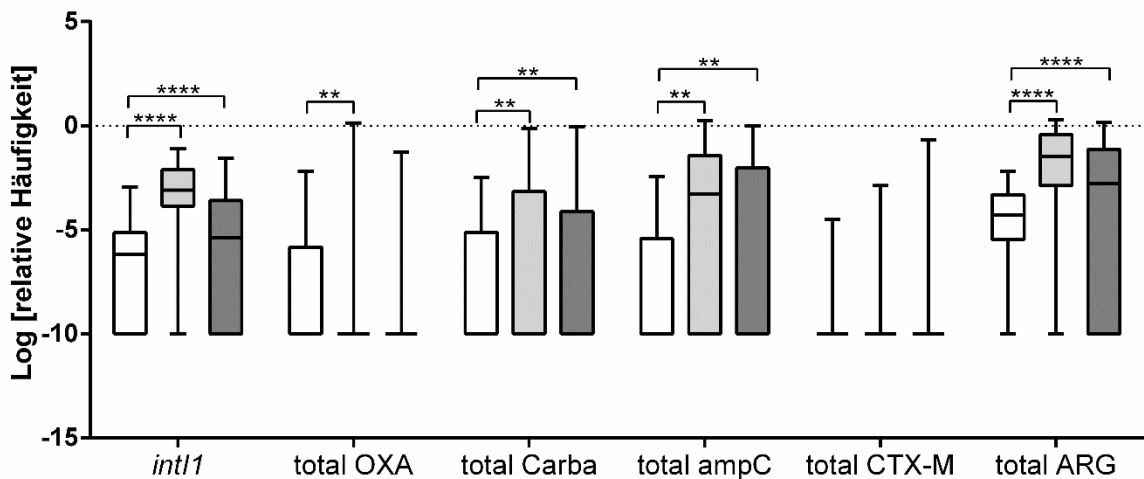
Der Schwerpunkt des Projektes lag auf dem Nachweis von Beta-Laktamase- und *MCR*-Genen in Haushaltsproben (Duschsiphon, Waschmaschine, Geschirrspüler). Im Zuge dessen wurden 54 Privathaushalte beprobt, von denen zehn keinen Geschirrspüler besaßen. Abgesehen von der Metallo- $\beta$ -Laktamase *bla*<sub>NDM</sub> konnten 12 der 13 betrachteten Beta-Laktamase-Varianten in den Haushaltsproben detektiert werden, zudem waren alle Proben *MCR*-negativ. Insgesamt wurden 207 Resistenzgene detektiert, die meisten wurden in Duschsiphons (39,1%) gefolgt von Waschmaschinen (33,3%) nachgewiesen während in 27,5% der Geschirrspüler ARG detektiert wurden. Die absolute Häufigkeit der Beta-Laktamase-Gene beschreibt die Genkopien/mL während die relative Häufigkeit das Verhältnis der Resistenzgene zur gesamten bakteriellen DNA darstellt (Abb. 1). Die absolute Häufigkeit aller ARG war mit  $2,74 \times 10^7$  Genkopien/mL in Waschmaschinen am höchsten und betrug  $1,53 \times 10^7$  Genkopien/mL in Duschsiphons und  $2,52 \times 10^6$  Genkopien/mL

in Geschirrspülern. Die relative Häufigkeit war in Duschsiphons, gefolgt von Geschirrspülern am höchsten. Zudem war die relative Häufigkeit des *int11*-Gens sowie der Gruppen der AmpC- $\beta$ -Laktamasen (*bla*<sub>CMY-2</sub>, *bla*<sub>FOX</sub>, *bla*<sub>ACT/MIR</sub>) und Carbapenemasen (*bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>) in Duschsiphons und Geschirrspülern signifikant höher im Vergleich zu den Proben aus Waschmaschinen.

(a)



(b)



- Waschmaschinen (n=54)
- ▒ Duschsiphons (n=54)
- Geschirrspüler (n=44)

**Abbildung 1:** Absolute (a) und relative (b) Häufigkeit der ARG in Haushaltsproben (n=152). Die Mittelwerte von je zwei Wiederholungen sind als logarithmierte Werte dargestellt. Die Gengruppen setzen sich wie folgt zusammen. Total OXA: *bla*<sub>OXA-58</sub> und *bla*<sub>OXA-23</sub>, total Carba: *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> und *bla*<sub>VIM</sub>, total ampC: *bla*<sub>CMY-2</sub>, *bla*<sub>FOX</sub>, *bla*<sub>ACT/MIR</sub> und *bla*<sub>DHA</sub> und total CTX-M: *bla*<sub>CTX-M-1</sub> und *bla*<sub>CTX-M-9</sub>. Proben ohne ARG (rel.

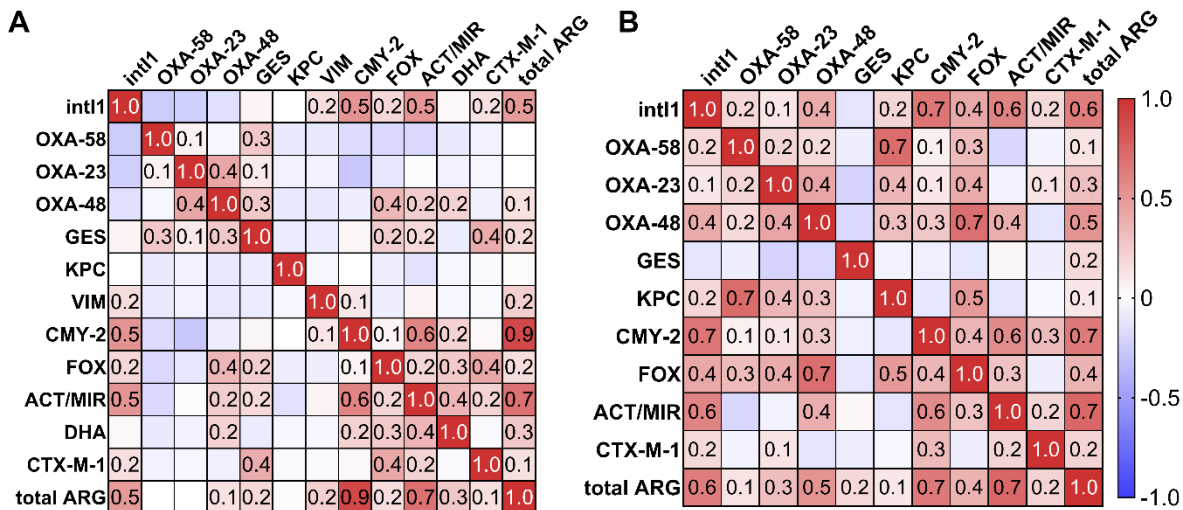
Häufigkeit=0) sind in **(b)** als -10 dargestellt. Signifikante Unterschiede ( $p \leq 0.05$ ) wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse bestimmt.

Die Anzahl der nachgewiesenen ARG in den einzelnen Proben reichte von null bis fünf, und die Duschsiphon-Proben zeigten die höchste Diversität mit 24,1%, die drei oder mehr Beta-Laktamase-Gene enthielten, während in 40,9% der Geschirrspüler- und 33,3% der Waschmaschinen-Proben kein Beta-Laktamase-Gen nachgewiesen wurde (Tabelle 4). Die meisten ARG wurden in Duschsiphons (39,1%) nachgewiesen, gefolgt von Waschmaschinen (33,3%) und Geschirrspülern (27,5%).

**Tabelle 4:** Auftreten von Beta-Laktamase (*bla*) Genen in Duschsiphons (n=54), Waschmaschinen (n=54) und Geschirrspülern (n=44).

	Duschsiphons	Waschmaschinen	Geschirrspüler
<b>kein <i>bla</i> Gen</b>	29,6%	<b>33,3%</b>	<b>40,9%</b>
<b>ein <i>bla</i> Gen</b>	24,1%	31,5%	20,5%
<b>zwei <i>bla</i> Gene</b>	22,2%	22,2%	20,5%
<b>≥ 3 <i>bla</i> Gene</b>	<b>24,1%</b>	12,9%	18,2%

Das gleichzeitige Auftreten der Beta-Laktamase-Gene wurde mit Hilfe der Spearman-Korrelation untersucht. Die absolute Häufigkeit der gesamten ARG, *bla*<sub>CMY-2</sub> und *bla*<sub>ACT/MIR</sub> korrelierte stark mit dem *intl1*-Gen in Duschsiphon- und Geschirrspülerproben. Darüber hinaus korrelierten auch *bla*<sub>CMY-2</sub> und *bla*<sub>ACT/MIR</sub> stark, während u.a. *bla*<sub>OXA-23</sub> und *bla*<sub>OXA-48</sub> sowie *bla*<sub>OXA-48</sub> und *bla*<sub>FOX</sub> eine positive Korrelation zeigten (Abb. 2). Die betrachteten ARG sind normalerweise Plasmid-kodiert oder Teil von Klasse 1 Integrons (*intl1*-Gen) auf übertragbaren Plasmiden<sup>38-40</sup>. Somit könnte die Korrelation der ARG mit dem *intl1*-Gen darauf zurückzuführen sein, dass die ARG und *intl1* auf dem gleichen mobilen genetischen Elementen lokalisiert sind oder die ARG sogar Teil des Klasse 1 Integrons sind. Auch die Korrelation der ARG (z.B. von *bla*<sub>CMY-2</sub> und *bla*<sub>ACT/MIR</sub>) miteinander kann auf deren gemeinsame Lokalisation auf einem mobilen genetischen Element zurückzuführen sein. Dennoch könnten diese ARG auch von verschiedenen Bakterienstämmen innerhalb der gleichen Probe stammen und nicht auf einem mobilen genetischen Element von einem spezifischen Bakterienstamm lokalisiert sein. Obwohl die Gene *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>CTX-M-1</sub> und *bla*<sub>CTX-M-9</sub> nur schwach mit *intl1* korrelierten, wurden diese bereits mit Klasse 1 Integrons assoziiert<sup>39</sup>. Im Gegensatz dazu wurden *bla*<sub>CMY-2</sub>, *bla*<sub>ACT/MIR</sub> oder *bla*<sub>OXA-48</sub> bisher nicht als Teil von Klasse 1 Integrons nachgewiesen. Demnach könnten die *intl1*- und Beta-Laktamase-Gene auf demselben Plasmid oder verschiedenen Plasmiden innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft lokalisiert sein.



**Abbildung 2:** Korrelation von Beta-Laktamase Genen in Duschsiphons **(A)** und Geschirrspülem **(B)**. Rot kennzeichnet eine starke positive Korrelation während blau eine starke negative Korrelation darstellt. Eine Korrelation mit  $r \geq 0.3$  gilt als statistisch signifikant. Die Beta-Laktamase Gene in Waschmaschinen zeigten keine signifikanten Korrelationen.<sup>41</sup>

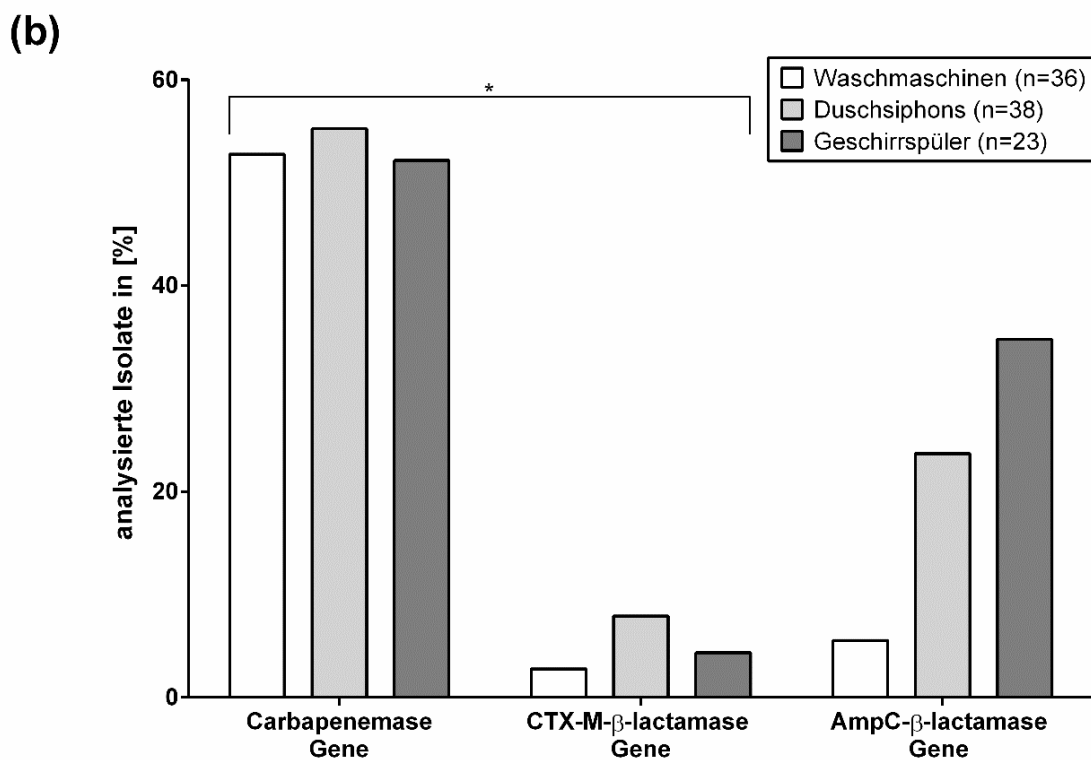
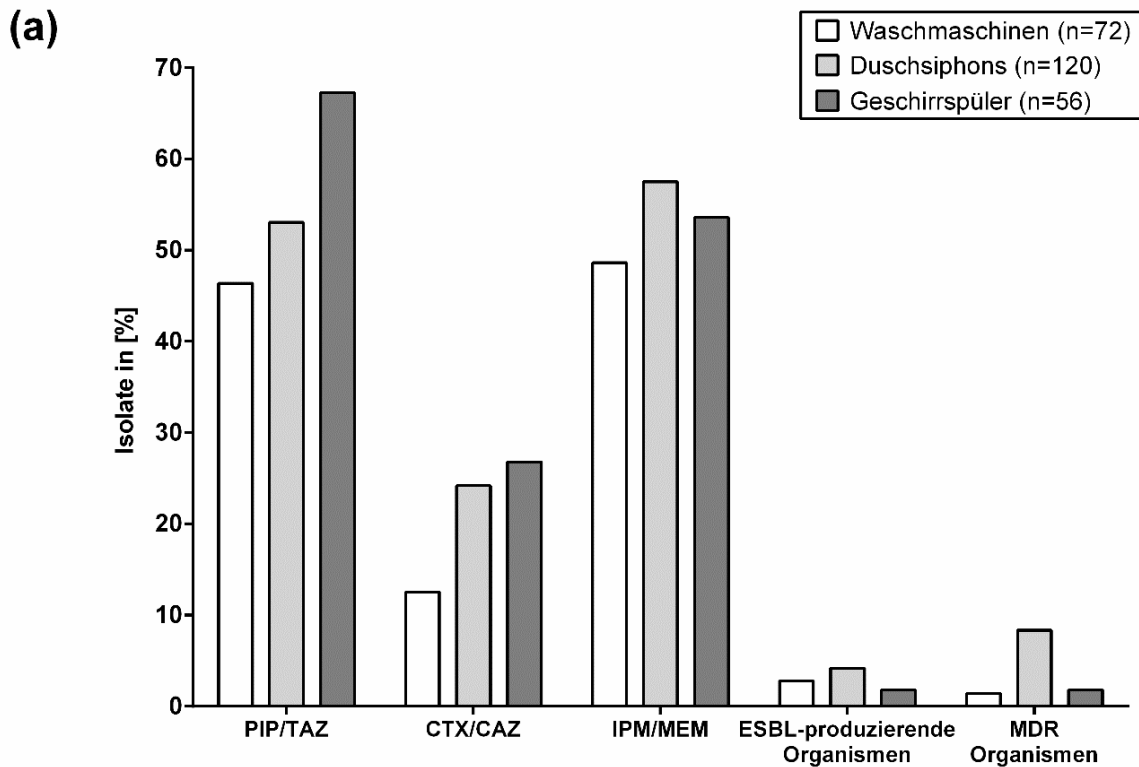
### 3.1.2 Resistente bakterielle Spezies im Haushalt

