



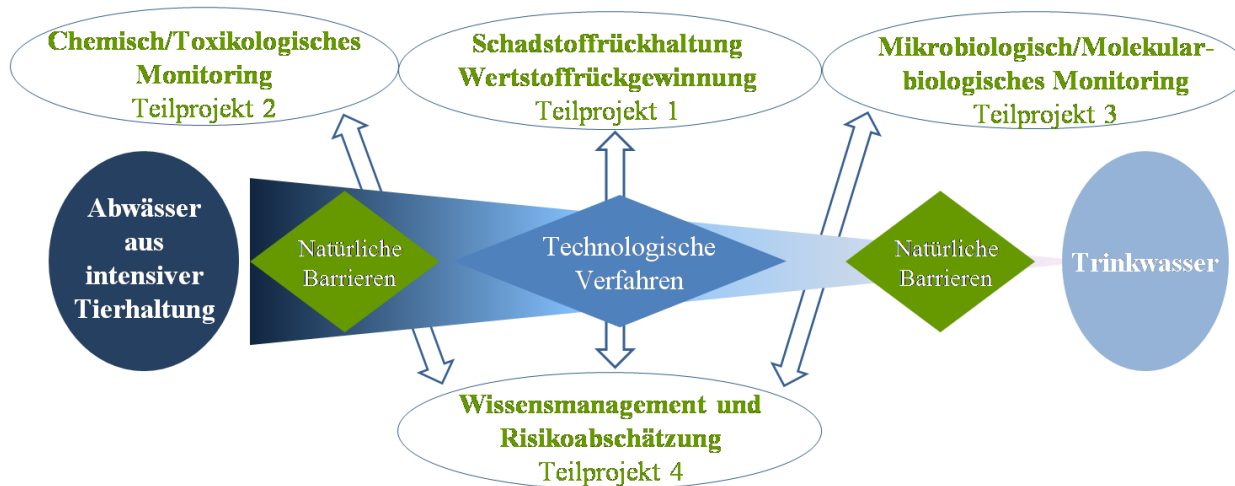
RiskAGuA

Risiken durch Abwässer aus der intensiven Tierhaltung für Grund- und Oberflächenwasser in Agrarräumen

W. Dott
Berlin



RiskAGuA

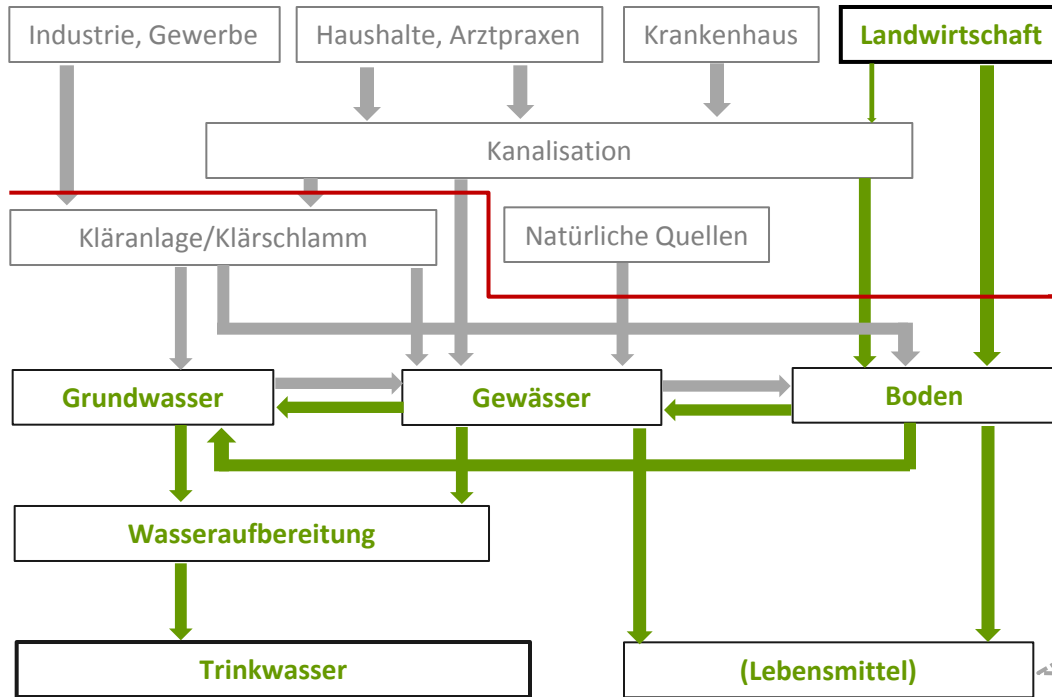


15 Biogasanlagen in ganz Deutschland



- ❖ Bestimmung der Persistenz von Veterinärpharmaka, pathogenen Mikroorganismen und deren Resistenzen über die Gülleverwertung in den Umweltkompartimenten
- ❖ Analyse natürlicher Ausbreitungsbarrieren
- ❖ Analyse und Schaffung künstlicher Barrieren wie Biogas-, und weitergehende Abwasser- und Abfallanlagen
- ❖ Modellierungen der Strömungs- und Stofftransportprozesse in der Umwelt

Eintragspfade



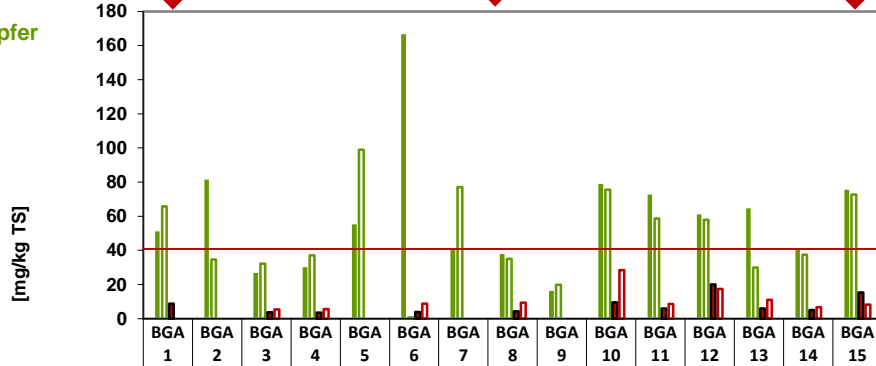
- Veterinärantibiotika
- Metallhaltige Futteradditive
- Pathogene Bakterien
- Resistente Bakterien
- Antibiotika-Resistenzgene

- Menschliche Gesundheit
- Tiergesundheit
- Bodenökologie
- Gewässergüte

Schwermetalle in Biogasanlagen

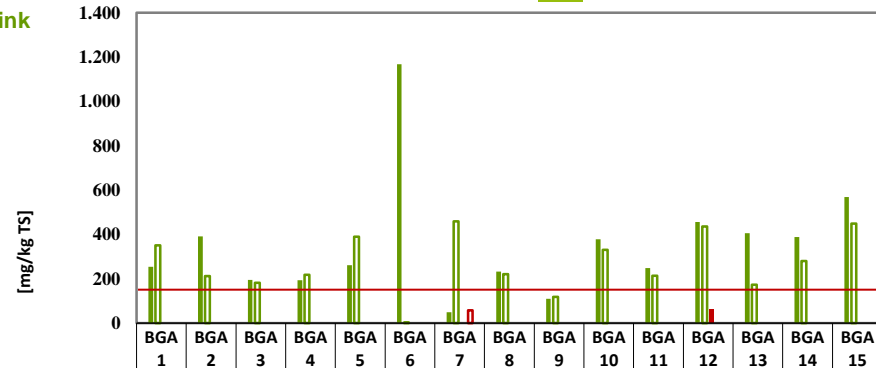
2012

Kupfer



	BGA 1	BGA 2	BGA 3	BGA 4	BGA 5	BGA 6	BGA 7	BGA 8	BGA 9	BGA 10	BGA 11	BGA 12	BGA 13	BGA 14	BGA 15
■ Eingang Feststoff	51,08	81,58	26,83	30,13	55,29	166,62	40,23	37,77	16,34	78,79	72,76	61,14	64,66	40,50	75,42
□ Ausgang Feststoff	65,84	34,63	32,27	37,13	99,02	0,78	77,07	34,97	19,90	75,59	58,64	57,92	29,91	37,44	72,76
■ Eingang Eluat	8,71	0,00	3,71	3,49	0,00	3,86	0	4,18	0,00	9,59	5,93	20,04	6,03	5,04	15,42
□ Ausgang Eluat	0,00	0,00	5,34	5,52	0,00	8,78	0	9,24	0,00	28,53	8,51	17,46	11,00	6,74	8,29

