

**Schlussbericht gemäß Nr. 3.1 der BNBest-BMBF 98 zum**

**ANTIRES 2.0 – Etablierung eines Plasma-basierten Verfahrens zur Bekämpfung der Antibiotika-Resistenz-Verbreitung durch kommunale Abwässer**

**Teilvorhaben ANTIRES 2.0-TV1**

**Zuwendungsempfänger:**

Institut für Marine Biotechnologie e.V.  
Walter-Rathenau-Str. 49a  
17489 Greifswald

**Förderkennzeichen:**

03ZZ0833A

**Vorhabenbezeichnung:**

Zwanzig20 – InfectionControl 2020 –  
Verbundvorhaben:

ANTIRES 2.0 – Etablierung eines  
Plasma-basierten Verfahrens zur  
Bekämpfung der Antibiotika-Resistenz-  
Verbreitung durch kommunale  
Abwässer

Teilvorhaben ANTIRES 2.0-TV1

**Laufzeit des Vorhabens:**

01.08.2019 – 31.03.2022

**Berichtszeitraum:**

01.08.2019 – 31.03.2022

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung

## INHALT

I.	Kurzdarstellung .....	3
1.	Aufgabenstellung .....	3
2.	Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde .....	3
3.	Planung und Ablauf des Vorhabens .....	3
4.	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde.....	6
5.	Zusammenarbeit mit anderen Stellen.....	6
II.	Eingehende Darstellung .....	7
1.	Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele .....	7
	Arbeitsschwerpunkt 1 .....	7
	Arbeitsschwerpunkt 2.....	12
	Arbeitsschwerpunkt 3.....	21
2.	Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises .....	22
3.	Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit .....	23
4.	Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans .....	23
5.	Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen.....	24
6.	Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 6.....	24
	Referenzen.....	25

### I. Kurzdarstellung

#### 1. Aufgabenstellung

In ANTIREs 2.0 TV1 sollte untersucht werden, inwieweit physikalisches Plasma geeignet ist, um die Belastung von Abwässern mit antibiotikaresistenten Keimen und Antibiotika zu verringern. In Zusammenarbeit mit dem assoziierten Partner Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. (INP) sollten verschiedene Methoden der Plasma-Erzeugung hinsichtlich ihrer Effizienz verglichen werden. Dabei sollte sowohl der Effekt auf Einzelorganismen (Reinkulturen), als auch auf die taxonomische und funktionelle Zusammensetzung komplexer mikrobieller Gemeinschaften in Kläranlagen analysiert werden. Zentrale Ziele in TV1 waren die Charakterisierung der Reaktion von ausgewählten Antibiotika-resistenten Einzelorganismen und komplexen Gemeinschaften auf die Plasmabehandlung auf mikrobieller und (Meta-)Proteomebene.

#### 2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die alarmierende Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen mit fast 5 Millionen in Zusammenhang gebrachten Todesfällen allein 2019 (Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022), zusammen mit der nur langsamen Entwicklung neuer Antibiotika sowie Antibiotika-unabhängiger Therapiemaßnahmen ist eine der zentralen Krisen unserer Zeit und birgt die Gefahr, die medizinische Versorgung in eine Prä-Antibiotika-Phase zurückzusetzen. Dieser Krise muss auf mehreren Ebenen begegnet werden, sowohl in der Eindämmung der Resistenzverbreitung als auch in der Entwicklung und Etablierung diagnostischer und präventiver Maßnahmen. Aus diesem Grund wurde im Rahmen der Fördermaßnahme „Zwanzig20 – Partnerschaft für Innovation“ des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) das InfectControl 2020-Konsortium gegründet. Ziel dieses Verbundes aus akademischen und Wirtschaftspartnern ist es, neue, erfolgreiche Strategien zur frühzeitigen Erkennung, Eindämmung, und Bekämpfung von Infektionskrankheiten zu entwickeln und zu implementieren – ein Ziel, das gerade angesichts der andauernden Corona-Krise und zu erwartender weiterer Pandemien auch ins Zentrum der öffentlichen Aufmerksamkeit gerückt ist.

#### 3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Teilvorhaben TV1 gliederte sich in 3 Arbeitsschwerpunkte.

In **Arbeitsschwerpunkt 1**, „Effekte physikalischen Plasmas auf AB-resistente Isolate aus Abwasser und Klärschlamm“ wurden ausgewählte Antibiotika-resistente Abwasserisolate mit physikalischem Plasma behandelt, um die Auswirkungen dieser Behandlung auf das Überleben, Resistenzprofil, und die Proteinexpression dieser Isolate zu analysieren. In diese Arbeiten wurden sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Stämme einbezogen, um den Einfluss der Zellwand-Morphologie auf die Effektivität der Plasmabehandlung nachzuvollziehen.

Im **Arbeitsschwerpunkt 2** „Effekte physikalischen Plasmas auf Bakteriengemeinschaften in Abwässern und Klärschlamm“ wurden das Abwasser des Greifswalder Universitätsklinikums und der Zulauf (Sandfang) und Ablauf sowie der Belebtschlamm der Kläranlage Greifswald zu vier Zeitpunkten (Oktober 2019, sowie Februar, Juni und August 2020) beprobt und die

### Schlussbericht

---

entsprechenden Proben mit Plasma behandelt. Vor und nach der Plasmabehandlung wurden Unterproben für die Bestimmung der Keimzahl und die Metaproteom-Analyse, sowie für, in TV2, die Amplicon-Sequenzierung, die metagenomische und metatranskriptomische Analyse und die Bestimmung der Antibiotika-Konzentrationen in wässrigen Proben genommen. Nach Amplicon- und Keimzahl-basierter Auswahl von Probenzeitpunkten und Plasmabehandlungen für die weitere tiefgehende Analyse zusammen mit dem Projektpartner Göttingen und dem assoziierten Partner INP wurden aus Metaproteomics-Proben die Proteine mittels des im Vorgängerprojekt ANTIREs etablierten Protokolls extrahiert und anschließend gel-frei verdaut und die taxonomische und funktionelle Zusammensetzung der Gemeinschaft vor und nach der Plasmabehandlung verglichen. Zudem wurden die Resistenzprofile ausgewählter isolierter Mikroorganismen analysiert. Da der Schnelltest aus ANTIREs nicht zur Verfügung stand, geschah dies über etablierte mikrobiologische Methoden, sowie über eine von der Analytik Jena GmbH zur Verfügung gestellte qPCR-basierte Laborstrecke, in die auch der Nachweis von SARS-CoV2 integriert wurde.

**Arbeitsschwerpunkt 3** „Effekte physikalischen Plasmas auf AB-Rückstände in Abwässern und Klärschlamm“ umfasste die Auswahl und detaillierte Analyse von 16 der ursprünglich 75 getesteten Antibiotika in den Proben, die in Arbeitsschwerpunkt 2 für eine tiefgreifende Analyse ausgewählt wurden.

Bedingt durch die Corona-Pandemie und damit verbundene Einschränkungen (Lieferverzögerungen, Lock-Downs) ergaben sich Verschiebungen im Arbeitsplan. Der finale Arbeitsplan ist in Tabelle 1 dargestellt.



#### 4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Proteom- und Metaproteomanalysen sind ein Mittel der Wahl, um die tatsächliche Aktivität von Mikroorganismen unter bestimmten Umweltbedingungen zu analysieren (z.B. Winter *et al.*, 2011, 2013, Fuchs *et al.*, 2013; Maaß *et al.*, 2014; Schneider & Riedel, 2010). Im vorangegangenen Verbundprojekt ANTIREs wurden diese Metaproteom-Techniken erfolgreich zur Aufklärung der Struktur und Funktion der mikrobiellen Gemeinschaften in kommunalen Abwässern und Klärschlämmen genutzt (Hinzke *et al.* 2022, One Health Conference Greifswald). Damit wurde in ANTIREs auch der Nachweis erbracht, dass diese Techniken sich hervorragend eignen, um das Vorkommen und die Abundanz von Antibiotika-Resistenz-assoziierten Proteinen in Bakteriengemeinschaften zu untersuchen. Ebenso sind proteomische und metaproteomische Methoden ein Mittel der Wahl, um den Einfluss von Umwelttoxinen auf die physiologische Aktivität von Mikroorganismen nachzuvollziehen. Dementsprechend sollten diese in ANTIREs optimierten Techniken in ANTIREs 2.0 genutzt werden, um die Auswirkungen physikalischen Plasmas auf die Physiologie von Mikroorganismen und die taxonomische und funktionale Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften in Abwasser zu untersuchen. Damit sollten, gemeinsam mit dem Verbundpartner Göttingen und dem assoziierten Partner INP, die molekularen Grundlagen der Wirkung physikalischen Plasmas auf Mikroorganismen verstanden und eine Nutzen-Risiko-Abschätzung einer Plasmabehandlung von Abwasser getroffen werden.

#### 5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

ANTIREs 2.0, TV1 wurde in der Zusammenarbeit mit anderen Stellen auf verschiedenen Ebenen erfolgreich durchgeführt:

##### *Innerhalb des Projektverbundes*

Georg-August-Universität Göttingen, Abteilung Genomische und Angewandte Mikrobiologie

Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e. V. (INP), Greifswald

##### *Außerhalb des Projektverbundes*

Stadtwerke Greifswald GmbH

JenaBios GmbH, Jena

## II. Eingehende Darstellung

### 1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

#### Arbeitsschwerpunkt 1

In Arbeitsschwerpunkt 1 wurden Antibiotika-resistente Isolate und deren Reaktion auf eine Plasmabehandlung untersucht. Da es im Sommer 2019 zu einem gehäuften Auftreten eines Stammes von *Klebsiella pneumoniae* mit zweifachem Carbapenemase-Besitz und Colistinresistenz bei Patienten u.a. auch im Universitätsklinikum Greifswald kam, wurde bei der Beprobung des Klinikumsabwassers ein Selektivmedium für Klebsiellen (*Klebsiella ChromoSelect Selective Agar*) genutzt. Für 50 dieser Isolate wurden weitere Charakterisierungen hinsichtlich des Antibiotika-Resistenzprofils vorgenommen. Alle Isolate wurden auf das für den *K. pneumoniae*-Ausbruchsstamm typische Resistenzprofil überprüft ([https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2019/Ausgaben/40\\_19.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2019/Ausgaben/40_19.pdf?__blob=publicationFile)). Obwohl alle Isolate eine Resistenz gegenüber Piperazillin-Tazobactam, Gentamicin, Tobramycin und Ciprofloxacin aufwiesen, konnte gerade die für den o.g. Stamm beschriebene Carbapenem-Resistenz nicht nachgewiesen werden, jedoch wiesen alle Isolate Mehrfach-Resistenzen auf (Abb. 1).