Insgesamt wurden 129 Isolate aus Duschsiphons, 83 aus Waschmaschinen und 61 aus Geschirrspülem isoliert (Tabelle 5). In Duschsiphons und Geschirrspülem wurde *Stenotrophomonas maltophilia* am häufigsten isoliert während *Pseudomonas aeruginosa* etwas häufiger in Waschmaschinen auftrat. Abgesehen davon dominierten in den Duschsiphons (21,7%) und Geschirrspülem (21,3%) *Enterobacteriaceae*. Es konnten weniger Bakterien aus Geschirrspülem isoliert werden, was mit den höheren Temperaturen während eines Reinigungslaufs zusammenhängen könnte.

**Tabelle 5:** Bakterielle Spezies isoliert aus Duschsiphons, Waschmaschinen und Geschirrspülern mit niedrigen Antibiotikakonzentrationen. Die Gruppe „Sonstige“ umfasst die folgenden Spezies: *Achromobacter denitrificans*, *Achromobacter xyloxidans*, *Brevundimonas diminuta*, *Chryseobacterium indologenes*, *Delftia acidovorans*, *Ochrobactrum anthropi*, *Roseomonas gilardii*, *Shewanella putrefaciens*, *Sphingomonas paucimobilis*

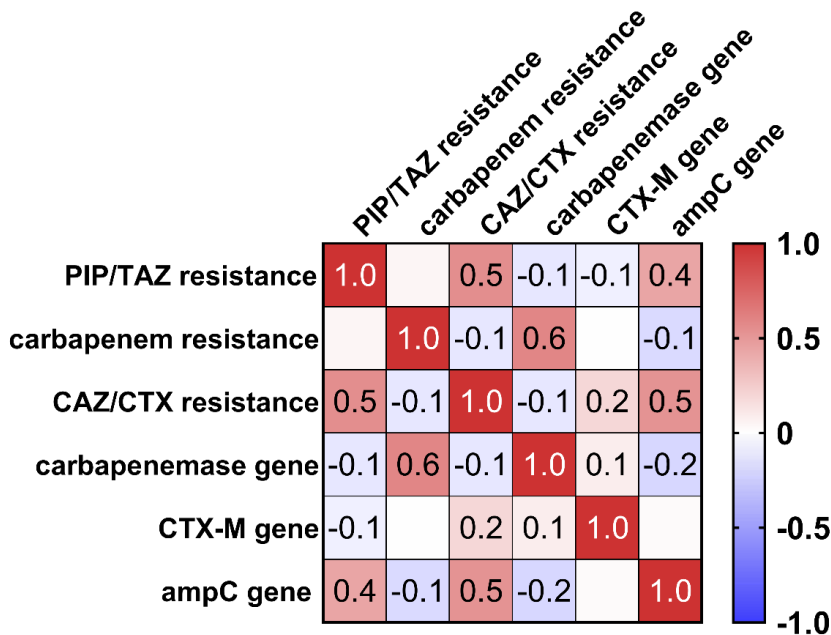
Bakterielle Spezies	Duschsiphons	Waschmaschinen	Geschirrspüler
	(n= 129)	(n= 83)	(n= 61)
<i>Enterobacteriaceae</i>	<b>21,7%</b>	10,8%	<b>21,3%</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9,3%	<b>19,3%</b>	3,3%
andere <i>Pseudomonas</i> spp.	12,4%	15,7%	11,5%
<i>S. maltophilia</i>	<b>27,9%</b>	<b>18,1%</b>	<b>37,7%</b>
<i>B. cepacia</i>	7,0%	8,4%	6,6%
<i>Acinetobacter</i> spp.	1,6%	3,6%	1,6%
<i>Aeromonas</i> spp.	3,9%	1,2%	3,3%
sonstige	10,9%	18,1%	8,2%
nicht identifiziert	5,4%	4,8%	6,6%

Eine Unempfindlichkeit gegenüber Piperacillin/Tazobactam war bei den Geschirrspüler-Proben am höchsten (67,3%), während die Unempfindlichkeit gegenüber einem oder beiden Carbapenemen Imipenem und Meropenem (IPM/MEM) bei den Duschsiphon- und Waschmaschinen-Proben dominierte (Abb. 3a). Zudem war eine Resistenz gegenüber Cephalosporinen (Cefotaxim (CTX)/Cefotazidim (CAZ)) bei Isolaten aus Duschsiphons und Geschirrspülern höher als bei Waschmaschinen-Isolaten. Multiresistente Bakterienstämme (MDR=multi-drug resistant) wurden gemäß internationalen Empfehlungen klassifiziert<sup>42</sup>. Die meisten der identifizierten Spezies waren opportunistisch pathogene Umweltbakterien und obwohl MDR- und ESBL (Extended-Spectrum-Beta-Laktamase)-produzierende Bakterien aus allen Proben isoliert wurden ( $p \leq 0,05$ ), war deren Anteil an resistenten Bakterien in den Duschsiphon-Proben am höchsten (8,3%). Neben der Erstellung der Resistenzprofile erfolgte auch der PCR-Nachweis von Beta-Laktamase- und MCR-Genen bei den Bakterienisolaten.



**Abbildung 3:** Prozentualer Anteil von Beta-Laktam resistenten bakteriellen Spezies **(a)** und Beta-Laktamase-Genen, die in Bakterienisolaten aus Duschsiphons, Waschmaschinen und Geschirrspülern isoliert wurden **(b)**. die Resistenzen und ESBL-Phänotypen wurden mittels VITEK 2 System ermittelt während die Klassifizierung von MDR-Bakterien nach internationalen Empfehlungen erfolgte. Signifikante Unterschiede ( $p \leq 0.05$ ) wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse bestimmt.

Eine Spearman-Korrelation der Carbapenemase-, CTX-M- und ampC-Gene mit der phänotypischen Resistenz gegen Carbapeneme, Ceftazidim und/oder Cefotaxim (CAZ/CTX) und Piperacillin/Tazobactam (PIP/TAZ) wurde durchgeführt, um die Relevanz der nachgewiesenen ARG zu identifizieren (Abb. 4). Der hohe prozentuale Anteil Carbapenem-resistenter Stämme wurde durch den Nachweis von Carbapenemase-Genen in mehr als 50% der Isolate und die starke positive Korrelation ( $p < 0,0001$ ) von Carbapenemase-Genen und Carbapenem-Resistenz bestätigt. Die PIP/TAZ- und CAZ/CTX-Resistenz korrelierte stark mit den *ampC*-Genen ( $p < 0,0001$ ) während die Korrelation von CTX-M-Genen mit der CAZ/CTX-Resistenz schwach war.



**Abbildung 4:** Spearman-Korrelation ( $p \leq 0.05$ ) von ARG (Carbapenemase-Gene: *bla*<sub>OXA-58</sub>, *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> und *bla*<sub>VIM</sub>, *ampC*-Gene: *bla*<sub>CMY-2</sub>, *bla*<sub>FOX</sub>, *bla*<sub>ACT/MIR</sub> und *bla*<sub>DHA</sub> and CTX-M-Gene: *bla*<sub>CTX-M-1</sub> und *bla*<sub>CTX-M-9</sub>) mit phänotypischer Resistenz (gegen Piperacillin/Tazobactam (PIP/TAZ), Carbapeneme (Imipenem und/oder Meropenem (IPM/MEM)) und Cephalosporine (Ceftazidim und/oder Cefotaxim (CAZ/CTX)) der untersuchten Isolate aus Haushalten.<sup>41</sup>

In 33 von 99 Isolaten stimmte das Resistenzprofil mit den detektierten ARG überein. Das bedeutet, dass die Resistenzen dieser Bakterien auf die vorhandenen Resistenzgene zurückzuführen sein könnten, da die Expression der entsprechenden Beta-Laktamase-Gene in diesen Resistenzen resultieren kann. Diese Vermutung wird zudem durch die positive Korrelation der Carbapenemase- und AmpC-Beta-Laktamase-Gene mit Carbapenem- bzw. Cefotaxim/Ceftazidim-Resistenz unterstützt. Dennoch zeigt der geringe Anteil, dass in vielen Fällen Resistenzgene von Bakterienstämmen getragen werden, ohne dass der Phänotyp eine Resistenz vorweist. Die meisten Beta-Laktamase-Gene wurden bei Isolaten der *Enterobacteriaceae* gefolgt von *Pseudomonadaceae* nachgewiesen. Carbapenemase-Gene wurden primär detektiert während in 50% der Isolate keine ARG nachgewiesen werden konnten. Dabei wurden, mit Ausnahme von den AmpC-Beta-



Laktamase-Genen, der höchste Anteil an Stämmen mit ARG bei Isolaten aus Duschsiphons identifiziert (Abb. 3b). Zudem wurden alle multiresistenten Bakterienstämme mit ARG aus Duschsiphons isoliert.

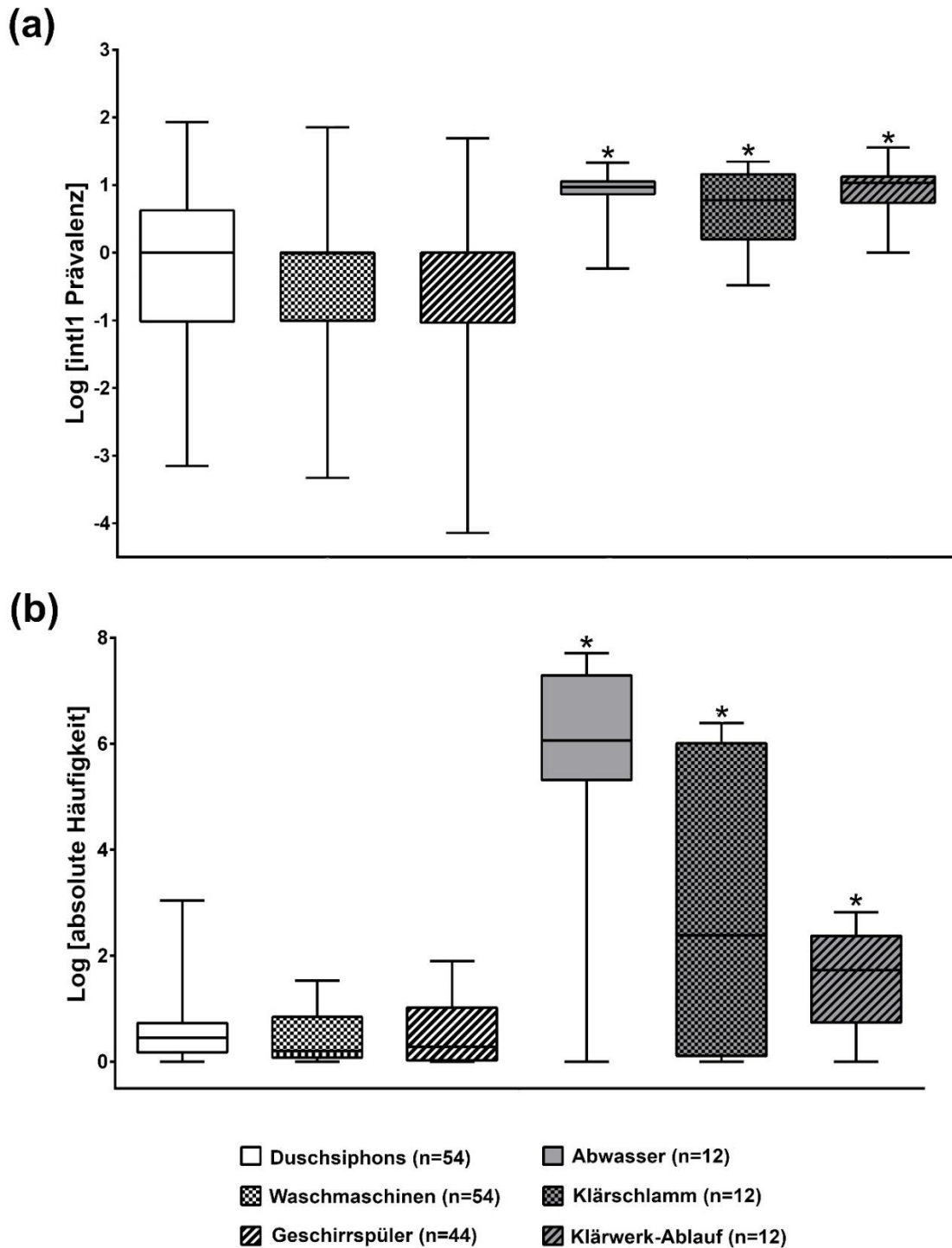
Die bakterielle Gemeinschaft in den Haushaltsproben besteht in der Regel aus Umweltbakterien, darunter u.a. *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonadaceae*<sup>23,43,44</sup>, die neben *Stenotrophomonas maltophilia* auch in dieser Studie die vorherrschenden Spezies waren. Bakterien dieser Familien können Beta-Laktamase-Gene besitzen<sup>45–47</sup>. Außerdem lässt die Isolierung klinisch relevanter Spezies wie multiresistente *P. aeruginosa* und ESBL-produzierende *E. coli*, die Carbapenemase-Gene besitzen, vermuten, dass die häusliche Umgebung ein potenzielles Reservoir für die Ausbreitung der Beta-Laktam-Resistenzen sein könnte. Interessanterweise stimmten in 21 von 54 Haushalten mindestens ein nachgewiesenes ARG in allen Proben (12 Haushalte), in Duschsiphons und Geschirrspülern (fünf Haushalte), in Duschsiphons und Waschmaschinen (vier Haushalte) oder in Waschmaschinen und Geschirrspülern (zwei Haushalte) überein. Der Anschluss der Probenahmestellen an das Wasserversorgungssystem<sup>48</sup> und das Wachstum von Biofilmen auf den Oberflächen der Innenrohre<sup>43,49</sup>, die diverse mikrobielle Gemeinschaften beherbergen, könnten zur Verbreitung von Resistenzgenen und antibiotikaresistenten Bakterien von/zu und in den Haushalten beitragen. Neben dem möglichen Eintrag antibiotikaresistenter Bakterien über das Wasserversorgungssystem ist auch ein Transfer innerhalb desselben Haushalts durch Haushaltsmitglieder oder kontaminiertes Geschirr bzw. kontaminierte Wäsche wahrscheinlich<sup>11,20,50</sup> und wurde bereits von Schmithausen *et al.* (2019) nachgewiesen<sup>31</sup>.