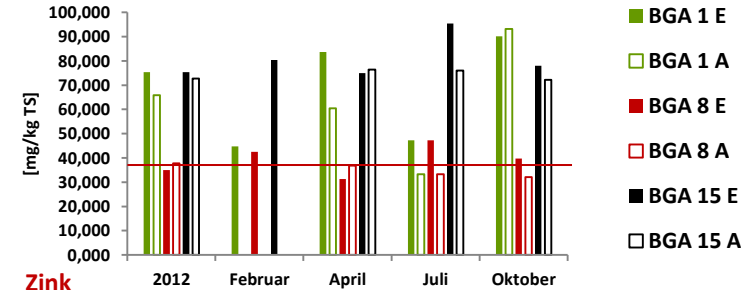
Zink



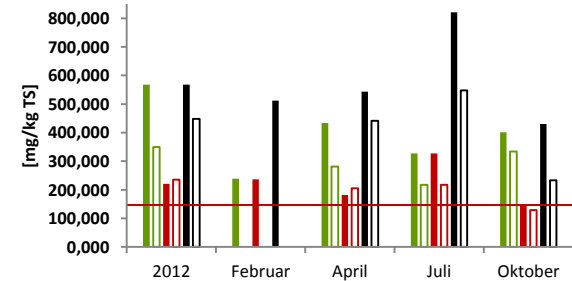
	BGA 1	BGA 2	BGA 3	BGA 4	BGA 5	BGA 6	BGA 7	BGA 8	BGA 9	BGA 10	BGA 11	BGA 12	BGA 13	BGA 14	BGA 15
■ Eingang Feststoff	253,12	391,40	194,67	193,7	261,26	1.168,48	48,57	232,03	109,04	77,54	248,57	455,39	405,90	387,93	568,42
□ Ausgang Feststoff	349,79	212,04	180,73	218	389,76	2,17	458,47	220,53	117,93	30,52	213,53	436,36	172,79	280,13	447,98
■ Eingang Eluat	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	60,11	0,00	0,00	0,00
□ Ausgang Eluat	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	57,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

2013 Jahresgang

Kupfer



Zink



- ◆ Schwankende Konzentrationen über den Jahresverlauf
- ◆ Konzentration im Eluat unterhalb der Nachweisgrenze (nicht gezeigt)

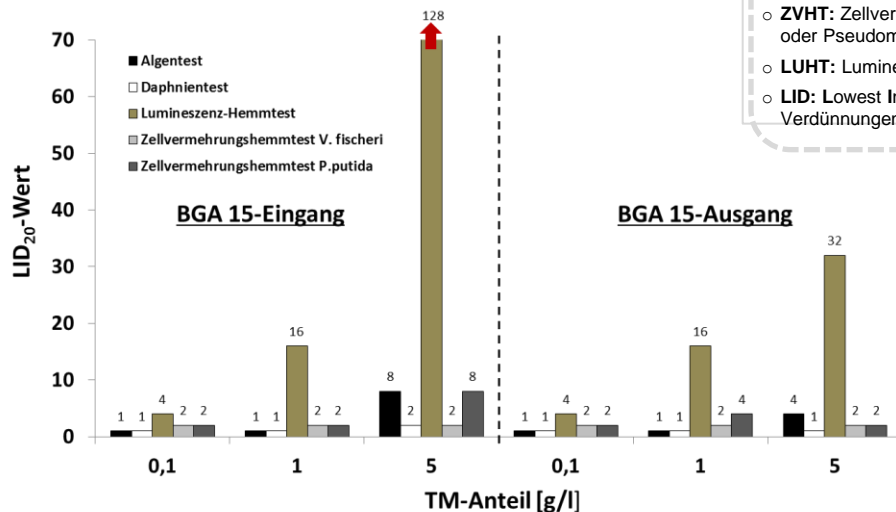
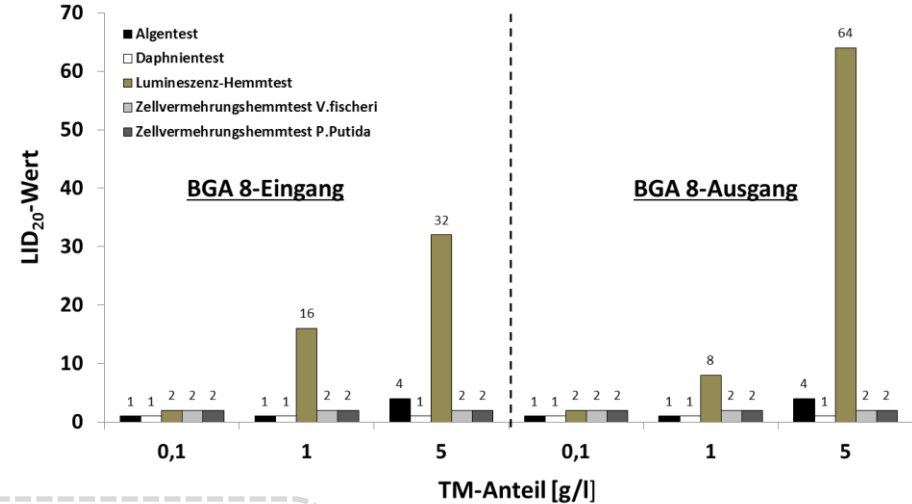
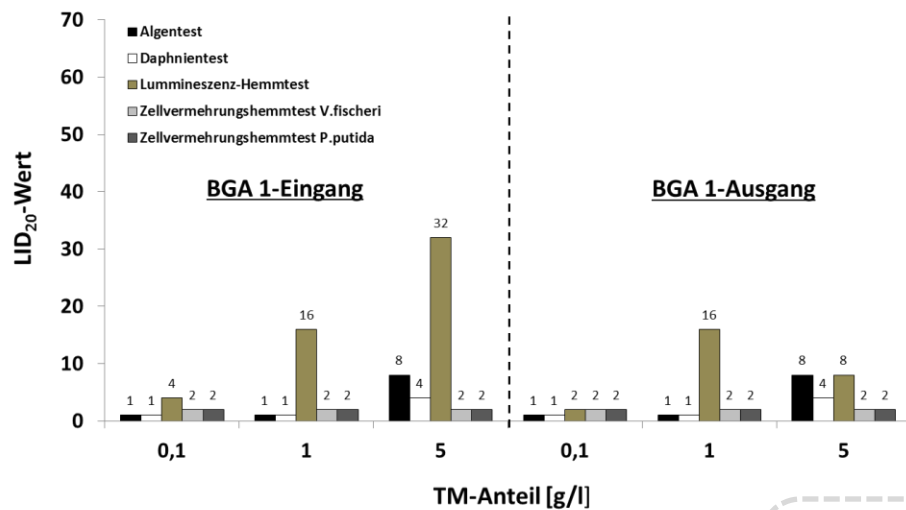


- Generelle Überschreitung der Vorsorgewerte
- Akkumulation in Boden

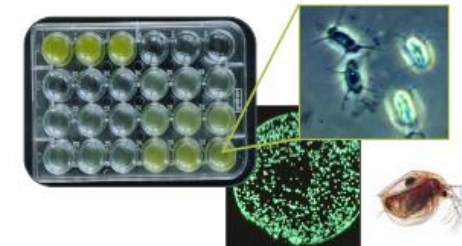
➤ Kupfer: Vorsorgewert für Lehm/Schluff-haltige Böden liegt bei 40 mg/kg TS

➤ Zink: Vorsorgewert für Lehm/Schluff-haltige Böden liegt bei 150mg/kg TS

Probenahme-Zeitraum: 07/13 (Eingang) und 10/13 (Ausgang)



- o **Algentest:** Algen-Wachstumshemmtest (72 h)
- o **Daphnientest:** Daphnien-Immobilisationstest (24 h)
- o **ZVHT:** Zellvermehrungs-Hemmtest mit *Vibrio fischeri* (VF) oder *Pseudomonas putida* (PP) ($\leq 15 - 30$ h)
- o **LUHT:** Lumineszenz-Hemmtest mit *Vibrio fischeri* (3 h)
- o **LID:** Lowest Ineffective Dilution anhand definierter dualer Verdünnungen mit keiner bzw. einer Hemmung < 20 %



- Veränderung des ökotoxikologischen Potentials nach der BGA
- Gülle und BGA spezifischer Verlauf
- TM-Anteil abhängige ökotoxische Effekte
- Empfindlichstes Testsystem LUHT
- Kein genotoxisches Potential im umu-Test vor/nach BGA