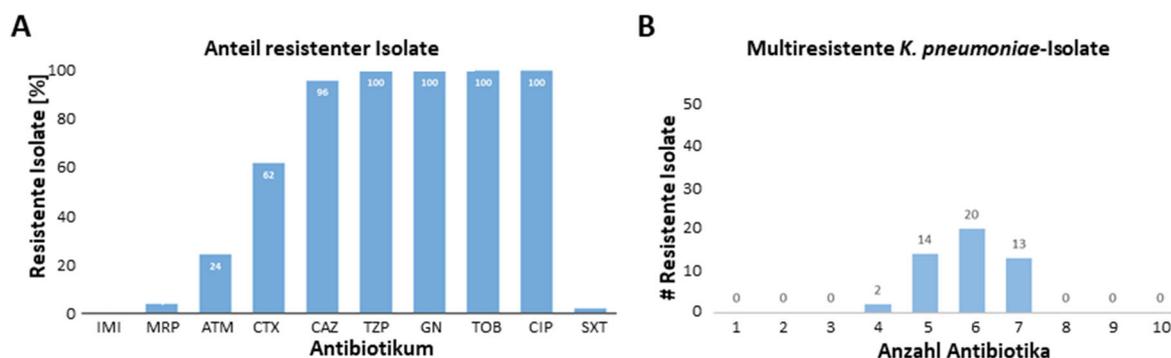


Abb. 1. Antibiotika-Resistenzprofil von *Klebsiella pneumoniae*-Isolaten aus dem Abwasser des Universitätsklinikums Greifswald. Anteil an resistenten Isolaten gegen verschiedene Antibiotika (A). Anzahl an *K. pneumoniae*-Isolaten mit Mehrfachresistenzen (B). IMI - Imipenem, MRP - Meropenem, ATM - Aztreonam, CTX - Cefotaxim, CAZ - Ceftazidim, TZP - Piperazillin-Tazobactam, GN - Gentamicin, TOB - Tobramycin, CIP - Ciprofloxacin, SXT - Trimethoprim/Sulfamethoxazol.

Nach den initialen Screenings wurden ausgewählte 16 *K. pneumoniae*-Stämme weiterführenden Antibiotika-Resistenztestungen unterzogen. In einem *K. pneumoniae*-Isolat (interne Bezeichnung St. 35) wurden bei Testung auf Carbapenem-Resistenz Einzelkolonien innerhalb der Hemmhöfe beobachtet. Die aus diesen Einzelkolonien stammenden Isolate wiesen Carbapenem-Resistenz auf (Abb. 2). Weitere 15 aus Klinikwasser isolierte Bakterienstämme wurden, der Prioritätenliste der WHO folgend, auf Carbapenem-Resistenz und Extended-Spectrum-Betalaktamasen (ESBL)-Produktion untersucht. Von diesen Isolaten waren vier Carbapenem-insensitiv und zwei ESBL-positiv. Auch der *K. pneumoniae* St. 35 und eines der Hemmhof-Isolate waren ESBL-positiv. Von allen getesteten Isolaten wurden insgesamt fünf Stämme (drei *K. pneumoniae*-Stämme, *Citrobacter brakii*, *Pseudomonas*

## Schlussbericht

*aeruginosa*) für die Genomsequenzierung (TV2) ausgewählt, um deren Repertoire an Resistenz-assoziierten Genen zu bestimmen. In diesen Sequenzierungen zeigte sich, dass es sich bei den vermuteten Klebsiellen tatsächlich um *Citrobacter*-Stämme handelte. Zwei dieser Stämme wurden weiterführend mikrobiologisch und proteomisch untersucht, wobei bei dem Carbapenemase-resistenten Stamm eine auch unter Antibiotika-freien Kontrollbedingungen hochabundante Carbapenemase nachgewiesen wurde. Diese ist wahrscheinlich (mit) verantwortlich für Carbapenem-Resistenz dieses Stammes.

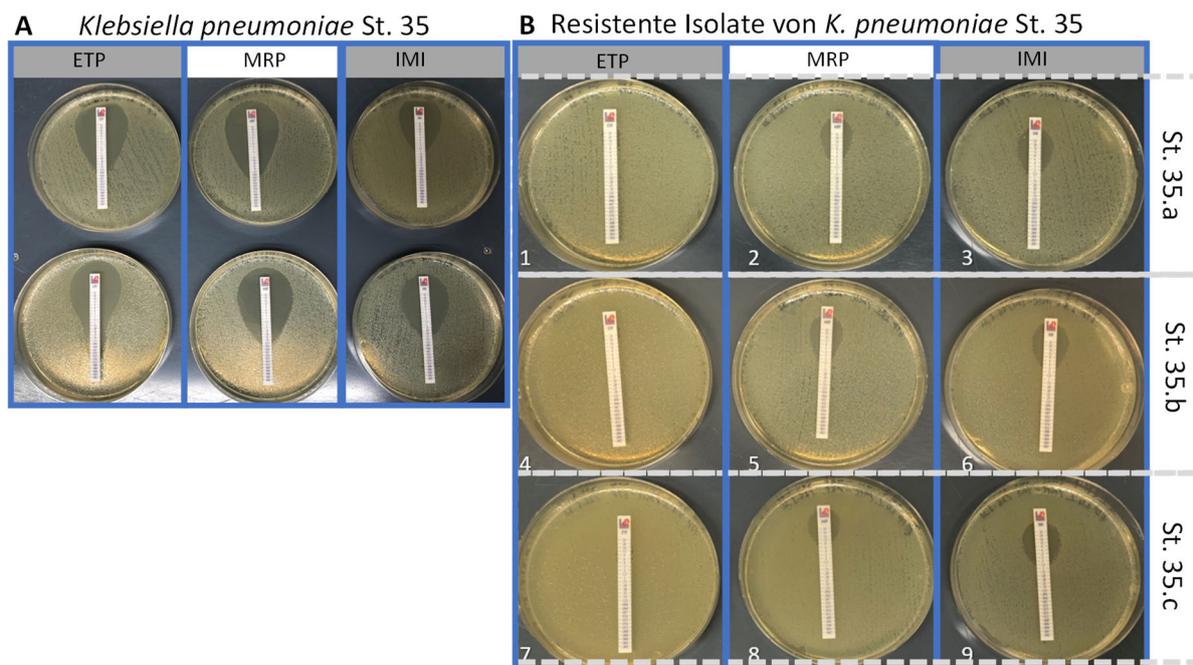


Abb. 2. Carbapenem-Resistenzbestimmung eines *Klebsiella pneumoniae*-Isolates (interne Bezeichnung St. 35) aus Abwasser und aus Einzelkolonien in Hemmhöfen dieses Stammes gewonnener Isolate. (A) Carbapenem-minimale Hemmkonzentration (MHK) von *K. pneumoniae* St. 35. (B) Carbapenem-MHKs von drei Isolaten, die aus Hemmhöfen von St. 35 isoliert wurden. ETP: Ertapenem, MRP: Meropenem, IMI: Imipenem.

Verschiedene Gram-negative (*Escherichia coli*, *Providencia rettgeri*) sowie Gram-positive Antibiotika-resistente Abwasser-Isolate (*Enterococcus faecalis*) wurden auf ihre Resistenz gegenüber einer Behandlung mit physikalischem Plasma untersucht. Die Plasmabehandlungen wurden durch das Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. (INP) in Greifswald durchgeführt. Die Isolate wurden als Reinkultur angezogen und in synthetischem Abwasser behandelt. Es wurden vier verschiedene physikalische Methoden getestet. Die Bestimmung der Inaktivierungseffizienz erfolgte über die Bestimmung der Lebendkeimzahl (CFU/ml) vor und nach der Plasmabehandlung. Die Inaktivierungseffizienz der Pin-to-Liquid (wINPlas)-Plasmaquelle und der gepulsten dielektrischen Barriere-Entladung (DBE) lag bei 100 % - bis zu 7,4 log-Stufen - (Tabelle 1); die Nutzung einer Mikrowellenplasmaquelle und gepulster elektrischer Felder zeigten geringere Inaktivierungseffizienzen (0.3 – 2.0 log-Stufen; nicht gezeigt). Bei diesen Analysen wurden keine Unterschiede in der Effektivität auf Gram-negative und Gram-positive Bakterien festgestellt.

Schlussbericht

Tabelle 1. Inaktivierungseffizienz der wINPlas- und DBE-Plasmaquelle gegenüber verschiedenen Antibiotika-resistenten Abwasserisolaten.

		Lebendkeimzahl [CFU/ml]	Reduktion [%]
<b><i>Escherichia coli</i> GW-AmxH19</b>			
wINPlas	vor Behandlung	1.82E+07	
	nach Behandlung	0	100
DBE	vor Behandlung	1.25E+07	
	nach Behandlung	0	100
<b><i>Providencia rettgeri</i></b>			
wINPlas	vor Behandlung	5.87E+06	
	nach Behandlung	0	100
DBE	vor Behandlung	7.85E+05	
	nach Behandlung	0	100
<b><i>Enterococcus faecalis</i></b>			
wINPlas	vor Behandlung	2.70E+07	
	nach Behandlung	0	100
DBE	vor Behandlung	7.87E+06	
	nach Behandlung	0	100

Um die physiologische Reaktion von Antibiotika-resistenten Isolaten auf die Plasmabehandlung nachzuvollziehen, wurde darüber hinaus das *Escherichia coli*-Abwasserisolat GW-AmxH19 (Schneider et al., 2020) einer sublethalen Behandlung mit physikalischem Plasma (wINPlas) unterzogen. Diese „Wiederanwachs-Versuche“ (*Re-Growth-Experimente*) sollten Effekte auf die überlebende Bakterienpopulation nach einer Plasmabehandlung aufzeigen. Neben dem Einfluss auf das Wachstumsverhalten wurden Antibiotika-Resistenzprofile verglichen, die Zellmorphologie untersucht und das Gesamtproteom (TV1) sowie Transkriptom (TV2) analysiert. Durch die Plasmabehandlung wurden Inaktivierungseffizienzen zwischen 50 - 100 % erreicht (Abb. 3).

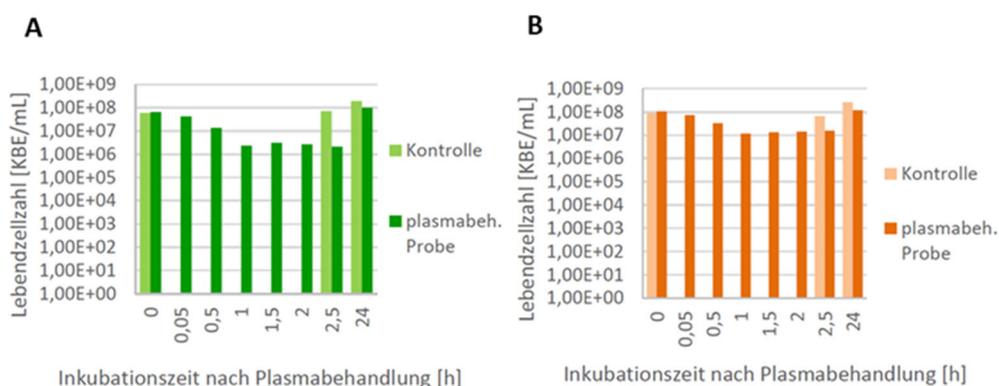


Abb. 3. Inaktivierung durch Plasmabehandlung und „Wiederanwachsen“ des Abwasserisolates *E. coli* GW-AmxH19. Die Zellen wurden mit der wINPlas-Plasmaquelle behandelt und die CFU zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. (A) Inaktivierungseffizienz 95 - 99 %, (B) Inaktivierungseffizienz 80 - 90 %.

Proben für die einzelnen Analysen wurden vor und jeweils 90 und 120 min nach der Plasmabehandlung entnommen (Abb. 4A). Die Zelloberflächenstruktur zeigt Änderungen

Schlussbericht

nach Plasmabehandlung; außerdem kam es zur Bildung von *inclusion bodies*, die auf die Akkumulation denaturierter Proteine in den Zellen hinweisen (Abb. 4B). Das Antibiotikaresistenzprofil zeigte hingegen keine wesentlichen Veränderungen nach der Plasmabehandlung (Abb. 4C).

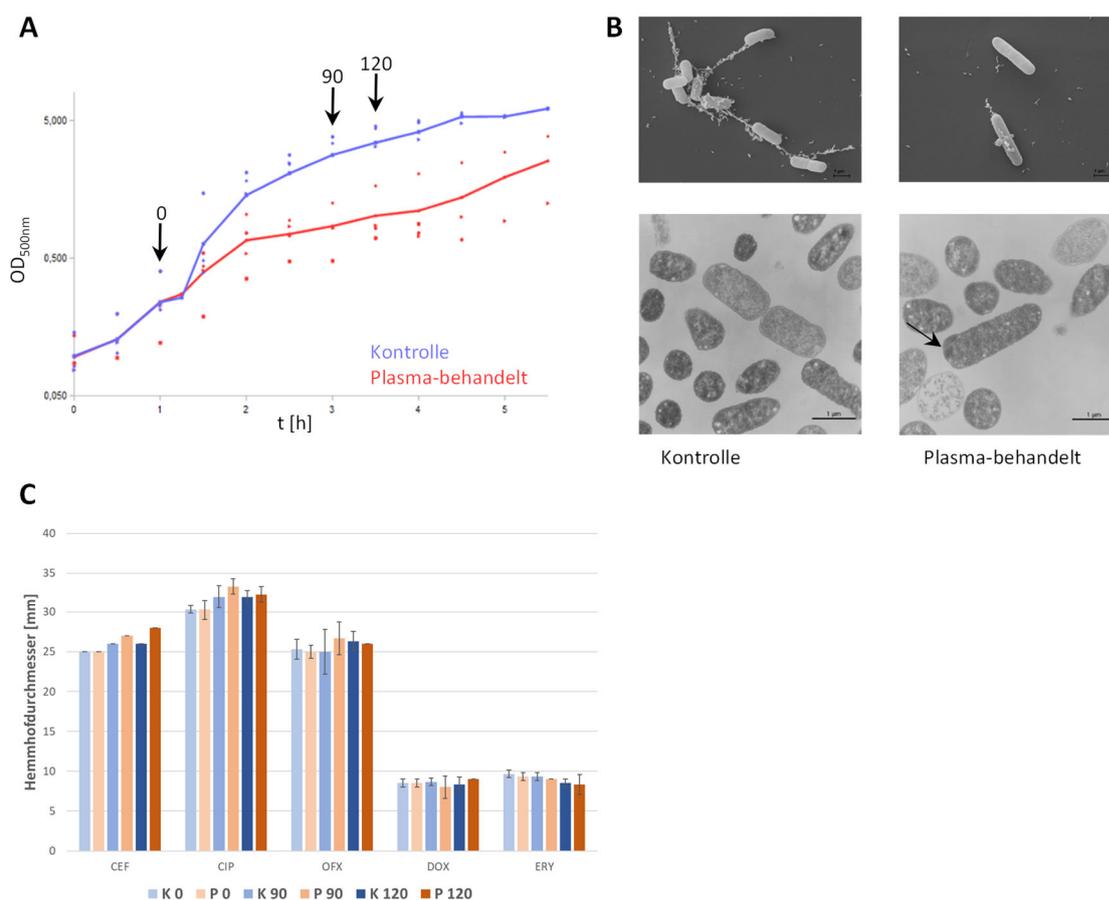


Abb. 4. Behandlung eines Antibiotika-resistenten *E. coli*-Abwasserisolates mit physikalischem Plasma (wINPlas-Plasmaquelle) im Rahmen von Wiederanwuchsversuchen. Das *E. coli*-Isolat wurde einer sublethalen Behandlung mit physikalischem Plasma ausgesetzt, die zu einer Verlangsamung des Wachstums führte, die Zellen aber nicht abtötete. (A) Wachstumskurve von *E. coli*. Die Pfeile zeigen die Probestpunkte (0 – vor Plasmabehandlung; 90/120 – 90 bzw. 120 min nach Plasmabehandlung). (B) Elektronenmikroskopische Aufnahmen (Raster-Elektronenmikroskopie, obere Fotos; Transmission-Elektronenmikroskopie, untere Fotos) erfolgten 90 min nach der Plasmabehandlung im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle. Der Pfeil im unteren Foto markiert inclusion bodies. (C) Antibiogramme wurden mittels Disc-Diffusion-Test aufgenommen. CEF – Cefotaxim, CIP – Ciprofloxacin, OFX – Ofloxacin, DOX – Doxycyclin, ERY - Erythromycin.

Während der Einfluss der Plasmabehandlung auf die Antibiotika-Resistenz von *E. coli* GW-AmxH19 insgesamt nicht signifikant blieb, zeigte sich dennoch, dass zu frühen Zeitpunkten nach der Plasmabehandlung (30 min, 2,5 h) die Hemmhöfe für die meisten getesteten Antibiotika vergrößert waren. Die 24 h-Proben zeigten dieses Verhalten nicht mehr (Abb. 5). Zumindest kurzfristig scheint es demnach eine Änderung des Resistenzprofils bzw. der Sensitivität gegenüber einigen Antibiotika zu geben.

Schlussbericht

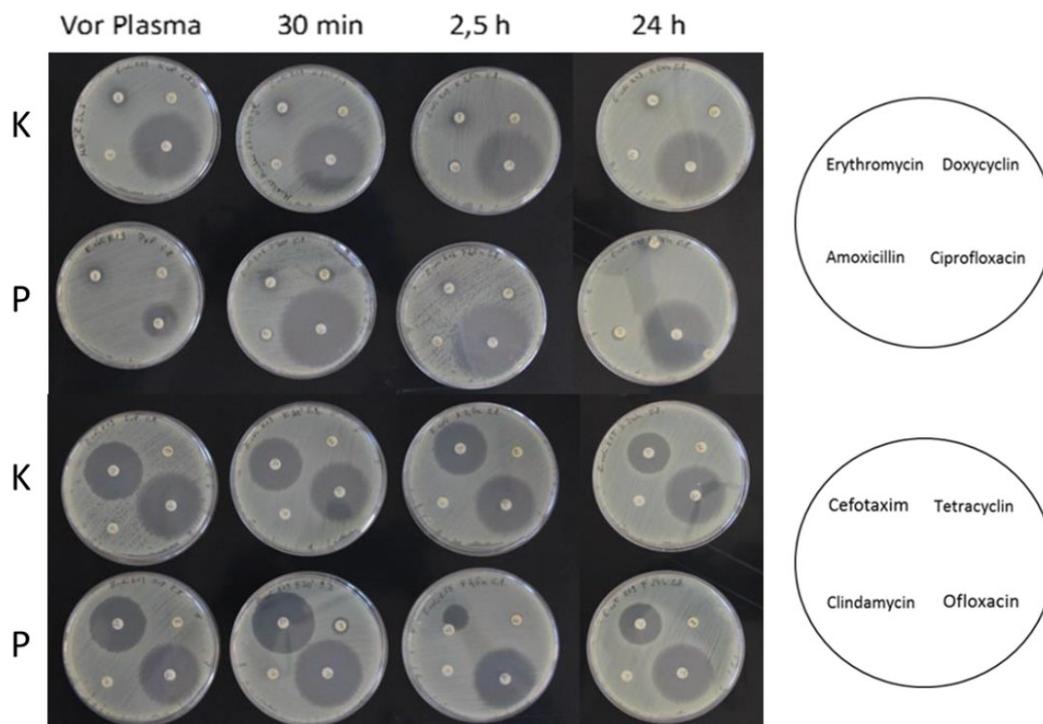


Abb. 5. Einfluss physikalischen Plasmas auf das Resistenzprofil von *E. coli* GW-AmxH19. Aliquots der Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Plasmabehandlung auf MH-Agar ausplattiert und das Wachstumsverhalten gegenüber acht verschiedenen Antibiotika bestimmt. K – unbehandelte Kontrolle, P – plasmabehandelte Kultur. Die Grafiken auf der rechten Bildseite stellen die Verteilung der Antibiotika-Plättchen dar.