### 3.2 Vergleich des Auftretens von Resistenzgenen in Haushalt und Klärwerk

Im Vergleich zu Kläranlagen, in denen häusliches, industrielles und klinisches Abwasser zusammenkommt, ist die Häufigkeit von Resistenzgenen und multiresistenten Bakterien in der häuslichen Umgebung jedoch deutlich geringer<sup>29</sup>. Obwohl im Rahmen einer anderen Untersuchung deutlich weniger Klärwerk-Proben (n=36) untersucht wurden, konnten in diesen Proben 244 Resistenzgene detektiert werden während in den 152 Haushaltsproben lediglich 207 Gene nachgewiesen werden konnten. Dies deckt sich mit der Literatur, in der Klärwerke als „Hotspot“ für Antibiotikaresistenzen beschrieben werden<sup>4,51</sup>. Sowohl im Haushalt als auch dem Klärwerk traten die ampC-Beta-Laktamasen häufig auf. Bis auf *bla*<sub>KPC</sub> und *bla*<sub>OXA-23</sub>, die nur in Haushalten auftraten, sowie *MCR-1*, welches nur im Abwasser detektiert werden konnte, konnten die gleichen ARG in beiden Habitaten nachgewiesen werden.

Die Häufigkeit der Resistenzgene war in allen Klärwerk-Proben signifikant höher als in den Haushaltsproben, welches ebenfalls für ein höheres Resistenzauftreten spricht (Abb. 5b). Der Großteil der Haushaltsproben wies eine sehr geringe ARG-Häufigkeit auf während vor allem die Abwasser-Proben eine hohe Abundanz zeigten. Dafür ähneln die Ergebnisse der Haushaltsproben denen des Klärwerk-Ablaufs, welcher in die Umwelt freigesetzt wird. Die starke Standardabweichung

der Prävalenz des Klasse 1 Integron-Integrase Gens (s. Abb. 5a) ist auf die starke Variation der Genkopien/mL in den Proben zurückzuführen. Bei den Klärwerkproben lagen alle Proben in einem ähnlichen Bereich und obwohl die Werte nicht deutlich über denen der Haushaltsproben liegen, ist die relative Prävalenz von *int1* signifikant höher.



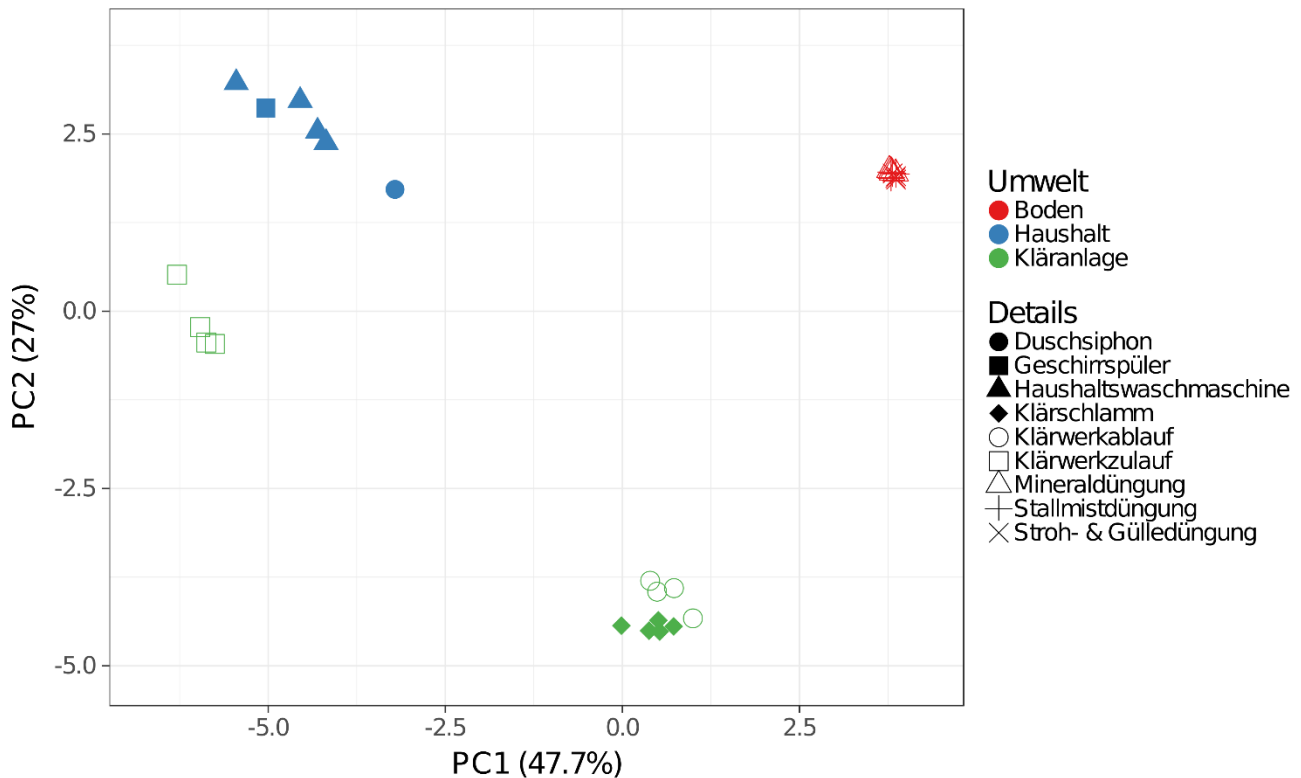
**Abbildung 5:** Vergleich der Häufigkeit des Klasse 1 Integrons (**a**, *int1*) und der Antibiotika-Resistenzgene (**b**, absolute Häufigkeit) in Haushalt- und Klärwerkproben. Die Mittelwerte sind dargestellt und signifikant höhere Werte mit einem \* markiert ( $p \leq 0.05$ ).

### 3.3 Vergleich von Haushalten mit anderen Habitaten

Mittels Metagenomanalysen von den Haushaltsproben und Umweltproben (Boden und Klärwerk) sollten potentielle Transferpfade identifiziert und die Bedeutung des häuslichen Umfelds bei der Verbreitung von ABR ermittelt werden. Die Analyse des Resistoms (Gesamtheit aller ARG) verschiedener Habitats ist ein hilfreiches Instrument zur Bestimmung möglicher Reservoirs von antibiotikaresistenten Bakterien und ARG. In diesem Zusammenhang ist es wichtig, neben der ARG-Häufigkeit auch weitverbreitete Bakterien zu identifizieren, da diese Taxa den Transfer von ARG zwischen verschiedenen Habitats ermöglichen könnten. Metagenomanalysen ermöglichen die Untersuchung des Resistoms ohne eine Beschränkung auf bestimmte Organismen. Daher wurde eine Metagenom-Sequenzierung von Haushalts-, Boden- und Kläranlagenproben durchgeführt, um potenzielle Reservoirs zu identifizieren und mögliche Übertragungswege zu verstehen.

#### 3.3.1 Vergleich der bakteriellen Gemeinschaft

Die Betadiversität zeigt die Unterschiede zwischen mikrobiellen Gemeinschaften aus verschiedenen Habitats, wobei ein Bray-Curtis-Index von null bedeutet, dass die Proben eine identische mikrobielle Gemeinschaft besitzen, während ein Wert von eins auf keine Übereinstimmungen hinweist. Eine Hauptkomponentenanalyse ermöglicht eine übersichtliche Darstellung von Daten und je kürzer die Distanz zwischen den Symbolen, desto geringer ist der Bray-Curtis-Index (Abb. 6). Die Betadiversität zeigte einen hohen Grad an Variation zwischen den verschiedenen Habitats während die Proben desselben Habitats sehr nah beieinander liegen. Demnach zeigten die Klärwerkzulauf-Proben mehr Gemeinsamkeiten mit den Haushaltsproben während sie sich stark von dem Klärschlamm (Bray-Curtis-Index=0,70) und Klärwerkablauf (Bray-Curtis-Index=0,72) unterschieden. Darüber hinaus zeigten die Proben aus Haushalten mit einem durchschnittlichen Bray-Curtis-Index von 0,55 die höchste Variation innerhalb eines Habitats. Die Bodenproben unterschieden sich ebenfalls sehr stark von den Haushaltsproben (Bray-Curtis-Index=0,75).



**Abbildung 6:** Hauptkomponentenanalyse der Betadiversität (Bray-Curtis-Index) von Haushalts- (n=6), Boden- (n=12) und Kläranlagenproben (n=13). Unit variance scaling und der NIPALS-Algorithmus (Nonlinear Iterative Partial Least Squares) wurde benutzt um die Hauptkomponenten zu berechnen. Die X- und Y-Achse zeigen Hauptkomponente 1 und 2, die 47,7% bzw. 27,0% der Gesamtvarianz erklären.<sup>52</sup>

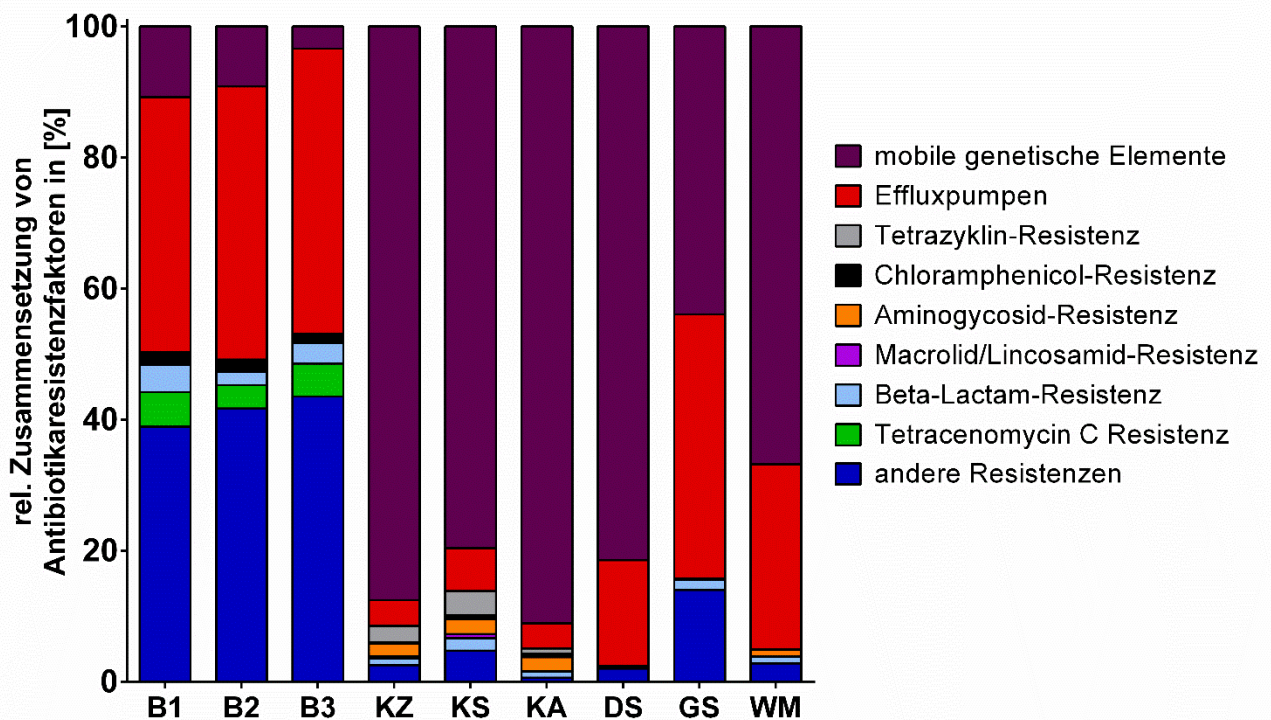
In den untersuchten Habitaten beeinflussen verschiedene Umweltfaktoren die bakterielle Gemeinschaft, was zu einer Selektion bestimmter Spezies und damit zu den beobachteten unterschiedlichen Zusammensetzungen der Mikrobiome führen könnte<sup>53</sup>.

