

Bundesgesundheitsbl 2023 · 66:660–668
<https://doi.org/10.1007/s00103-023-03710-7>
 Eingegangen: 23. Dezember 2022
 Angenommen: 25. April 2023
 Online publiziert: 26. Mai 2023
 © Der/die Autor(en) 2023



Kornelia Smalla¹ · Jan Kabisch² · Gregor Fiedler² · Jens Andre Hammer³ · Bernd-Alois Tenhagen³

¹ Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Julius Kühn-Institut (JKI), Braunschweig, Deutschland

² Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Max Rubner-Institut (MRI), Kiel, Deutschland

³ Abteilung Biologische Sicherheit, Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin, Deutschland

Gesundheitsrisiken durch die Bewässerung von Nutzpflanzen mit aufbereitetem Abwasser, das Antibiotikarückstände, Resistenzgene und resistente Mikroorganismen enthält

Einleitung

Die Nutzung aufbereiteten Abwassers zu Bewässerungszwecken im Pflanzenbau ist bereits in vielen Regionen der Welt notwendig. Sie wird im Hinblick auf zunehmende Trockenperioden auch für die Landwirtschaft in Europa diskutiert. Da die Verordnung (EU) 2020/741 des Europäischen Parlaments und des Rates eine solche Bewässerung mit Einschränkungen vorsieht, soll dieser Übersichtsartikel den derzeitigen wissenschaftlichen Kenntnisstand und die sich daraus ergebende Risikobewertung für Deutschland darstellen [1]. Es wird diskutiert, ob für Rückstände von Antibiotika-, Metall- und Biozidverbindungen bzw. das Vorhandensein von resistenten Bakterien besondere Vorsichtsmaßnahmen erforderlich sind, die über die im Hinblick auf pathogene Mikroorganismen ohnehin erforderlichen Maßnahmen hinausgehen.

Bewässerungswasser gilt als wichtige Quelle für den Eintrag von Antibiotika-, Metall- und Biozidverunreinigungen sowie von antibiotikaresistenten Bakterien in Nutzpflanzenkulturen [2]. Es wird ein direkter Zusammenhang zwischen der Wasserqualität und der Kontamination von roh verzehrtem Obst und

Gemüse vermutet. Das Vorkommen von Mikroschadstoffen, wie Antibiotikarückständen, und deren Aufnahme in die Pflanze kann sowohl die Zusammensetzung des natürlichen Pflanzenmikrobioms beeinflussen als auch die Etablierung der mit dem aufbereiteten Abwasser eingebrachten Keime. Das Pflanzenmikrobiom wiederum kann einen direkten Einfluss auf das menschliche Darmmikrobiom nehmen [3].

Zum Schutz vor lebensmittelbedingten Erkrankungen durch pathogene Bakterien, Viren und Parasiten durch Rohverzehr von frischem Obst und Gemüse sind entsprechende Anforderungen an die Wasserqualität zu berücksichtigen [4]. Mit diesem Übersichtsartikel wird gezeigt, dass die Qualität des zur Bewässerung genutzten aufbereiteten Abwassers auch im Hinblick auf die Antibiotikaresistenz-Problematik von großer Bedeutung ist.

Einerseits enthält aufbereitetes Abwasser Nährstoffe für das Pflanzenwachstum, andererseits sollten Mikroschadstoffe, die antibiotikaresistente Bakterien selektieren und die Übertragung von Genen zwischen Bakterien (horizontaler Gentransfer) stimulieren, vor der Nutzung von aufbereitetem Abwasser

aus dem Bewässerungswasser entfernt werden [5].

Aufbereitete Abwässer enthalten deutlich geringere Rückstandskonzentrationen wie Antibiotika-, Metall- und Biozidverbindungen als z. B. Gülle. Allerdings übersteigt bei einer regelmäßigen Bewässerung die Gesamtmenge der aufbereiteten Abwässer die der ausgebrachten Gülle deutlich, so dass es über die Zeit zu einer stärkeren Exposition des Bodens und der Pflanzen gegenüber diesen Substanzen kommen kann.

Wesentlich für die Fragestellung dieses Artikels sind einerseits der Gehalt an antimikrobiell wirksamen Substanzen im aufbereiteten Abwasser sowie der Gehalt an resistenten Mikroorganismen und ggf. freier DNA, die Resistenzgene tragen kann. Zweitens ist zu prüfen, in welchem Umfang sowohl die resistenten Mikroorganismen als auch die Rückstände von Arzneimitteln von den Pflanzen aufgenommen werden bzw. auf den Pflanzen verbleiben. Drittens ist zu fragen, in welchem Umfang übliche Maßnahmen, z. B. das Waschen von pflanzlichen Lebensmitteln vor dem Verzehr, zu einem relevanten Rückgang solcher Mikroorganismen und ggf. der Rückstände führen, der über den Effekt der Entfernung von Bodenpartikeln hinausgeht.

Tab. 1 Gehalt von 17 antimikrobiellen Substanzen (ng/l) am Ablauf von 13 europäischen Kläranlagen in 7 EU-Mitgliedstaaten 2015/2016 [13]

Substanz	Minimum	Maximum	Anzahl Kläranlagen ohne Nachweis
Cefalexin	37	308	3
Trimethoprim	15,2	190,6	0
Ciprofloxacin	38,4	584,9	0
Enrofloxacin	69,4	69,4	12
Ofloxacin	20	305,1	1
Orbifloxacin	6,5	6,7	11
Clindamycin	6,5	110,7	1
Azithromycin	45,2	597,5	0
Clarithromycin	4,5	313,2	1
Metronidazol	7,6	93,2	4
Ampicillin	68,1	99,4	11
Nalidixinsäure	25,3	50,3	11
Oxolidinsäure	5,3	5,3	12
Pipemidsäure	3,2	30,1	1
Sulfamethoxazol	7,1	123,4	3
Sulfapyridin	4,7	184	0
Tetracyclin	15,4	231,2	2

Dieser Übersichtsartikel strebt keine umfassende Risikobewertung der möglichen Exposition von Verbraucherinnen und Verbrauchern gegenüber resistenten Mikroorganismen, Resistenzgenen und Rückständen von Arzneimitteln durch die Bewässerung von Nutzpflanzen mit aufbereitetem Abwasser an, sondern fokussiert auf mögliche Aspekte, die über die Herausforderungen hinausgehen, die sich im Hinblick auf pathogene Mikroorganismen stellen und an anderer Stelle bewertet worden sind [4]. Ausgehend von den im geklärten Abwasser vorhandenen Kontaminanten und resistenten Mikroorganismen betrachten wir zunächst deren Effekt auf die bewässerten Pflanzen. Anschließend analysieren wir den Effekt der Verarbeitung der Lebensmittel auf die Konzentrationen von Antibiotikarückständen und Bakterien im verzehrfertigen Lebensmittel.

Resistente Bakterien, Plasmide und Antibiotikarückstände im Zu- und Ablauf von Klärwerken

Vorkommen resistenter Bakterien

Das Vorhandensein resistenter Mikroorganismen in aufbereiteten Abwässern ist weltweit gut belegt [6–10]. Resistente Mi-

croorganismen unterschiedlichster Art kommen in fast allen Abwässern vor [11]. Dabei unterscheiden sich Muster der feststellbaren Resistenzen zwischen Abwässern verschiedener Herkunft (kommunale Abwässer mit und ohne Krankenhaus im Einzugsgebiet, Schlachthofabwässer etc.; [8–10]). Die Zahl und Abundanz (Häufigkeit) der detektierten Resistenzgene ist auch von dem Behandlungsverfahren der Kläranlage abhängig [12].