Antibiotika in Biogasanlagen

2012 Screening

- ❖ in vielen Anlagen keine Antibiotika nachweisbar oder unterhalb Bestimmungsgrenze
- ❖ aber: vereinzelte Spitzenwerte von über 200 mg Sulfamethazin pro kg TM gefunden

2013 Jahrgang

- ❖ für alle detektierten Antibiotika Abnahme zwischen Eingang und Ausgang
- ❖ höchste Eliminierungsraten für Chlortetracyclin

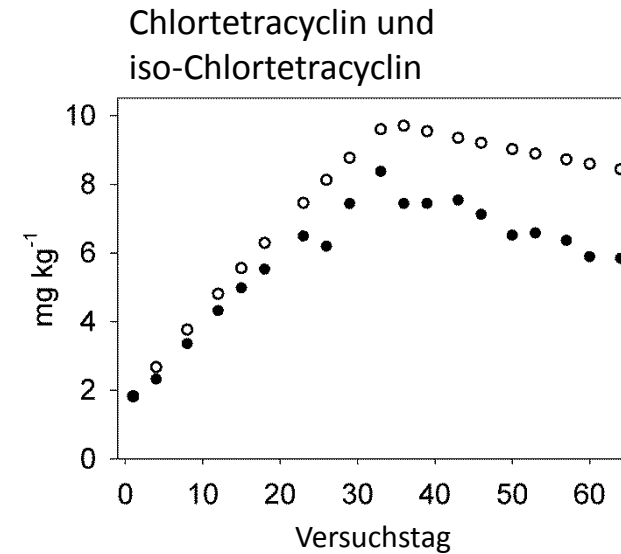
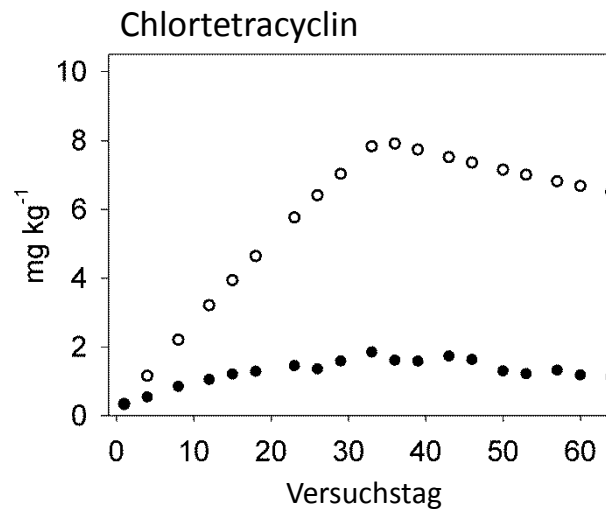
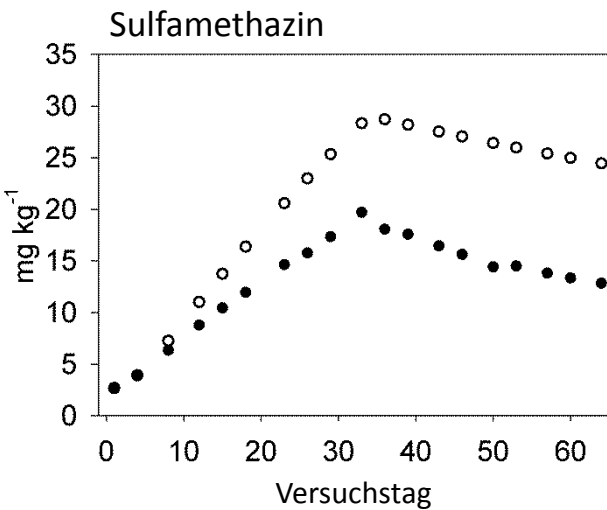
Verbindung Zeitpunkt	Chlortetracyclin		Tetracyclin		Sulfadiazin		Sulfamethazin	
	Eingang	Ausgang	Eingang	Ausgang	Eingang	Ausgang	Eingang	Ausgang
Februar '13	3,0		0,3		0,5		11,2	
April	1,7	+	+	+	0,1	0,2	12,3	5,2
Juli	2,3	0,7	+	+	+	+	20,7	9,2
Oktober	2,6	0,5	+	+	+	+	3,9	3,8
Januar '14		0,7		+		+		2,8

(+ unterhalb Bestimmungsgrenze, Gehalte in mg pro kg Feuchtgewicht)

Antibiotika in Biogasanlagen

Laborfermenter-Studie

- ❖ Fermenter mit täglichem Substrataustausch
- ❖ vergleichbare Eliminierungsraten wie in Feldanlagen
- ❖ Eliminierung von Chlortetracyclin geht auf Bildung von iso-Chlortetracyclin zurück
- ❖ iso-Chlortetracyclin zeigt keine antibiotische Aktivität

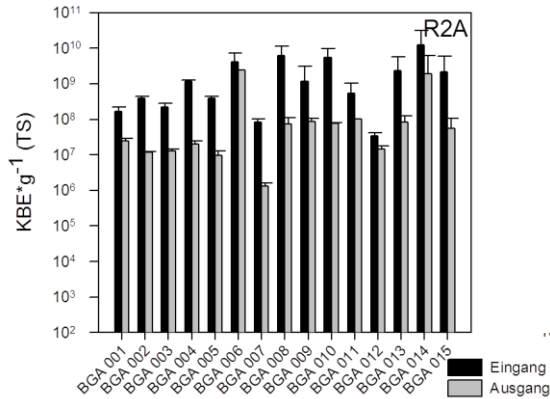


Gehalt in mg pro kg Feuchtgewicht; ○ - berechnet; ● - gemessen

Mikrobiologie des Fermenters

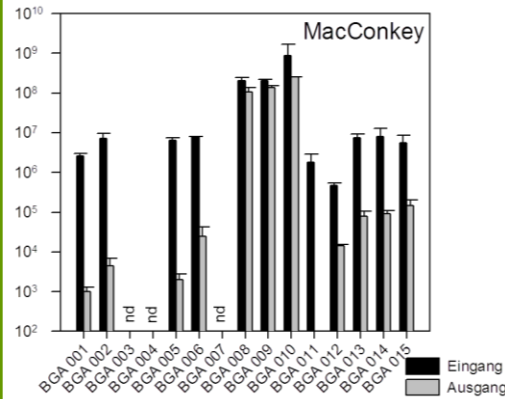
Kolonie-bildende Einheiten (KBE) in Gülle- und Gärrestproben auf selektiven Medien

Allgemein



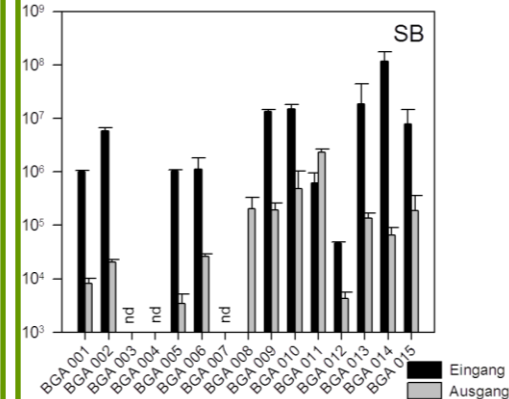
Enterococcus, Escherichia,
Pseudomonas, Staphylococcus,
~~(MRSA)~~

Enterobacteriaceae



Enterobacter, Citrobacter,
Escherichia, Shigella, Serratia,
Proteus, **Salmonella**, (ESBL)