In Haushalten werden Bakterien von Menschen, Haustieren oder Lebensmitteln eingetragen, wo sie häufig Desinfektions-, Reinigungs- und Pflegeprodukten ausgesetzt sind<sup>24,54,55</sup>. Zudem können extreme Bedingungen durch hohe Temperaturen oder pH-Werte sowie der häufige Wechsel der Bedingungen (z.B. eine längere Zeit ohne Gebrauch, gefolgt von einem Reinigungszyklus bei WM und GS) zu einer Selektion gut angepasster bakterieller Spezies und resistenter Bakterien führen<sup>56</sup>. In Kläranlagen herrscht ein für Bakterien günstiges Milieu, durch hohen Nährstoffgehalt und eine konstante Temperatur, während Substanzen wie Antibiotikarückstände, Biozide oder Schwermetalle<sup>57-60</sup> antibiotikaresistente Bakterien selektieren. Dies bestätigen frühere Studien, die eine einzigartige bakterielle Gemeinschaft<sup>61,62</sup> zeigen, in der Bakterien aus der Kanalisation dominieren<sup>61</sup>. Im Gegensatz dazu ist das vielfältige Mikrobiom des Bodens vergleichsweise seltener Antibiotikarückständen und industriellen Schadstoffen oder Reinigungs- und Pflegeprodukten ausgesetzt. Trotz der spezifischen Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft zeigten die Haushaltsproben mehr Übereinstimmungen mit dem Klärwerkzulauf als anderen Habitaten, da häusliches Abwasser einen wesentlichen Bestandteil des Abwassers darstellt. Außerdem entstehen

sowohl in Waschmaschinen, Geschirrspülern sowie Duschsiphons als auch auf den Innenflächen von Kanalrohren Biofilme<sup>43,44,63,64</sup>, die ebenfalls dazu führen, dass ähnliche Spezies in den Proben auftreten.

### 3.3.2 Vergleich der Antibiotikaresistenzen

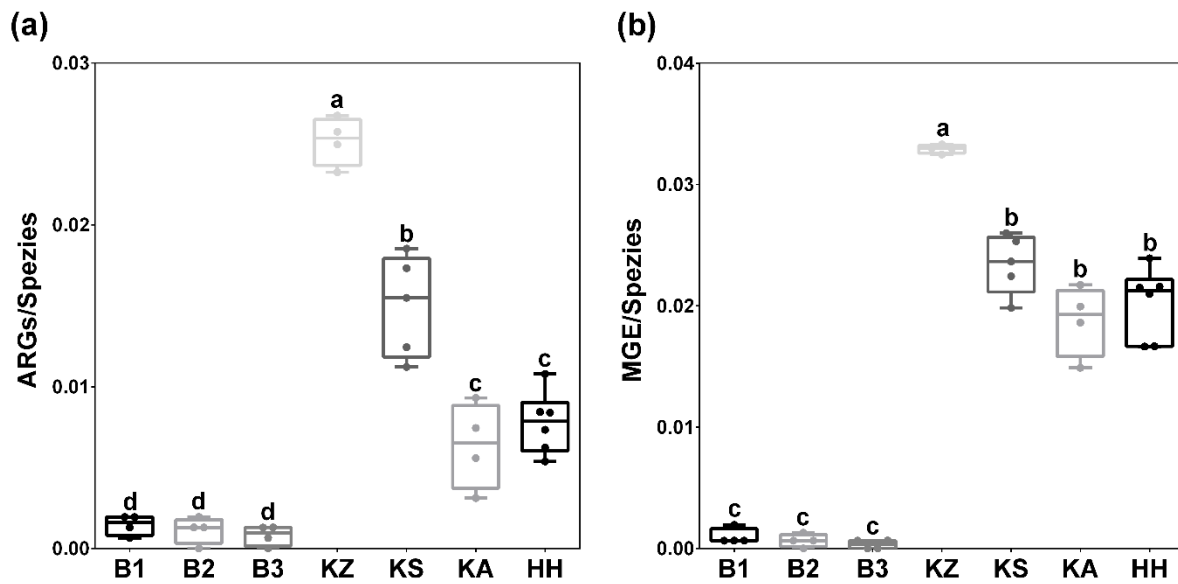
Im Rahmen der Metagenom-Sequenzierung wurden die Virulenzfaktoren bestimmt, zu denen u.a. die Antibiotikaresistenzfaktoren zählen (Abb. 7). Der Anteil an Antibiotikaresistenzfaktoren in Bodenproben war deutlich geringer. Während in Haushalts- und Klärwerkproben die mobilen genetischen Elemente überwogen, war der relative Anteil an Effluxpumpen in Bodenproben höher. Mobile genetische Elemente sind Plasmide, Transposons oder Integrons, die die Übertragung von genetischen Eigenschaften (z.B. ARG) zwischen Bakterien ermöglichen<sup>65</sup> und so auch wesentlich zur Verbreitung von Antibiotikaresistenzen beitragen<sup>66</sup>.



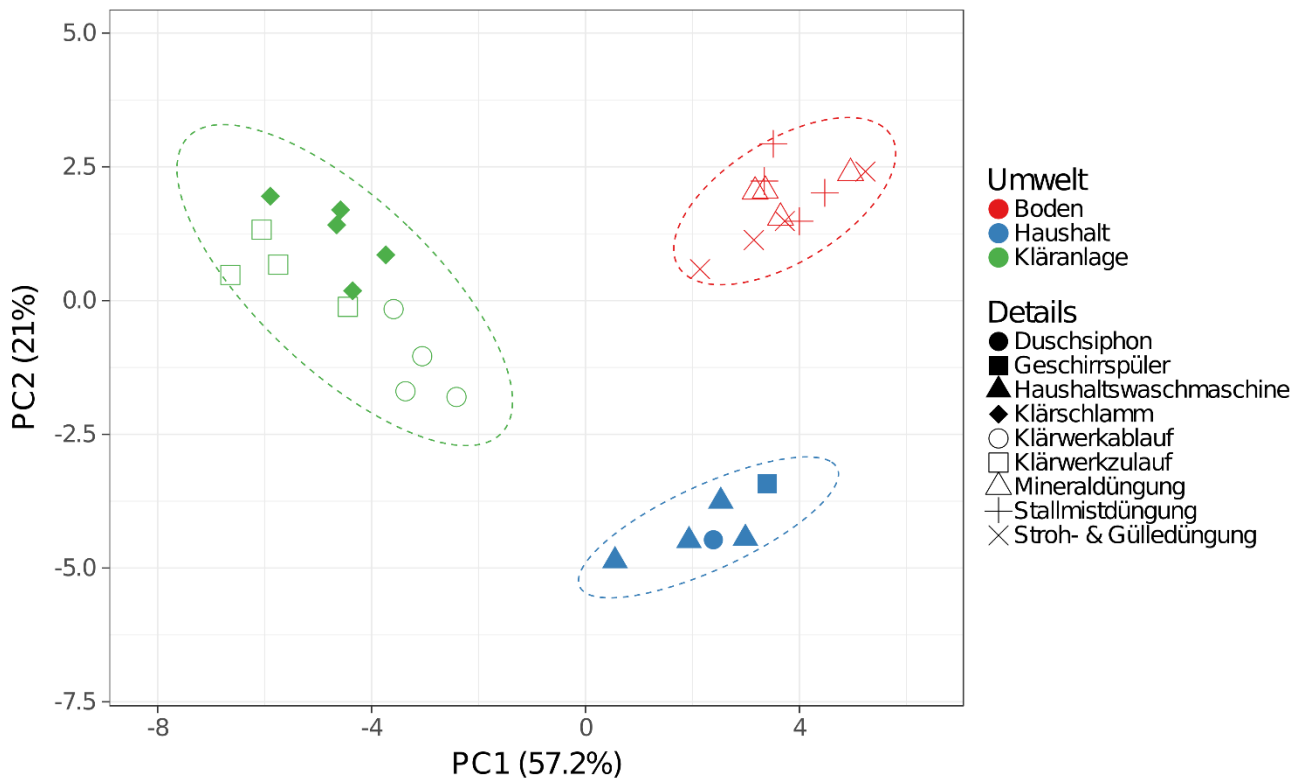
**Abbildung 7:** Relative Zusammensetzung der Antibiotikaresistenzfaktoren in Boden- (B1 (n=4), B2 (n=4), B3 (n=4)) (a), Klärwerk- (KZ (n=4), KS (n=5), KA (n=4)) und Haushaltsproben (DS (n=1), GS (n=1), WM (n=4)). Die DNA-Sequenzen wurden mit der mikrobiellen Virulenzdatenbank (MvirDB) abgeglichen.<sup>52</sup>

Die Anzahl an ARG und mobilen genetischen Elementen (MGE) im Verhältnis zur Anzahl der bakteriellen Spezies waren in den Proben des Klärwerkzulaufs signifikant höher, während die Haushaltsproben ähnliche Werte wie die Proben des Klärwerkablaufs aufwiesen (Abb. 8). In den Bodenproben wurden fast keine ARG sowie MGE nachgewiesen. Daraus geht hervor, dass zwar im

Klärwerk das Reservoir an antibiotikaresistenten Bakterien höher zu sein scheint, aber die Haushaltsproben dennoch einen signifikant höheren Anteil an ARG und MGE im Vergleich zu Bodenproben zeigen.

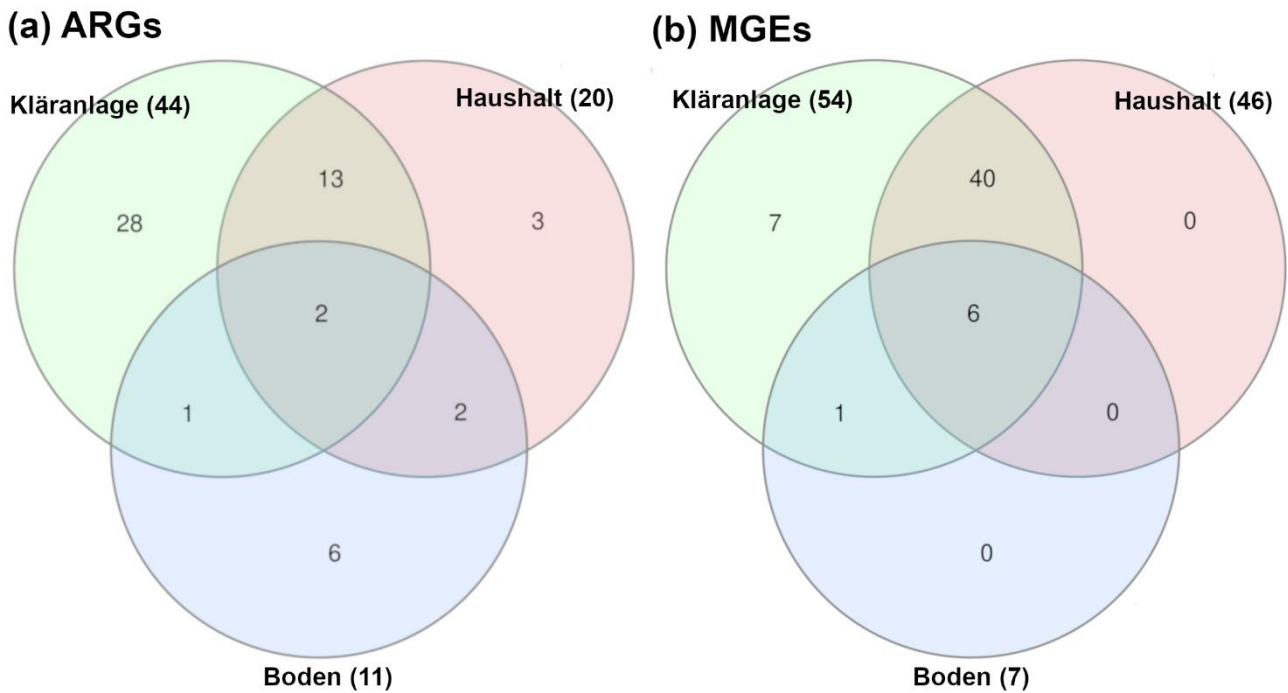


**Abbildung 8:** Verhältnis von ARG (a) und MGE (b) pro bakterieller Spezies in verschiedenen Böden (B1, B2, B3, jeweils n=4), Klärwerkzulauf (KZ, n=4), Klärschlamm (KS, n=5), Klärwerkablauf (KA, n=4) und Haushaltsproben (HH, n=6). Verschiedene Buchstaben weisen auf signifikante Unterschiede hin, die mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test berechnet wurden ( $p \leq 0.05$ ).<sup>52</sup>



**Abbildung 9:** Hauptkomponentenanalyse auf der Grundlage der Spearman-Korrelation der Antibiotikaresistenzfaktoren. Unit variance scaling und der NIPALS-Algorithmus (Nonlinear Iterative Partial Least Squares) wurde benutzt um die Hauptkomponenten zu berechnen. Die X- und Y-Achse zeigen Hauptkomponente 1 und 2, die 57,2% bzw. 21% der Gesamtvarianz erklären.<sup>52</sup>

Die Hauptkomponentenanalyse der Antibiotikaresistenzfaktoren zeigt, dass die Proben des gleichen Habitats stark korrelieren (Abb. 9) während die Haushaltsproben nur schwach mit Boden- (Spearman Korrelation=0,02) und Klärwerkproben (Spearman Korrelation=0,01) korrelieren. Daraus lässt sich schließen, dass die Resistome der verschiedenen Habitats sehr unterschiedlich zusammengesetzt sind. Dennoch wurden zum Teil die gleichen Resistenzgene und mobilen genetischen Elemente detektiert (Abb. 10). Während nur wenige Gene in allen drei Habitats auftraten, wiesen die Klärwerk- und Haushaltsproben viele Übereinstimmungen auf. Insbesondere traten alle MGE im Klärwerk auf, die auch im Haushalt und Boden nachgewiesen wurden. Dies lässt sich aber vermutlich darauf zurückführen, dass die Klärwerkproben generell den größten Anteil an ARG und MGE aufwiesen.



**Abbildung 10:** Venn-Diagramm von Antibiotikaresistenzgenen (ARGs) (a) und mobilen genetischen Elementen (MGEs) (b) in Kläranlagen-, Boden- und Haushaltsproben. Die Zahl in der Klammer gibt die Gesamtzahl der für jeden Probenotyp annotierten Gene an.<sup>52</sup>

Studien haben gezeigt, dass das Resistom besonders durch die bakterielle Zusammensetzung des Habitats beeinflusst wird<sup>67–69</sup>. Zudem führen Ähnlichkeiten der mikrobiellen Gemeinschaft zu Übereinstimmungen des ARG- und MGE-Vorkommens<sup>70</sup> und auch die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine spezifische Zusammensetzung des Resistoms in jedem Habitat.