Zudem führte die Behandlung mit physikalischem Plasma zu distinkten Änderungen im Proteom (Abb. 6). Die Analyse des Proteinprofils zeigte ein deutliches Clustering in Plasma-behandelte und unbehandelte Proben; nach 24 h sind diese Effekte allerdings nicht mehr sichtbar. Das Isolat reagiert auf die Plasmabehandlung demzufolge mit einer reproduzierbaren und temporären Änderung seines Proteoms.

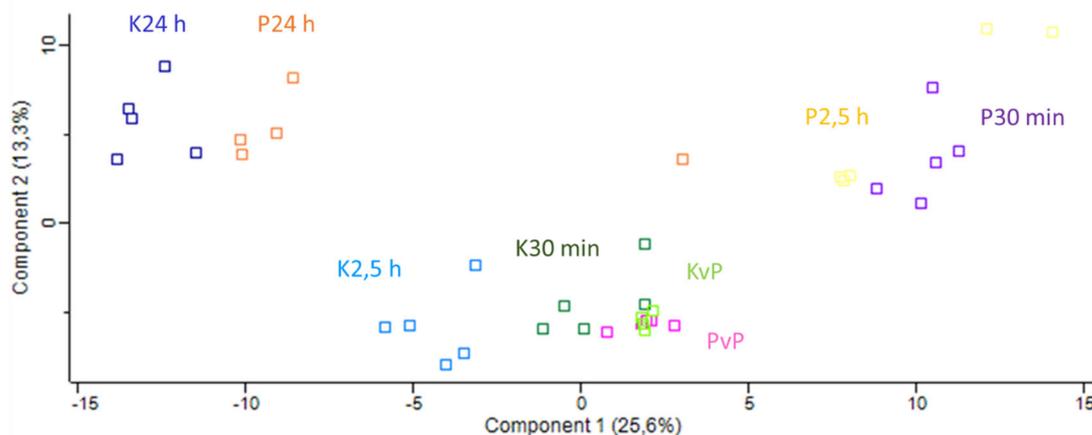


Abb. 6. Hauptkomponentenanalyse der Änderungen im Proteom eines *E. coli*-Abwasserisolates (GW-AmxH19) nach Behandlung mit physikalischem Plasma. K- Kontrollen, P – Plasma-behandelte Proben; KvP, PvP – Kontrolle und Probe vor Plasmabehandlung; die Zeitpunkte nach der Plasmabehandlung sind angegeben. Dargestellt sind die Ergebnisse von fünf unabhängigen Experimenten.

### Schlussbericht

---

Änderungen im Speziellen betreffen vor allem Proteine, die Chaperonfunktion ausüben. Diese wurden nach Plasmabehandlung in verstärkter Menge synthetisiert, wahrscheinlich, um Proteine, die durch die Plasmabehandlung fehlgefaltet vorliegen, in ihre native Konformation rückfalten zu können. Proteine, die in die Transkription oder Translation involviert sind, lagen nach Plasmabehandlung in geringerer Menge vor. Eine Katalase, die Superoxidradikale und Wasserstoffperoxid entgiften kann, lag ebenfalls in erhöhter Menge vor und ist möglicherweise an der Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies, die durch die Plasmabehandlung gebildet werden, beteiligt. Parallel zu den in TV1 durchgeführten Proteomanalysen wurden Transkriptomanalysen durch den Kooperationspartner TV2 durchgeführt, um ein umfassenderes Bild auf die physiologischen Änderungen, die durch die Plasmabehandlung induziert wurden, zu gewinnen.

Um die inclusion bodies näher zu analysieren, wurde die Proteinaggregatfraktion mittels massenspektrometrischer Methoden untersucht. Hier wurden die Chaperone DnaK, HtpG, und IbpB in deutlich erhöhter Menge gefunden. Diese Proteine sind vermutlich an der Rückfaltung fehlgefalteter Proteine und damit der Auflösung der Aggregate beteiligt.

Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS/RNS) können sich auf den Oxidationsstatus cysteinhaltiger Proteine auswirken. Mittels differentiell Cysteinlabeling (Sievers et al., 2018) wurde der Oxidationsstatus von Cysteinen untersucht. Zu den untersuchten Zeitpunkten (90 und 120 min nach Plasmabehandlung) wurde allerdings keine verstärkte (reversible) Cysteinoxidation detektiert. Ein Grund dafür kann in der verstärkten Abundanz entsprechender Reparatur- und Detoxifikationsproteine liegen, die zum einen (reversible) Cysteinoxidationen reduzieren können und zum anderen ROS/RNS unschädlich machen. Die Ergebnisse zeigten allerdings Hinweise auf Proteinschädigung und/oder -inaktivierung durch irreversible Cysteinoxidationen (Sulfonsäuren).

### Arbeitsschwerpunkt 2

Um die Effekte physikalischen Plasmas auf Bakteriengemeinschaften in Abwässern und Klärschlamm zu untersuchen, wurden das Abwasser des Greifswalder Universitätsklinikums und der Zulauf (Sandfang) und Ablauf sowie der Belebtschlamm der Kläranlage Greifswald zu vier Zeitpunkten (Oktober 2019, sowie Februar, Juni und August 2020) beprobt. Zulauf, Ablauf und Klinikabwasser wurden als 24h-Mischproben mittels stationärer (Zulauf) und mobiler (Ablauf, Klinikum) Probenehmer genommen. Der Belebtschlamm wurde als Stichprobe beprobt. Im Anschluss an die Probenahme wurden die Plasmabehandlungen mit verschiedenen Plasmaquellen am INP in Greifswald durchgeführt, die Proben (auch die jeweils unbehandelte Kontrollprobe) für die weiteren Metagenom- und Metaproteomanalysen vorbereitet und entsprechend der im Projekt ANTIREs etablierten Protokolle prozessiert.

Zur Behandlung der Abwässer und des Belebtschlammes wurden insgesamt sieben verschiedene Technologien (einschließlich zwei Variationen im Fall der DBE) eingesetzt. Die Effizienz der Behandlungen wurde über die Berechnung des Reduktionsfaktors nach Bestimmung der Lebendzellzahl vor und nach der Plasmabehandlung auf LB-Agarplatten mit Zusatz von Cycloheximid (zur Hemmung des Pilzwachstums) ermittelt.

Plasmaquelle 1: wINPlas – *Pin-to-liquid*-Entladung

Bei dieser Technologie wird zwischen vier Elektroden und der Fluidoberfläche eine

### Schlussbericht

---

hochfrequente Gasentladung in Luft gezündet (Abb. 7A). Durch die in dieser Plasma-Umgebung gebildeten reaktiven Spezies (z.B. NO, NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH) werden chemische Reaktionen in der behandelten Flüssigkeit angestoßen und ein bakterizider Effekt erzielt.

**Plasmaquelle 2: Gepulste dielektrische Barriere-Entladung (DBE) für Wassersprühnebel**  
In dieser Plasmaquelle wird das zu behandelnde Fluid durch eine Vollkegeldüse gepumpt und der Sprühnebel auf die Elektroden einer dielektrischen Barrierenentladung (DBE) gerichtet. Im Betrieb bilden sich zwischen den Elektroden Plasmaentladungen aus, die sich durch den Sprühnebel auf die Wassertropfen zwischen den Elektroden konzentrieren (Abb. 7B). Die Anpassungen der DBE umfassten (1) die Nutzung von drei statt einem Elektrodenstacks mit angepasster Generatorleistung, und (2) eine Generatorleistung wie in Anpassung (1), mit nur einem Elektrodenstack, um stärkere Entladungen zu erreichen.

#### Plasmaquelle 3: Funkenentladung im Wasser

Das Fluid wird mittels Pumpe durch einen Reaktor geleitet und fließt dann in den Behälter zurück. In der Mitte des Reaktors stehen sich zwei Wolframelektroden mit einem Abstand von 0,5 mm stirnseitig gegenüber. An eine Elektrode ist eine gepulste Gleichspannung und an der anderen das Massepotential angeschlossen. Erreicht diese Spannung einen kritischen Wert, kommt es zu einer Funkenentladung durch das Fluid hindurch. Nach diesem Zusammenbruch des elektrischen Feldes wird durch die angeschlossene Gleichspannungsquelle ein „Pulse Forming Network“ (PFN) mit einer Hochspannung aufgeladen, bis es erneut zum Entladungsdurchbruch kommt (Abb. 7C).

#### Plasmaquelle 4: Korona-Entladungen im Wasser

Der Aufbau besteht aus einem Reaktor, durch den das Fluid als offener Kreislauf gepumpt wird, und einer Hochspannungseinheit. An der Innenwandung des Reaktor-Glasrohres ist ein feinmaschiges Gitter aus rostfreiem Stahl befestigt und in der Mitte des Rohres ist ein Wolframdraht (Ø 0,05 mm) gespannt. Durch diesen koaxialen Aufbau und den Anschluss an eine gepulste Hochspannung bilden sich Korona-Entladungen um den mittigen Draht. Durch die Korona-Entladungen werden in dem Fluid Radikale erzeugt (Abb. 7D).

#### Plasmaquelle 5: Mikrowellen

In dieser Plasmaquelle erzeugen Mikrowellen, die durch die Luft ausgetragen werden, das physikalische Plasma in Form eines Plasmajets (Abb. 7E).