Häufig ist unklar, in welcher Abundanz die resistenten Bakterien vorhanden sind. Bei kultivierungsunabhängigen DNA-basierten Nachweisverfahren ist meist nicht bekannt, ob es sich bei den festgestellten Genen um Nachweise aus intakten Bakterien oder aus freier DNA handelt, die nicht aus intakten Bakterien stammt, weil die Gene in direkt extrahierter DNA, d.h. ohne die vorherige Kultivierung und Isolierung der Bakterien, nachgewiesen werden. Insgesamt kann der Gehalt an Mikroorganismen stark variieren, je nach Jahreszeit und Temperatur sowie nach Aufbereitung der Abwässer (mechanisch, biologisch etc.) und Einspeisung aus verschiedenen Ressourcen [13].

Kultivierungsunabhängige DNA-basierte Untersuchungen zeigten, dass es im Laufe des Klärprozesses bei vielen Re-

sistenzgenen zu einer Verminderung der Abundanz kommt [14]. Dabei bestehen sowohl hinsichtlich der Ausgangsabundanz [9] als auch hinsichtlich des Grades der Reduktion erhebliche Unterschiede [7, 15], die durch Verschiebungen in der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft im Rahmen des Klärprozesses begründet sind. Eine Übersicht über die nachgewiesenen Resistenzgene gaben Pazda et al. (2019; [11]).

Mit kultivierungsunabhängigen DNA- oder RNA-basierten Methoden können die Dynamik der Zusammensetzung des Mikrobioms sowie das Vorkommen von Antibiotikaresistenzgenen (ARG) oder mobilen genetischen Elementen (MGE) analysiert werden. Diese Methoden haben aber im Hinblick auf Empfindlichkeit und Informationen zum Resistenzphänotyp oder dem genetischen Kontext noch deutliche Schwächen gegenüber den traditionellen, oft mit Anreicherungen verbundenen Kultivierungstechniken. Letztere erlauben gleichzeitig die Charakterisierung des Resistenzphänotyps der isolierten Bakterien durch Gesamtgenomsequenzierung, die Analyse der plasmidlokalisierten Resistenzgene und ihrer Verknüpfung mit Insertionssequenz(IS)-Elementen [16] sowie den Vergleich von Isolaten aus aufbereitetem Abwasser und von rohverzehrt Gemüse oder Obst. Die exogene Isolierung von übertragbaren plasmidlokalisierten Antibiotikaresistenzen in einem *E.-coli*- oder *Pseudomonas*-Rezipienten [17, 18] kann diese Analyse unterstützen.

Rückstände antimikrobiell wirksamer Arzneimittel

Neben resistenten Mikroorganismen können geklärte Abwässer auch Rückstände antimikrobiell wirksamer Substanzen enthalten ([7, 13, 19–26]; exemplarisch **Tab. 1**). Auch bei den Rückständen kommt es im Rahmen der Klärung der Abwässer in der Regel zu einem Rückgang der Konzentrationen [23]. Es kann aber bei einigen Substanzen auch dazu kommen, dass durch chemische Prozesse die ursprüngliche Substanz aus Metaboliten wiederhergestellt wird, und deshalb die Konzentrationen im Auslauf

von Kläranlagen höher sind als im Zulauf [22]. Die EU hat 5 antimikrobielle Substanzen auf eine Beobachtungsliste hinsichtlich der Belastung von Gewässern gesetzt: Ciprofloxacin, Amoxicillin, Erythromycin, Clarithromycin und Azithromycin [27]. Grundsätzlich ist davon auszugehen, dass es zukünftig durch verbesserte Technologien in der Abwasseraufbereitung zu einem Rückgang der im aufbereiteten Abwasser verbleibenden Rückstände kommen wird [5, 24, 28].

In einer umfassenden Monitoringstudie zu aufbereitetem Abwasser von Kläranlagen in 7 EU-Mitgliedstaaten konnten 17 von 53 getesteten Antibiotika in mindestens einer Kläranlage nachgewiesen werden (■ Tab. 1). Im aufbereiteten Abwasser deutscher Kläranlagen wurden Trimethoprim, Ciprofloxacin, Ofloxacin, Azithromycin, Clarithromycin, Sulfamethoxazol, Sulfapyridin und Tetrazyklin nachgewiesen. Die Studie zeigte auch saisonale Unterschiede in der Antibiotikabelastung des aufbereiteten Abwassers. Von den Autoren dieser Studie wurden Ciprofloxacin, Azithromycin und Cefalexin als Marker für Antibiotikaverunreinigungen vorgeschlagen [13].

Diese Rückstände können einerseits zur weiteren Resistenzselektion im Mikrobiom der Abwässer beitragen. Andererseits können sie ggf. von den bewässerten Pflanzen aufgenommen werden [5] und dann als Rückstände im Lebens- oder Futtermittel eventuell toxiologisch relevante Wirkungen entfalten oder aber wiederum zur Resistenzselektion bei Pflanzen-, Tier- und Menschenassoziierten Mikroorganismen beitragen [29, 30].

Der Umfang, in dem die aufbereiteten Abwässer noch Wirkstoffe enthalten, hängt von der Ausgangssituation, also dem Eintrag der Wirkstoffe in die Kläranlagen, sowie dem Abbau oder der Sedimentation der Substanzen ab. Fraglich bleibt, inwieweit geringe Konzentrationen entsprechender Rückstände nach Ausbringung in die Umwelt zu einer Resistenzentwicklung führen. Subinhibitorische Rückstände unterbinden zwar nicht das Wachstum sensibler Organismen, könnten aber die Aufnah-

Bundesgesundheitsbl 2023 · 66:660–668 <https://doi.org/10.1007/s00103-023-03710-7>
© Der/die Autor(en) 2023

K. Smalla · J. Kabisch · G. Fiedler · J. A. Hammerl · B.-A. Tenhagen

Gesundheitsrisiken durch die Bewässerung von Nutzpflanzen mit aufbereitetem Abwasser, das Antibiotikarückstände, Resistenzgene und resistente Mikroorganismen enthält

Zusammenfassung

Diese Übersichtsarbeit beschreibt Effekte und mögliche Gesundheitsrisiken durch resistente Mikroorganismen, Resistenzgene und Biozid- und Arzneimittelrückstände, die durch die Nutzung von aufbereitetem Abwasser zur Bewässerung von Nutzpflanzen entstehen können. Dabei fokussiert die Arbeit auf spezifische Aspekte dieser Kontaminanten und ihrer Interaktionen, strebt jedoch keine allgemeine Bewertung der mikrobiologischen Belastungen an.

In aufbereitetem Abwasser werden regelmäßig Rückstände von antibiotisch wirksamen Arzneimitteln, resistente Mikroorganismen und Resistenzgene nachgewiesen. Diese beeinflussen das Boden- und Pflanzenmikrobiom und können von den Pflanzen aufgenommen werden. Mit einer Interaktion von Antibiotikarückständen und Mikroorganismen ist vor allem vor der Ausbringung der aufbereiteten Abwässer zu rechnen. Sie kann allerdings auch das Pflanzenmikrobiom beeinflussen, inklusive der Gesamtheit seiner Resistenzgene (Resistom). Eine besondere

Problematik ergibt sich dadurch, dass Pflanzen als Lebensmittel häufig roh, also ohne keimreduzierende Verarbeitungsschritte verzehrt werden. Gründliches Waschen pflanzlicher Lebensmittel beeinflusst das Pflanzenmikrobiom nur geringfügig. Zerkleinerungsschritte bei der Verarbeitung können hingegen zur Vermehrung vorhandener Mikroorganismen beitragen, so dass danach eine gründliche Kühlung erforderlich ist. Bei der Aufbereitung von Abwässern, die zur Bewässerung von Nutzpflanzen eingesetzt werden sollen, werden neue Verfahren zur Elimination von Mikroschadstoffen und Mikroorganismen benötigt, um das Risiko einer verstärkten Exposition von Verbraucherinnen und Verbrauchern gegenüber übertragbaren Resistenzgenen und resistenten Bakterien weiter zu reduzieren.