Kläranlagen gelten als Hotspots für ABR<sup>71,72</sup> und auch unsere Daten zeigen signifikant höhere Werte für Antibiotikaresistenzfaktoren, ARG und MGE. Die Überschneidung der identifizierten ARG und MGE in Haushalts- und Klärwerkzulaufproben zeigen, dass häusliche Abwässer eine wichtige Komponente des Abwassers darstellen. Zwar kann die Übertragung von Bodenbakterien durch physikalische Kräfte wie Wasser oder Wind gefördert werden<sup>73</sup>, dennoch ist eine Verbreitung von antibiotikaresistenten Bakterien von Haushalten über häusliche Abwässer zur Kläranlage wahrscheinlicher, da diese Habitate unmittelbar miteinander verbunden sind.

Für den Transfer von ARG zwischen Bakterien müssen viele Faktoren, wie nahe Verwandtschaft der Spezies, zeitgleiche Präsenz im gleichen Habitat und Selektionsdruck, erfüllt werden<sup>74</sup>. Demnach ist ein Transfer zwischen Bakterien aus verschiedenen Habitaten weniger wahrscheinlich während innerhalb eines Habitats diese Bedingungen häufiger gegeben sind. Obwohl Bakterien



zwischen miteinander verbundenen Habitaten, wie Haushalt und Klärwerk, übertragen werden können, erfordert dies dennoch das Überleben dieser Bakterien unter den neuen Umweltbedingungen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Antibiotikaresistenzen primär innerhalb eines Habitats entstehen zu scheinen und vermutlich von den spezifischen Umweltbedingungen beeinflusst und geformt werden.

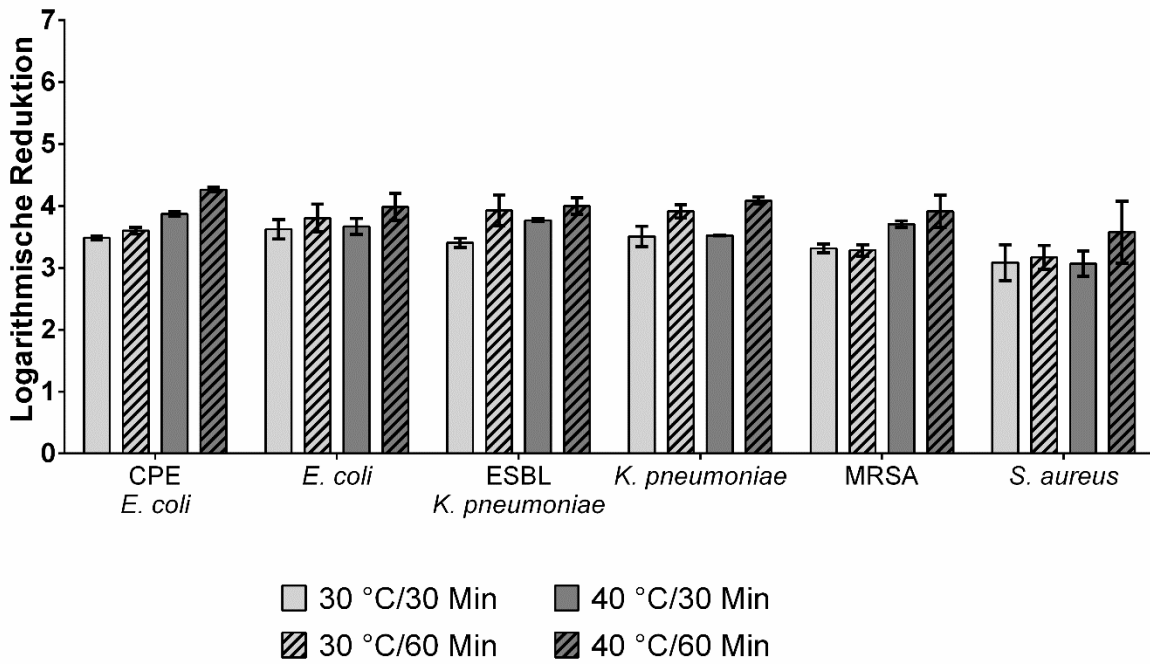
### 3.4 Einfluss von Waschprozessen auf antibiotikaresistente Bakterien

Einen weiteren Aspekt stellt der Einfluss der gegebenen Umweltbedingungen in Waschmaschinen und Geschirrspülern auf antibiotikaresistente Bakterienstämme dar. Im Zuge der anwendungsbezogenen Waschversuche wurden bereits charakterisierte, resistente Laborstämme bzw. aus Umweltproben isolierte Bakterienstämme verwendet, um den Effekt der Waschbedingungen auf antibiotikaresistente Bakterien zu bestimmen. Während die Geschirrspüler-Versuche in einem haushaltsüblichen Gerät durchgeführt wurden erfolgte die Untersuchung des Waschprozesses in einer Waschmaschine im Labormaßstab (Rotawash), die sich in der Arbeitsgruppe Hygiene und Mikrobiologie bereits zur Simulation von haushaltsnahen Waschprozessen als geeignet erwiesen hat<sup>36</sup>.

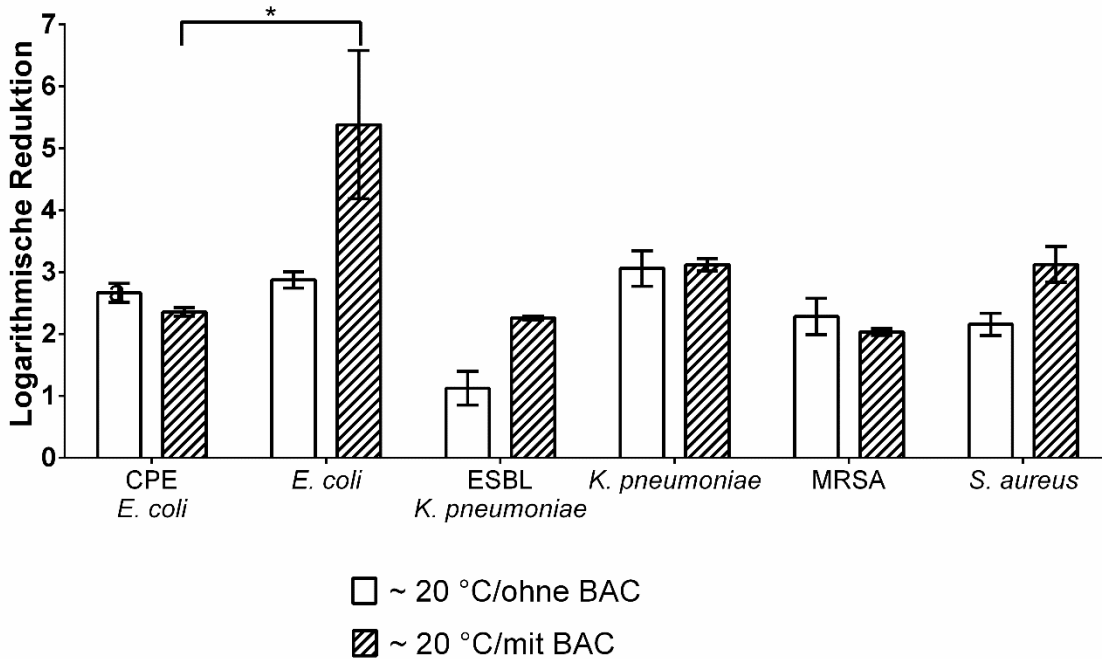
#### 3.4.1 Einfluss der Bedingungen in Waschmaschinen

In Abbildung 11 sind die Ergebnisse der Waschversuche mit Waschmittel ohne Bleiche sowie des Spülgangs mit und ohne Benzalkoniumchlorid dargestellt. Obwohl die Unterschiede marginal ausfallen (nicht signifikant), wurden in allen Fällen minimal höhere logarithmische Reduktionen (LR) bei den resistenten Stämmen erreicht. Lediglich bei dem Spülgang sind die Reduktionen bei dem sensitiven *E. coli*-Stamm im Vergleich zu dem resistenten Stamm signifikant höher und auch die anderen resistenten Stämme zeigen etwas geringere oder ähnliche Reduktionen verglichen mit den nicht-resistenten Stämmen.

(a)



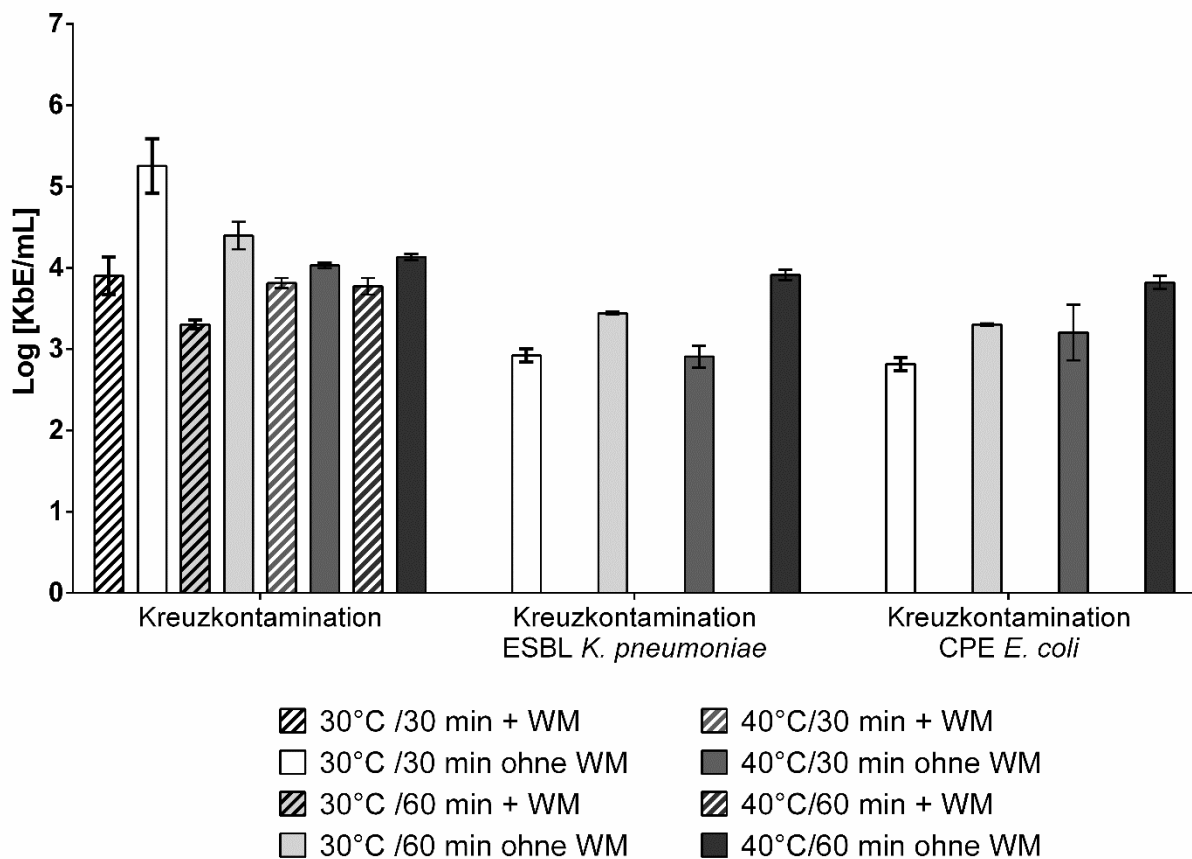
(b)



**Abbildung 11:** Einfluss des Hauptwaschganges (a) und des Spülgangs (b) des Waschprozesses simuliert in der Rotawash auf nicht-resistente und resistente Stämme von *E. coli*, *K.pneumoniae* und *S. aureus*. Die Mittelwerte mit Standardfehler (n=3) sind dargestellt ( $p \leq 0.05$ ).

Der antimikrobielle Effekt des Waschens basiert auf der Kombination von mechanischer Entfernung und Inaktivierung von Mikroorganismen durch Temperatur und Waschmittel<sup>75</sup>. Die Ergebnisse zeigen, dass unabhängig von der bakteriellen Spezies oder Resistenzen bei 40 °C höhere Reduktionen erreicht wurden als bei 30 °C. Außerdem waren die LR der *S. aureus*-Stämme etwas

geringer, was vermutlich auf eine schlechtere Haftung an den Textilien oder aber auf eine höhere Sensitivität gegenüber dem Waschmittel der gram-negativen Stämme zurückzuführen sein könnte<sup>32</sup>.



**Abbildung 12:** Kreuzkontamination aller Waschgänge in KbE/mL (Kolonienbildende Einheiten/mL). Während die Kreuzkontamination unabhängig von der Spezies ermittelt wurde, wurden mittels Selektivmedien zusätzlich die Kreuzkontamination mit ESBL *K. pneumoniae* und CPE *E. coli* ermittelt.