Enterococcaceae



E. malodoratus, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*,
E. hirae, (VRE)



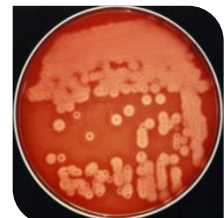
E. coli auf EMB-Agar



E. coli und *Salmonella*
Typhimurium auf SS-Agar



Staphylococcus aureus auf
Mannit-Kochsalz-Agar



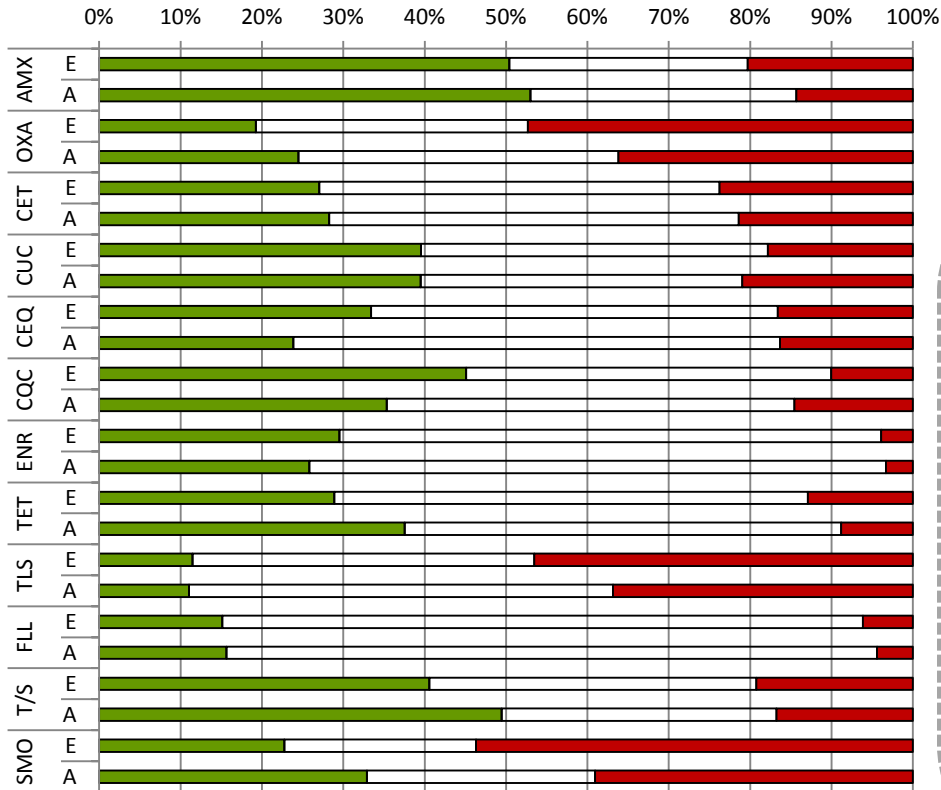
Clostridium perfringens
auf Blut-Agar

15 Biogasanlagen

- ❖ Kultivierung von Schlüsselorganismen auf speziellen Medien
 - ❖ Isolation von Indikatororganismen
 - ❖ Reduktion kultivierbarer Organismen in der Biogasanlage
- ➡ Reduktion bekannter Pathogene
- u. a. ESBL, VRE, ~~MRSA~~

Antibiotikaresistenz

Antibiogramme von Isolaten der Anlagen BGA 1-15



Isolate aus Eingangsproben (E) n=488
Isolate aus Ausgangsproben (A) n=453

- empfindlich gegen die niedrigste eingesetzte Antibiotikakonzentration
- unempfindlich gegen Konzentrationen zwischen minimal und maximal eingesetzter Antibiotikakonzentration
- unempfindlich gegen die höchste eingesetzte Antibiotikakonzentration

Antibiotika
Ampicillin 0,5>64 mg/l (AMX), Oxacillin 0,25>32 mg/l (OXA), Ceftiofur 0,25>32 mg/l (CET), Ceftiofur/ Clavulansäure 0,25>32 mg/l (CUC), Cefquinom 0,25>32 mg/l (CEQ), Cefquinom/ Clavulansäure 0,25>32 mg/l (CQC), Enrofloxacin 0,0625> 8 mg/l (ENR), Tetracyclin 0,25>32 mg/l (TET), Tylosin 0,125>16 mg/l (TLS), Florfenicol 0,5>64 mg/l (FLL), Trimethoprim/ Sulfamethoxazol 0,0625> 8 mg/l (T/S), Sulfamethoxazol4>256 mg/l (SMO)

Empfindlichkeit von Mikroorganismen gegenüber veterinär- und humanmedizinisch relevanten Antibiotika

- ❖ Isolate wurden mittels Mikrobouillondilutionsverfahren (MID) getestet
- ❖ Tendenziell wurden sensiblere Organismen aus Ausgangsproben isoliert
- ❖ Gehäufte Resistenzen traten bei den veterinärmedizinisch genutzten AB Tylosin (TLS) und Sulfamethoxazol (SMO) auf
- ❖ TLS und SMO wurden bis 2006 prophylaktisch oder als Leistungsförderer eingesetzt



Keine Anreicherung resistenter oder Mikroorganismen über die Passage der Biogasanlage

Resistenzgene



Qualitativer Nachweis von Resistenzgenen in Umweltproben



15 Biogasanlagen

BGA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Gene	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A
Tetrazykline																
tetA	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
tetB						x				x						
tetC		x									x					x
tetG	x	x	x	x		x	x	x	x	x			x	x	x	x
tetS																
tetX																x
tetM	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
tetT	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
tetB/P																
tetQ	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x		x	x
tetW	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
tetO	x	x	x			x	x	x	x		x		x	x		
otrA																
Sulfonamid																
suI	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
suII	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
suIII																
ESBL																
CTX-M								x								
TEM	x	x	x	x		x	x	x	x	x		x	x	x	x	x
SHV																
MRSA																
mecA																
VRE																
vanA																
vanB																

22 Resistenzgene

- ❖ Resistenzgene kommen ubiquitär vor
- ❖ Keine Unterschiede zwischen Gülle/Mist und Gärrest in **qualitativer Analyse**
- ❖ Kein Nachweis von **MRSA** und **VRE** assoziierten Genen direkt im Probenmaterial

Nachweis von Resistenzgenen in Isolaten

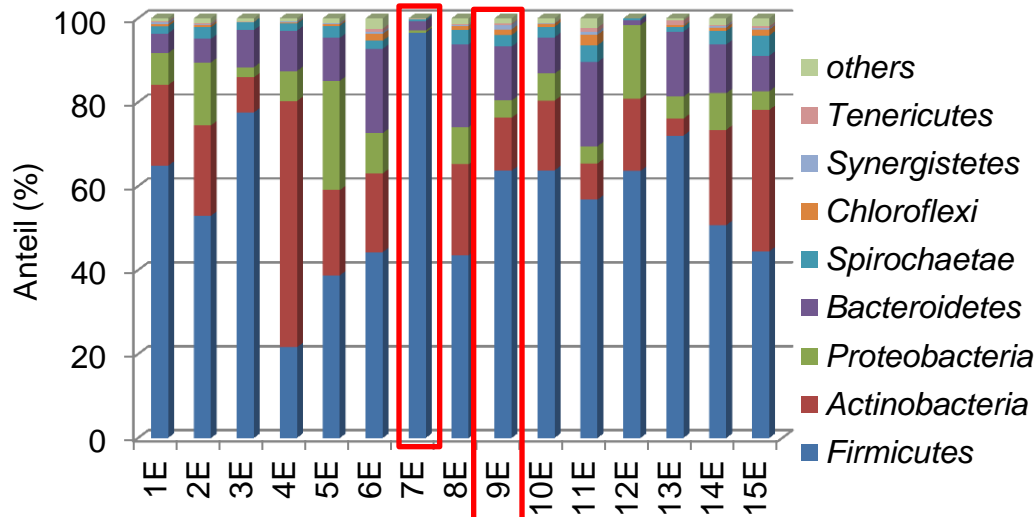
- ❖ Resistenzgen-tragende Bakterien wurden in allen Proben identifiziert
- ❖ Es wurden auch **ESBLs** in Isolaten der Ausgangsproben gefunden
- ❖ Das Methicillin-Resistenzgen *mecA* wurde in *Staphylococcus haemolyticus*, *S. sciuri* und *S. lentum* detektiert
- ❖ **MRSA** wurde nicht gefunden
- ❖ Die **VRE** Resistenzgene *vanA*, *vanB* und *vanC1* wurden in Enterokokken nachgewiesen

Quantitativer Nachweis von Resistenzgenen in Umweltproben

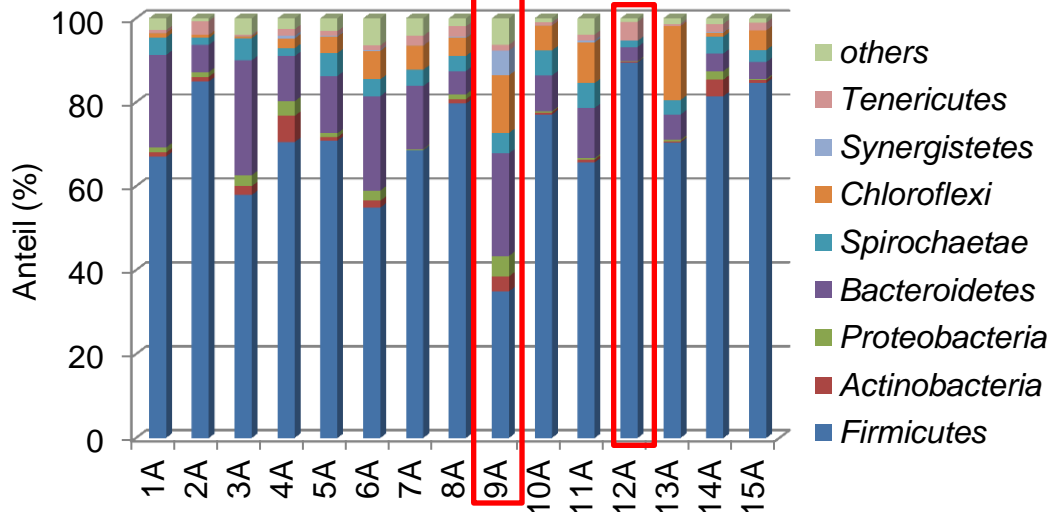
- ❖ Selektionsdruck durch Schwermetalle und subtherapeutische Antibiotika Konzentrationen
- ❖ Resistenzgene werden während der Fermentation reduziert

16S rRNA Gen Amplicon Pyrotag Sequenzierung der Eingangs- und Ausgangsproben

Eingang Phylum Ebene



Ausgang



Firmicutes sind das vorherrschende Phylum in den Eingangs- und den Ausgangsproben!