Schlüsselwörter

Aufbereitete Abwässer · Antibiotikaresistenz · Arzneimittelrückstände · Pflanzenverfügbarkeit · Lebensmittelsicherheit

Health risks from crop irrigation with treated wastewater containing antibiotic residues, resistance genes, and resistant microorganisms

Abstract

This review describes the effects and potential health risks of resistant microorganisms, resistance genes, and residues of drugs and biocides that occur when re-using wastewater for crop irrigation. It focusses on specific aspects of these contaminants and their interactions, but does not provide a general risk assessment of the microbial load when using reclaimed water.

Antimicrobial residues, antimicrobial resistant microorganisms, and resistance genes are frequently detected in treated wastewater. They have effects on the soil and plant-associated microbiota (total associated microorganisms) and can be taken up by plants. An interaction of residues with microorganisms is mainly expected before using the water for irrigation. However, it may also occur as a combined effect on the plant microbiome and all the abundant

resistance genes (resistome). Special concerns are raised as plants are frequently consumed raw, that is, without processing that might reduce the bacterial load. Washing fruits and vegetables only has minor effects on the plant microbiome. On the other hand, cutting and other processes may support growth of microorganisms. Therefore, after such process steps, cooling of the foods is required. Further progress has to be made in the treatment of wastewater that will be used for crop irrigation with respect to removing micropollutants and microorganisms to minimize the risk of an increased exposure of consumers to transferable resistance genes and resistant bacteria.

Keywords

Water reuse · Antimicrobial resistance · Drug residues · Bioavailability · Food safety

me von freier DNA mit Resistenzgenen begünstigen und damit einer weiteren Ausbildung von Resistenzen Vorschub leisten. Auch durch andere, nicht antimikrobielle Substanzen im Abwasser kann der Austausch mobiler genetischer Elemente befördert werden [31, 32]. Diese Veränderungen sind vor allem vor der Ausbringung zu erwarten, weil danach die Konzentrationen der Substanzen weiter sinken und die Verfügbarkeit der freien DNA in der Umgebung rasch abnimmt.

Während Beta-Laktam-Antibiotika in hohem Maße einem Abbau durch Hydrolyse unterliegen, besitzen andere Antibiotikaklassen wie Fluorchinolone, Tetracykline, Makrolide und Sulfonamide eine höhere Stabilität. Sie werden nur langsam abgebaut und oft in der organischen Substanz des Klärschlammes abgelagert (sequestriert; [33]). Sie können sich ggf. in der Umwelt anreichern.

Effekt zusätzlicher Behandlungsschritte im Klärprozess auf das Vorkommen von Mikroorganismen und Resistenzgenen

Weitere Aufbereitungsschritte des Abwassers, wie zum Beispiel die Ozonierung, können zu einer Reduktion der Zahl resistenter Bakterien und der Abundanz von Resistenzgenen beitragen. Sie führen aber aufgrund der unterschiedlichen Wirksamkeit gegenüber verschiedenen Mikroorganismen auch zu einer Verschiebung des Spektrums vorhandener Bakterien und ihrer Resistenzgene oder mobilen genetischen Elemente [7, 34]. Nur bei ausreichender Vorreinigung der Abwässer kann eine effiziente Reduktion von Mikroorganismen durch Ozonierung erreicht werden. Hierfür fehlen jedoch Daten, inwieweit die unterschiedlichen Prozessstufen einen wesentlichen Einfluss auf die mikrobielle Last der Abwässer ausüben. Daher empfehlen verschiedene Autoren eine Kombination von konventionellen Abwasserbehandlungsmethoden mit Verfahren, die auf oxidativen Methoden (UV-Strahlung, Ozon, H₂O₂) oder adsorptiven Methoden (Holzkohlefilter, Sandfilter und membranbasierten

Filtertechnologien) basieren [5, 7, 24, 28].

Kontamination von Pflanzen bei der Bewässerung mit aufbereiteten Abwässern

Das Pflanzenmikrobiom

Die Zusammensetzung des Pflanzenmikrobioms (Gesamtheit aller mit Pflanzen assoziierten Mikroorganismen) hängt von der Pflanzenart, vom Wachstumsstadium, vom Mikrohabitat (Blatt, Stängel, Wurzel, endophytisch oder epiphytisch), dem Substrat, dem landwirtschaftlichen Management (organische Dünger, Bewässerung) und der Witterung ab. Von besonderer Bedeutung ist das Mikrobiom von roh verzehrten Pflanzen, wie Blattsalaten, Lauch und Wurzelgemüsen, da ihr Verzehr eine direkte Beeinflussung des menschlichen Darmmikrobioms ermöglicht [35]. Grundsätzlich dominieren bei den Bakterien die Proteobakterien und bei den Pilzen Basidiomyceten im Pflanzenmikrobiom [36]. Gerade Proteobakterien sind als genetischer Ursprung für eine Vielzahl mobiler Resistenzgene identifiziert worden, die eine klinische Relevanz aufweisen [37]. Der Einfluss des Bodentyps auf das Mikrobiom der Pflanzen wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen [38]. Neben der Diversität werden auch das Vorkommen und die Persistenz von antibiotikaresistenten Bakterien durch die Beschaffenheit des Bodens beeinflusst [38, 39].

Epiphytische und auch die endophytischen Bakterien haben eine sehr heterogene Verteilung mit lokal sehr hohen Zelldichten (sogenannte Mikroaggregate, Biofilme), die die heterogene Verteilung und Verfügbarkeit von Nährstoffen für Mikroorganismen widerspiegelt. Die Phyllosphäre besiedelnde Bakterien haben häufig sehr effiziente Effluxpumpen, sie bilden Auxine, Antibiotika, Pigmente, Biosurfactants (Detergenzien), N-Acyl-Homoserinlactone oder extrapolymere Substanzen, um sich an das Leben in der Phyllosphäre anzupassen [40, 41]. Dabei dienen die mikrobiell gebildeten Antibiotika als hochaktive Signalmoleküle. Es ist deshalb nicht überraschend, dass ein großer Anteil der pflanzenasso-

ziierten Bakterien Mehrfachresistenzen gegen klinisch relevante Antibiotika besitzt. Die Kenntnisse zur Gesamtheit der natürlich vorhandenen Resistenzgene im Pflanzenmikrobiom (intrinsisches Resistom) wurden durch Metagenomstudien wesentlich verbessert [41–43].

Viele der typischen pflanzenbesiedelnden Gattungen (*Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* oder *Serratia*) spielen auch im Krankenhaus als Erreger nosokomialer Infektionen eine große Rolle. Der Erfolg von Isolaten dieser Gattungen im Habitat Krankenhaus erklärt sich durch effiziente Effluxpumpen und die Fähigkeit, Biofilme zu bilden. Dadurch sind sie bestens geeignet trotz des starken Selektionsdrucks im Krankenhaus (hoher Einsatz von antimikrobiellen Substanzen und Bioziden) aufgrund fehlender Konkurrenz zu kolonisieren.

Es ist wichtig festzuhalten, dass das natürliche Pflanzenmikrobiom nicht nur von großer Bedeutung für die Gesundheit und das Wachstum der Pflanzen ist, sondern auch für die Gesundheit des Menschen. Die Produktion von möglichst keimarmem Gemüse ist daher nicht sinnvoll. Vielmehr trägt eine hohe Diversität des Pflanzenmikrobioms dazu bei, dass eingebrachte Mikroorganismen, z. B. Keime aus dem Bewässerungswasser, sich nicht auf Pflanzen etablieren können. Pro Gramm Blattmaterial im Freiland gewachsenem Salat können typischerweise 10⁶–10⁷ koloniebildende Einheiten (KbE) nach einer Plattierung auf nichtselektiven Nährmedien nachgewiesen werden [44]. Diese Zahl wird nur in geringem Maße durch Waschen reduziert [45–47]. Man geht heute davon aus, dass das Samenmikrobiom und der Boden die Zusammensetzung des oberirdischen Pflanzenmikrobioms wesentlich beeinflussen [48]. Allerdings tragen auch eine Reihe von externen Faktoren wie Regen- und Bewässerungswasser, Staub- oder Boden-assoziierte Mikroorganismen zum Blatt-Mikrobiom bei.

Einfluss der Bewässerung auf Mikrobiom und Resistom

Trotz der Belastung von aufbereitetem Abwasser mit antibiotikaresistenten Bakterien hat ihr begrenzter Nachweis im Boden zu der Einschätzung geführt, dass Boden wie ein Puffer wirkt, d.h. biotische und abiotische Bodenfaktoren den Effekt limitieren [49].

Bei der vergleichenden Nutzung von Oberflächen- und Trinkwasser oder aufbereitetem Abwasser zur Bewässerung zeigte sich in einer Metagenomstudie keine Beeinflussung des Bodenmikrobioms und -resistoms [50]. Wurde der Boden aber bei 37 °C in flüssigem Nährmedium (Lysogeny Broth) angereichert, zeigten sich deutliche Unterschiede. So wurden aus Böden, die mit aufbereitetem Abwasser beregnet worden waren, vor allem *Moraxellaceae* und *Enterobacteriaceae* angereichert, während aus Leitungswasser-beregneten Böden vor allem *Bacillaceae* angereichert wurden. Auch unterschieden sich 50 % der analysierten Resistenzgene signifikant. In dem Boden, der mit aufbereitetem Abwasser beregnet worden war, waren nach Anreicherung mehr als 61 % Multidrug-Resistance-Effluxpumpen (Membrantransporter, die antimikrobielle Stoffe aus Bakterien ausschleusen können) nachweisbar, im Leitungswasser-beregneten lediglich 8 %. In der Risikobeurteilung sollte berücksichtigt werden, dass bei Persistenz einer geringen Anzahl von Bakterien im aufbereiteten Abwasser unter geeigneten Bedingungen wieder eine Vermehrung stattfinden kann.

Aus Bewässerungswasser stammende Keime mit Mehrfachresistenz-Plasmiden können Pflanzen kolonisieren und auch Plasmide übertragen [51, 52]. Die Kombination aus Keimen mit übertragbaren, plasmidlokalisierten Antibiotikaresistenzen und Schadstoffen wie Antibiotika und Bioziden kann Effekte haben, die über die Einzeleffekte der mikrobiellen Kontamination und der Arzneimittelrückstände hinausgehen, und ist deshalb gesondert zu berücksichtigen. Auch wenn die Keimbelastung in aufbereitetem Abwasser im Vergleich zum ungereinigten geringer ist und z.B. *E. coli*-Keimzahlen unter den zugelassenen

Grenzwerten liegen, können sich solche Keime auf Pflanzen etablieren, insbesondere wenn sie Plasmide enthalten. Für einige typischerweise in Enterobakterien vorkommende Plasmide, wie die der IncF-Gruppe, konnte gezeigt werden, dass sie zur Ausbildung von Biofilmen beitragen können. Die im aufbereiteten Abwasser enthaltenen und von Pflanzen zum Teil aufgenommenen Arzneimittelrückstände und Biozide bieten den aus dem Bewässerungswasser stammenden Keimen einen Selektionsvorteil [53, 54]. Aufgrund der hohen Zelldichten in Mikrokolonien kann es darüber hinaus zur Übertragung von Plasmiden aus Bewässerungswasser-assoziierten Bakterien auf dominante Blatt-assoziierte Bakterien, wie z. B. die Enterobacterales und Pseudomonadales, kommen.

Antibiotika aus zur Bewässerung genutztem aufbereitetem Abwasser können in Abhängigkeit von ihren physikochemischen Eigenschaften von Pflanzen aufgenommen werden [25, 55]. Die Aufnahme und Akkumulation von Pharmazeutika und Pflegeprodukten aus dem Bewässerungswasser in Pflanzen sind auch von der Pflanzenart abhängig [30, 53, 54, 56–60]. Insbesondere in Gurken wurden erhöhte Konzentrationen gefunden [59, 61]. In den Pflanzen können sie das intrinsische Resistom modulieren, horizontale Gentransferprozesse stimulieren und die Etablierung von Abwasserbakterien auf Pflanzen fördern.

Die Charakterisierung von Tetracyklin- und Colistin-resistenten und ESBL-produzierenden Enterobakterien aus Anreicherungen von Salat, der hydroponisch in verschiedenen aufbereitetem Abwasser gewachsen war, zeigte, dass sie zu den Gattungen *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* und *Escherichia* gehören [62]. Die intrinsisch auf den Chromosomen vorkommenden AmpC-Beta-Laktamasen wurden in Isolaten des *Enterobacter*-Komplexes und von *Citrobacter* spp. nachgewiesen. Als mobile, nicht chromosomal gebundene genetische Elemente gehörten die am häufigsten in Isolaten nachgewiesenen Plasmide zu den Inkompatibilitätsgruppen ColE1 und IncF. Aus Anreicherungen von aufbereitetem Abwasser und Salatblättern konnten konjugative Tetracyklin-Re-

sistenzplasmide in *E. coli*-Rezipienten isoliert werden, die zu den Plasmiden der IncF-, IncI-, IncN- und der IncP-1-Gruppen gehörten. In direkt extrahierter DNA konnten IncF- und IncI-Plasmide nicht nachgewiesen werden, wohl aber in der nach Anreicherung extrahierten DNA [62].

Entwicklung einer resistenten Mikroflora nach der Ernte durch Waschen oder andere Prozessschritte

Vor allem pflanzliche Produkte, die zum Rohverzehr geeignet sind, stellen eine sensible Produktgruppe für eine potenzielle Übertragung von antibiotikaresistenten Bakterien auf den Menschen dar [63]. Bei diesen Produkten (Obst, Gemüse) fehlt oftmals ein Dekontaminationsschritt wie das Erhitzen. Eine Verarbeitung wie Waschen oder Schälen ermöglicht nur eine moderate Reduktion von Mikroorganismen. Daher werden diese Produkte im Folgenden fokussiert betrachtet. Insbesondere für vulnerable Gruppen ist es dabei wichtig, die Hinweise über den sicheren Umgang mit solchen Lebensmitteln zu beachten [64].

Bei der Betrachtung von Antibiotikaresistenzen in pflanzlichen Lebensmitteln nehmen vor allem Enterobakterien eine hervorgehobene Stellung ein. Enterobakterien wie *E. coli*, *Klebsiella*, aber auch *Enterobacter* und *Citrobacter* gehören zu den häufigsten Infektionserregern und sind aufgrund von Antibiotikaresistenzen oftmals schwer zu therapieren [65]. Gleichzeitig sind Pflanzen natürlicherweise mit Enterobakterien besiedelt [66]. Der Anteil der Enterobakterien am gesamten Mikrobiom beträgt meist nur 1–5 %, ist aber von einer hohen Varianz gekennzeichnet [66]. Cho et al. konnten antibiotikaresistente *Enterobacter*-, *Citrobacter*-, *Escherichia*- und *Klebsiella*-Arten aus pflanzlichen Frischeprodukten des deutschen Einzelhandels isolieren [67]. Mittels Genomsequenzierung wurden Resistenzgene gegen Tetracycline, Sulfonamide, Aminoglykoside, Chloramphenicol, Chinolone und Beta-Laktamantibiotika nachgewiesen. Des Weiteren zeigten die Isolate verschiedene Plasmidgruppen wie IncF, IncH, IncN,

IncQ, IncR, p0111 und ColRNAI, was auf eine Mobilisierung der Resistenzgene hindeutet [67]. Blau et al. untersuchten das Vorkommen von Plasmiden (IncF, IncI, IncP-1 und Klasse 1 Integrons) auf kommerziell erworbenem Koriander, Rucola und Mischsalat [17]. Insbesondere die IncF- und IncI-Plasmide in der Gesamt-DNA konnten nur nach vorheriger Anreicherung detektiert werden. Gekenides et al. (2018) zeigten, dass Bewässerungswasser eine wichtige Quelle von antibiotikaresistenten Bakterien auf Frischeprodukten ist [68].

Pflanzen- und produktgruppenspezifische Unterschiede führen zu verschiedenen mikrobiologischen Belastungen in Obst und Gemüse. Üblich sind Keimgehalte von ca. 4–8 log KBE/g in der Gesamtkeimzahl und 3–7 log KBE/g Enterobakterien [44]. Sprossen sind beispielsweise höher belastet als Salatgurken [66]. Generell sind bodennah wachsende Pflanzenteile höher belastet. Die Keimzahlen von Pflanzen aus dem Gewächshaus sind 2–3 log KBE/g niedriger als Keimzahlen von Pflanzen aus dem Freiland.

Bei frischen pflanzlichen Lebensmitteln, wie Obst und Gemüse, bleibt der Stoffwechsel auch nach der Ernte aktiv. Neben der Respiration (Aufnahme von Sauerstoff, Abgabe von Kohlenstoffdioxid) führen vor allem intrazelluläre Abbaureaktionen zu einer Veränderung der physikalisch-chemischen Beschaffenheit dieser Lebensmittel. Bakterien, Hefen und Schimmelpilze unterstützen diese Prozesse und führen zum mikrobiologischen Verderb.

Meist ist Gemüse und Obst durch eine intakte Oberfläche geschützt. Diese verhindert den Austritt von nährstoffreichem Zellsaft und schützt vor einer raschen Vermehrung von Mikroorganismen (insbesondere schnell wachsende Bakterien wie *E. coli*). Allerdings gibt es Produktgruppen, wie vorgeschnittenes Obst oder geschnittene und gewaschene Salate („Fresh-Cut“), deren zerstörte Oberflächenstruktur eine rasche Vermehrung von Mikroorganismen zulässt. Um das Wachstum zu verlangsamen, müssen geschnittene Produkte gekühlt werden. Dies ist grundsätzlich bei intakter Oberfläche nicht notwendig, da

sich Mikroorganismen während der üblichen Lagerzeit nicht zu einem beeinträchtigenden Maße vermehren.

Die Verarbeitungsschritte, wie Waschen und Schneiden, beeinflussen die Mikrobiota der Produkte deutlich. Das industrielle Waschen von pflanzlichen Produkten führt zu einer gewissen Reduktion der mikrobiellen Belastung, aber auch zu einer Verteilung der Mikroorganismen zwischen den gewaschenen Produkten [47, 66]. Die Übertragung von pathogenen und antibiotikaresistenten Bakterien kann dadurch auch zwischen den Produkten stattfinden. Im Fresh-Cut-Bereich wurde durch den Waschschrift eine moderate Reduktion von ca. 0,27 log KBE/g in der Gesamtkeimzahl und ca. 0,36 log KBE/g bei der Enterobakterienanzahl festgestellt [66]. Mit einer Nachweisrate von 10 % (*L. monocytogenes*, Shigatoxin-bildende *E. coli*, *Salmonella* spp.) wies die Produktgruppe der Fresh-Cut-Salate eine deutlich höhere Belastung mit humanpathogenen Bakterien auf als frische Kräuter, Kopf-/Blatt-/Pflücksalate, Sprossen, Möhren, Speisepilze und Gurken [66]. Daher ist durch den Waschschrift auch mit einer Verteilung von antibiotikaresistenten Bakterien zu rechnen.

Die Reduktion der mikrobiellen Besiedlung durch die gesamte Prozessierung von Fresh-Cut-Salaten (Vorputzen, Schneiden, Waschen) beträgt etwa 0,5 log KBE/g in der Gesamtkeimzahl und etwa 1 log KBE/g in der Anzahl der Enterobakterien [66]. Als marktfähige Einheit kommt es während der Haltbarkeitsdauer zu einem Anstieg der Keimzahlen um ca. 1 log KBE/g in der Gesamtkeimzahl und ca. 2 log KBE/g bei der Enterobakterienanzahl [69].

Durch das Waschen im Privathaushalt wurden lediglich geringfügige Reduktionen von 0,5–0,9 log KBE/g in der Gesamtkeimzahl und 0,3–0,7 log KBE/g bei den Enterobakterienzahlen beschrieben [45, 46]. Der Waschvorgang bei Gemüse und Salat eignet sich demnach grundsätzlich nicht, um eine mikrobiologische Sicherheit zu gewährleisten, sondern nur um ein potenzielles Risiko geringfügig zu mindern.

Lagerung

Deutschland ist ein Importland für Gemüse und Obst (64–78 % werden importiert). Auch wenn der Großteil in anderen EU-Ländern (Niederlande/Spanien) produziert wird, findet ein globalisierter Handel mit pflanzlichen Frischeprodukten statt. Durch Transport und Vorratslagerung können Lagerzeiten von mehreren Wochen entstehen. Trotz verbesserter Lagerungsbedingungen kommt es zu Veränderungen in der mikrobiologischen Besiedlung. Bei Kühlungslagerung kann es beispielsweise zu einer Vermehrung von kältetoleranten Enterobakterien (z.B. Yersinien; [69]) oder anderen Veränderungen des Mikrobioms und Resistoms kommen [42].

Durch das Verpacken in Kunststoffverpackungen mit modifizierter Atmosphäre wird das Wachstum von Mikroorganismen gehemmt [70]. Im Fresh-Cut-Bereich werden verschiedene Systeme eingesetzt. *Modified Atmosphere Packages* (MAP) besitzen eine produktspezifisch modifizierte Schutzatmosphäre von 3–8 % CO₂, 2–5 % O₂, 87–95 % N [71]. Ein weiteres System ist das *Equilibrium Modified Atmosphere Packaging* (EMA), indem die Verpackung eine definierte Permeabilität aufweist und der Gasaustausch zu einem Equilibrium zwischen Austausch und Respiration der Pflanzen/Mikroorganismen führt [71]. Sowohl MAP als auch EMA führen zu einem reduzierten Sauerstoffgehalt in der Verpackung, wodurch aerobe Mikroorganismen gehemmt und anaerobe Bakterien begünstigt werden [70]. Enterobakterien können sich als fakultativ anaerobe Bakterien auch unter diesen Bedingungen vermehren und ihren Anteil an der Mikrobiota erhöhen [72].

Fazit

Pflanzen sind grundsätzlich kein natürliches Habitat für fäkale Enterobakterien wie *E. coli*. Jedoch bilden Pflanzen ein allgemeines Reservoir für Enterobakterien, was auch medizinisch relevante Gattungen wie *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* und *Citrobacter* einschließt [73]. Prinzipiell können diese Bakterien auch Antibiotikaresistenzen tragen und

weitergeben [65]. Der Eintrag von antibiotikaresistenten Bakterien kann über Düngung, Wild- und Haustiere, Luft, Wasser sowie menschliche Einflüsse auf Böden und auf die Pflanzen stattfinden [74]. Ein Eintrag über Bewässerungswasser findet statt, wird aber nicht als dominierende Eintragsquelle beschrieben. Er folgt denselben Prinzipien wie der Eintrag von humanpathogenen Bakterien. Die in der EU-Verordnung 2020/741 definierten Anforderungen an die Wasserqualität von Bewässerungswasser reduzieren die Wahrscheinlichkeiten für eine Kontamination der Pflanzen mit antibiotikaresistenten Bakterien analog zu pathogenen Bakterien. Der Indikatorkeim *E. coli* wird als genereller Parameter für das Vorkommen von fäkalen Enterobakterien verwendet. Seine Abwesenheit oder eine geringe Anzahl in Bewässerungswasser lässt sich demnach als Qualitätsparameter auch auf andere, potenziell antibiotikaresistente Enterobakterien übertragen.

Spezielle Verarbeitungs- und Lagerbedingungen wie im Fresh-Cut-Bereich können eine Vermehrung von Enterobakterien begünstigen. Die Eigenschaft der Antibiotikaresistenz führt nicht grundsätzlich zu einem veränderten Wachstumsverhalten der Mikroorganismen, einschließlich der Humanpathogene. Dadurch ist die im Hinblick auf pathogene Bakterien getroffene Einschätzung zu den mikrobiellen Anforderungen an das Bewässerungswasser auch auf antibiotikaresistente Bakterien übertragbar.

Einer besonderen Betrachtung bedarf allerdings die Exposition gegenüber einer Kombination von Mikroorganismen mit übertragbaren Resistenzeigenschaften und Spuren von Antibiotikarückständen oder Mikroschadstoffen im Bewässerungswasser. Diese Kombination kann zu einer Begünstigung des Wachstums der resistenten Mikroorganismen auf den bewässerten Pflanzen und zu einer Weitergabe der mobilen genetischen Elemente führen. Bei den Mikroorganismen im Bewässerungswasser wie auch bei Klärschlamm handelt es sich um potenziell humanadaptierte Stämme und bei den Rückständen um Substanzen, die zur Therapie von bakteriellen In-

fektionen beim Menschen verwendet werden. Die Exposition erfolgt nicht einmalig, wie bei Düngemitteln, sondern über einen bestimmten Zeitraum mehr oder weniger kontinuierlich. Die durch diese Kombinationen induzierten Veränderungen und Interaktionen der Mikrobiota auf Pflanzen sind wenig erforscht, sodass weitere Studien im Hinblick auf Antibiotikaresistenzen und die Persistenz der von Pflanzen aufgenommenen Mikroschadstoffe notwendig erscheinen.

Aktuell gibt es vermehrt Hinweise, dass neben antibiotischen Substanzen auch andere Spurenstoffe den Gentransfer und somit auch einen Resistenzg austausch beschleunigen können, z. B. künstliche Süßstoffe [31, 32, 75].

Unter diesem Gesichtspunkt ist neben den mikrobiologischen Anforderungen auch die Minimierung des Gehaltes an antimikrobiellen Substanzen zu fordern. Als Orientierung kann dabei die im Durchführungsbeschluss (EU) 2018/840 vorgeschlagene Liste von antimikrobiellen Substanzen berücksichtigt werden.

Korrespondenzadresse

PD Dr. med. vet. Bernd-Alois Tenhagen
Abteilung Biologische Sicherheit, Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)
Max-Dohrn-Str. 8–10, 10589 Berlin, Deutschland
bernd-alois.tenhagen@bfr.bund.de

Funding. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. K. Smalla, J. Kabisch, G. Fiedler, J.A. Hammerl und B.-A. Tenhagen geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Für diesen Beitrag wurden von den Autor/-innen keine Studien an Menschen oder Tieren durchgeführt. Für die aufgeführten Studien gelten die jeweils dort angegebenen ethischen Richtlinien.

Open Access. Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden.

Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen.

Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Literatur

1. Europäisches Parlament, Europäischer Rat (2020) Verordnung (EU) 2020/741 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 25. Mai 2020 über Mindestanforderungen an die Wasserwiederverwendung. OJ L177:32–55
2. FAO, WHO (2019) Joint FAO/WHO Expert Meeting in collaboration with OIE on Foodborne Antimicrobial Resistance: Role of the Environment, Crops and Biocides—Meeting report. no. 34. In: FAO (Hrsg) Microbiological Risk Assessment Series. Food and Agricultural Organisation of the UN Rome, S 62
3. Chen QL, Cui HL, Su JQ, Penuelas J, Zhu YG (2019) Antibiotic resistomes in plant microbiomes. Trends Plant Sci 24:530–541. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.02.010>
4. BfR/JKI (2020) Aufbereitete Abwässer: Bakterielle Krankheitserreger auf frischem Obst und Gemüse vermeiden. <https://www.bfr.bund.de/cm/343/aufbereitete-abwaesser-bakterielle-krankheitserreger-auf-frischem-obst-und-gemuese-vermeiden.pdf>. Zugegriffen: 15. Sept. 2022 (In: Stellungnahme Nr. 021/2020. Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, p 60)
5. Kreuzig R, Haller-Jans J, Bischoff C et al (2021) Reclaimed water driven lettuce cultivation in a hydroponic system: the need of micropollutant removal by advanced wastewater treatment. Environ Sci Pollut Res Int 28:50052–50062. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14144-6>
6. Rizzo L, Manaia C, Merlin C et al (2013) Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. Sci Total Environ 447:345–360. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.01.032>
7. Savin M, Alexander J, Bierbaum G et al (2021) Antibiotic-resistant bacteria, antibiotic resistance genes, and antibiotic residues in wastewater from a poultry slaughterhouse after conventional and advanced treatments. Sci Rep 11:16622. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96169-y>
8. Sib E, Lenz-Plet F, Barabasch V et al (2020) Bacteria isolated from hospital, municipal and slaughterhouse wastewaters show characteristic, different resistance profiles. Sci Total Environ 746:140894. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140894>
9. Alexander J, Hembach N, Schwartz T (2020) Evaluation of antibiotic resistance dissemination by wastewater treatment plant effluents with different catchment areas in Germany. Sci Rep 10:8952. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65635-4>
10. Hendriksen RS, Munk P, Njage P et al (2019) Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage.

- Nat Commun 10:1124. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08853-3>
11. Pazda M, Kumirska J, Stepnowski P, Mulkiewicz E (2019) Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems—A review. *Sci Total Environ* 697:134023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134023>
 12. Elder FCT, Proctor K, Barden R et al (2021) Spatiotemporal profiling of antibiotics and resistance genes in a river catchment: Human population as the main driver of antibiotic and antibiotic resistance gene presence in the environment. *Water Res* 203:117533. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117533>
 13. Rodriguez-Mozaz S, Vaz-Moreira I, Varela Della Giustina S et al (2020) Antibiotic residues in final effluents of European wastewater treatment plants and their impact on the aquatic environment. *Environ Int* 140:105733. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105733>
 14. Hong PY, Al-Jassim N, Ansari MI, Mackie RI (2013) Environmental and public health implications of water reuse: antibiotics, antibiotic resistant bacteria, and antibiotic resistance genes. *Antibiot (basel)* 2:367–399. <https://doi.org/10.3390/antibiotics2030367>
 15. Hiller CX, Hübner U, Fajnorova S, Schwartz T, Drewes JE (2019) Antibiotic microbial resistance (AMR) removal efficiencies by conventional and advanced wastewater treatment processes: A review. *Sci Total Environ* 685:596–608. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.315>
 16. Che Y, Yang Y, Xu X et al (2021) Conjugative plasmids interact with insertion sequences to shape the horizontal transfer of antimicrobial resistance genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. <https://doi.org/10.1073/pnas.2008731118>
 17. Blau K, Bettermann A, Jechalke S et al (2018) The Transferable Resistome of Produce. *mBio*. <https://doi.org/10.1128/mBio.01300-18>
 18. Smalla K, Jechalke S, Top EM, Tolmasky M, Alonso JC (2015) Plasmid Detection, Characterization, and Ecology. *Microbiol Spectr*. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0038-2014>
 19. Savin M, Bierbaum G, Hammerl JA et al (2020) Antibiotic-resistant bacteria and antimicrobial residues in wastewater and process water from German pig slaughterhouses and their receiving municipal wastewater treatment plants. *Sci Total Environ* 727:138788. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138788>
 20. Umweltbundesamt (2020) Arzneimittelrückstände in der Umwelt. <https://www.umweltbundesamt.de/daten/chemikalien/arzneimittelrueckstaende-in-der-umwelt#arzneimittelwirkstoffe-in-der-umwelt>. Zugegriffen: 15. Sept. 2022
 21. Dusi E, Rybicki M, Jungmann D (2019) The database “Pharmaceuticals in the Environment”—Update and new analysis. *Umweltbundesamt, Dessau*. https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/1410/publikationen/2019-06-24_texte_67-2019_database_pharmaceuticals-environment_0.pdf. Zugegriffen: 15. Dez. 2022
 22. Serra-Compte A, Pikkemaat MG, Elferink A et al (2021) Combining an effect-based methodology with chemical analysis for antibiotics determination in wastewater and receiving freshwater and marine environment. *Environ Pollut* 271:116313. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116313>
 23. Lopez FJ, Pitarch E, Botero-Coy AM et al (2021) Removal efficiency for emerging contaminants in a WWTP from Madrid (Spain) after secondary and tertiary treatment and environmental impact on the Manzanares River. *Sci Total Environ* 812:152567. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152567>
 24. Kesari KK, Soni R, Jamal QMS et al (2021) Wastewater treatment and reuse: a review of its applications and health implications. *Water Air Soil Pollut* 232:208. <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05154-8>
 25. Gudda FO, Waigi MG, Odinga ES, Yang B, Carter L, Gao Y (2020) Antibiotic-contaminated wastewater irrigated vegetables pose resistance selection risks to the gut microbiome. *Environ Pollut* 264:114752. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114752>
 26. Bergmann A, Fohrmann R, Weber F-A (2011) Zusammenstellung von Monitoringdaten zu Umweltkonzentrationen von Arzneimitteln. *Umweltbundesamt, Dessau*. <https://www.umweltbundesamt.de/publikationen/zusammenstellung-von-monitoringdaten-zu-zugegriffen:15.Sept.2022>
 27. European Commission (2018) COMMISSION IMPLEMENTING DECISION (EU) 2018/840 of 5 June 2018 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council and repealing Commission Implementing Decision (EU) 2015/495. *OJL* 141:9–12.
 28. Voigt M, Wirtz A, Hoffmann-Jacobsen K, Jaeger M (2020) Review: Prior art for the development of a fourth purification stage in wastewater treatment plant for the elimination of anthropogenic micropollutants—a short-review. *Aims Environ Sci* 7:69–98. <https://doi.org/10.3934/environsci.2020005>
 29. Otteneider H (Hrsg) (2019) Rückstände und Kontaminanten in Getreide und Getreideerzeugnissen. Erling, Clenze
 30. Fu Q, Malchi T, Carter LJ, Li H, Gan J, Chefetz B (2019) Pharmaceutical and Personal Care Products: From Wastewater Treatment into Agro-Food Systems. *Environ Sci Tech* 53:14083–14090. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b06206>
 31. Yu Z, Wang Y, Lu J, Bond PL, Guo J (2021) Nonnutritive sweeteners can promote the dissemination of antibiotic resistance through conjugative gene transfer. *ISME J* 15:2117–2130. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00909-x>
 32. Yu Z, Wang Y, Henderson IR, Guo J (2021) Artificial sweeteners stimulate horizontal transfer of extracellular antibiotic resistance genes through natural transformation. *ISME J*. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01095-6>
 33. Wolters B, Hauschild K, Blau K et al (2022) Biosolids for safe land application: does wastewater treatment plant size matters when considering antibiotics, pollutants, microbiome, mobile genetic elements and associated resistance genes? *Environ Microbiol* 24:1573–1589. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15938>
 34. Alexander J, Knopp G, Dötsch A, Wieland A, Schwartz T (2016) Ozone treatment of conditioned wastewater selects antibiotic resistance genes, opportunistic bacteria, and induce strong population shifts. *Sci Total Environ* 559:103–112. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.154>
 35. Larsson DGJ, Flach CF (2021) Antibiotic resistance in the environment. *Nat Rev Microbiol*. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>
 36. Trivedi P, Leach JE, Tringe SG, Sa T, Singh BK (2020) Plant-microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nat Rev Microb* 18:607–621. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1>
 37. Ebmeyer S, Kristiansson E, Larsson DGJ (2021) A framework for identifying the recent origins of mobile antibiotic resistance genes. *Commun Biol* 4:8. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01545-5>
 38. Guron GKP, Chen C, Du P, Pruden A, Ponder MA (2021) Manure-based amendments influence surface-associated bacteria and markers of antibiotic resistance on radishes grown in soils with different textures. *Appl Environ Microb*. <https://doi.org/10.1128/aem.02753-20>
 39. Phan-Thien K, Metaferia MH, Bell TL et al (2020) Effect of soil type and temperature on survival of salmonella enterica in poultry manure-amended soils. *Lett Appl Microbiol* 71:210–217. <https://doi.org/10.1111/lam.13302>
 40. Vorholt JA (2012) Microbial life in the phyllosphere. *Nat Rev Microbiol* 10:828–840. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2910>
 41. Cernava T, Erlacher A, Soh J, Sensen CW, Grube M, Berg G (2019) Enterobacteriaceae dominate the core microbiome and contribute to the resistome of arugula (*Eruca sativa* Mill.). *Microbiome* 7:13. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0624-7>
 42. Wassermann B, Abdelfattah A, Müller H, Korsten L, Berg G (2022) The microbiome and resistome of apple fruits alter in the post-harvest period. *Environ Microbiome* 17:10. <https://doi.org/10.1186/s40793-022-00402-8>
 43. Obermeier MM, Wicaksono WA, Taffner J et al (2021) Plant resistome profiling in evolutionary old bog vegetation provides new clues to understand emergence of multi-resistance. *ISME J* 15:921–937. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00822-9>
 44. Abadias M, Usall J, Anguera M, Solsona C, Viñas I (2008) Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *Int J Food Microb* 123:121–129. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.013>
 45. Nastou A, Rhoades J, Smirniotis P, Makri I, Kontominas M, Likotrafti E (2012) Efficacy of household washing treatments for the control of *Listeria monocytogenes* on salad vegetables. *Int J Food Microb* 159:247–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.09.003>
 46. Uhlig E, Olsson C, He J et al (2017) Effects of household washing on bacterial load and removal of *Escherichia coli* from lettuce and “ready-to-eat” salads. *Food Sci Nutr* 5:1215–1220. <https://doi.org/10.1002/fsn3.514>
 47. Rosberg AK, Darlison J, Mogren L, Alsanian BW (2021) Commercial wash of leafy vegetables do not significantly decrease bacterial load but leads to shifts in bacterial species composition. *Food Microbiol* 94:103667. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103667>
 48. Hirt H (2020) Healthy soils for healthy plants for healthy humans: How beneficial microbes in the soil, food and gut are interconnected and how agriculture can contribute to human health. *Embo Rep* 21:e51069. <https://doi.org/10.15252/embr.202051069>
 49. Marano RBM, Zolti A, Jurkevitch E, Cytryn E (2019) Antibiotic resistance and class 1 integron gene dynamics along effluent, reclaimed wastewater irrigated soil, crop continua: elucidating potential risks and ecological constraints. *Water Res* 164:114906. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.114906>
 50. Marano RBM, Gupta CL, Cozer T, Jurkevitch E, Cytryn E (2021) Hidden Resistome: enrichment reveals the presence of clinically relevant antibiotic

- resistance determinants in treated wastewater-irrigated soils. *Environ Sci Tech* 55:6814–6827. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c00612>
51. Gekenidis MT, Rigotti S, Hummerjohann J, Walsh F, Drissner D (2020) Long-term persistence of bla(CTX-M-15) in soil and lettuce after introducing extended-spectrum β -Lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* via manure or water. *Microorganisms*. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111646>
 52. Gekenidis MT, Kläui A, Smalla K, Drissner D (2020) Transferable extended-spectrum β -Lactamase (ESBL) plasmids in enterobacteriaceae from irrigation water. *Microorganisms*. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8070978>
 53. Boxall ABA, Johnson P, Smith EJ, Sinclair CJ, Stutt E, Levy LS (2006) Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *J Agr Food Chem* 54:2288–2297. <https://doi.org/10.1021/jf053041t>
 54. Freitag M, Yolcu DH, Hayen H, Betsche T, Grote M (2008) Screening zum Antibiotika-Transfer aus dem Boden in Getreide in Regionen Nordrhein-Westfalens mit großen Viehbeständen. *J Verbr Leb* 3:174–184. <https://doi.org/10.1007/s00003-008-0329-5>
 55. Pan M, Chu LM (2017) Transfer of antibiotics from wastewater or animal manure to soil and edible crops. *Environ Pollut* 231:829–836. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.051>
 56. Jones-Lepp TL, Sanchez CA, Moy T, Kazemi R (2010) Method development and application to determine potential plant uptake of antibiotics and other drugs in irrigated crop production systems. *J Agr Food Chem* 58:11568–11573. <https://doi.org/10.1021/jf1028152>
 57. Sabourin L, Duenk P, Bonte-Gelok S, Payne M, Lape DR, Topp E (2012) Uptake of pharmaceuticals, hormones and parabens into vegetables grown in soil fertilized with municipal biosolids. *Sci Total Environ* 431:233–236. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.05.017>
 58. Marsoni M, Fd M, Labra M, Bruno A, Bracale M, Vannini C (2014) Uptake and effects of a mixture of widely used therapeutic drugs in *Eruca sativa* L. and *Zea mays* L. plants. *Ecotoxicol Environ Saf* 108:52–57. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.05.029>
 59. Goldstein M, Shenker M, Chefetz B (2014) Insights into the uptake processes of wastewater-borne pharmaceuticals by vegetables. *Environ Sci Tech* 48:5593–5600. <https://doi.org/10.1021/es5008615>
 60. Ahmed MBM, Rajapaksha AU, Lim JE et al (2015) Distribution and accumulative pattern of tetracyclines and sulfonamides in edible vegetables of cucumber, tomato, and lettuce. *J Agr Food Chem* 63:398–405. <https://doi.org/10.1021/jf5034637>
 61. Liu X, Liang C, Liu X, Zhao F, Han C (2020) Occurrence and human health risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in real agricultural systems with long-term reclaimed wastewater irrigation in Beijing, China. *Ecotoxicol Environ Saf* 190:110022. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110022>
 62. Bliedung A, Dockhorn T, Germer J et al (2020) Produktqualität. In: *Siedlungswasserwirtschaft If (Hrsg) HypoWave – Einsatz hydroponischer System zur ressourceneffizienten landwirtschaftlichen Wasserwiederverwendung. Gesellschaft zur Förderung des Institutes für Siedlungswasserwirtschaft an der Technischen Universität Braunschweig e.V Braunschweig, S81–114*
 63. S-Y-D ZWM-Y, Giles M et al (2020) Prevalence of antibiotic resistome in ready-to-eat salad. *Front Public Health* 8:92. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00092>
 64. BfR (2020) Schutz vor Lebensmittelinfektionen im Privathaushalt. https://www.bfr.bund.de/cm/350/verbrauchertipps_schutz_vor_lebensmittelinfektionen_im_privathaushalt.pdf. Zugriffen: 15. Jan. 2023 (In: BfR, Berlin)
 65. Kock R, Herr C, Kreienbrock L, Schwarz S, Tenhagen BA, Walther B (2021) Multiresistant gram-negative pathogens-A zoonotic problem. *Dtsch Arztebl Int* 118:579–589. <https://doi.org/10.3238/arztebl.m2021.0184>
 66. Fiedler G (2021) Mikrobiologische Sicherheit von Gemüse und Salat. In: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Dissertation. https://macau.uni-kiel.de/receive/macau_mods_00002370. Zugriffen: 15.12.2022
 67. Cho GS, Stein M, Fiedler G et al (2021) Polyphasic study of antibiotic-resistant enterobacteria isolated from fresh produce in Germany and description of *Enterobacter vonholyi* sp. nov. isolated from marjoram and *Enterobacter dykesii* sp. nov. isolated from mung bean sprout. *Syst Appl Microbiol* 44:126174. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126174>
 68. Gekenidis MT, Schöner U, von Ah U, Schmelcher M, Walsh F, Drissner D (2018) Tracing back multidrug-resistant bacteria in fresh herb production: from hive to source through the irrigation water chain. *FEMS Microbiol Ecol*. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy149>
 69. Söderqvist K, Osman AO, Wolff C, Bertilsson S, Vågsholm I, Boqvist S (2017) Emerging microbiota during cold storage and temperature abuse of ready-to-eat salad. *Infect Ecol Epidemiol* 7:1328963. <https://doi.org/10.1080/2008686.2017.1328963>
 70. Arvanitoyannis IS, Bouletis AD, Papa EA, Gkagtzis DC, Hadjichristodoulou C, Papaloucas C (2011) Microbial and sensory quality of “Lollo verde” lettuce and rocket salad stored under active atmosphere packaging. *Anaerobe* 17:307–309. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.04.011>
 71. Phillips CA (1996) Review: Modified Atmosphere Packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce. *Int J Food Sci Tech* 31:463–479. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.1996.00369.x>
 72. Nousiainen L-L, Joutsen S, Lunden J, Hänninen M-L, Fredriksson-Ahomaa M (2016) Bacterial quality and safety of packaged fresh leafy vegetables at the retail level in Finland. *Int J Food Microb* 232:73–79. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodmicro.2016.05.020>
 73. Holden N, Pritchard L, Toth I (2009) Colonization outwith the colon: plants as an alternative environmental reservoir for human pathogenic enterobacteria. *FEMS Microbiol Rev* 33:689–703. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00153.x>
 74. Lee S, Mir RA, Park SH et al (2020) Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in the local farm environment and livestock: challenges to mitigate antimicrobial resistance. *Crit Rev Microb* 46:1–14. <https://doi.org/10.1080/1040841x.2020.1715339>
 75. Suez J, Korem T, Zeevi D et al (2014) Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature* 514:181–186. <https://doi.org/10.1038/nature13793>