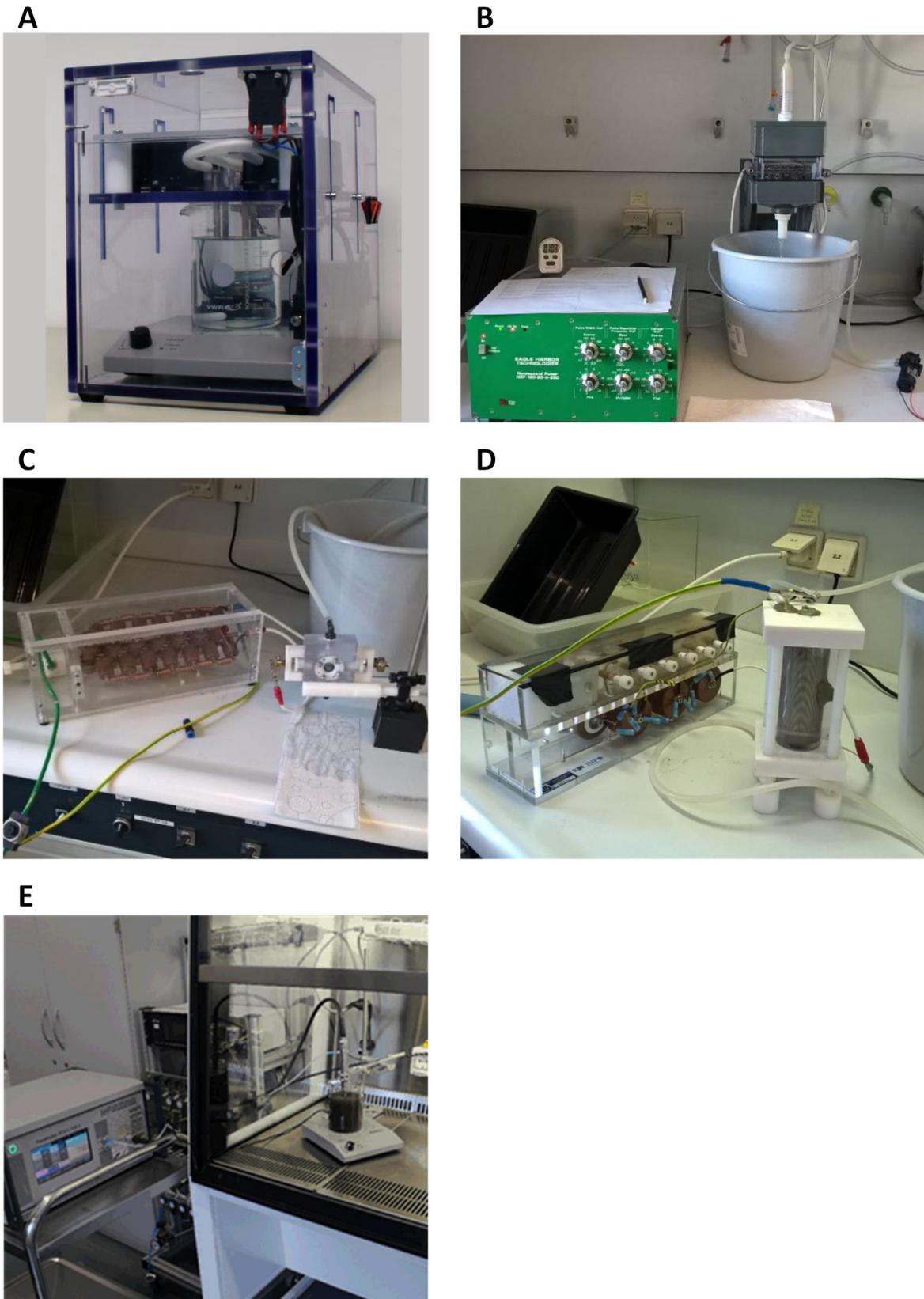


Abb. 7. Aufbauten der fünf getesteten Plasmaquellen zur Behandlung von Abwässern und Klärschlammproben. (A) Plasmaquelle wINPlas – Pin-to-Liquid-Entladung, (B) Experimentalaufbau mit Impulsgenerator und DBE-Reaktor (Dielektrische Barriere-Entladung), (C) Experimentalaufbau der Funkenentladung mit PFN (Pulse Forming Network), Reaktor und Flüssigkeitsbehälter, (D) Reaktor mit „Marx-Bank“, (E) Mikrowellengenerator und Plasmajet über Becherglas.

### **Schlussbericht**

---

Um die Plasmaquellen nicht zu verstopfen, wurden Abwasser bzw. Klärschlamm gesiebt, falls notwendig (Maschenweite von 2 mm). Es wurden von den Abwasserproben jeweils 3 l mit der jeweiligen Plasmaquelle behandelt; vom Belebtschlamm wurden jeweils 1,5 l behandelt. Zusätzlich wurde das Abwasser bzw. der Belebtschlamm für die Behandlung mit der Plasmaquelle 4 (Korona) generell verdünnt, um einen Leitwert von ca. 600-800  $\mu\text{S}/\text{cm}$  zu erreichen und Überschläge zu verhindern. Generell blieb die Leitfähigkeit nach den Behandlungen konstant.

Die Wirkung der Plasmabehandlung war sowohl abhängig von der Art der Plasmaquelle als auch der der Abwasserprobe (Tabelle 2).

Schlussbericht

Tabelle 2. Effizienz der verwendeten Plasmaquellen, die Lebendkeimzahl in Abwasserproben zu verringern. Dargestellt sind % CFU im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Start-CFU: Klinikum/Zulauf ca.  $2 \times 10^6$ ; Ablauf ca.  $2 \times 10^3$ ; Belebtschlamm ca.  $6 \times 10^4$ .

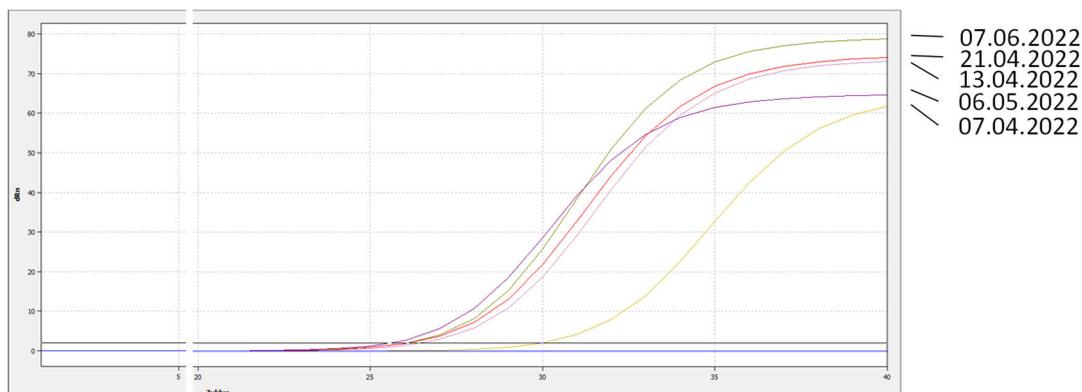
	Plasmaquelle	Klinikum	Zulauf	Ablauf	Belebtschlamm
<b>Okt 19</b>	wINPlas	21.67	68.15	47.46	99.28
	DBE	83.47	55.99	14.04	284.81
	Funken	44.79	68.48	170.46	151.56
	Korona	138.50	125.56	88.14	152.35
<b>Feb 20</b>	wINPlas	39.16	55.25	0.23	41.65
	wINPlas	7.83	100.56	0.47	44.12
	DBE	61.93	54.92	13.05	35.18
	DBE	62.41	43.95	11.89	36.12
<b>Jun 20</b>	wINPlas	21.98	23.29	27.42	32.11
	DBE	0	1.01	6.02	78.87
	Mikrowellen	63.05	28.76	10.03	20.00
	DBE advanced1*	0.91	6.07	8.03	30.28
<b>Aug 20</b>	wINPlas	19.69	64.27	6.68	29.67
	DBE	18.36	31.24	4.55	205.10
	Mikrowellen	19.64	55.86	7.89	118.17
	DBE advanced2*	1.61	1.40	3.61	97.35

\* DBE advanced1: Nutzung von drei statt einem Elektrodenstacks im Vergleich zur DBE und angepasster Generatorleistung; DBE advanced2: ein Elektrodenstack, aber angepasste Generatorleistung aus DBE advanced1

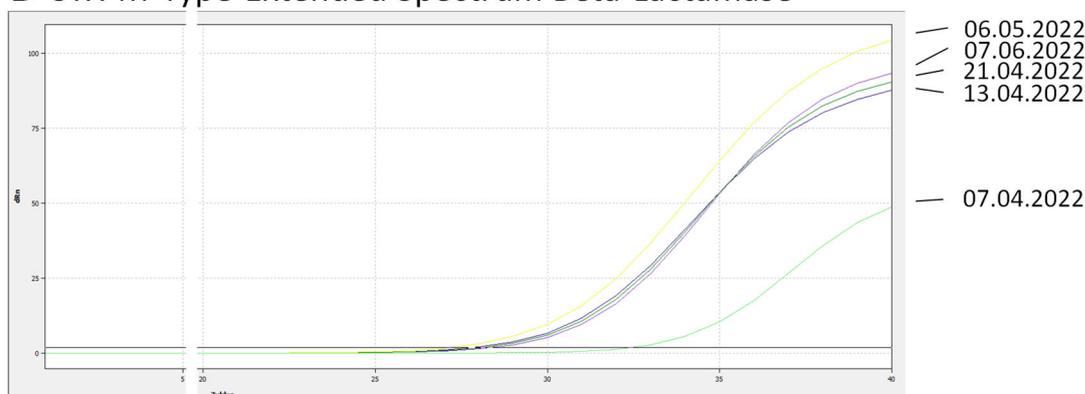
Die beiden Plasmaquellen wINPlas und DBE zeigten sich am besten geeignet für einen Einsatz zur Behandlung kommunaler Abwässer.

Der Nachweis resistenter Mikroorganismen erfolgte abweichend zum ursprünglichen Antrag mittels etablierter mikrobiologischer Methoden, da der ursprünglich eingeplante Schnelltest aus dem Vorgängerprojekt nur als Demonstratorlösung zur Verfügung stand. Zusätzlich wurde eine qPCR-basierte Laborstrecke, zur Verfügung gestellt von der Analytik Jena GmbH, als Schnelltest-Alternative ausgetestet. Ausgewählte Resistenzgene (oxa48: Carbapenemase-Gen, mcr1: Colistinresistenz-Gen, shv: Extended Spectrum b-Lactamase-Gen, ctx: Extended Spectrum b-Lactamase-Gen, mecA: Methicillin-Resistenz-Gen, tem: b-Lactamase-Gen) wurden im Zulaufs-Abwasser der Greifswalder Kläranlage nachgewiesen; außerdem wurde SARS-CoV-2 in die Analyse einbezogen und im Zulaufs-Abwasser detektiert (Abb. 8).