Eingangsproben:

Firmicutes > *Bacteroidetes* > *Actinobacteria* > *Proteobacteria*

Ausgangsproben:

Reduktion der *Actinobacteria* und *Proteobacteria*.

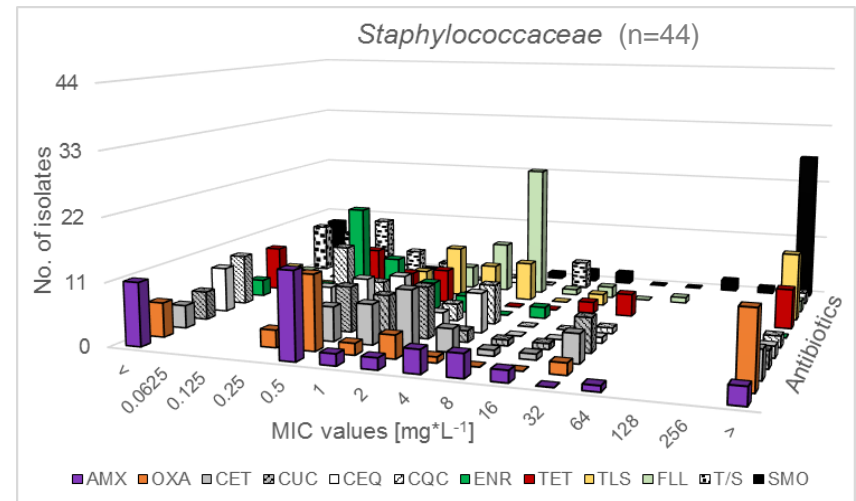
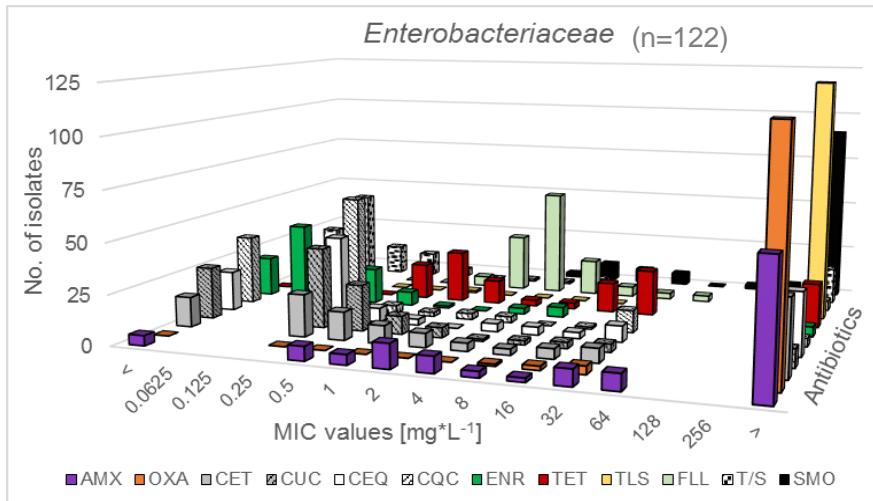
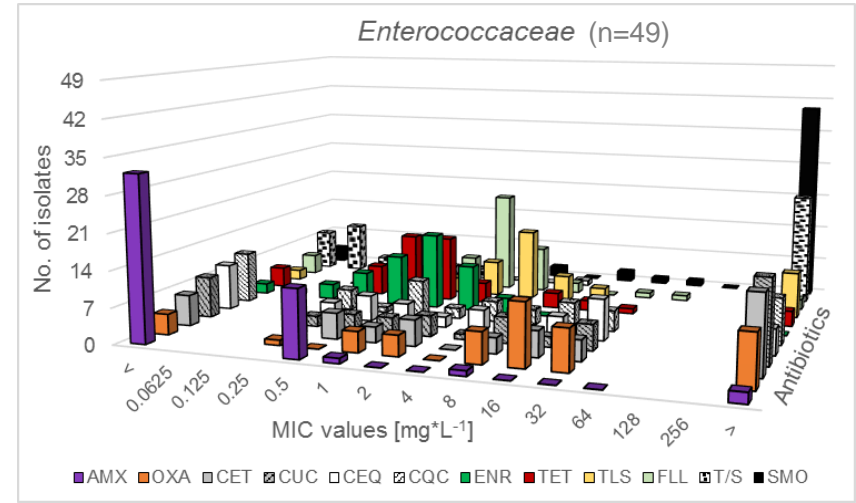
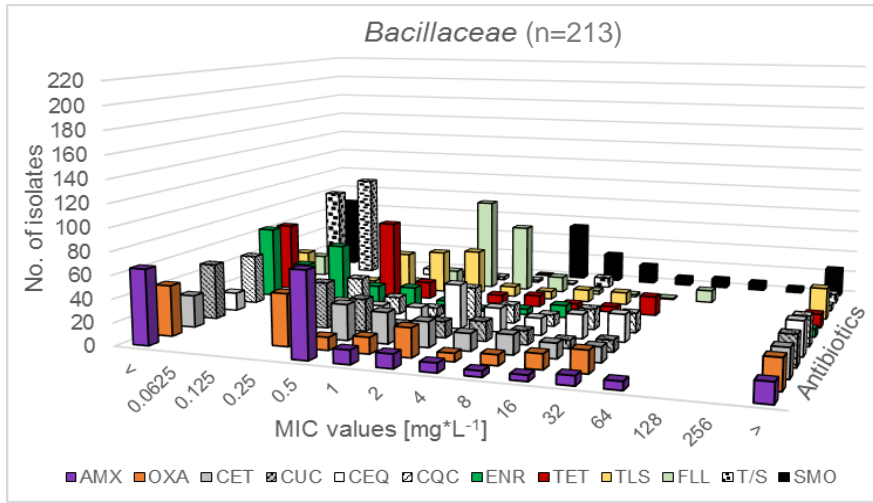
Anstieg der *Chloroflexi* in den Ausgangsproben