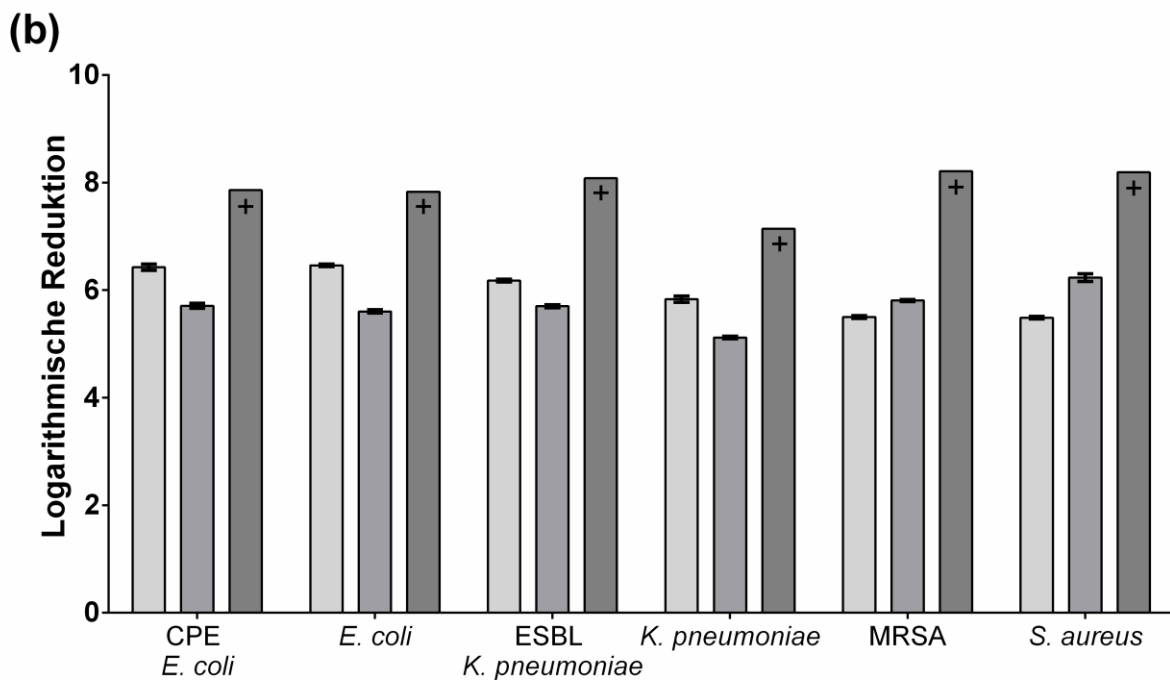
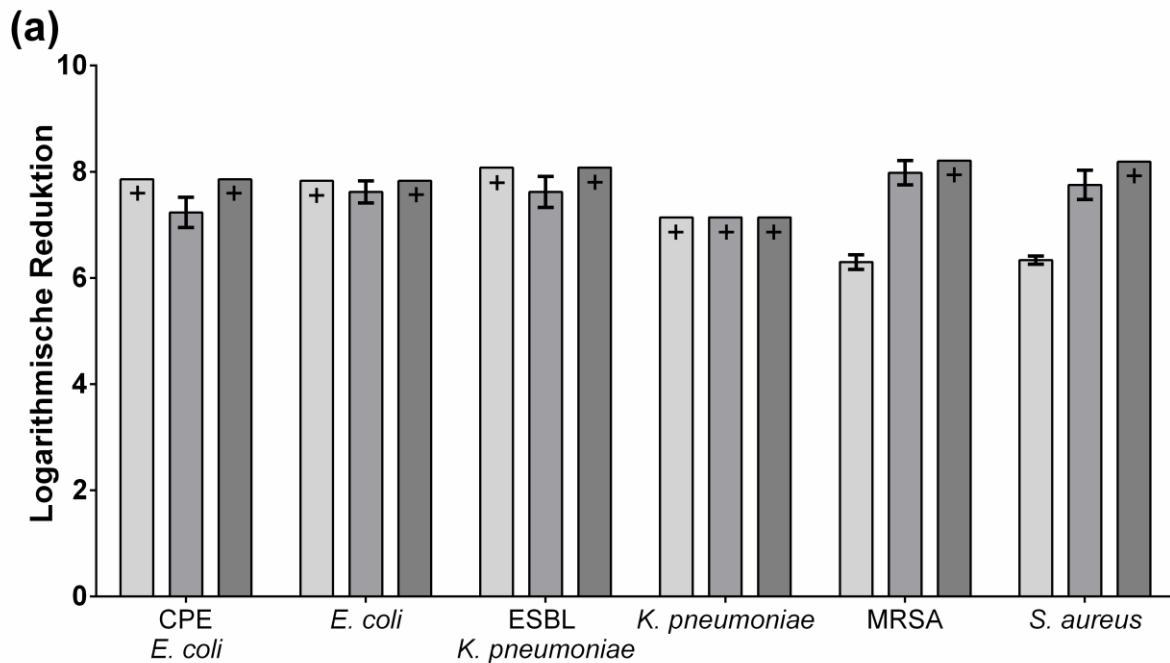
In Abbildung 12 ist außerdem die Kreuzkontamination dargestellt. Diese wurde gemessen, indem bei jedem Versuch sterile Baumwollläppchen mitgewaschen wurden und diese anschließend genau wie die zuvor artifiziell kontaminierten Baumwollläppchen behandelt wurden. Daraus geht hervor, dass bei allen Waschläufen Kreuzkontaminationen auftraten, die der logarithmischen Reduktion der untersuchten Bakterienstämme ähneln. Zusätzlich wurde mithilfe von Selektivmedien die Kreuzkontamination auf ESBL *K. pneumoniae* und CPE *E. coli* überprüft. Lediglich bei den Waschläufen ohne Waschmittel wurden hohe Kreuzkontaminationen dieser resistenten Stämme ermittelt, welches den großen Einfluss des Waschmittels verdeutlicht. Eine Vermutung für die höheren Reduktionen der resistenten Bakterienstämme könnte auf der verminderten Fitness beruhen, die durch die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen bzw. die Aufnahme von Resistenzgenen beobachtet wird<sup>76,77</sup>.

Generell wurde bei den Waschversuchen ohne bleichehaltiges Waschmittel keine vollständige Reduktion (mit Waschmittel: ca. 45%, ohne Waschmittel: ca. 30%) der resistenten und nicht-resistenten Stämme erzielt. Aus der Literatur geht hervor, dass Vollwaschmittel mit aktivierter Sauerstoffbleiche eine deutlich bessere Inaktivierung auch bei Temperaturen von 30 - 40 °C ermöglichen<sup>32,78,79</sup>, sodass unter Verwendung eines Vollwaschmittels bei niedrigeren Temperaturen ebenfalls eine ausreichende hygienische Qualität der Wäsche gewährleistet wird, besonders wenn Infektionen im Haushalt vorliegen<sup>80</sup>. Außerdem wird deutlich, dass der Zusatz von BAC ebenfalls zu einer geringfügigen Reduktion führt. Bei der Verwendung von Hygienespülern sollte jedoch berücksichtigt werden, dass dadurch die Entstehung von Resistenzen gegenüber Bioziden und sogar Kreuz-Resistenzen gegenüber Antibiotika begünstigt werden kann<sup>81-83</sup>.

### 3.4.2 Einfluss der Bedingungen in Geschirrspülern

Bei den Geschirrspüler-Versuchen wurden die gleichen Stämme verwendet und möglichst haushaltsnahe Bedingungen getestet. Daher wurden die Programme so ausgewählt, dass sie jeweils einem Kurzprogramm (45°C/5 min Hauptwaschgang), einem Eco-Programm (45°C/90 min Hauptwaschgang) und einem Standardprogramm (60°C/15 min Hauptwaschgang) ähneln. Aus Abbildung 13 geht hervor, dass bei den Versuchen mit Geschirrspülmittel bei 60 °C eine vollständige Reduktion erfolgte. Auch bei dem Kurzprogramm wurde bei allen Stämmen ausgenommen von *S. aureus* die maximale Reduktion erreicht. Lediglich bei dem Eco-Programm wurde nur der sensitive *K. pneumoniae*-Stamm vollständig inaktiviert. Obwohl keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden, fielen bei den Geschirrspülversuchen die Reduktionen aller resistenten Stämme im Vergleich zu den sensitiven Stämmen etwas geringer aus. Bei den Versuchen ohne Geschirrspülmittel wurde nur bei 60 °C die maximale LR erreicht während bei den anderen beiden Programmen die Stämme schlechter inaktiviert wurden als unter Verwendung von Geschirrspülmittel.

Aus den Daten der Anwendungsversuche geht demnach hervor, dass unter normalen Bedingungen im Haushalt eine ausreichende Reduktion von sowohl nicht-resistenten als auch resistenten Bakterienstämmen stattfindet. Auch wenn mit dem Eco-Programm keine vollständigen Reduktionen erreicht wurden, lagen diese minimal unter der maximalen Inaktivierung und demnach können auch diese umweltfreundlichen Programme problemlos verwendet werden, sofern keine Infektionen im Haushalt vorliegen.



- 45°C/5 min (Hauptwaschgang) + 50°C Spülgang
- ▒ 45°C/90 min (Hauptwaschgang) + 50°C Spülgang
- 60°C/15 min (Hauptwaschgang) + 50°C Spülgang + LR max.

**Abbildung 13:** Einfluss eines Geschirrspülers auf nicht-resistente und resistente Stämme von *E. coli*, *K. pneumoniae* und *S. aureus* mit (a) und ohne (b) Geschirrspülmittel. Die Mittelwerte mit Standardfehler (n=6) sind dargestellt. Nicht-parametrischer Mann-Whitney Test zeigte keine signifikanten Unterschiede.

### 3.5 Verbraucherempfehlungen

Basierend auf den gewonnenen Daten, insbesondere der Untersuchung des Einflusses von Waschprozessen auf antibiotikaresistente Bakterien, können konkrete Verbraucherempfehlungen verfasst werden. Die Anwendungsversuche zeigen, dass resistente Bakterien nicht oder nur geringfügig widerstandsfähiger gegenüber den Bedingungen in den Haushaltsgeräten sind als nicht resistente Stämme. Demnach ist das zusätzliche Risiko im Zusammenhang mit antibiotikaresistenten Bakterien auf Geschirr oder Wäsche nach der Reinigung gering. Nichtsdestotrotz erfolgte eine Kreuzkontamination bei den Waschversuchen, sodass es möglich ist, dass die Bakterienstämme dort lediglich abgelöst aber nicht inaktiviert werden und so auf andere Textilien übertragen werden könnten. Bei der Geschirrspülmaschine kann das Fehlen von Reiniger und das Verwenden von Programmen mit niedrigen Temperaturen ebenfalls zu geringeren Keimreduktionen führen, wobei der Einfluss dieser Parameter auf die hygienische Leistung kleiner ist als bei der Waschmaschine.

#### 3.5.1 Empfehlungen für die Dusche

Antibiotikaresistente Keime können unter anderem auch auf der Haut oder im Darm von Menschen vorkommen. Beim Duschen kommt es zu einer Keimzahlreduktion auf der Haut und somit zum Transfer von Keimen in den Duschauslauf, wo sich diese Bakterien gemeinsam mit Umweltkeimen ansiedeln und Biofilme bilden können. Diese Biofilme können lange Zeiträume überdauern und dabei immer mehr Arten und somit genetische Vielfalt akkumulieren. In Duschsiphons angesiedelte Bakterien müssen zuvor bereits im Haushalt bzw. an und in den Haushaltsmitgliedern vorhanden gewesen sein. Aus diesem Grund ist es plausibel, dass eine hohe Zahl von Resistenzgenen in Duschsiphons detektiert wurden. Da dort aber im Normalfall einströmendes Wasser abläuft, ist die Gefahr einer Rückkontamination eher gering, aber nicht vollkommen auszuschließen. Eine Reinigung der Duschsiphons in regelmäßigen Abständen ist demnach als sinnvoll anzusehen.

#### 3.5.2 Empfehlungen für die Textilreinigung

Es konnte gezeigt werden, dass alle antibiotikaresistenten Teststämme beim Waschen und Geschirrspülen signifikant reduziert wurden und da Bakterien auf Textilien in der Regel aus dem menschlichen Mikrobiom oder der Umwelt stammen, sollte das Infektionsrisiko eher gering sein. Allerdings wurden nach dem Waschen bei 40 °C für 60 min mit einem bleichmittelfreien Waschmittel keine vollständigen mikrobiellen Reduktionen erreicht, und wenn ein ausreichendes Hygieneniveau gewährleistet sein muss, könnten höhere Temperaturen oder die Verwendung eines bleichmittelhaltigen Waschmittels notwendig sein<sup>75</sup>. Bei Wäsche, die weder Hitze noch Bleiche verträgt, oder in Haushalten mit kranken oder gefährdeten Personen, kann im Einzelfall auch der Einsatz von Hygienespülnern Sinn ergeben. Die häufige Nutzung von Hygienespülnern auf Basis quartärer Ammoniumverbindungen kann aber die Resistenzbildung begünstigen, weshalb eher darauf verzichtet werden sollte<sup>82,83</sup>. Neben den genannten Maßnahmen ist auch das schnelle Austrocknen und das regelmäßige Reinigen von Einspülkammer und Gummidichtung sinnvoll, da sich vor allem dort Bakterien ansiedeln können.

- Regelmäßig heiße Programme benutzen (60 °C).
- Bleichehaltige Waschmittel verwenden.
- Hygienespüler nur bei Haushalten mit gefährdeten Personen und keine regelmäßige Anwendung.
- Regelmäßige Reinigung von Einspülkammer und Gummidichtung.

### 3.5.3 Empfehlungen für das Geschirrspülen

Nahezu alle Maschinengeschirrspülmittel enthalten Bleiche. Diese hat neben der Entfärbung von Farbflecken, wie sie durch verschiedene Lebensmittel entstehen können, einen großen Einfluss auf die mikrobielle Reduktion. Maschinelles Geschirrspülen ohne Reiniger führt zu einer geringeren Keimreduktion, wobei der Reinigereinfluss offenbar geringer ist als bei der Waschmaschine. Auch Ökoprogramme erreichen (mit Reiniger) im Schnitt sehr hohe Keimreduktionen und können problemlos Anwendung finden. Auf längere Zeiträume ist es allerdings empfehlenswert nach einigen Ökoläufen ein heißeres Intensivprogramm mit ca. 70 °C zu verwenden. Insbesondere bei Spülmaschinenläufen, die tagsüber stattfinden, sind Programme kürzerer Dauer beliebter als Programme die mehrere Stunden dauern<sup>84</sup>. Auch diese Schnellprogramme erzielen (bei schlechterer Energieeffizienz) eine sehr hohe Reduktion der Keimbelastung, allerdings gilt auch hier, dass nach einigen Durchgängen ein Intensivprogramm gestartet werden sollte, und allgemein müssen sowohl die individuelle Beladung der Spülmaschine als auch der gesundheitliche Zustand der Haushaltsmitglieder berücksichtigt werden. Bei starker Anschmutzung des Geschirrs oder hygienisch kritischem Geschirr, wie Schneidebrettern, auf denen Geflügel geschnitten wurde, sollten heißere Programme verwendet werden. Nach dem Reinigen von stark verschmutztem Geschirr kann es erforderlich sein, die Filtereinheit und ggfls. die Sprüharme zu reinigen.

- Geschirrspülmittel verwenden.
- Nach längeren Zeiträumen bei ausschließlicher Verwendung von Ökoprogrammen oder Kurzprogrammen heißere Intensivprogramme verwenden.
- Berücksichtigung der individuellen Beladung (bei starken Verschmutzungen/ mikrobiell kritisches Geschirr Programme mit höherer Temperatur wählen).
- Anwendung von Intensivprogrammen bei gefährdeten Personen im Haushalt.
- Siebe und Sprüharme gelegentlich reinigen.

## 4. Öffentlichkeitsarbeit/Veröffentlichungen/Vorträge

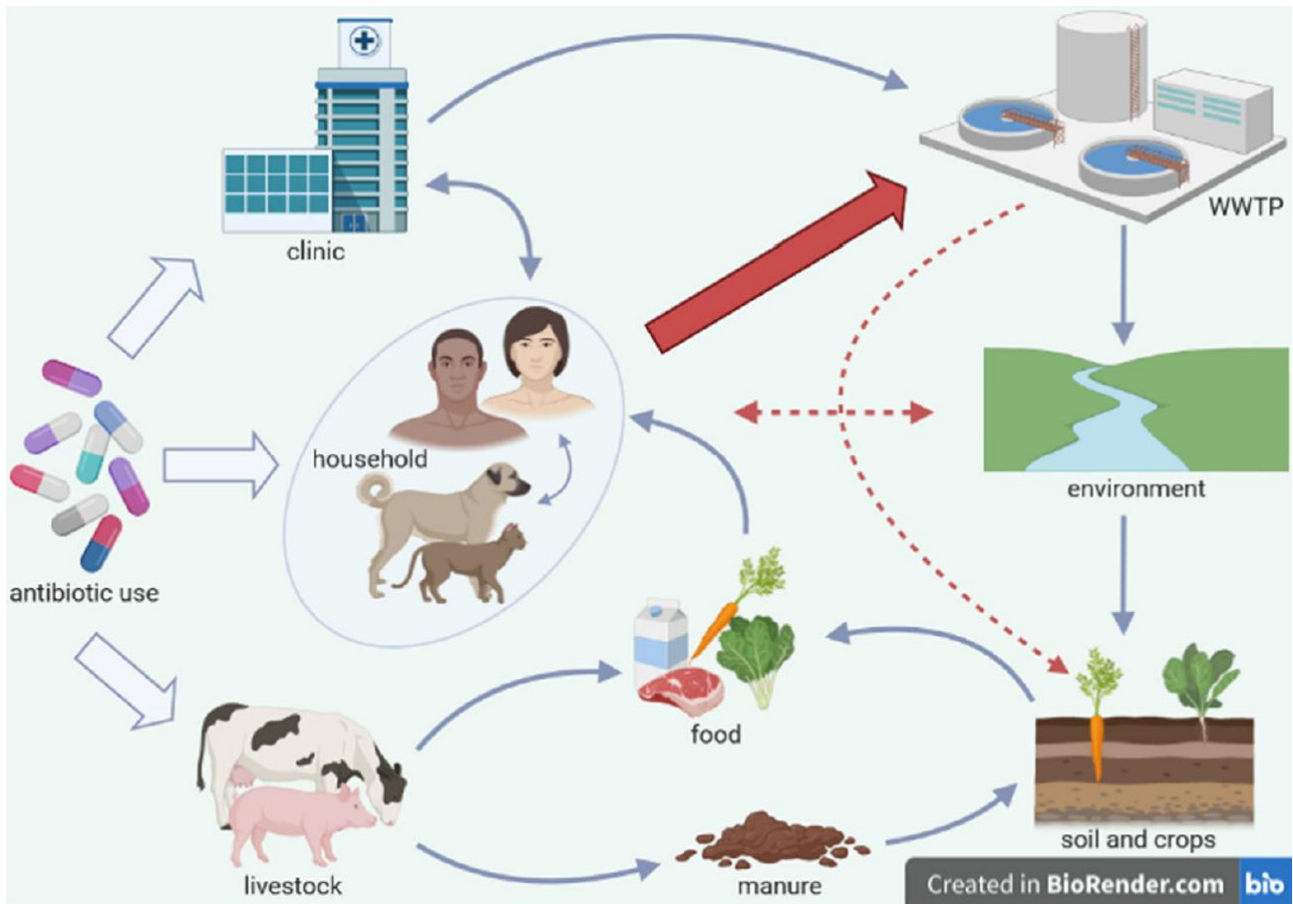
Die Daten zu Antibiotikaresistenzen wurden bereits im November 2020 in einem Peer-Review-Journal veröffentlicht<sup>41</sup>. Außerdem wurde auf das laufende Projekt im HN21 Journal 2019 aufmerksam gemacht<sup>85</sup>. Eine umfangreiche Publikation der Ergebnisse der Metagenomanalyse wurde im Mai 2021 ebenfalls in einem Peer-Review-Journal veröffentlicht<sup>86</sup>. Da das Projekt im Rahmen einer Promotionsarbeit bearbeitet wurde, enthält auch eine Ende 2020 veröffentlichte Dissertation<sup>52</sup> die entsprechenden Resultate und Zukunftsperspektiven.

## 5. Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit wurden verschiedene Umgebungen derselben geografischen Region analysiert, um mögliche Übertragungswege von antibiotikaresistenten Bakterien mit besonderem Fokus auf Privathaushalte zu untersuchen. Während die Rolle von Kläranlagen als Hotspots für ABR bestätigt wurde, traten ARGs und antibiotikaresistente Bakterien häufig in Privathaushalten auf, was darauf hinweist, dass die häusliche Umgebung auch als Reservoir für ABR fungieren könnte.

Die Ergebnisse belegen, dass Resistenzgene und antibiotikaresistente Bakterienstämme auch im Haushalt zu finden sind. Dabei werden teilweise die gleichen Spezies und Gene gefunden, die auch in der Umwelt (hier: Kläranlage) auftreten, allerdings ist der Anteil an Resistenzen im Haushalt im Vergleich zu Abwasser und Klärschlamm deutlich geringer. Vergleicht man jedoch die bakteriellen Spezies zeigt sich, dass im Haushalt eine höhere Speziesvielfalt und mehr intrinsisch resistente Spezies vertreten sind. Obwohl die intrinsischen Resistenzen von Natur aus bestehen, sind auch Infektionen durch diese Mikroorganismen von Relevanz<sup>87,88</sup>. Während in Abwasser, Klärschlamm und Ablauf die identifizierten bakteriellen Spezies nur geringfügig voneinander abweichen, variieren die verschiedenen Bereiche im Haushalt stärker. Ein Eintrag von Mikroorganismen aus dem Haushalt in das Klärwerk und umgekehrt könnte möglich sein, da die gleichen Umweltbakterien in den jeweiligen Habitaten überleben. Die unterschiedlichen bakteriellen Zusammensetzungen und Resistome von Böden, Kläranlagen und Haushalten belegen jedoch, dass, obwohl eine häufige Entwicklung mobiler Resistenzgene wahrscheinlich ist<sup>74</sup>, nur wenige dieser Determinanten zwischen unterschiedlichen bakteriellen Gemeinschaften übertragen werden oder sich dort etablieren (Abb. 14).





**Abbildung 14:** Mögliche Transferpfade von Antibiotikaresistenzen zwischen verschiedenen Umgebungen. Rote Pfeile stellen die untersuchten Routen dar und gestrichelte Linien markieren die begrenzte Übertragung.<sup>52</sup>

Die durchgeführte Metagenomanalyse der verschiedenen Habitate zeigt, dass es charakteristische Resistome gibt und nur wenige Überschneidungen von ARG zwischen den untersuchten Habitaten. Dies deutet darauf hin, dass sich ABRs vorwiegend in den jeweiligen Umgebungen entwickeln könnten, verursacht durch die unterschiedlichen Umweltbedingungen. Eine Übertragung von ABR zwischen den verschiedenen Umgebungen ist eher auf direkt verbundene Umgebungen beschränkt, beispielsweise vom Haushalt zur Kläranlage. Die untersuchten Umgebungen zeigten unterschiedliche bakterielle Gemeinschaften mit ausgeprägten Unterschieden zwischen den Teilumgebungen innerhalb der Kläranlage und in den Haushalten<sup>86</sup>, was die Hypothese unterstützt, dass Resistome vorwiegend durch die bakterielle Phylogenie strukturiert sind. Daher liefert die durchgeführte Studie Hinweise darauf, dass die Übertragung von ARG und antibiotikaresistenten Bakterien zwischen verschiedenen Umgebungen weniger wichtig sein könnte als die Konzentration auf die Umsetzung von Präventionsmaßnahmen in jeder einzelnen Umgebung. Während die durchgeführte Metagenomstudie<sup>86</sup> einen guten ersten Überblick gibt, sind weitere Studien mit mehr Proben und einer tiefgreifenden Analyse der gemeinsam genutzten Gene erforderlich. Die Ausbreitung von ABR kann begrenzt werden, indem die Entwicklung von Resistenzen in der Haushaltsumgebung reduziert wird, um ein geringes, aber dennoch mögliches Infektionsrisiko für Haushaltsmitglieder und eine Verbreitung innerhalb des Haushalts oder über häusliches Abwasser

zur Kläranlage zu verhindern. Darüber hinaus sollte ein möglicher Transfer von Antibiotikarückständen und resistenten Bakterien aus der Kläranlage in die terrestrische und aquatische Umwelt vermieden werden, um die Förderung der Resistenzentwicklung zu verhindern. Dies könnte durch den Einsatz fortschrittlicher Technologien bei der Abwasserbehandlung und die Vermeidung der Verwendung von behandeltem Abwasser zur Düngung und Bewässerung erreicht werden. Es sind jedoch umfassendere Studien erforderlich, um die Resistome verschiedener Umgebungen zu vergleichen und um zu bestätigen, ob sich ABR unabhängig in jeder Umgebung entwickeln. Basierend auf den erhobenen Daten sollten quantitative Analysen durchgeführt werden, um die Bedeutung der Unterschiede zwischen den analysierten Umgebungen weiter herauszuarbeiten. Wesentliche Ergebnisse dieses Projekts werden online zur Verfügung gestellt. Die Onlinepräsenz wird auf <https://foodsystems.institute/> der Hochschule Rhein-Waal erfolgen und aktuell gehalten.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Wellington EMH, Boxall ABA, Cross P, et al. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(2):155-165. doi:10.1016/S1473-3099(12)70317-1
2. Da Costa PM, Loureiro L, Matos AJF. Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: The interface between humans, animals and the environment. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(1):278-294. doi:10.3390/ijerph10010278
3. Sandegren L. Selection of antibiotic resistance at very low antibiotic concentrations. *Ups J Med Sci*. 2014;119(2):103-107. doi:10.3109/03009734.2014.904457
4. Rizzo L, Manaia C, Merlin C, et al. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Sci Total Environ*. 2013;447(2013):345-360. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.01.032
5. Gullberg E, Albrecht LM, Karlsson C, Sandegren L, Andersson DI. Selection of a Multidrug Resistance Plasmid by Sublethal Levels of Antibiotics and Heavy Metals. 2014;5(5):e01918-14. doi:10.1128/mBio.01918-14
6. Roschanski N, Fischer J, Guerra B, Roesler U. Development of a Multiplex Real-Time PCR for the Rapid Detection of the Predominant Beta-Lactamase Genes CTX-M , SHV , TEM and CIT-Type AmpCs in Enterobacteriaceae. 2014;9(7). doi:10.1371/journal.pone.0100956
7. Knapp CW, Dolfig J, Ehlert PAI, Graham DW. Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environ Sci Technol*. 2010;44(2):580-587. doi:10.1021/es901221x
8. Nesme J, Simonet P. The soil resistome: A critical review on antibiotic resistance origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria. *Environ Microbiol*. 2015;17(4):913-930. doi:10.1111/1462-2920.12631
9. Galler H, Feierl G, Petternel C, et al. Multiresistant bacteria isolated from activated sludge in Austria. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(479):1-11. doi:10.3390/ijerph15030479
10. Blaak H, Lynch G, Italiaander R, Hamidjaja RA, Schets FM, De Husman AMR. Multidrug-resistant and extended spectrum beta-lactamase-producing escherichia coli in dutch surface water and wastewater. *PLoS One*. 2015;10(6):1-16. doi:10.1371/journal.pone.0127752
11. Börjesson S, Egervärn M, Lindblad M, Englund S. Frequent occurrence of extended-spectrum beta-lactamase- and transferable AMPC beta-lactamase-producing Escherichia coli on domestic chicken meat in Sweden. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(7):2463-2466. doi:10.1128/AEM.03893-12
12. de Almeida MVA, Cangussú ÍM, de Carvalho ALS, Brito ILP, Costa RA. Drug resistance, AmpC- $\beta$ -lactamase and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolated from fish and shrimp. *Chin Med J (Engl)*. 2013;126(2007):1310-1316. doi:10.3760/cma.j.issn.0366-6999.20130029
13. Marti R, Scott A, Tien YC, et al. Impact of manure fertilization on the abundance of antibiotic-resistant bacteria and frequency of detection of antibiotic resistance genes in soil and on vegetables at harvest. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(18):5701-5709. doi:10.1128/AEM.01682-13
14. Udikovic-Kolic N, Wichmann F, Broderick NA, Handelsman J. Bloom of resident antibiotic-resistant bacteria in soil following manure fertilization. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111(42):15202-15207. doi:10.1073/pnas.1409836111
15. Gudeta DD, Bortolaia V, Amos G, et al. The soil microbiota harbors a diversity of carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases of potential clinical relevance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(1):151-160. doi:10.1128/AAC.01424-15

16. Forsberg KJ, Reyes A, Wang B, et al. The Shared Antibiotic Resistome of Soil Bacteria and Human Pathogens. *Science* (80- ). 2012;337(6098):1107-1111. doi:10.1126/science.1220761
17. Laube H, Friese A, von Salviati C, et al. Longitudinal monitoring of extended-spectrum-beta-lactamase/ampC-producing *Escherichia coli* at german broiler chicken fattening farms. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(16):4815-4820. doi:10.1128/AEM.00856-13
18. Abdallah HM, Reuland EA, Wintermans BB, et al. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and/or carbapenemases-producing enterobacteriaceae isolated from retail chicken meat in Zagazig, Egypt. *PLoS One*. 2015;10(8):e0136052. doi:10.1371/journal.pone.0136052
19. Guerra B, Fischer J, Helmuth R. An emerging public health problem: Acquired carbapenemase-producing microorganisms are present in food-producing animals, their environment, companion animals and wild birds. *Vet Microbiol*. 2014;171(3-4):290-297. doi:10.1016/j.vetmic.2014.02.001
20. Reuland EA, al Naiemi N, Raadsen SA, Savelkoul PHM, Kluytmans JAJW, Vandenbroucke-Grauls CMJE. Prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in raw vegetables. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33(10):1843-1846. doi:10.1007/s10096-014-2142-7
21. Zurfluh K, Poirel L, Nordmann P, Klumpp J, Stephan R. First detection of *Klebsiella variicola* producing OXA-181 carbapenemase in fresh vegetable imported from Asia to Switzerland. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2015;4(38). doi:10.1186/s13756-015-0080-5
22. Woolhouse M, Ward M, van Bunnik B, Farrar J. Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2015;370(1670):20140083. doi:10.1098/rstb.2014.0083
23. Rehberg L, Frontzek A, Melhus Å, Bockmühl DP. Prevalence of  $\beta$ -lactamase genes in domestic washing machines and dishwashers and the impact of laundering processes on antibiotic-resistant bacteria. *J Appl Microbiol*. 2017;123(6):3218-3221. doi:10.1111/jam.13574
24. Lucassen R, Rehberg L, Heyden M, Bockmühl DP. Strong correlation of total phenotypic resistance of samples from household environments and the prevalence of class 1 integrons suggests for the use of the relative prevalence of *intl1* as a screening tool for. *PLoS One*. 2019;14(6):e0218277. doi:10.1371/journal.pone.0218277
25. Bundesministerium für Gesundheit. *Dart 2020 - Antibiotika-Resistenzen Bekämpfen Zum Wohl von Mensch Und Tier.*; 2015.
26. Martínez JL. Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments. *Science* (80- ). 2008;321(July):365-367. doi:10.1002/9781118075609
27. Finley RL, Collignon P, Larsson DGJ, et al. The scourge of antibiotic resistance: The important role of the environment. *Clin Infect Dis*. 2013;57(5):704-710. doi:10.1093/cid/cit355
28. Galler H, Feierl G, Petternel C, et al. KPC-2 and OXA-48 carbapenemase-harboring Enterobacteriaceae detected in an Austrian wastewater treatment plant. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(2):O132-O134. doi:10.1111/1469-0691.12336
29. Schages L, Wichern F, Kalscheuer R, Bockmühl D. Winter is coming – Impact of temperature on the variation of beta-lactamase and *mcr* genes in a wastewater treatment plant. *Sci Total Environ*. 2020;712:136499. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.136499
30. Bloomfield SF, Exner M, Signorelli C, Nath KJ, Scott EA. The infection risks associated with clothing and household linens in home and everyday life settings, and the role of laundry. *Int Sci Forum Home Hyg*. 2011;(April):1-43.
31. Schmithausen RM, Sib E, Exner M, et al. The Washing Machine as a Reservoir for Transmission of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase (CTX-M-15)-Producing *Klebsiella*

- oxytoca ST201 to Newborns. *Appl Environ Microbiol.* 2019;85(22):e01435-19. doi:10.1128/AEM.01435-19
32. Honisch M, Stamminger R, Bockmühl DP. Impact of wash cycle time, temperature and detergent formulation on the hygiene effectiveness of domestic laundering. *J Appl Microbiol.* 2014;117(6):1787-1797. doi:10.1111/jam.12647
  33. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.1. <http://www.eucast.org>.
  34. Gillings MR, Gaze WH, Pruden A, Smalla K, Tiedje JM, Zhu YG. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *ISME J.* 2015;9(6):1269-1279. doi:10.1038/ismej.2014.226
  35. Gaze WH, Zhang L, Abdousslam NA, et al. Impacts of anthropogenic activity on the ecology of class 1 integrons and integron-associated genes in the environment. *ISME J.* 2011;5(8):1253-1261. doi:10.1038/ismej.2011.15
  36. Schages J, Stamminger R, Bockmühl DP. A new method to evaluate the antimicrobial efficacy of domestic laundry detergents. *J Surfactants Deterg.* 2020;submitted:629-639. doi:10.1002/jsde.12401
  37. Brands B, Schulze Struchtrup S, Stamminger R, Bockmühl DP. A method to evaluate factors influencing the microbial reduction in domestic dishwashers. *J Appl Microbiol.* Published online 2020:1324-1338. doi:10.1111/jam.14564
  38. Evans BA, Amyes SGB. OXA  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(2):241-263. doi:10.1128/CMR.00117-13
  39. O. Gutkind G, Di Conza J, Power P, Radice M.  $\beta$ -lactamase-mediated Resistance: A Biochemical, Epidemiological and Genetic Overview. *Curr Pharm Des.* 2012;19(2):164-208. doi:10.2174/13816128130202
  40. Dolejska M, Papagiannitsis CC. Plasmid-mediated resistance is going wild. *Plasmid.* 2018;99(April):99-111. doi:10.1016/j.plasmid.2018.09.010
  41. Schages L, Lucassen R, Wichern F, Kalscheuer R, Bockmühl D. The household resistome – frequency of  $\beta$ -lactamases, class 1 integron and antibiotic resistant bacteria in the domestic environment and their reduction during automated dishwashing/laundry. *Appl Environ Microbiol.* 2020;86(23):e02062-20. doi:10.1128/aem.02062-20
  42. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):268-281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
  43. Gattlen J, Amberg C, Zinn M, Mauclaire L. Biofilms isolated from washing machines from three continents and their tolerance to a standard detergent. *Biofouling.* 2010;26(8):873-882. doi:10.1080/08927014.2010.524297
  44. McBain AJ, Bartolo RG, Catrenich CE, et al. Microbial Characterization of Biofilms in Domestic Drains and the Establishment of Stable Biofilm Microcosms. 2003;69(1):177-185. doi:10.1128/AEM.69.1.177
  45. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: Here is the storm! *Trends Mol Med.* 2012;18(5):263-272. doi:10.1016/j.molmed.2012.03.003
  46. Thomson KS. Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. *J Clin Microbiol.* 2010;48(4):1019-1025. doi:10.1128/JCM.00219-10
  47. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(2):161-168. doi:10.1016/S1473-3099(15)00424-7

48. Sanganyado E, Gwenzi W. Antibiotic resistance in drinking water systems: Occurrence, removal, and human health risks. *Sci Total Environ.* 2019;669(March):785-797. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.03.162
49. Schwartz T, Kohlen W, Jansen B, Obst U. Detection of antibiotic resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiol Ecol.* 2003;43(3):325-335. doi:10.1111/j.1574-6941.2003.tb01073.x
50. Baron SA, Diene SM, Rolain JM. Human microbiomes and antibiotic resistance. *Hum Microbiome J.* 2018;10(November):43-52.
51. Karkman A, Do TT, Walsh F, Virta MPJ. Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water. *Trends Microbiol.* 2018;26(3):220-228. doi:10.1016/j.tim.2017.09.005
52. Schages L. Ways of transmission of antibiotic resistant organisms in the environment and households. Published online 2020:102. [https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DerivateServlet/Derivate-59803/Diss\\_LS\\_final.pdf](https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DerivateServlet/Derivate-59803/Diss_LS_final.pdf)
53. Fillinger L, Hug K, Griebler C. Selection imposed by local environmental conditions drives differences in microbial community composition across geographically distinct groundwater aquifers. *FEMS Microbiol Ecol.* 2019;95(11):fiz160. doi:10.1093/femsec/fiz160
54. Levy SB. Antibacterial household products: Cause for concern. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(3):512-515. doi:10.3201/eid0707.017705
55. Marshall BM, Robleto E, Dumont T, Levy SB. The frequency of antibiotic-resistant bacteria in homes differing in their use of surface antibacterial agents. *Curr Microbiol.* 2012;65(4):407-415. doi:10.1007/s00284-012-0172-x
56. Savage AM, Hills J, Driscoll K, Fergus DJ, Grunden AM, Dunn RR. Microbial diversity of extreme habitats in human homes. *PeerJ.* 2016;4:e2376. doi:10.7717/peerj.2376
57. Novo A, André S, Viana P, Nunes OC, Manaia CM. Antibiotic resistance, Antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. *Water Res.* 2013;47(5):1875-1887. doi:10.1016/j.watres.2013.01.010
58. Berendonk TU, Manaia CM, Merlin C, et al. Tackling antibiotic resistance: The environmental framework. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13(5):310-317. doi:10.1038/nrmicro3439
59. Mao D, Yu S, Rysz M, et al. Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants. *Water Res.* 2015;85:458-466. doi:10.1016/j.watres.2015.09.010
60. Pazda M, Kumirska J, Stepnowski P, Mulkiewicz E. Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems – A review. *Sci Total Environ.* 2019;697:134023. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.134023
61. McLellan SL, Huse SM, Mueller-Spitz SR, Andreishcheva EN, Sogin ML. Diversity and population structure of sewage-derived microorganisms in wastewater treatment plant influent. *Environ Microbiol.* 2010;12(2):378-392. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02075.x
62. Munck C, Albertsen M, Telke A, Ellabaan M, Nielsen PH, Sommer MOA. Limited dissemination of the wastewater treatment plant core resistome. *Nat Commun.* 2015;6:2-11. doi:10.1038/ncomms9452
63. Chen GH, Leung DHW, Hung JC. Biofilm in the sediment phase of a sanitary gravity sewer. *Water Res.* 2003;37(11):2784-2788. doi:10.1016/S0043-1354(03)00083-6
64. Raghupathi PK, Zupančič J, Brejnrod AD, et al. Microbial Diversity and Putative Opportunistic Pathogens in Dishwasher Biofilm Communities. *Appl Environ Microbiol.* 2018;84(5):e02755-17. doi:10.1128/AEM.02755-17
65. Giedraitienė A, Vitkauskienė A, Naginienė R, Pavilonis A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas).* 2011;47(3):137-146.

doi:10.3390/medicina47030019

66. Stokes HW, Gillings MR. Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35(5):790-819. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00273.x
67. Ju F, Beck K, Yin X, et al. Wastewater treatment plant resistomes are shaped by bacterial composition, genetic exchange, and upregulated expression in the effluent microbiomes. *ISME J.* 2019;13(2):346-360. doi:10.1038/s41396-018-0277-8
68. Forsberg KJ, Patel S, Gibson MK, et al. Bacterial phylogeny structures soil resistomes across habitats. *Nature.* 2014;509(7502):612-616. doi:10.1038/nature13377
69. Pehrsson EC, Tsukayama P, Patel S, et al. Interconnected microbiomes and resistomes in low-income human habitats. *Nature.* 2016;533(7602):212-216. doi:10.1038/nature17672
70. Smillie CS, Smith MB, Friedman J, Cordero OX, David LA, Alm EJ. Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome. *Nature.* 2011;480(7376):241-244. doi:10.1038/nature10571
71. Bouki C, Venieri D, Diamadopoulos E. Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2013;91(2013):1-9. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.01.016
72. Manaia CM, Rocha J, Scaccia N, et al. Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: Tackling the black box. *Environ Int.* 2018;115(April):312-324. doi:10.1016/j.envint.2018.03.044
73. Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(4):251-259. doi:10.1038/nrmicro2312
74. Bengtsson-Palme J, Kristiansson E, Larsson DGJ. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2018;42(1):68-80. doi:10.1093/femsre/fux053
75. Bockmühl DP. Laundry hygiene - how to get more than clean. *J Appl Microbiol.* 2017;122(5):1124-1133. doi:10.1111/jam.13402
76. Melnyk AH, Wong A, Kassen R. The fitness costs of antibiotic resistance mutations. *Evol Appl.* 2015;8(3):273-283. doi:10.1111/eva.12196
77. Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: Is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol.* Published online 2010. doi:10.1038/nrmicro2319
78. Linke S, Gemein S, Koch S, Gebel J, Exner M. Orientating investigation of the inactivation of *Staphylococcus aureus* in the laundry process. *Hyg Medizin.* 2011;36:8-12.
79. Terpstra PMJ, van Kessel IAC. Hygiene effects of laundry processes in Europe. In: *An Investigation of Domestic Laundry in Europe : Habits, Hygiene and Technical Performance.* National Institute for Consumer Research; 2003:69-102.
80. Bockmühl D. Hygiene aspects in domestic laundry. *Hyg Medizin.* 2011;36:280.
81. Bockmühl DP, Schages J, Rehberg L. Laundry and textile hygiene in healthcare and beyond. *Microb Cell.* 2019;6(7):299-306. doi:10.15698/mic2019.07.682
82. Mc Cay PH, Ocampo-Sosa AA, Fleming GTA. Effect of subinhibitory concentrations of benzalkonium chloride on the competitiveness of *Pseudomonas aeruginosa* grown in continuous culture. *Microbiology.* 2010;156(1):30-38. doi:10.1099/mic.0.029751-0
83. Gilbert P, McBain AJ. Potential Impact of Increased Use of Biocides in Consumer Products on Prevalence of Antibiotic Resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(2):189-208. doi:10.1128/CMR.16.2.189-208.2003

84. Hook I, Schmitz A, Stamminger R. Dishwashing behaviour of European consumers with regard to the acceptance of long programme cycles. *Energy Effic.* 2018;11(7):1627-1640. doi:10.1007/s12053-017-9539-y
85. Hochschulnetzwerk NRW. Spurensuche in Privathaushalten - Übertragungswege resistenter Erreger im häuslichen Umfeld. Published online 2019:4.
86. Schages L, Wichern F, Geisen S, Kalscheuer R, Bockmühl D. Distinct resistomes and microbial communities of soils, wastewater treatment plants and households suggest development of antibiotic resistances due to distinct environmental conditions in each environment. *Antibiotics.* 2021;10(5). doi:10.3390/antibiotics10050514
87. Sánchez MB. Antibiotic resistance in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Front Microbiol.* 2015;6(JUN):658. doi:10.3389/fmicb.2015.00658
88. Walsh F, Duffy B. The Culturable Soil Antibiotic Resistome: A Community of Multi-Drug Resistant Bacteria. *PLoS One.* 2013;8(6). doi:10.1371/journal.pone.0065567