### A TEM Beta-Lactamase



### B CTX-M-Type-Extended Spectrum Beta-Lactamase



### C SARS-Cov2

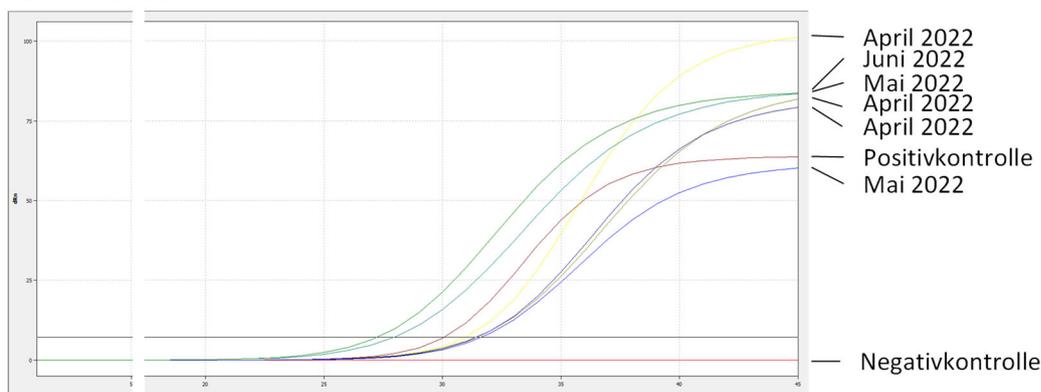


Abb. 8. qPCR-Nachweis von Antibiotika-Resistenzgenen und SARS-CoV2 im Zulauf der Greifswalder Kläranlage. (A) TEM Beta-Lactamase, (B) CTX-M-Type Extended Spectrum Beta-Lactamase, (C) SARS-Cov2.

In Absprache mit dem Verbundpartner Göttingen und dem assoziierten Partner INP Greifswald wurden plasmabehandelte und Kontroll-Proben für die detaillierte Analyse auf Multi-Omics-Ebene ausgewählt. Dabei handelte es sich um Klinikums-Abwasser- und Kläranlagen-Ablaufproben, da diese die vielversprechendsten Standorte für eine Plasmabehandlung darstellen. Es wurden für die Metaproteomics in TV1 jeweils die Kontrolle und alle vier plasmabehandelten Proben der Zeitpunkte Februar, Juni und August analysiert.

Aufbauend auf dem in dem Projekt ANTIREs etablierten Proteinextraktions- und Aufbereitungs-Protokoll wurde ein gel-freies, filterbasiertes Protokoll mit dem standardmäßig

Schlussbericht

genutzt, eine hohe Protein-Identifikationsrate erzielenden gel-basierten verglichen. Die gel-freie Proteinaufbereitung erwies sich als vergleichbar in der Anzahl detektierter Proteine, und zeiteffizienter, und wurde daher für die weitere Aufbereitung der Metaproteom-Proben genutzt. Für die Metaproteomics-Analysen ist neben der Probenaufbereitung insbesondere die Protein-Datenbank entscheidend. Diese wurde durch den Projektpartner Göttingen in Rückkopplung passgenau zu den Proben erstellt. In den in die Analyse einbezogenen Klinikums-Abwasserproben aus Februar, Juni und August 2020 wurden 30.000 bis 37.000 Proteingruppen pro Zeitraum identifiziert. Da in den zugehörigen Ablauf-Proben der Kläranlage nur höchstens wenige hundert Proteingruppen identifiziert wurden, wurde die weitere Analyse auf die Klinikumsproben bezogen.

Für die Einordnung der Metaproteomics-Daten ist die Anzahl der nach Plasmabehandlung noch keimfähigen Zellen (colony-forming units, CFUs), verglichen mit der Kontrolle, zentral (Abb. 9). Alle Plasmabehandlungen führten zu einer Reduktion der CFU, am deutlichsten für die DBE bzw. DBE-Variationen in Juni und August. Gleichzeitig zeigt sich technische Varianz in der durch dieselbe Plasmaquelle hervorgerufenen Reduktion, sowohl zwischen den Monaten als auch für die technischen Replikate innerhalb des Monats Februar.

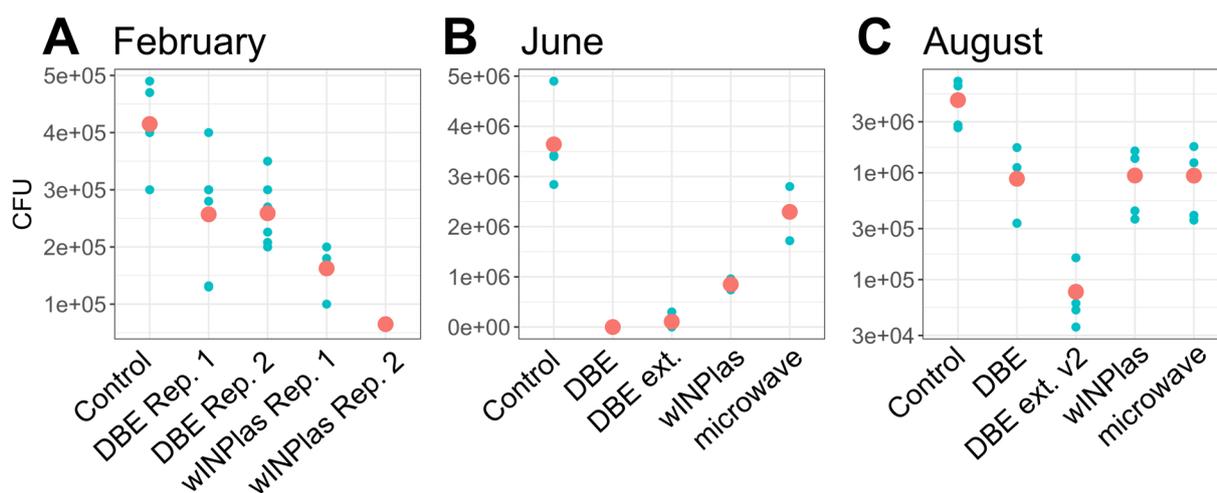


Abb. 9: Koloniebildende Einheiten (colony-forming units, CFU) im Abwasser der Universitätsklinik Greifswald pro Beprobungszeitpunkt für unterschiedliche Plasmabehandlungen, gezählt auf Vollmedium. DBE: gepulste dielektrisch behinderte Entladung, Grundmodell, wINPlas: Pin-to-liquid-Entladung, microwave: Mikrowellenplasmaquelle, DBE ext.: DBE-Variation 1, DBE ext. v2: DBE-Variation 2, Rep. 1/2: technisches Replikat 1/2.

Trotz dieser zum Teil sehr unterschiedlichen Reduktion ist die Verteilung sowohl der Antibiotika-Resistenzproteine (Resfams-Kategorien basierend auf der Resfams-Datenbank, Gibson et al., 2015) als auch der taxonomischen Familien in den Gesamt-Metaproteomen ähnlich zwischen Kontrollen und plasmabehandelten Proben, und unterscheidet sich vor allem zwischen den Beprobungs-Zeitpunkten (Abb. 10).

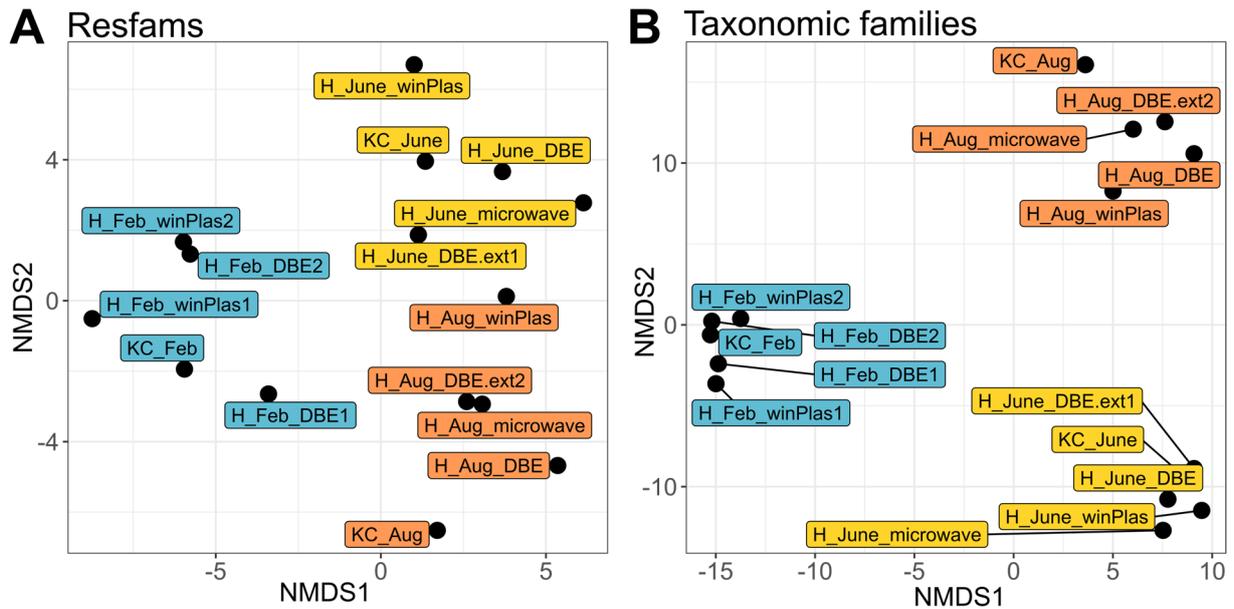


Abb. 10: NMDS-Plots der (A) Resfams-Kategorien (Kategorien von Antibiotika-Resistenzproteinen) und (B) taxonomischen Familien in Metaproteomen des Abwassers des Universitätsklinikums Greifswald. Feb: Februar, June: Juni, Aug: August, KC: Kontrolle, DBE: gepulste dielektrisch behinderte Entladung (1,2: technisches Replikat 1 und 2), Grundmodell, winPlas: Pin-to-liquid-Entladung (1,2: technisches Replikat 1 und 2), microwave: Mikrowellenplasmaquelle, DBE.ext1: DBE-Variation 1, DBE.ext2: DBE-Variation 2.

Ein ebensolches Bild von kaum bzw. in großen Teilen geringen Veränderungen ergibt sich bei Analyse der jeweils 10 abundantesten Resfams-Kategorien bzw. taxonomischen Familien auf Metaproteomebene. Lediglich in den Plasmabehandlungen im August sind größere Verschiebungen in einzelnen Gruppen (v.a. ABC-Transporter und Aminotransferasen) erkennbar (Abb. 11).

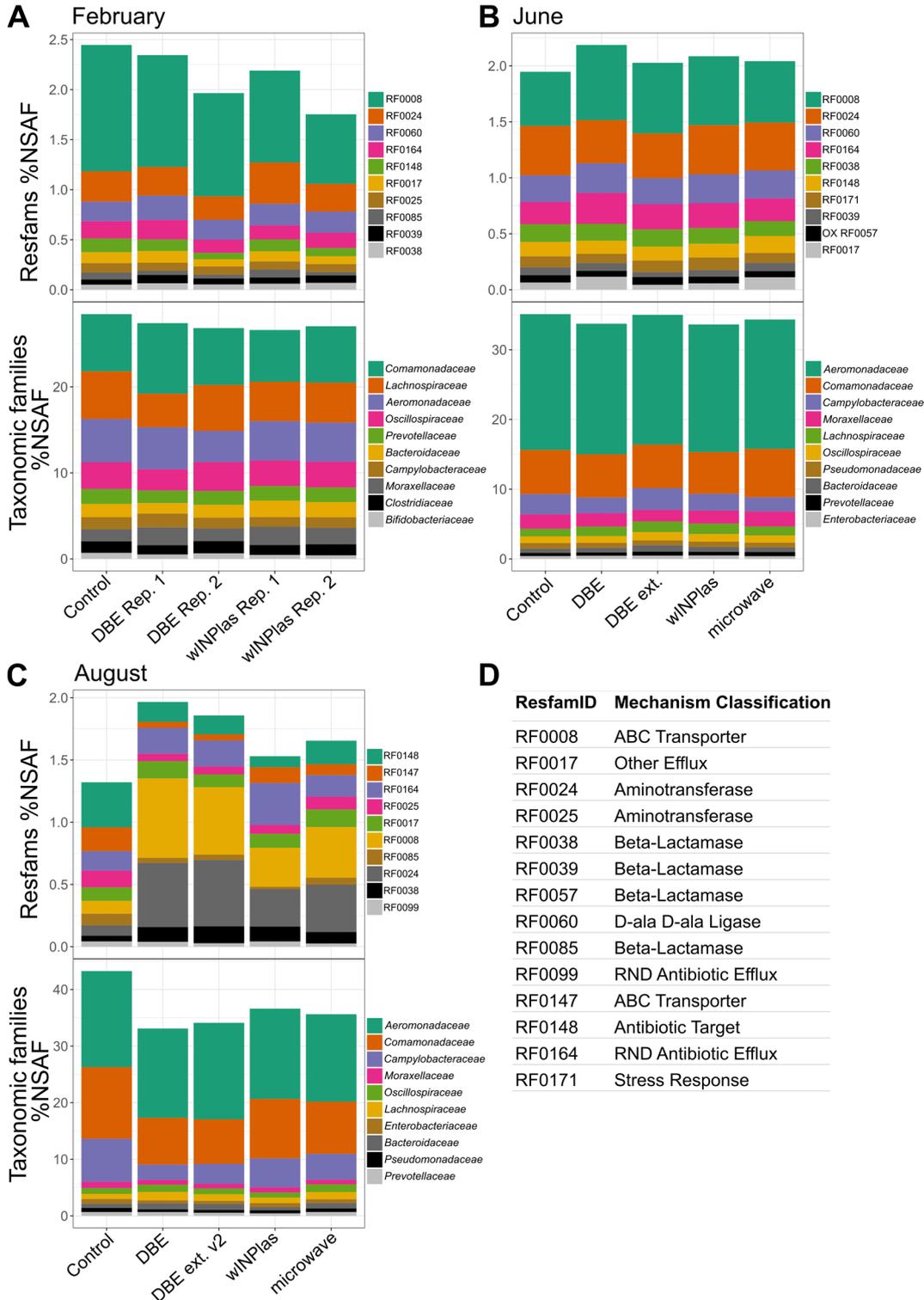


Abb. 11: Relative Abundanz der jeweils 10 häufigsten Resfams-Kategorien und taxonomischen Familien (ausgenommen „unklassifiziert“) in den Metaproteomen des Abwassers des Universitätsklinikums Greifswald. NSAF%: Normalized spectral abundance factor, bezogen auf % der gesamten Proteine.

Die großteilig geringen Veränderungen im Metaproteom sind dabei wahrscheinlich auf zwei zusammenwirkende Ursachen zurückzuführen: (1) Ein Teil der Gemeinschaft stirbt, aber Proteine sind noch nachweisbar. (2) Die Plasmabehandlung wirkt sich auf alle untersuchten Teile der Gemeinschaft gleichermaßen aus, es werden also nicht bestimmte Resistenz-

### Schlussbericht

---

Eigenschaften oder taxonomische Familien selektiv reduziert, bzw. durch die Behandlung relativ abundanter.

Dank der konstruktiven Zusammenarbeit im Projekt stand uns für ANTIREs 2.0 eine Datenbank zur Verfügung, die auf Metagenom-assemblierten Genomen (MAGs) der von uns auf Metaproteom-Ebene analysierten Standorte basiert, sodass wir physiologische Funktionen taxonomisch zuordnen können. Diese passgenaue Datenbank erlaubte uns die Identifizierung von bis zu über 37.000 Proteingruppen pro Standort (siehe oben). Die Datenanalyse der Metaproteom-Daten wurde auf die Software Proteome Discoverer umgestellt, da vergleichende Analysen ergaben, dass hier mehr Proteingruppen identifiziert werden als mit alternativen Programmen, bei gleichzeitig höherer Effizienz des Arbeitsablaufs. Dank der MAG-basierten Datenbank ist die Integration von Metagenom- und Metaproteomdaten bereits von Beginn an in der Datenanalyse verankert. Die weitere Datenanalyse und -visualisierung, basierend auf der Programmiersprache R, wurde an die finalen Daten angepasst.

Insgesamt führte die Plasmabehandlung zu einer, zum Teil sehr effektiven, Verringerung der Zahl keimfähiger Mikroorganismen. Ebenso wurde generell die Antibiotika-Konzentration im Abwasser reduziert (siehe TV2). Beide Effekte waren abhängig von der Art der Plasmaquelle. Basierend auf den Metaproteomics-Analysen scheint die Plasmabehandlung nicht selektiv auf einzelne untersuchte Vertreter (insbesondere Pathogene) auf taxonomischer oder Resistenz-Ebene zu wirken (bzw. selektiv nicht zu wirken). Folgerichtig ist die Behandlung von Abwässern mit physikalischem Plasma eine vielversprechende Methode zur Reduktion der Belastungen mit Antibiotika und Antibiotika-Resistenzproteinen und des damit verbundenen Risikos. Zukünftig ist es entscheidend, die technischen Varianzen der Plasma-Behandlungen zu reduzieren. Weiterhin erfordern das mögliche Auftreten von Mutationen in überlebenden Mikroorganismen und ein möglicherweise über längere Zeiträume auftretender Selektionsdruck, sowie die Möglichkeit, dass sich durch die Plasmabehandlung toxische Derivate von Bestandteilen des Abwassers bilden, zukünftige Untersuchungen.

### Arbeitsschwerpunkt 3

Durch die JenaBios GmbH wurden Ablauf- und Klinikumsabwasser-Proben auf das Vorhandensein von 75 Antibiotika und antimikrobiellen Substanzen untersucht. 16 dieser Substanzen wurden im Klinikumsabwasser und/oder Ablauf der Kläranlage nachgewiesen und wurden für weitere Analysen verwendet (Tabelle 3).

Schlussbericht

Tabelle 3: In Klinikumsabwasser und/oder Ablauf nachgewiesene Antibiotika [ $\mu\text{g/l}$ ] und deren relative Reduktion [%] von Klinikabwasser zu Ablauf.

	Klinikum [ $\mu\text{g/l}$ ]	Ablauf [ $\mu\text{g/l}$ ]	Reduktion [%]
<b>Acetylsulfadiazin</b>	0.042	0.0024	94.3
<b>Acetylsulfamethoxazol</b>	13	0.036	99.7
<b>Ampicillin</b>	0.69	<0.012	>98.3
<b>Ciprofloxacin</b>	3.2	0.02	99.4
<b>Clarithromycin</b>	1.8	0.12	93.3
<b>Clindamycin</b>	0.4	0.06	85.0
<b>Cotinin*</b>	1.9	0.025	98.7
<b>Erythromycin</b>	2.8	0.48	82.9
<b>Lincomycin</b>	0.055	0.0021	96.2
<b>Metronidazol</b>	3.4	0.014	99.6
<b>Nicotin*</b>	0.39	<0.01	>97.4
<b>Ofloxacin</b>	3.1	0.052	98.3
<b>Ronidazol<sup>§</sup></b>	0.0049	<0.002	>59.2
<b>Sulfadiazin</b>	0.022	0.0059	73.2
<b>Sulfamethoxazol</b>	1	0.15	85.0
<b>Trimethoprim</b>	1	0.046	95.4

\*Tabak-Alkaloid

<sup>§</sup>Veterinärmedizin

## 2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die Hauptposition der Zuwendung stellten die **Personalausgaben** dar. Diese sind essentiell für die erfolgreiche Projektbearbeitung. Abwasser- und Klärschlammproben sind ohnehin schon hoch komplex, und durch die Plasmabehandlung wurden zu Beginn des Projektes unbekannte Effekte auf diese Komplexität ausgeübt. Zudem waren die Plasmabehandlungen auch logistisch anspruchsvoll. Daher war es für den Projekterfolg entscheidend, erfahrene Wissenschaftlerinnen (Dr. Daniela Zühlke, Dr. Tjorven Hinzke) mit diesen Aufgaben zu betrauen, die über langjährige Erfahrung im (Meta)Omics-Bereich und, im Fall von Dr. Zühlke, insbesondere in Kläranlagen-Proben verfügen. Mit der adäquaten bioinformatischen Auswertung, der Integration der verschiedenen Daten und notwendigen Adaptationen der zugehörigen Infrastruktur wurde ein Informatiker betraut.

Weitere wichtige Positionen:

### **Plasmabehandlungen**

Die Behandlungen mit physikalischem Plasma war das Zentrum dieses Projektes und wurde durch den assoziierten Partner Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. (INP) durchgeführt.

### **Nutzungsgebühr Massenspektrometer**

Die massenspektrometrische Analyse der Reinkultur-, Abwasser-, und Klärschlammproben war zentraler Bestandteil des Teilvorhabens, um die durch die Plasmabehandlung ausgelösten

## Schlussbericht

---

Veränderungen von Reinkulturen und mikrobiellen Gemeinschaften im Abwasser nachzuvollziehen.

### **Probenaufbereitung für die Massenspektrometrie**

Für die Vorbereitung der Proben für die Massenspektrometrie waren verschiedene Produkte notwendig (z.B. Trypsin, StageTips, C18 Spin Columns, Probengefäße).

### **Antibiotika**

Verschiedene medizinisch relevante Antibiotika wurden für die Bestimmung der Resistenzprofile von Abwasserisolaten genutzt.

## 3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Alle wesentlichen im Arbeitsprogramm dargestellten Ziele wurden erreicht (Etablierung von Abwasser-Behandlungen mit physikalischem Plasma, Charakterisierung der Effekte dieser Behandlung auf Reinkulturen, mikrobielle Gemeinschaften und Antibiotika, Antibiotika-Resistenzspektren von Abwasserisolaten). Entsprechende Publikationen sind veröffentlicht (Schneider et al 2020) bzw. derzeit in Vorbereitung. Dementsprechend waren die geleisteten Arbeiten angemessen und notwendig.

## 4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

ANTIRES 2.0 ermöglicht, den Nutzen einer Behandlung von Abwasser mit physikalischem Plasma in Bezug auf die Reduktion einer Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen einzuschätzen. Die in TV1 erbrachten Ergebnisse zeigen, dass die Plasmabehandlung effektiv in der Verringerung der Lebendzellzahl und der Konzentration von Antibiotika ist, und sich gleichzeitig nicht selektiv auf die aktive mikrobielle Gemeinschaft auswirkt. Damit ebnet ANTIRES 2.0 auch den Weg für weitere Arbeiten zur Verringerung der technischen Variation der Plasmabehandlung, Untersuchungen zur etwaigen Entstehung toxischerer Derivate von Abwasser-Bestandteilen bis hin zur Einsatzfähigkeit in der Kläranlage.

Der in ANTIRES 2.0 etablierte Workflow mit MAG-basierter Datenbank, gelfreier (Meta-)Proteomvorbereitung, Suche der Rohdaten mit dem Proteome Discoverer und anschließender R-basierter Datenauswertung und -visualisierung steht nun auch anderen (Meta-)Proteomics-Projekten zur Verfügung.

Folgende Abschlussarbeiten wurden und werden im Rahmen von und aufbauend auf ANTIRES 2.0 durchgeführt:

### **Bachelorarbeiten:**

Winter, H. „Einfluss von physikalischem Plasma auf das Proteom- und Antibiotikaresistenzprofil eines Abwasserisolates“ (2019)

Raasch, J. „Metaproteomics-Analyse zum Einfluss physikalischen Plasmas auf die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft in klinischen Abwässern“ (2021)

Landskron, A. „Effects of physical plasma on the thiol proteome and protein aggregation in an *Escherichia coli* wastewater isolate (2022)

## Schlussbericht

---

Rode, W. „Phänotypische Charakterisierung und Proteomanalysen von zwei Antibiotika-resistenten *Citrobacter*-Isolaten aus dem Abwasser des Universitätsklinikums Greifswald“ (in progress)

### **Masterarbeiten:**

Rielicke, J. „Effekte physikalischen Plasmas auf das Antibiotikaresistenz- und Proteomprofil eines *Escherichia coli* Abwasserisolates (2021)

Ganbarzade, A. „Antibiotic-resistant sewage treatment plant isolates: Impact of sublethal concentrations of antibiotics and capability for horizontal gene transfer“ (in progress)

Dierker, J. „Targeted multi-omics analysis of antibiotics resistances in wastewater“ (in progress)

Junker, J. „Phänotypische und proteomische Untersuchungen zum Quorum sensing-System eines Antibiotika-resistenten *Escherichia coli*-Abwasserisolates“ (Arbeitstitel; in progress)

Pommerien, R. „Abbau von aromatischen Verbindungen und Mikroplastik als Xenobiotika in Kläranlagen: Eine *in silico*-Studie“ (Arbeitstitel, in progress)

## 5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Der wissenschaftliche Fortschritt auf dem Gebiet der Plasmabehandlung von Abwasserproben und der Auswirkungen dieser Behandlung auf Abwasser-assoziierte Reinkulturen und mikrobielle Gemeinschaften wurde anhand der aktuellen Literatur verfolgt. Uns sind im Projektzeitraum keine Kenntnisse über Ergebnisse Dritter bekannt geworden, welche für die Durchführung des Vorhabens relevant waren und Anpassungen des Arbeitsplans erforderlich gemacht hätten.

## 6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 6.

### **Erfolgte und geplante Veröffentlichungen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften**

Schneider D, Zühlke D, Petscheleit T, Poehlein A, Riedel K, Daniel R. 2020. Complete genome sequence of *Escherichia coli* GW-AmxH19, isolated from hospital wastewater in Greifswald, Germany. Microbiol Resour Announc 9:e00279-20. doi: 10.1128/MRA.00279-20.

Hinzke T., Schneider D, Hahn V, Kolb J, Sievers S, Daniel R, Riedel K, Zühlke D. Physical cold plasma combats spread of antibiotic resistances via sewage treatment plants. In Vorbereitung für STOTEN.

Hinzke T., Ganbarzade A, Schneider D, Hahn V, Kolb J, Sievers S, Daniel R, Riedel K, Zühlke D. A sewage *Citrobacter* isolate owns its carbapenem resistance to a constitutively expressed carbapenemase. In Vorbereitung für Frontiers in Microbiology.

Hahn, V., Zühlke, D., Winter, H, Schmidt, M., von Woedtke, T., Riedel, K., Kolb, J. Physical plasma for the inactivation of antibiotic-resistant *Escherichia coli* GW-AmxH19 in wastewater remediation. In Vorbereitung.

### Schlussbericht

---

Die Ergebnisse des Teilvorhabens wurden und werden auf internationalen Fachkonferenzen präsentiert, sofern dies im Rahmen der Corona-Pandemie und damit verbundener Absagen von Konferenzen und Einschränkungen von Reistätigkeiten möglich war.

#### Vorträge

One Health Conference Greifswald 2022: „Sewage treatment plants = Antibiotic resistance hotspots?“

DGHM-Jahrestagung, Berlin, 2022 (eingeladen)

Analytik Jena Anwendertreffen, Jena, 2022 (eingeladen)

#### Poster (+Kurzvortrag)

Hahn, V., Balazinski, M., Schulz, T., Schmidt, M., Zühlke, D., von Woedtke, T., Kolb, J., Weltmann, K.-D., Riedel, K. (2021) Inactivation of antibiotic-resistant microorganisms by physical plasma, Microbiology Society Annual Conference Online 26.-30.04.2021. doi.org/10.1099/acmi.ac2021.p00031

#### Referenzen

Antimicrobial Resistance Collaborators (2022) Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* 399:629-655.

Fuchs S, Zühlke D, Pané-Farré J, Kusch H, Wolf C, Reiß S, Binh LTN, Albrecht D, Riedel K, Hecker M, Engelmann S (2013) Aureolib – a proteome signature library: towards an understanding of *Staphylococcus aureus* pathophysiology. *PLoS ONE* 8, e70669.

Gibson MK, Forsberg KJ, Dantas G (2015) Improved annotation of antibiotic resistance determinants reveals microbial resistomes cluster by ecology. *ISME J* 9:207-216.

Hinzke T, Zühlke D, Schneider S, Hahn V, Stressmann F, Premke K, Kolb J, Daniel R, Riedel K (2022) Sewage treatment plants as hotspots of critical antibiotic resistances – and how to tackle this health threat. Talk at One Health Conference Greifswald.

Maaß S, Wachlin G, Bernhardt J, Eymann C, Fromion V, Riedel K, Becher D, Hecker M (2014). Highly precise quantification of protein molecules per cell during stress and starvation responses in *Bacillus subtilis*. *Mol Cell Proteomics* mcp.M113.035741.

Schneider D, Zühlke D, Petscheleit T, Poehlein A, Riedel K, Daniel R. 2020. Complete genome sequence of *Escherichia coli* GW-AmxH19, isolated from hospital wastewater in Greifswald, Germany. *Microbiol Resour Announc* 9:e00279-20.

Schneider T, Riedel K (2010) Environmental proteomics: Analysis of structure and function of microbial communities. *Proteomics* 10, 785-798.

Sievers S, Dittmann S, Jordt T, Otto A, Hochgräfe F, Riedel K. Comprehensive redox profiling of the thiol proteome of *Clostridium difficile*. *Mol Cell Proteomics*, 2018, 10.1074/mcp.TIR118.000671

Winter T, Winter J, Polak M, Kusch K., Mäder U, Sietmann R, Ehlbeck J, Hijum S van, Weltmann K-D, Hecker M, Kusch H (2011) Characterization of the global impact of low temperature gas plasma on vegetative microorganisms. *Proteomics* 11, 3518–3530.

Winter T, Bernhardt J, Winter J, Mäder U, Schlüter R, Weltmann K-D, Hecker M, Kusch H. (2013) Common versus noble *Bacillus subtilis* differentially responds to air and argon gas plasma. *Proteomics* 13, 2608–2621.