Lebensmittelreste

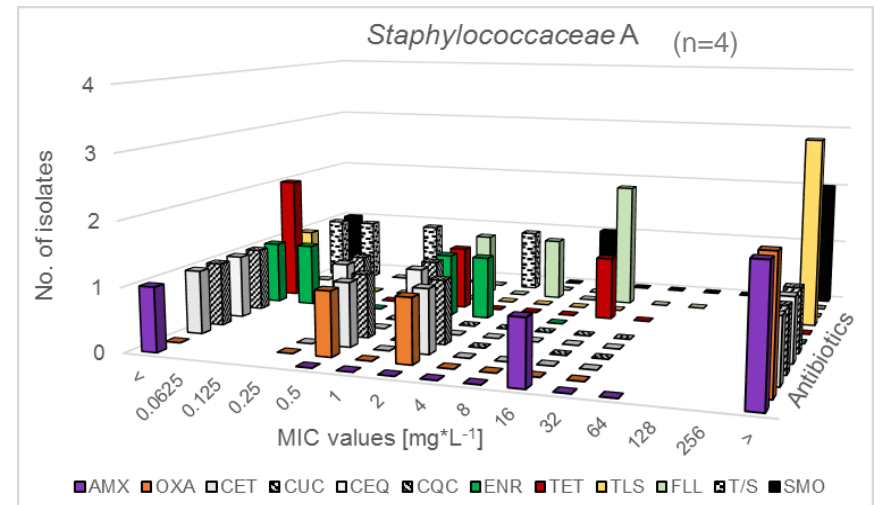
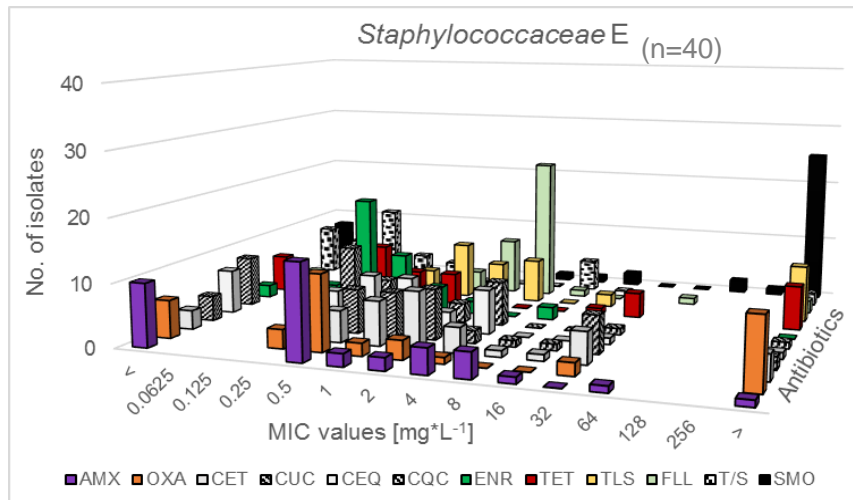
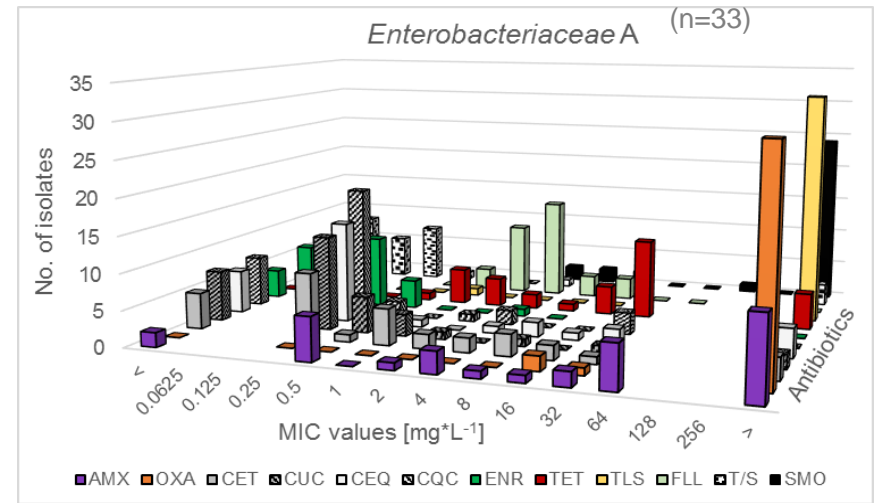
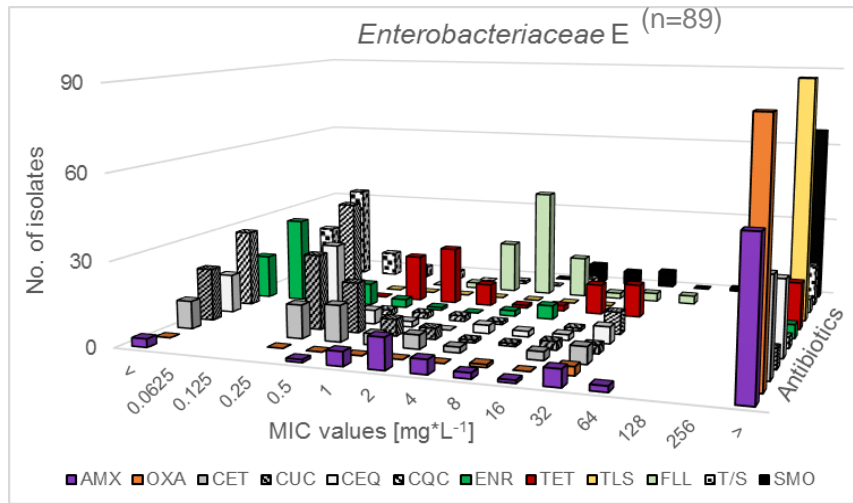
Bio-Betrieb

Thermophile Anlage

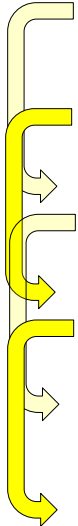
Resistenzmuster (MHK) der dominantesten kultivierbaren Bakterien (Familienebene) der zehn untersuchten veterinärrelevanten Antibiotika



Resistenzmuster (MHK) der dominantesten kultivierbaren Bakterien (Familienebene) der zehn untersuchten veterinärrelevanten Antibiotika



ESBL, MRS und VRE Detektion



	ESBL	BGA-1			BGA-15				
		DP	0.1	1	10	DP	0.1	1	10
Feb 13	Eingang	x		x	x	x	x	x	x
	Ausgang	Nicht untersucht							
April	Eingang	x	x	x	x	x	x	x	x
	Ausgang			x	x				
Juli	Eingang	x	x	x	x	x	x	x	x
	Ausgang				x		x	x	x
Okt	Eingang	x	x	x	x		x	x	x
	Ausgang								x
Feb 14	Eingang	Nicht untersucht							
	Ausgang		x	x	x				

- Eingang: ESBL Detektion in allen Proben der ausgewählten Anlagen 1 und 15
 - Ausgang: ESBL Detektion nie durch Direktplattierung, jedoch nach spezifischer Voranreicherung der Ausgangsproben
 - ESBLs sind vorhanden, aber reduziert
 - ESBL Gendetektion fast ausschließlich in *E.coli*
 - CTX-M Gene der Gruppe 1 waren vorherrschend
- Veröffentlicht in: [Schauss et al. 2015 \(Plos One\)](#)

MRS: *mecA* Gennachweis in Eingangs- und Ausgangsproben nach Voranreicherung in:

Staphylococcus haemolyticus, *S. sciuri*, *S. lentum*



	MRS	BGA -1	BGA -15
Feb	Eingang	x	x
	Ausgang	Nicht untersucht	
April	Eingang	x	x
	Ausgang		
Juli	Eingang	x	x
	Ausgang		x



	VRE	BGA -1	BGA -15
Feb	Eingang	x	
	Ausgang	Nicht untersucht	
April	Eingang	x	x
	Ausgang	x	
Juli	Eingang		
	Ausgang		x

VRE: *vanA*, *vanB* und *vanC1* Detektion in Eingangs- und Ausgangsproben in: *Enterococcus gallinarum*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*

Teilprojekt 4 (IWW)

Ziel

Risikoabschätzung zur Quantität von Veterinärantibiotika, die mittels **Oberflächenabfluss und Bodenerosion** in Oberflächengewässer gelangen

Einflussfaktoren

Menge an Veterinärantibiotika im Düngemittel und im Agrarboden, Klima, Bodeneigenschaften, Landnutzung, Topografie

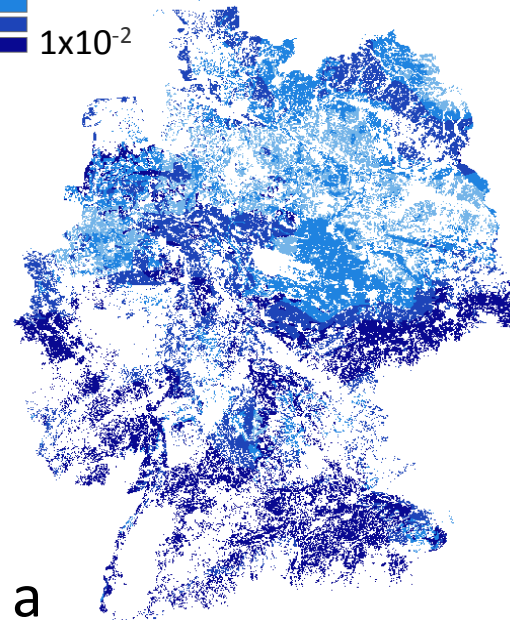
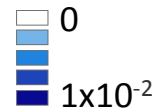
Methodik

Das **numerische Modell** PESERA-VA wurde entwickelt, um folgendes abzuschätzen:

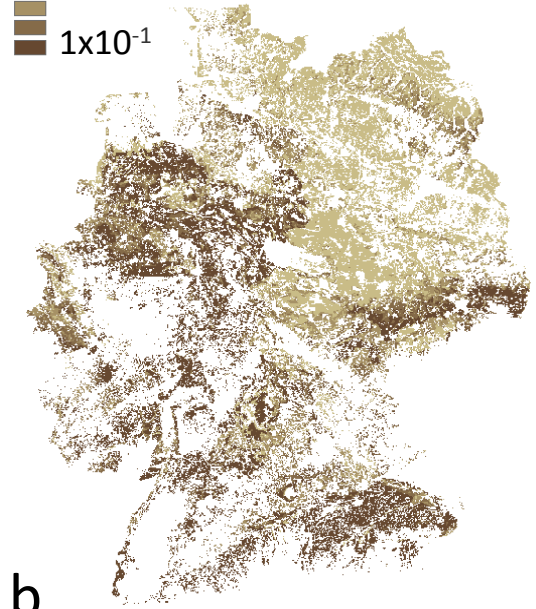
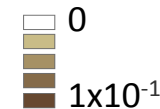
- ❖ die Menge an Antibiotika, die mit dem Oberflächenabfluss und Bodenerosion transportiert wird
- ❖ die Menge an Antibiotika, die nicht transportiert wird
- ❖ die Effekte von Sorption und exponentiellem Abbau

Ergebnisse

- ❖ Das Risiko von Oberflächentransport von Veterinärantibiotika ist gering, obwohl lokal Ausnahmen bestehen und PESERA-VA diese aufzeigt
- ❖ Das Risiko von Antibiotikatransport mittels Bodenerosion ist höher als mittels Oberflächenabfluss
- ❖ Die Menge an Antibiotika, die nicht transportiert wird, baut sich ab oder akkumuliert im Boden



a



b

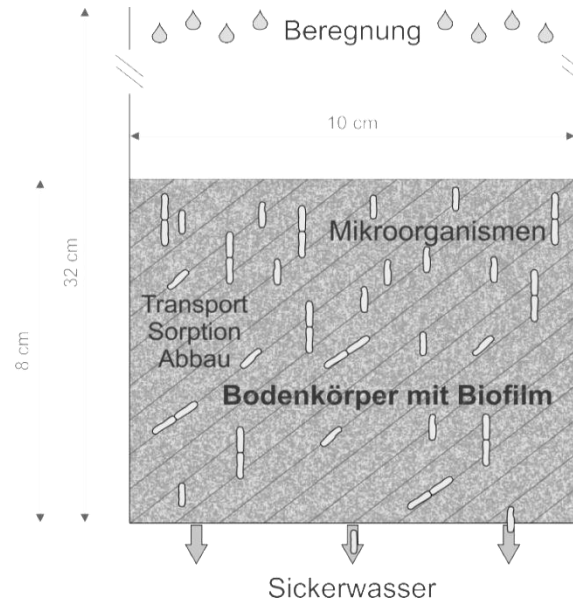
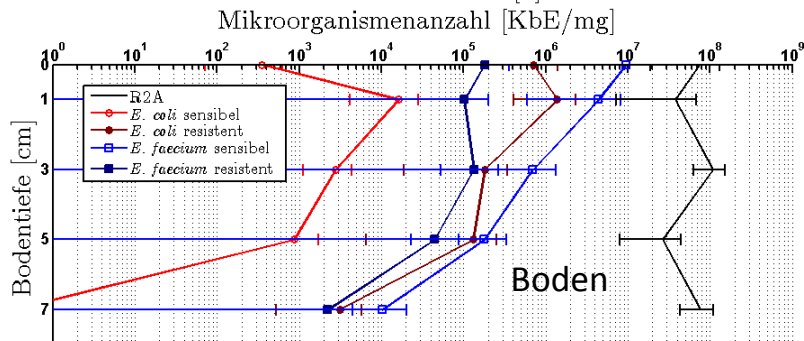
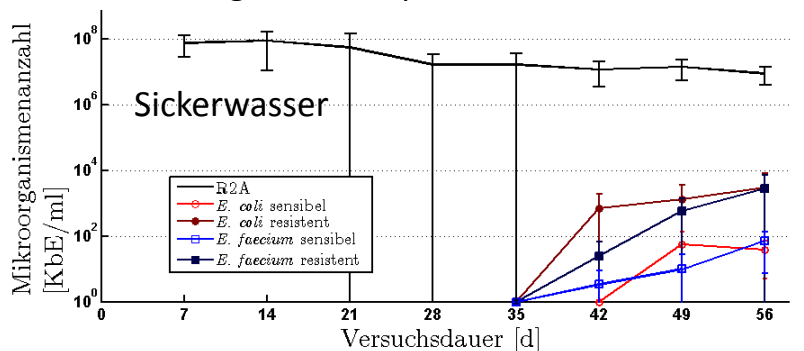
Antibiotikatransport im Juli [mg km^{-2}] in a) Oberflächenabfluss und b) Bodenerosion

ZIEL

Untersuchung des Transportverhaltens von Mikroorganismen im Boden zur Risikoabschätzung von tierischen Abwässern auf Boden und Grundwasser

METHODIK

- ❖ Lysimeterversuche mit regelmäßiger Beregnung
- ❖ Versuchsdauer 28 Tage
- ❖ Mikrobiologische Quantifizierung der Mikroorganismen mittels Agarplatten
- ❖ Sammlung wöchentlicher Sickerwasserproben
- ❖ Aufteilung Bodenkörper in fünf Bodenschichten



ERGEBNISSE

Transport findet statt

❖ ABHÄNGIGKEITEN:

- ❖ Art des Mikroorganismus
- ❖ sensibel / resistent
- ❖ Quelle (Gülle / Gärrest)
- ❖ Negativ auf Schwermetalle bzw. Antibiotika

Forschungsbedarf

- ❖ Resistenzübertrag?
- ❖ Resistenzakkumulation?
- ❖ Transport im Grundwasser?

Ziel

Aufbereitung und nachhaltige Sicherung der Forschungsergebnisse rund um Risiken bezüglich Veterinärantibiotika durch:

- ❖ Erstellung einer **Wissenstransfer-Strategie**.
- ❖ Ableitung eines handlungsorientierten **Wissensmanagement**.
- ❖ Formulierung von **Handlungsdirektiven**.

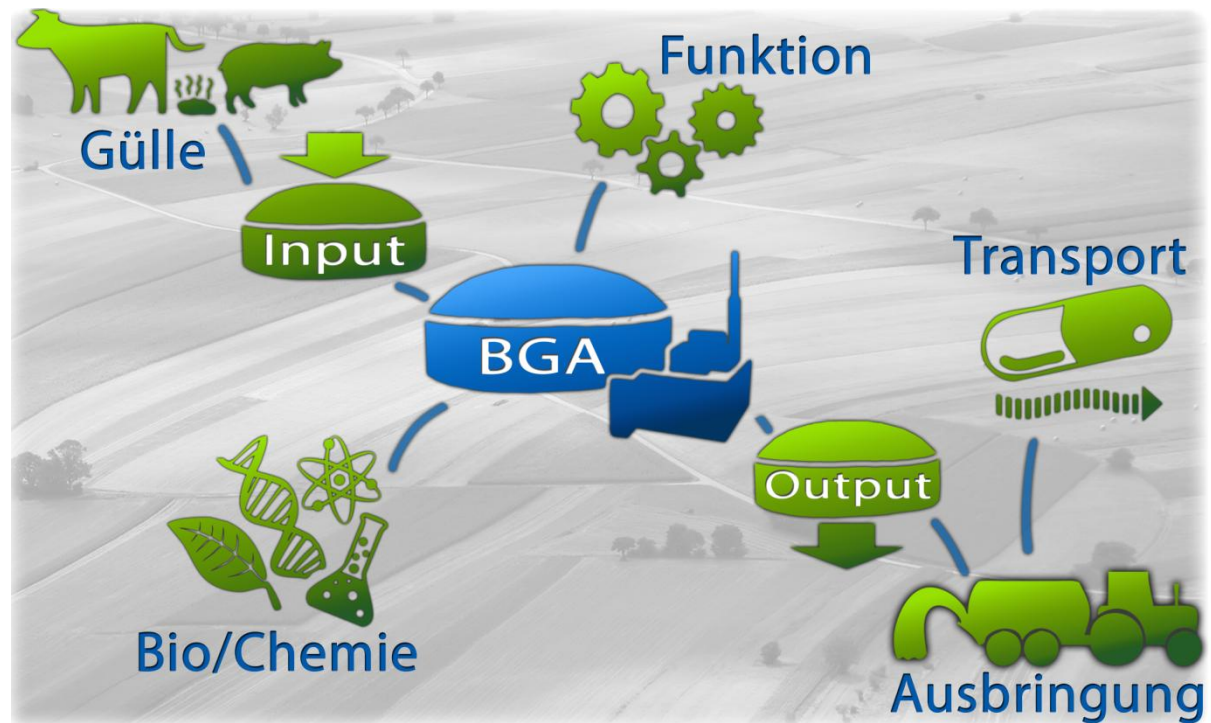
Methodik

Durch den Aufbau einer digitalen und interaktiven Wissensplattform „RiskAGuA Sharepoint“ wird folgendes ermöglicht:

- ❖ interdisziplinärer **Transfer** der erzielten **Ergebnisse**.
- ❖ Aufbau einer **Wissenslandkarte** zum Themenkomplex auf der Projekthomepage.
- ❖ **Risikoeinschätzung** von Landwirten zum Thema „Veterinärantibiotikum“.

Ergebnisse

- ❖ **Interaktive Mindmap** über den „Zyklus einer Biogasanlage“
<http://www.riskagua.de>
- ❖ **Interaktiver Sharepoint** zum Wissensaustausch
- ❖ **Handlungsdirektiven** auf Basis der Risikoeinschätzung



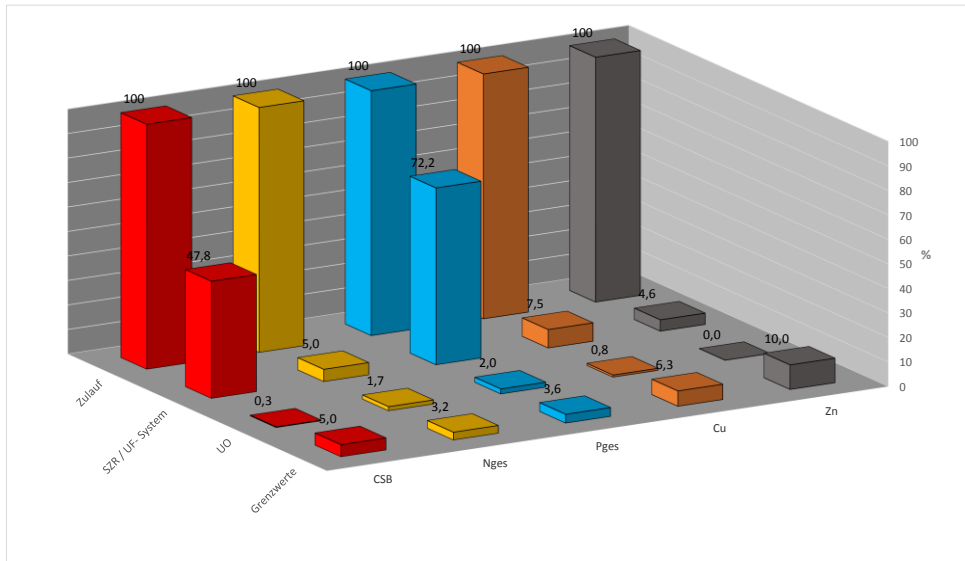
„Emissions- und Immissionsminimierung durch biotechnologische Prozesse mit Wertstoffrückgewinnung“

Abwasserbehandlung mittels SZR-Verfahren (Strahl-Zonen-Schlaufenreaktor)

- ❖ Behandlung von flüssigem Gärrest und Gülle hinsichtlich der **Vermeidung pathogener Inhaltstoffe und Gewässerbelastungen**
- ❖ **Gewähltes Aufbereitungsverfahren: Strahl-Zonen-Schlaufenreaktor (SZR) mit Ultrafiltration (UF) und Umkehrosmose (UO) im SND-Betrieb** (Simultane Nitrifikation/Denitrifikation via Nitrit).

Ergebnisse der Untersuchungen und Pilotierung

- ❖ In Gülle wurden höhere Antibiotikagehalte detektiert als im Gärrest. Eine **Reduzierung der Antibiotikagehalte** bzw. deren Umbau in Metabolite konnte für Gülle aufgezeigt werden.



Rückhalt wichtiger Leitparameter bei Güllebehandlung mit SZR



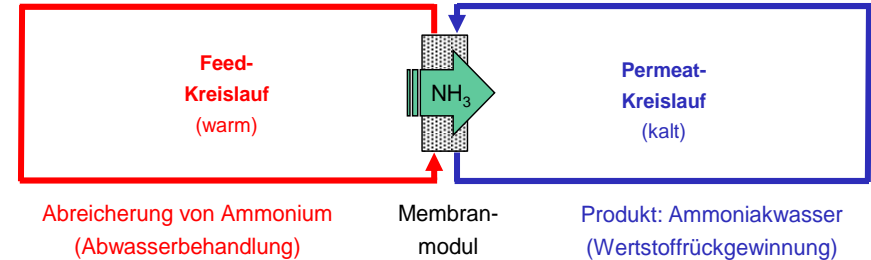
SZR-Containeranlage

- ❖ Multiresistente Keime finden sich im Belebtschlamm und teilweise in den nicht separierten Gärresten / Güllen.
- ❖ **Die Grenzwerte (AbwV, Anhang 23) können bei störungsfreiem Anlagenbetrieb nach der UF teilweise und nach der UO ganz eingehalten werden.**

„Emissions- und Immissionsminimierung durch biotechnologische Prozesse mit Wertstoffrückgewinnung“

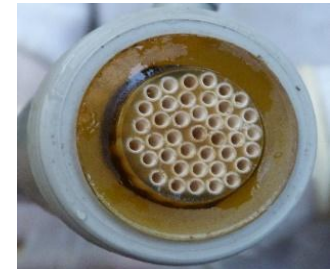
Wertstoffrückgewinnung: Membrandestillation (MD) zur NH_3 -Rückgewinnung

- ❖ Partialdruckgetriebenes Verfahren, bestehend aus **zwei Kreislaufströmungen**, die durch eine **hydrophobe Membran** voneinander getrennt sind
- ❖ NH_3 dringt in **gasförmigem Zustand** durch die Membran und wird **im Permeat wieder aufgenommen**, die Feed-Flüssigkeit bzw. Suspension wird zurück gehalten
- ❖ **Direct-Contact-Verfahren (DCMD)**: Permeatkreislauf (PK) = flüssig, **Sweeping-Gas-Verfahren (SGMD)**: PK = Gas



Versuchsprogramm

- ❖ Untersuchung des DCMD- und SGMD-Verfahrens mit hydrophoben Mikrofiltrationsmodulen
- ❖ Ausgangssubstrate: an Gülle/Gärrest angepasstes Modellwasser, separierte Schweinegülle
- ❖ **Verfahrensoptimierung** in Bezug auf die **Einflussfaktoren** Temperatur, pH-Wert, Strömungsgeschwindigkeit und NH_4 -N-Konzentration im Feed-Kreislauf



Mikrofiltrationsmodul

Ergebnisse

- ❖ **DCMD**: Im Vergleich zum SGMD-Verfahren **höherer transmembraner NH_3 -Flux** bzw. höhere absolute NH_3 -Ausbeute erreichbar. Maximal erreichte NH_4 -Abreicherung in der eingesetzten Gülle: ca. 50 Ma.-%.
- ❖ **SGMD**: Deutlich **höhere NH_3 -Konzentration im produzierten Wertstoff Ammoniakwasser** erzielbar. Maximal erreichte Konzentration im Permeat: ca. 1 Ma.-%.
- ❖ Der **Stoffübergang** durch die eingesetzten Membran ist **mit Hilfe der untersuchten Einflussgrößen** in verfahrenstechnisch und physikochemisch bedingten Bereichen **steuerbar**
- ❖ Für einen ökonomisch vertretbaren Betrieb sind **weitere Verfahrensoptimierungen erforderlich**. Hierfür ist die **Entwicklung eines speziell ausgelegten temperaturbeständigen Membranmoduls erforderlich**.

Projektpartner

RWTHAACHEN
UNIVERSITY

IHU
Institut für
Hygiene und
Umweltmedizin

Prof. Dr. Wolfgang Dott



Universität Bremen



Prof. Dr. Norbert Rübiger

RWTHAACHEN
UNIVERSITY



Prof. Dr. Holger Schüttrumpf

JUSTUS-LIEBIG-
UNIVERSITÄT
GIESSEN



ILL
Institut für
Lebensmittelchemi
e und -
biotechnologie

Prof. Dr. Gerd Hamscher

RWTHAACHEN
UNIVERSITY



Frau Prof. Dr. Sabina Jeschke

JUSTUS-LIEBIG-
UNIVERSITÄT
GIESSEN



IAM
Institut für
Angewandte
Mikrobiologie

Prof. Dr. Peter Kämpfer



Frau Ursula Fritzmeier

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit



GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung