

Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie  
Max Rubner-Institut  
Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel

**Mikrobiologische Sicherheit von Gemüse und Salat:**  
pathogene und antibiotikaresistente Bakterien und  
Veränderungen der Mikrobiota während der Verarbeitung zu  
Fresh-Cut Salaten

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
Gregor Fiedler, geb. in Marienberg  
Kiel, 2021

Erster Gutachter: Prof. Dr. Charles M.A.P. Franz

Zweite Gutachterin: Prof. Dr. Tal Dagan

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2021

Diese Arbeit ist meiner Familie gewidmet.

## Abstract:

Fresh produce, such as vegetables and lettuce are of great health value as long as a microbiologically safe status permits raw consumption. Major outbreaks such as the EHEC epidemic in 2011, but also international trade and changing consumption behaviour have shown the need for more in-depth, microbiological investigations of fresh, plant-based products. The present study therefore investigated the general microbiological load and the occurrence of human pathogenic and antibiotic-resistant bacteria in fresh plant products. For this purpose, the product chain from the field to the end product was investigated with a focus on fresh-cut salads, but also vegetables from the retail sector. It could be shown, that human-pathogenic bacteria enter the product chain via raw plant material from the field, while only a moderate reduction of bacterial contamination could be observed during food processing. A product-specific microbiota was found in the field samples, which, however, became homogeneous in the final products as a result of the washing step. Human pathogenic bacteria (*Salmonella*, *Listeria monocytogenes* (including ST1) and shiga toxin-producing *Escherichia coli* (including O26:H11)) were detected in 13 of the 561 examined lettuce and vegetable samples. Whole genome sequencing enabled the determination of clonal lineages and the detection of genetic risk factors of the isolated strains. In addition, ESBL-producing enterobacteria were detected in 19 of the 239 samples examined. *Klebsiella pneumoniae* (including ST14) and *Escherichia coli* (including ST410) were identified as primary carriers of the most frequently detected CTX-M-15 ESBL gene. These strains showed multiple resistance to fluoroquinolones, aminoglycosides, tetracyclines and folic acid antagonists. Plasmid replicon sequences (e.g. IncFI in 77 % of the isolates) could be detected in all isolates. Carbapenem-resistant enterobacteria were not detected. In addition, toxin-producing *Bacillus cereus* strains were found frequently in vegetables and lettuce.

In summary, the clonal lineages of medically relevant bacteria and the spread of antibiotic resistance genes detected in various plant-based food products are of public health concern due to their prevalence in the environment. Humans, animals, the environment and food as habitats of bacteria are therefore not separate from each other, they strongly influence each other and ought to be considered as a whole in the "one health" approach.

## Zusammenfassung:

FrISCHE pflanzliche Produkte wie Gemüse und Salat sind von großem gesundheitlichem Wert, solange ein mikrobiologisch unbedenklicher Status den Rohverzehr zulässt. Große Ausbruchsgeschehen wie die EHEC-Epidemie 2011, aber auch der internationale Handel und veränderte Konsumgewohnheiten zeigten den Bedarf für vertiefende, mikrobiologische Untersuchungen von frischen pflanzlichen Produkten. In der vorliegenden Studie wurden daher der allgemeine mikrobiologische Status und das Vorkommen humanpathogener und antibiotikaresistenter Bakterien in frischen pflanzlichen Produkten untersucht. Dafür wurde die Lebensmittelkette vom Feld bis zum Endprodukt untersucht. Der Fokus lag dabei auf Fresh-Cut Salaten und Gemüse aus dem Einzelhandel. Es zeigte sich der Eintrag von humanpathogenen Bakterien über die Rohprodukte vom Feld in die weitere Verarbeitungskette und eine moderate Keimreduktion während der Prozessierung. Bei den Feldproben konnte eine produktspezifische Mikrobiota festgestellt werden, die sich allerdings durch den Waschschrift in den Endprodukten anglich. In 13 der 561 untersuchten Salat- und Gemüseproben wurden humanpathogene Bakterien (*Salmonella*, *Listeria monocytogenes* (u.a. ST1) und Shigatoxin-produzierende *Escherichia coli* (u.a. O26:H11)) nachgewiesen. Durch die Ganzgenomsequenzierungen war es möglich, die klonalen Linien und genetischen Risikofaktoren der isolierten Stämme zu bestimmen. Zudem wurden in 19 der 239 untersuchten Proben ESBL-bildende Enterobakterien nachgewiesen. Vor allem *Klebsiella pneumoniae* (u.a. ST14), aber auch *Escherichia coli* (u.a. ST410) wurden als Träger des am häufigsten detektierten CTX-M-15 ESBL-Gens identifiziert. Diese Stämme zeigten Mehrfach-Resistenzen gegenüber Fluorchinolonen, Aminoglykosiden, Tetrazykline und Folsäure-Antagonisten. In allen Isolaten konnten Plasmid-Replikonsequenzen (z. B. IncFI bei 77 % der Isolate) nachgewiesen werden. Carbapenemresistente Enterobakterien wurden nicht detektiert. Außerdem konnte bei Gemüse und Salat das häufige Vorkommen von Toxin-bildenden *Bacillus cereus* belegt werden. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die nachgewiesenen klonalen Linien und Resistenzgene in der Umwelt weit verbreitet und in der Humanmedizin relevant sind. Menschen, Tiere, Umwelt und Lebensmittel als Lebensräume von Bakterien sind daher nicht getrennt voneinander, sondern beeinflussen sich stark und sind im „one health“-Ansatz als Ganzes zu betrachten.

## Abkürzungsverzeichnis:

Die Abkürzungen der Nuklein- und Aminosäuren erfolgen gemäß der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Weiterhin gelten die Abkürzungen der SI-Einheiten (Le Système International d'Unités), die nachfolgend nicht gesondert aufgeführt sind.

<i>aqua dest.</i>	<i>Aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)
AS	Aminosäure
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bla	$\beta$ -Laktamase
bp	Basenpaare
BPW	Buffered Peptone Water (Gepuffertes Peptonwasser)
BRILA	Brilliant Green Bile Lactose
cgMLST	core genome Multilocus Sequence Typing
DIN	Deutsches Institut für Normung
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EFSA	European Food Safety Authority
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
ESBL	Extended Spectrum $\beta$ -Laktamase
EU	Europäische Union
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
G/C	Guanin/Cytosin
Inc	Inkompatibilitätsgruppe
IS	Insertionssequenz
ISO	International Organization for Standardization
KbE	Koloniebildende Einheiten
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
log	Dekadischer Logarithmus
MLST	Multilocus Sequence Typing
MRI	Max Rubner-Institut
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
RKI	Robert Koch-Institut
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
ST	Sequence Type
STEC	Shigatoxin-produzierende <i>E. coli</i>
wgMLST	whole genome Multilocus Sequence Typing
WGS	Whole Genome Sequencing (Gesamtgenomsequenzierung)

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1. Frische pflanzliche Produkte in der Humanernährung .....	1
1.2. Erzeugung und Verarbeitung von Gemüse und Salat.....	3
1.3. Humanpathogene Bakterien in frischen pflanzlichen Produkten.....	5
1.4. Eintragswege humanpathogener und antibiotikaresistenter Bakterien in die Lebensmittelkette .....	10
1.4.1. <i>Salmonella</i> .....	11
1.4.2. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	13
1.4.3. Pathogene <i>Escherichia coli</i> .....	14
1.4.4. Toxin-bildende <i>Staphylococcus aureus</i> und <i>Bacillus cereus</i> .....	16
1.4.5. Antibiotikaresistente Bakterien .....	18
1.5. Ganzgenomsequenzierung in der Lebensmittelsicherheit.....	20
1.6. Ziele dieser Arbeit .....	23
2. Material und Methoden.....	25
2.1. Materialien.....	25
2.1.1. Geräte .....	25
2.1.2. Verbrauchsmaterialien, Enzyme und Kits .....	25
2.1.3. Chemikalien, Lösungen und Puffer.....	25
2.1.4. Nährmedien .....	25
2.1.5. Stammhaltung und Bakterienstämme.....	28
2.1.6. Software und Online-Tools.....	29
2.2. Probennahme .....	31
2.2.1. Handelsproben .....	31
2.2.2. Herstellerproben.....	32
2.3. Mikrobiologische Methoden.....	34
2.3.1. Kulturabhängige, quantitative Nachweise .....	35
2.3.2. Kulturabhängige, qualitative Nachweise .....	38
2.3.3. Antibiotika-Resistenztestung.....	40

2.4. Molekularbiologische Methoden .....	41
2.4.1. DNA-Isolierung .....	41
2.4.2. Nachweis Shigatoxin-produzierender <i>E. coli</i> (STEC) durch <i>real-time</i> PCR .....	42
2.4.3. PCR zur Bestätigung von STEC und <i>L. monocytogenes</i> verdächtiger Kolonien.....	44
2.4.4. Nachweis von <i>Bacillus cereus</i> Toxingenen mittels multiplex PCR und Toxinproteinen mittels Serologie .....	48
2.5. Ganzgenomsequenzierung .....	49
2.6. 16S-rDNA Metagenomics.....	50
2.7. Bioinformatik .....	51
2.7.1. PATRIC (BRC)-Qualitätskontrolle der Sequenzdaten, Assemblierung, Annotation, Phylogenetische Analysen .....	51
2.7.2. Multi-Lokus-Sequenz-Typisierung MLST, cgMLST und wgMLST.....	52
2.7.3. Molekulare Serotypisierung .....	52
2.7.4. Identifizierung von Resistenzgenen .....	52
2.7.5. Identifizierung von Virulenzfaktoren-Genen .....	52
2.7.6. Identifizierung von Plasmidsequenzen .....	53
2.7.7. Spezies Identifizierung durch den Type (Strain) Genome Server .....	53
2.7.8. Identifizierung von verwandten Stämmen in den online Datenbanken .....	53
2.7.9. Vergleichende genomische Analysen mittels digitaler DNA-DNA Hybridisierung (dDDH) und kmer basierter <i>Mash</i> Distanzberechnung ( <i>mash</i> ) ..	53
2.7.10. Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP)-Analysen mittels CSI Phylogeny und CFSAN.....	54
2.8. Statistik.....	54
3. Ergebnisse.....	56
3.1. Mikrobiologische Qualität von Salat und Gemüse auf Produktionsebene .....	56
3.1.1. Mikrobiologischer Status und Nachweis von Humanpathogenen.....	56
3.1.2. 16S-rDNA Mikrobiota-Analysen .....	68
3.2. Mikrobiologische Qualität von Salat und Gemüse auf Handelsebene.....	77



3.2.1.	Allgemeiner mikrobiologischer Status .....	77
3.2.2.	Unterschiede zwischen ökologischem und konventionellem Anbau auf Handelsebene .....	82
3.2.3.	Nachweise von Pathogenen auf Handelsebene .....	83
3.3.	Differenzierung der humanpathogenen Bakterien und deren Charakterisierung.....	84
3.3.1.	<i>Salmonella</i> .....	86
3.3.2.	<i>Listeria monocytogenes</i> .....	90
3.3.3.	Shigatoxin-produzierende <i>Escherichia coli</i> .....	94
3.4.	Nachweis von <i>Staphylococcus aureus</i> und <i>Bacillus cereus</i> als Toxinbildner in pflanzlichen Frischeprodukten.....	96
3.5.	Nachweis ESBL-produzierender Enterobakterien .....	98
3.5.1.	Speziesidentifizierung .....	100
3.5.2.	Phänotypische Resistenz .....	102
3.5.3.	Nachweis von Resistenzgenen .....	105
3.5.4.	Nachweis von Plasmidsequenzen .....	109
3.5.5.	Genetische Positionierung der ESBL Gene CTX-M.....	110
3.6.	Nachweis von Carbapenemase-produzierenden Enterobakterien .....	112
4.	Diskussion .....	113
4.1.	Pflanzliche Produkte während der Verarbeitung vom Feld bis zum Endprodukt .....	113
4.2.	Humanpathogene.....	122
4.3.	ESBL-produzierende Enterobakterien.....	133
4.4.	Perspektive der Lebensmittelsicherheit bei frischen pflanzlichen Produkten und Fazit .....	139
5.	Zusammenfassung .....	141
6.	Literaturverzeichnis .....	143
7.	Anhang.....	169
	Eidesstattliche Erklärungen .....	211
	Danksagung .....	214

# 1. Einleitung

## 1.1. Frische pflanzliche Produkte in der Humanernährung

Pflanzliche Lebensmittel bilden eine wichtige Grundlage der Ernährung. Neben gesundheitsförderlichen Inhaltsstoffen rückt das Verständnis für ressourcenschonende Produktion und Tierwohl die pflanzlichen Lebensmittel zunehmend in den Fokus der westlichen Gesellschaft. Eine Verarbeitung von pflanzlichen Produkten, wie Cerealien, Gemüse oder Kartoffeln, schließt meist eine thermische Dekontamination wie Backen oder Kochen mit ein. Dieser Schritt fehlt bei frischem Obst und Gemüse, welches roh verzehrt wird (Harris et al. 2003). In Deutschland werden pro Tag und Person durchschnittlich ca. 280 g Obst und Gemüse konsumiert (MRI 2013). Die beliebtesten frischen Produkte sind Fruchtgemüse (Tomaten, Gurken), Wurzelgemüse (Möhren), Blattgemüse (Kopf-, Blatt-, Pflücksalate) und Kernobst (Apfel) (Treu et al. 2017; Statista). Produkte wie grüner Salat, frische Kräuter oder Möhren werden von 30-60 % der europäischen Bevölkerung regelmäßig verzehrt (Da Silva Felício et al. 2015). Die Verzehrmenge von Obst und Gemüse pro Person blieb in Deutschland in den letzten Jahren nahezu konstant (Gose et al. 2016), allerdings zeigen sich hier Veränderungen bei den Lebens- und Essgewohnheiten. Sozioökonomische und demografische Faktoren, Lebens- und Arbeitsbedingungen sowie mediale Einflüsse führen zu einer Vielfalt von Trends und Diversifizierung im Ernährungsverhalten. Das Bewusstsein für Lebensmittel und deren Einfluss auf Gesundheit und Umwelt ist allerdings generell gestiegen (BMEL 2020). Demgegenüber erkennbar ist ein Trend in Richtung verzehrfertiger und verarbeiteter Lebensmittel, die schnell und einfach zu konsumieren sind. Obwohl gerade der Einkauf regionaler Produkte eine zunehmende Tendenz zeigt, ist Deutschland weiterhin ein großer Importeur von Obst und Gemüse. Etwa 80 % des Obstes und ca. 65 % des Gemüses werden aus europäischen und nicht-europäischen Ländern importiert (BMEL 2021a). Ein Großteil dieser pflanzlichen Produkte wird roh oder wenig verarbeitet verzehrt (Callejón et al. 2015). Ein guter mikrobiologischer Status und die Abwesenheit von humanpathogenen Bakterien ist daher umso wichtiger, da vor dem Verzehr oft keine weiteren Schritte zur Keimreduktion erfolgen. Sowohl in Privathaushalten als auch in der Gemeinschaftsverpflegung und Gastronomie tendiert das Einkaufsverhalten bei einigen Gemüsesorten zu verzehrfertigen Produkten wie Misch- und Schnittsalaten (Fresh-Cut-, Ready-to-eat-, to-go-, minimal prozessiert-, convenience-Produkte). Fresh-Cut Salate und Gemüse machten 2017 in Deutschland einen Anteil von ca. 4,6 % (4,2 % Salate) am Gesamtumsatz für frisches Gemüse aus (Statista). In Großbritannien und den

Niederlanden lag der Anteil im gleichen Zeitraum bei 17,4-32,9 % für Fresh-Cut Salate/Gemüse (5,6-6,2 % nur Salate) (Statista).

Die Oberfläche von Pflanzen ist von einer großen Anzahl von Mikroorganismen besiedelt. Dieses Mikrobiom wird von Proteobakterien dominiert und durch Boden, Pflanzentyp und Wetter beeinflusst (Trivedi et al. 2020). Durch mikrobiologische Interaktionen im Wurzelbereich der Pflanzen (Rhizosphäre) kommt es zur Wachstumsförderung (Siebers et al. 2018). Die Mikrobiota des Wurzelbereichs ist dabei stark von der Mikrobiota des Bodens abhängig (Siebers et al. 2018; Pérez-Jaramillo et al. 2018) und die bakterielle Mikrobiota im Blattbereich der Pflanzen (Phyllosphäre) steht in direkter Abhängigkeit zur Rhizosphäre und dem Boden (Pérez-Jaramillo et al. 2018; Trivedi et al. 2020). Ob eine produktspezifische Mikrobiota ausgebildet wird oder diese eher von Umweltfaktoren bestimmt wird, ist bisher nicht geklärt (Trivedi et al. 2020). Durch die große geographische Variabilität importierter Produkte gelangen die unterschiedlichsten Mikroorganismen auf den Oberflächen von Salat und Gemüse letztendlich zu den Verbraucherinnen und Verbrauchern (im folgenden Verbraucher genannt). Daher ist die Zusammensetzung der Bakterien auf pflanzlichen Produkten von grundlegendem Interesse, um die natürliche Besiedlung, deren Interaktionen und Veränderungen einschätzen zu können. Besonders relevant für Lebensmittel ist beispielsweise die Familie der Enterobakterien als Hygieneindikator (Weber 2013). Zur Familie der Enterobakterien gehören auch infektiöse fäkale Bakterien (z. B. *Escherichia (E.) coli*, *Salmonella (S.)* spp.), aber auch eine Vielzahl ungefährlicher Umweltkeime ohne direkte Bedeutung für die Gesundheit des Menschen (Weber 2013).

Alleine das Vorhandensein von Mikroorganismen führt kurzfristig nicht zum Verderb von pflanzlichen Lebensmitteln, denn Pflanzen sind durch ihre äußerste Zellschicht (Epidermis) und aufgelagerte Wachsschicht (Kutikula) wirksam gegen Mikroorganismen geschützt (Bulgarelli et al. 2013). Diese Situation ändert sich bei der Ernte, dem Schälen oder Zerschneiden von Salat und Gemüse. Die Oberflächen werden geöffnet und nährstoff- und enzymhaltiger Zellsaft tritt aus (Koukkidis et al. 2017). Mikroorganismen nutzen diese verfügbaren Kohlenstoff- und Stickstoff-Quellen sofort und vermehren sich (Tournas 2005; Koukkidis et al. 2017). Die Abbauprodukte führen bei fortschreitendem Prozess zu optischen (braune Stellen, weiche Konsistenz) sowie geruchlichen und geschmacklichen Veränderungen (Tournas 2005). Um diese Prozesse zu verlangsamen, werden Fresh-Cut-Produkte (z. B. verzehrfertige Mischsalate) gekühlt gelagert, unter Schutzatmosphäre verpackt und mit einem relativ kurzen Verbrauchsdatum von wenigen Tagen angeboten.

## 1.2. Erzeugung und Verarbeitung von Gemüse und Salat

Weltweit wurden 2019 ca. 313.000.000 Tonnen Gemüse erzeugt (Statista), wovon ca. 63.000.000 Tonnen Gemüse in der Europäischen Union produziert wurden (Statista). Allein in Deutschland wurden im Jahr 2019 ca. 3.900.000 Tonnen Gemüse angebaut (BMEL 2021b). Die deutsche Bilanz (Selbstversorgungsgrad) zwischen Verbrauch und nationaler Eigenerzeugung liegt für Gemüse bei nur 36 % und damit weit unter den gewünschten Zielen der europäischen Agrarpolitik (BMEL 2021c). Hierbei tragen vor allem die EU-Länder Niederlande (1.800.000 Tonnen; 2019) und Spanien (1.400.000 Tonnen; 2019) einen beträchtlichen Anteil am Import von Gemüse nach Deutschland bei (Statista). In Deutschland wurden die höchsten Erntemengen im Freiland durch Möhren (791.000 Tonnen, 2019), Speisezwiebeln (522.000 Tonnen, 2019) und Weißkohl (448.000 Tonnen, 2019) erbracht (Statistisches Bundesamt 2020). Bei geschützten Kulturen (Gewächshäuser) wurden 2019 hauptsächlich Tomaten (107.000 Tonnen) und Salatgurken (62.000 Tonnen) produziert (Statistisches Bundesamt 2020).

Die Erntemenge von ökologisch erzeugtem Gemüse betrug 2019 in Deutschland 328.403 Tonnen, was einem Anteil von etwa 9 % entspricht (Statistisches Bundesamt 2020).

Der Umsatz von Obst- und Gemüse-verarbeitenden Betrieben in Deutschland stieg in den letzten Jahren stetig an und betrug 2020 knapp 12 Milliarden Euro (Statista). Dabei wurde im Jahr 2018 Frischgemüse im Wert von ca. 4 Milliarden Euro importiert (BMEL 2021a). Etwa 50 % des Umsatzes werden über Discounter generiert (Statista). Trotz Umsatzsteigerung sank die Anzahl der Betriebe im Gemüseanbau in Deutschland von 9.851 im Jahr 2009 auf 5.892 im Jahr 2020, wobei die Anbauflächen (Abbildung 1) von etwa 145.000 ha nahezu konstant blieben (Statista).

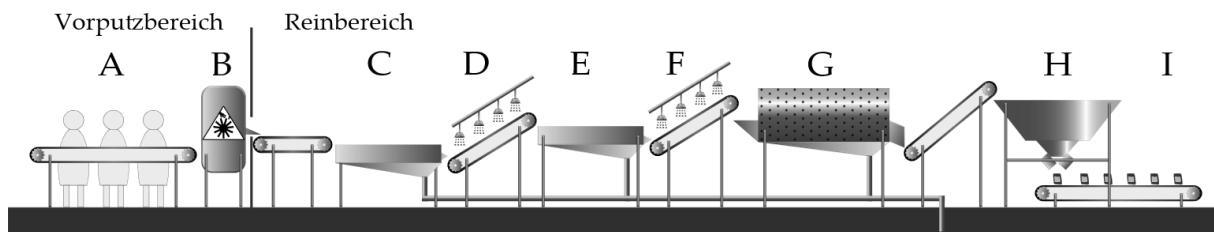
Gemüse und Salat werden vorwiegend in Handarbeit geerntet und produktabhängig verarbeitet (Beuchat und Ryu 1997; Hortipendium; BZL 2021). Fruchtgemüse (wie Tomaten und Gurken), Kohlgemüse und Blattsalate werden meist ohne Reinigung verpackt oder als lose Ware in Kisten transportiert (BZL 2021). Hingegen werden Wurzelgemüse und Knollengemüse oftmals vor dem Verpacken durch einen maschinellen Waschschrift gereinigt (Hortipendium). Je nach Produkt, Anbauform, Witterung und Betriebsgröße erfolgen die Schritte des Sortierens, Waschens, Verlesens und Verpackens schon direkt auf dem Feld oder werden in verarbeitenden Betrieben durchgeführt (BZL 2021). Ein Transport über die Ländergrenzen ist auf allen Verarbeitungsstufen möglich. Die Marktaufbereitung zur verkaufsfähigen Einheit kann dabei regional, national oder international erfolgen (BZL 2021).



**Abbildung 1**

*Kommerzieller Salatanbau im Freiland.*

Neben dem minimal verarbeiteten Frischgemüse werden auch intensiv verarbeitete Produkte wie Gemüsekonserven, Tiefkühlgemüse (Mischungen) und fermentierte, feinsaure Gemüse durch Betriebe hergestellt (BZL 2021). Minimal verarbeitete Frischgemüse sind vor allem Fresh-Cut Salate und Fresh-Cut Gemüse. Hierbei wird die Rohware meist innerhalb von 24 Stunden nach Ernte in die Kühllager der Verarbeitungsbetriebe gebracht und sofort oder innerhalb weniger Tage prozessiert (Hortipendium; BZL 2021). Die industrielle Verarbeitung besteht aus einer Vorsortierung der eintreffenden Rohware, bevor diese im Kühllager aufbewahrt wird (Hortipendium). Entsprechend den Produktionsplänen wird dann Material aus dem Lager entnommen und im Vorputzbereich von äußeren Beschmutzungen und nicht verzehrfähigem Material wie beispielsweise der Strunk bei Salat oder die Schale/Blattansatz bei Möhren befreit. Produktabhängig folgen Wasch- und Schneideschritte, wobei bei Fresh-Cut Salaten zuerst geschnitten und anschließend gewaschen wird. Eine schematische Darstellung der maschinellen Verarbeitung ist in Abbildung 2 dargestellt.



**Abbildung 2**

*Schematische Darstellung einer industriellen Produktionsanlage von verzehrfertigen Fresh-Cut Salaten. Im Vorputzbereich werden die äußeren Blätter und nicht verzehrfähige Anteile per Hand entfernt (A). Es folgt der Transport in die Schneideanlage (B). Die geschnittenen Produkte werden in zwei Waschbecken gewaschen (C, E), mit Frischwasser besprüht (D, F), anschließend durch eine Salatschleuder (G) getrocknet und zur Abfülleinrichtung (H) transportiert. Die portionierten und verpackten Einheiten (I) werden für den Transport vorbereitet. Die Abbildung wurde mit freundlicher Unterstützung von Markus Fiedler erstellt.*

Die vorgeputzten Salate werden über ein Fließband der Schneidemaschine zugeführt. Die geschnittenen Materialien gelangen dann in ein Wasserbad, welches durch Strömung und mechanische Schaufeln die Ware turbulent bewegt und auf ein Förderband überführt. Wasserdüsen reinigen das Material mit Frischwasser während des Transports zum zweiten Wasserbad. Hier wird analog dem ersten Wasserbad gewaschen und die Ware über ein Förderband in die industrielle Salatschleuder transportiert. Anschließend folgen die Trocknung, Portionierung und Verpackung. Die Ware wird schlussendlich an die Logistikzentren verteilt oder direkt zu den Märkten ausgeliefert.

Im Gegensatz zu anderen Ländern sind in Deutschland chemische Zusätze zur Desinfektion des Waschwassers bei Fresh-Cut Produkten unzulässig (EFSA 2015; Corato 2020; Praeger et al. 2018). Den Einsatz des in den USA gebräuchlichsten Desinfektionsmittels Chlor (50-200 mg/l Waschwasser) hat die EU für das Waschen von tierischen Produkten verboten und für pflanzliche Produkte unter die nationalen Gesetzgebungen der Mitgliedsländer gestellt (EFSA 2015; Corato 2020). Demnach stellt der Waschschrift von frischen pflanzlichen Produkten in Deutschland eine technisch und mikrobiologisch besondere Herausforderung dar.

### **1.3. Humanpathogene Bakterien in frischen pflanzlichen Produkten**

Ein sensorisch optimales frisches Produkt kann dennoch humanpathogene Bakterien beinhalten. Im Gegensatz zum Verderb kann die Konsumentin und der Konsument (im Folgenden Konsument genannt) diese Gefahr bei pflanzlichen Produkten sensorisch nicht wahrnehmen. Lebensmittelinfektionen sind Erkrankungen, die durch

den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln auftreten und durch pathogene Bakterien, Viren oder Protozoen, Schimmelpilze und Helminthen verursacht werden (Harris et al. 2003). Dabei kann die Erkrankung durch den Erreger selbst oder durch dessen Stoffwechselprodukte (z. B. Toxine) ausgelöst werden (Weber 2013). Ausbruchsquellen sind überwiegend Lebensmittel tierischen Ursprungs, aber auch pflanzliche Produkte können Krankheitsausbrüche verursachen. So wurden 2019 in Europa 7,1 % der Infektionsausbrüche durch pflanzliche Lebensmittel (z. B. Gemüse), 21,1 % durch Fleisch und Fleischprodukte und 27,0 % durch Meeresfrüchte und Fisch verursacht (EFSA 2021a). Der Ausbruch des enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) O104:H4 im Jahr 2011 hat das Bewusstsein für Lebensmittelinfektionen gerade auch bei pflanzlichen Produkten erhöht. Als Ursache wurden kontaminierte Sprossen identifiziert (Beutin und Martin 2012). Innerhalb von 13 Wochen forderte diese Epidemie 52 Todesopfer bei ca. 4.000 Infizierten (Beutin und Martin 2012). Neben den gesundheitlichen Spätfolgen, wie neurologischen und nephrologischen Schäden, führten auch die ökonomischen Auswirkungen zu einem Umdenken in der Mikrobiologie (Hoffmann et al. 2012; Beutin und Martin 2012). Es zeigte sich, dass frische pflanzliche Produkte bei Ausbruchsgeschehen ebenso wie tierische Produkte in Betracht zu ziehen sind und unbekanntes genomisches Potential aufweisen können. Dieser EHEC O104:H4 entwickelte sich aus einem unbedeutenden enteroaggregativen *E. coli* durch Integration eines Shigatoxin 2 Phagens zu einer extrem aggressiven Variante (Mellmann et al. 2011; Beutin und Martin 2012). Allein auf Grundlage der genetischen Ausstattung wäre zu dieser Zeit nicht mit diesen schweren Verläufen gerechnet worden (Beutin und Martin 2012). Außerdem zeigte diese Epidemie auch Verbesserungspotentiale für Nachweis- und Typisierungsmethoden sowie den Informationsaustausch zwischen den Akteuren (Beutin und Martin 2012; Karch et al. 2012).

Pflanzliche Produkte können mit einer Vielzahl an Mikroorganismen kontaminiert sein, wie pathogene *E. coli*, *Salmonella* spp., *Listeria* (*L.*) *monocytogenes*, *Shigella* spp., *Clostridium botulinum*, *Aeromonas* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter* spp., *Bacillus* (*B.*) *cereus* und *Staphylococcus* (*St.*) *aureus*, Viren (Norovirus, Hepatitis-Virus A und E) und Parasiten (*Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Giardia*) (Harris et al. 2003; Callejón et al. 2015; Alegbeleye et al. 2018). Kontaminierte Produkte führten zu einer Vielzahl von lebensmittelbedingten Ausbrüchen (Michino et al. 1999; Harris et al. 2003; Olaimat und Holley 2012; Kozak et al. 2013; Callejón et al. 2015). Eine Auswahl an schweren Ausbrüchen ist in Tabelle 1 aufgeführt. Infektionen mit EHEC, *Salmonella enterica* und Noroviren gehören in Europa zu den am häufigsten beschriebenen lebensmittelbedingten Ausbrüchen für Lebensmittel nicht tierischen Ursprungs (Da Silva Felício et al. 2015; Callejón et al. 2015; EFSA 2018).

**Tabelle 1**

*Auswahl von lebensmittelbedingten Ausbrüchen (pflanzliche Produkte) durch verschiedene Infektionserreger.*

Humanpathogen	Jahr und Land	Assoziiertes Produkt	Infizierte (Tote)	Quelle
<i>Campylobacter jejuni</i>	1984, USA	Salat	330 (0)	(Harris et al. 2003)
<i>Cyclospora cayatenansis</i>	1997, USA	Basilikum	>300 (0)	(Harris et al. 2003)
EHEC	1996, Japan	Sprossen (weißer Rettich)	9.451 (12)	(Michino et al. 1999)
EHEC	2011, Deutschland/ Europa	Sprossen (Bockshorn)	>4.000 (52)	(Beutin und Martin 2012)
EHEC	2020, USA	Romanasalat	167 (0)	(CDC/FDA 2021)
EHEC	2018, USA	Romanasalat	210 (5)	(CDC/FDA 2021)
EHEC	2006, USA	Spinat	199 (3)	(CDC/FDA 2021)
Hepatitis A	1988, USA	Eissalat	202 (0)	(Harris et al. 2003)
<i>L. monocytogenes</i>	1981, Kanada	Gemüse	41 (17)	(Harris et al. 2003)
<i>L. monocytogenes</i>	2011, USA	Cantaloupe-Melone	147 (33)	(CDC/FDA 2021)
<i>L. monocytogenes</i>	2020, USA	Enoki-Pilze	36 (4)	(CDC/FDA 2021)
<i>L. monocytogenes</i>	2015/2016, USA	Geschnittener Salat	19 (1)	(CDC/FDA 2021)
<i>L. monocytogenes</i>	2015-2018, Europa	Gefrorener Mais	47 (9)	(ECDC/EFSA 2021a)
Norovirus ( <i>Norwalk</i> )	1990, USA	Geschnittenes Obst	>217 (0)	(Harris et al. 2003)
<i>Salmonella enterica</i>	1994, Schweden/ Finnland	Sprossen (Alfalfa)	595 (0)	(Harris et al. 2003)
<i>Salmonella enterica</i>	1996, USA	Sprossen (Alfalfa)	>500 (1)	(Harris et al. 2003)
<i>Salmonella enterica</i>	2005, Kanada	Sprossen (Mungbohne)	592	(Olaimat und Holley 2012)



Humanpathogen	Jahr und Land	Assoziiertes Produkt	Infizierte (Tote)	Quelle
<i>Salmonella enterica</i>	2008, USA/Kanada	Paprika	1.442 (2)	(Olaimat und Holley 2012)
<i>Salmonella enterica</i>	2020, USA	Zwiebeln	1.127 (0)	(CDC/FDA 2021)
<i>Salmonella enterica</i>	2019/2020, USA	Geschnittenes Obst	165 (0)	(CDC/FDA 2021)
<i>Salmonella enterica</i>	2017, USA	Papaya	220 (1)	(CDC/FDA 2021)
<i>Salmonella enterica</i>	2014, USA	Sprossen (Soja)	115 (0)	(CDC/FDA 2021)
<i>Salmonella enterica</i>	2015/2016, USA	Salatgurken	907 (6)	(CDC/FDA 2021)
<i>Salmonella enterica</i>	2021, Europa	Obst (Melone)	348 (0)	(ECDC/EFSA 2021a)
<i>Salmonella enterica</i>	2018, Europa	Geschnittener Salat (Gurke)	122 (0)	(ECDC/EFSA 2021a)
<i>Shigella sonnei</i>	1986, USA	Eissalat	347 (0)	(Harris et al. 2003)

Die rechtlichen Rahmenbedingungen für Lebensmittel werden durch das EU-Lebensmittelrecht mit der Verordnung (VO) (EG) 178/2002 definiert (Die Europäische Union 2002). Daneben greifen bei pflanzlichen Produkten die Verordnungen VO (EG) 852/2004, VO (EG) 882/2004 und VO (EG) 2073/2005. In Deutschland liefert das nach EU-Recht harmonisierte und ab 2005 gültige Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) den gesetzlichen Rahmen für die nationale Lebensmittelsicherheit. Neben dem Verbraucherschutz wurden die Ziele der Transparenz und Rückverfolgbarkeit auf allen Stufen der Lebensmittelkette berücksichtigt.

Neben dem Grundsatz „Lebensmittel, die nicht sicher sind, dürfen nicht in den Verkehr gebracht werden“ (VO (EG) 178/2002), stellen die mikrobiologischen Kriterien für Lebensmittel (VO (EG) 2073/2005) allgemeine und nach Produktgruppen definierte Anforderungen. Die Keimzahl von *L. monocytogenes* soll in Lebensmitteln generell unter 100 KbE/g liegen und VTEC (STEC) stellt eine Gefahr für die öffentliche Gesundheit in Frischerzeugnisse bzw. Rohkost dar, sodass deren Abwesenheit gefordert ist (VO (EG) 2073/2005). Werden Shiga<sub>2</sub>toxin- (Synonym: Verotoxin-) produzierende *E. coli* (STEC/VTEC) bei Personen mit Erkrankungssymptomen nachgewiesen, werden diese als enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) bezeichnet.

Spezifisch werden Sprossen und vorzerkleinertes Obst/Gemüse als Produkte definiert, in denen *Salmonella* nicht nachweisbar (0/5 Proben a 25 g) sein dürfen (VO (EG) 2073/2005). Ebenso dürfen in vorzerkleinertem Obst und Gemüse keine *E. coli* Keimzahlen über 1.000 KbE/g (1/5 Proben a 25 g) nachgewiesen werden (VO (EG) 2073/2005). Obst/Gemüse/Blattsalate werden nicht generell zu verzehrfertigen Lebensmitteln gezählt. Verzehrfertige Lebensmittel werden definiert als „Lebensmittel, die vom Erzeuger oder Hersteller zum unmittelbaren menschlichen Verzehr bestimmt sind, ohne dass eine weitere Erhitzung oder eine sonstige Verarbeitung zur Abtötung der entsprechenden Mikroorganismen oder zu deren Reduzierung auf ein akzeptables Niveau erforderlich ist“ (VO (EG) 2073/2005 Artikel 2 g). Hier muss im Einzelfall entschieden werden, ob die mikrobiologischen Kriterien der „Verzehrfertigen Lebensmittel“ bei bestimmten frischen pflanzlichen Produkten Anwendung finden (z. B. Suppengrün), was für die Grenzwerte von *L. monocytogenes* von Bedeutung ist. In der Praxis gelten Gemüse und Salate, die ohne Erhitzungsschritt verzehrt werden, beim Nachweis von *Salmonella* oder STEC als nicht verkehrsfähig.

Es gibt keine Möglichkeit, den Eintrag von potentiell gefährlichen Bakterien in frische Produkte auszuschließen. Jedoch kann das Verständnis für Vorkommen, Eintragswege und Differenzierung zur Verbesserung der Lebensmittelhygiene beitragen. Beispielsweise die Erkenntnis, dass *Salmonella* die Fähigkeit zur Invasion von pflanzlichem Gewebe (Internalisierung) besitzen, erweiterte das Verständnis für Kontaminationen (Erickson 2012; Burris et al. 2020; Schierstaedt et al. 2019). Erst mit diesem Wissen konnten potentielle Infektionsursachen erkannt und bewertet werden (Esteban-Cuesta et al. 2018).

In Europa werden jährlich etwa 50.000 Erkrankungen, 4.000 Hospitalisierungen und 60 Todesfälle mit ca. 5.000 lebensmittelbedingten Ausbrüchen assoziiert (EFSA 2021a). In Deutschland allein werden jährlich 400 lebensmittelbedingte Ausbrüche gemeldet (EFSA 2021a). Die nicht entdeckten oder nicht übermittelten Fälle liegen weit über diesen Zahlen. Erkrankungen mit *Salmonella* verursachen den Großteil der Hospitalisierungen und *L. monocytogenes* lösen die meisten tödlichen Infektionen aus (EFSA 2021a). Dabei zeigte die dramatische EHEC Epidemie 2011 in Norddeutschland mit 52 tödlichen Infektionen, wie innerhalb von 6 Wochen eine ähnliche Opferzahl zu beklagen ist, wie in ganz Europa durch Ausbrüche von Lebensmittelinfektionen in einem ganzen Jahr (2019) gemeldet wurden (Karch et al. 2012; EFSA 2021a).

## 1.4. Eintragswege humanpathogener und antibiotikaresistenter Bakterien in die Lebensmittelkette

Eine Kontamination mit unerwünschten bzw. humanpathogenen Mikroorganismen kann im Anbau sowie bei allen weiteren Schritten der Produktionskette dieser Nahrungsmittel erfolgen (Olaimat und Holley 2012). Im Anbau von Gemüse gibt es unterschiedliche Eintragswege von humanpathogenen und antibiotikaresistenten Bakterien und diese Stufe wird auch als hauptsächliche Quelle für initiale Kontaminationen angesehen (Abadias et al. 2008; Linke et al. 2014; Smith et al. 2018; Bennett et al. 2018; Alegbeleye et al. 2018; Cha et al. 2020). Über die Bewässerung werden pathogene und antibiotikaresistente Bakterien auf das Feld und auch direkt auf die Pflanzen gebracht (Gekenidis et al. 2018; Gu et al. 2020b; Raschle et al. 2021). Daneben kommt es zum Eintrag über die Ausscheidungen, wie Fäzes von Wildtieren (Vögel, Rehe, Wildschweine, Insekten etc.). Beispielsweise waren 26-75 % der Wasser/Tierfäzesproben aus der Nähe von Gemüsefeldern positiv für antibiotikaresistente Enterobakterien (ESBL) und 40 % der Reh-Fäzes STEC positiv (Miko et al. 2009; Cha et al. 2020; Plaza-Rodríguez et al. 2020). Zusätzlich stellt die organische Düngung einen Eintragsfaktor dar, der auch eine dauerhafte Besiedlung des Erdbodens mit Pathogenen und/oder resistenten Bakterien ermöglicht (Islam et al. 2004; Fremaux et al. 2008; Weller et al. 2015; Gekenidis et al. 2020). Auch der Eintrag über Aerosole oder Staub durch Wind ermöglicht eine Verbreitung, beispielsweise während der Düngung, Bewässerung oder Ernte (Glaize et al. 2021). Während der Ernte und Verarbeitung können auch Hygienemängel zu einem menschlichen Eintrag von Krankheitserregern führen (Baba et al. 2019; Bennett et al. 2018).

Neben diesen Eintragswegen führen Kreuzkontaminationen zu einer Verteilung und Etablierung von Bakterien. Bei Erntemaschinen, Transportbehältern und vor allem in den verarbeitenden Betrieben können sich schädliche Bakterien als Biofilme auf Oberflächen entwickeln und so über einen längeren Zeitraum persistieren (Leong et al. 2017). Punktuelle Anhaftungen an Produkten können auf Schneidewerkzeuge, Arbeitsbereiche, Förderbänder, Waschwasser und Abfüllanlagen übertragen werden, die wiederum nachfolgende Produkte kontaminieren (Leong et al. 2017; Gelbíčová et al. 2019).

Humanpathogene und antibiotikaresistente Bakterien können sich über die Lebensmittelkette verbreiten, dabei direkt oder indirekt wieder zurück in die Umwelt gelangen und Lebensmittel-liefernde Pflanzen und Tiere erneut besiedeln (Abbildung 3). Wie hoch der Anteil von Lebensmitteln an der Verbreitung ist, wird kontrovers diskutiert und bleibt Gegenstand aktueller Forschung, da eine Bewertung nur im zeitlichen Verlauf entwickelt werden kann.



Abbildung 3

*Schematische Darstellung der Verbreitung von humanpathogenen und antibiotikaresistenten Bakterien über die Lebensmittelkette. Lebensmittelproduktion und Verteilung sind Stufen (Text fett), die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Bilder: Icons made by freepik from Flaticon.com.*

### 1.4.1. *Salmonella*

*Salmonella* (*S.*) spp. sind Gram-negative, stäbchenförmige Bakterien, die zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehören (im Folgenden auch als Enterobakterien bezeichnet). Einige Vertreter der Enterobakterien können Erkrankungen hervorrufen (RKI 2021a). Durch *Salmonella* spp. (im Folgenden *Salmonella* genannt) werden mittlere bis schwere Durchfallerkrankungen ausgelöst (RKI 2021a). Diese Salmonellose genannte Darmentzündung heilt in der Regel auch ohne ärztliche Behandlung aus (RKI 2021a). Für eine Infektion gilt im Allgemeinen eine hohe Infektionsdosis von ca. 100.000 Bakterien als notwendig (Weber 2013; RKI 2021a). Dies ist allerdings stark vom Gesundheitszustand der betroffenen Person abhängig, wodurch eine Infektionsdosis ab 100 Bakterien möglich ist (RKI 2021a). 18 bis 72 Stunden nach Aufnahme treten die ersten Erkrankungssymptome auf (RKI 2021a). Die Sterberate bei Salmonellose liegt in der EU im Durchschnitt bei 0,22 % (EFSA 2021a) und betrifft meist ältere und abwehrgeschwächte Personen. Ein teilweise lebensbedrohlicher Flüssigkeitsverlust des Körpers führt hier zu schwersten Verläufen (RKI 2021a).

Als Reservoir für Salmonellen gelten der Magen-Darm-Trakt von Haus- und Wildtieren (z. B. Geflügel, Schweine, Reptilien), aber auch der Mensch kann symptomloser Ausscheider sein (RKI 2021a). Die Salmonellose ist eine klassische Lebensmittelinfektion (Weber 2013). Neben den diagnostizierten Fällen muss von

einer hohen Dunkelziffer von Infektionen ausgegangen werden (RKI 2021a). Im Jahr 2001 wurden in Deutschland noch 76.989 Erkrankungen registriert, welche sich bis 2016 auf 12.967 Fälle reduzierten (RKI 2021b). Aufgrund umfangreicher Impf- und Kontrollprogramme in Geflügelbetrieben konnten die Infektionen um fast 80 % reduziert werden (RKI 2021a). Im Jahr 2020 wurde mit nur 8.761 gemeldeten Salmonellosen ein neuer Tiefstwert erreicht (RKI 2021b), wobei die Einschränkungen durch die SARS-CoV-2-Pandemie vermutlich zur Reduktion beigetragen haben. Die Erkrankungen zeigen eine saisonale und demografische Abhängigkeit mit erhöhten Fallzahlen in den wärmeren Monaten und einem verstärkten Auftreten bei Kindern unter fünf Jahren (RKI 2021b). In Europa beträgt die Inzidenz der Salmonellose ca. 20 Fälle/100.000 Einwohner (2015-2019) mit einer Gesamtzahl von ca. 90.000 Erkrankungen pro Jahr (EFSA 2021a).

Die Taxonomie und Nomenklatur von Salmonellen ist sehr komplex und beruht auf historischen und molekularen Grundlagen. Die Gattung *Salmonella* beinhaltet aktuell zwei Spezies (*S. bongori*, *S. enterica*). Der Status der 2004 postulierten dritten Spezies *S. subterranea* ist strittig (Patrick A.D. Grimont & François-Xavier Weill 2007). Hauptsächlicher Verursacher von Erkrankungsfällen ist *Salmonella enterica* (synonym *S. enteritidis*) (EFSA 2021a). *Salmonella enterica* wird weiterhin in 6 Subspezies eingeteilt, von denen *Salmonella enterica* subsp. *enterica* die Gruppe der der medizinisch relevantesten Vertreter ist (RKI 2021a). Besonders wichtig ist, dass Salmonellen taxonomisch neben der Gattung, Spezies und Subspezies weiterhin in über 2.500 Serovare eingeteilt werden (Patrick A.D. Grimont & François-Xavier Weill 2007). Diese vierte Ebene der Serovare (nach Gattung, Spezies, Subspezies) bestimmt auch die gebräuchliche Bezeichnung, sodass beispielsweise *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Kiel als *Salmonella* Kiel bezeichnet wird. Die Serovare werden anhand des O- (Oberflächenantigen), H- (Geißelantigen) und K-Antigens (Hüllenantigen) durch das aktualisierte White-Kaufmann-Le Minor Schema zugeordnet (Patrick A.D. Grimont & François-Xavier Weill 2007). Mit etwa 50 % werden die Mehrheit der humanen Infektionen durch *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (kurz *Salmonella* Enteritidis) ausgelöst (EFSA 2021a).

Lebensmittel wie Eier und Eiprodukte sowie Geflügel und rohes Fleisch zählen zu den Risikoprodukten (RKI 2021a). Aber auch frische pflanzliche Produkte können Salmonellen übertragen (EFSA 2018, 2021a; Callejón et al. 2015). *Salmonella* werden auch in frischen pflanzlichen Produkten mit Prävalenzen zwischen 0,05 bis 5 % nachgewiesen (Olaimat und Holley 2012), wobei in Europa 0,49 % der Fresh-Cut Salate (2015-2018; n=9.533) *Salmonella* positiv waren (EFSA 2021a).

Diese *Salmonella* können über alle Stufen der Produktion und Verarbeitung auf die Produkte gelangen (Olaimat und Holley 2012). Als wichtigster Eintragsweg wird die

Kontamination durch fäkale Verunreinigungen auf dem Feld angesehen (Alegbeleye et al. 2018). Bis auf verarbeitete Produkte wie Fresh-Cut Salate schützt eine intakte Oberfläche vor Nährstoffaustritt und einer rapiden Vermehrung von Mikroorganismen (Bulgarelli et al. 2013). Im Fall von Fresh-Cut Produkten, welche aus diesem Grund gekühlt werden, kann prinzipiell auch eine Vermehrung stattfinden (Tournas 2005; Koukkidis et al. 2017). Da *Salmonella* unter 8 °C kein Wachstum zeigt, sondern eher eine Reduktion, ist bei Einhaltung der Kühlkette nicht mit einer Vermehrung von *Salmonella* zu rechnen (Tarlak et al. 2020).

#### 1.4.2. *Listeria monocytogenes*

*Listeria (L.) monocytogenes* ist ein Gram-positives, kokkoides Stäbchen, das zur Familie der *Listeriaceae* gehört und keine Sporen bildet (RKI 2021a).

Als Umweltkeim ist *L. monocytogenes* ubiquitär und weltweit verbreitet und kann gelegentlich bei gesunden Menschen im Stuhl nachgewiesen werden (Buchanan et al. 2017). Die für eine Infektion notwendige Infektionsdosis ist bei *L. monocytogenes* besonders stark vom Gesundheitszustand der betroffenen Person abhängig (Buchanan et al., 2017). Für eine Infektion werden im Allgemeinen relativ viele Bakterien benötigt (Infektionsdosis >10.000 Bakterien) (Buchanan et al. 2017). Bei älteren, schwangeren und Immunsystem-geschwächten Menschen können schon sehr viel geringere Mengen ausreichen (Buchanan et al. 2017). Durch die Fähigkeit, sich intrazellulär (im Gewebe) zu vermehren, werden Gewebegrenzen aktiv überwunden (Blut-Hirnschranke) und schwerste Infektionen (z. B. Sepsis, Hirnhautentzündung) ermöglicht (Listeriose) (RKI 2021a). Die Inkubationszeit beträgt zwischen 24 Stunden und fünf oder mehr Wochen (RKI 2021a). Die sehr hohe Sterberate bei Listeriose liegt in der EU im Durchschnitt bei 17,6 % (EFSA 2021b). Die Listeriose verursacht weiterhin die höchste Anzahl von Todesfällen unter den lebensmittelbedingten Infektionen in der EU und begründet alle Anstrengungen zur Vermeidung (EFSA 2021b).

Als Reservoir für Listerien gelten Böden, Abwässer, Oberflächengewässer, Haus- und Wildtiere und die Umwelt im Allgemeinen, aber auch der Mensch kann symptomloser Ausscheider sein (Buchanan et al. 2017; Gu et al. 2020b; Weller et al. 2015; Raschle et al. 2021). Die Listeriose ist eine klassische Lebensmittelinfektion (Weber 2013). Neben den diagnostizierten Fällen muss von einer hohen Dunkelziffer von asymptomatischen Infektionen ausgegangen werden (RKI 2021a).

Im Jahr 2001 wurden in Deutschland noch 217 Erkrankungen registriert, welche sich bis 2016 auf 699 Fälle erhöhten (RKI 2021b). Trotz SARS-CoV-2-Pandemie wurde 2020 mit 578 Listeriosen eine ähnlich hohe Zahl wie 2019 (n=592) gemeldet (RKI 2021b). Die Erkrankungen zeigen keine saisonalen, aber demografische Abhängigkeiten mit

ähnlichen Fallzahlen im Jahresverlauf und einem stetigen Risikoanstieg bei Personen ab 55 Jahren (RKI 2021b). Aufgrund der sehr ähnlichen Zahlen von 2019 und 2020 finden Infektionen wohl ausschließlich im privaten Umfeld statt. In Europa beträgt die Inzidenz der Listeriose ca. 0,5 Fälle/100.000 Einwohner (2015-2019) mit einer Gesamtzahl von ca. 2.500 Erkrankungen pro Jahr (EFSA 2021a). *L. monocytogenes* lässt sich in 13 Serovare subdifferenzieren, von denen die Serovare 4b, 1/2a und 1/2b besonders mit Erkrankungen des Menschen assoziiert sind (Robert Koch-Institut (RKI) 2010).

Lebensmitteln wie Rohfleisch- und Rohwurstprodukte, sowie roher Fisch, Rohmilchweickäse und verzehrfertige Salate zählen zu den Risikoprodukten (Robert Koch-Institut (RKI) 2010). Somit können frische pflanzliche Produkte eine ähnliche Gefährdung für abwehrgeschwächte Personen darstellen wie die bekannteren tierischen Produkte. *L. monocytogenes* wird dementsprechend häufiger in frischen pflanzlichen Produkten nachgewiesen, als *Salmonella* und pathogene *E. coli* mit Prävalenzen zwischen 1 bis 50 % (Olaimat und Holley 2012), wobei in Europa 1,7 % der Obst-/Gemüseproben und 3,5 % der Fresh-Cut Salate (2015-2019; n=2.357 und n=3.138) *L. monocytogenes* positiv waren (EFSA 2021a).

Der Eintrag erfolgt auf allen Stufen der Produktion und Verarbeitung (Olaimat und Holley 2012). Als größter Eintragsweg wird die Kontamination auf dem Feld angesehen (Buchanan et al. 2017). Die intakte Oberfläche von Gemüse/Salat wird durch das Zerkleinern bei Fresh-Cut Produkten zerstört und eine Kühlung wird notwendig, um die mikrobielle Vermehrung zu verlangsamen (Tournas 2005). Dennoch findet eine Vermehrung von *L. monocytogenes* statt, da trotz Einhaltung der Kühlkette (unter 8 °C) *L. monocytogenes* bei diesen Temperaturen zum Wachstum fähig ist (Buchanan et al. 2017; Smith et al. 2018; Culliney und Schmalenberger 2020). So wächst *L. monocytogenes* beispielsweise bei 5 °C mit ca. 0,013 log KbE/h (Carrasco et al. 2008).

### 1.4.3. Pathogene *Escherichia coli*

*Escherichia (E.) coli* sind Gram-negative, stäbchenförmige Bakterien, die wie *Salmonella* zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehören (RKI 2021a). Das Bakterium ist Teil der kommensalen Dickdarmflora von Menschen und warmblütigen Tieren (RKI 2021a). Jedoch können genetische Virulenzfaktoren (z. B. Toxingene) zu pathogenen *E. coli* führen, welche leichte bis schwere Durchfallerkrankungen auslösen können (*E. coli* Enteritis) (RKI 2021a). Die pathogene Variante des enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC/STEC) hat aufgrund der Schwere der verursachten Erkrankungen eine besondere Bedeutung. Durch die Fähigkeit zur Produktion von verschiedenen

Shigatoxinen (auch Verotoxin genannt) können diese STEC zu blutigen Durchfällen, Schädigungen der Blutgefäße und roten Blutkörperchen bis hin zu Nierenversagen führen (RKI 2021a). Ist ein STEC als Infektionsauslöser beim Menschen identifiziert, wird dieser als EHEC bezeichnet (RKI 2021a). Dabei können die Shigatoxine im menschlichen Körper neben der akuten Darmsymptomatik auch zu einem hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) führen (RKI 2021a). HUS schädigt die Nieren bis zur dauerhaften Dialysepflicht und irreparablen neurologischen Störungen. Ebenfalls können permanente Schädigungen weiterer Organe auftreten (RKI 2021a). Für eine Infektion gilt im Allgemeinen eine niedrige Infektionsdosis von ca. 100 Bakterien als ausreichend (RKI 2021a). Auch hier spielen der Gesundheitszustand der betroffenen Person und die frühkindliche Entwicklung der Säure-Barriere des Magens eine Rolle (Infektionsdosis 10-1.000 Bakterien) (RKI 2021a). 2 bis 10 Tagen nach Aufnahme treten die ersten Erkrankungssymptome auf (RKI 2021a). Die Sterberate bei EHEC-Gastroenteritis liegt in der EU im Durchschnitt bei 0,21 % (EFSA 2021a). Neben dem Durchfall-bedingten, lebensbedrohlichen Flüssigkeitsverlust des Körpers führen die Ausbildung von HUS zu schwersten Verläufen und irreversiblen Schädigungen (RKI 2021a).

Als Reservoir für STEC gelten der Magen-Darm-Trakt von wiederkäuenden Haus- und Wildtieren (z. B. Rind, Schaf, Ziege, Reh), aber auch der Mensch kann symptomloser Ausscheider sein (RKI 2021a). Die EHEC-Enteritis ist keine klassische Lebensmittelinfektion und wird erst seit den 1980ern intensiv untersucht (Weber 2013). Neben der Aufnahme über Lebensmittel führen Schmierinfektionen von tierischen oder humanen Fäkalspuren oder kontaminiertes Wasser zur oralen Aufnahme (RKI 2021a). Im Jahr 2001 wurden in Deutschland 942 Erkrankungen registriert, welche im Jahr 2011 mit dem EHEC Ausbruch in 4.907 Fällen gipfelten (Mellmann et al. 2011; RKI 2021b). In den folgenden Jahren wurden jährlich etwa 2.000 Erkrankungen (2016: 1.827 Fälle) registriert (RKI 2021b). Im Jahr 2020 wurde mit nur 1.371 gemeldeten EHEC-Erkrankungen ein neuer Tiefstwert seit 2011 erreicht (RKI 2021b). Wie bei *Salmonella* ist eine Reduktion der Infektionen durch die SARS-CoV-2-bedingten Maßnahmen wahrscheinlich. Die Erkrankungen zeigen leicht saisonale und stark demografische Abhängigkeiten mit erhöhten Fallzahlen in den wärmeren Monaten und einem verstärkten Auftreten bei Kindern unter fünf Jahren (RKI 2021b). In Europa beträgt die Inzidenz der EHEC-Enteritis ca. 1,6-2,3 Fälle/100.000 Einwohner (2015-2019) mit einer Gesamtzahl von ca. 6.000-8.000 Erkrankungen pro Jahr (EFSA 2021a).

Ähnlich wie bei *Salmonella* beruht die Taxonomie von *E. coli* auf historischen und molekularen Grundlagen. Die Spezies *E. coli* wird anhand des O- (Oberflächenantigen)



und H-Antigens (Geißelantigen) subtypisiert (RKI 2021a). Als bedeutendster Serotyp für humane Infektionen wird O157 angesehen (RKI 2021a).

Rohes Fleisch und Rohmilch von Wiederkäuern zählen zu den Risikoprodukten (RKI 2021a), aber auch frische pflanzliche Produkte können STEC übertragen (EFSA 2018, 2021a; Callejón et al. 2015). Die Nachweisraten in frischen pflanzlichen Produkten liegen bei bis zu 25 % (Olaimat und Holley 2012), wobei in Europa 0,35 % der Fresh-Cut Salate (2019; n=285) und 0,1 % der Gemüse/Obstproben (n=2.171) STEC positiv waren (EFSA 2021a). STEC können über alle Stufen der Produktion und Verarbeitung auf die Produkte gelangen (Olaimat und Holley 2012). Als wichtigster Eintragsweg wird die Kontamination durch fäkale Verunreinigungen auf dem Feld angesehen (Alegbeleye et al. 2018).

Da STEC unter 8 °C kein Wachstum zeigt, ist bei Einhaltung der Kühlkette (Fresh-Cut) mit keiner Vermehrung von STEC zu rechnen (Posada-Izquierdo et al. 2013). STEC bleiben unter 8 °C dennoch vital und infektiös. Bei 8 °C konnte sogar ein stammspezifisches, sehr geringes Wachstum von 0,0058 log KbE/h für O157:H7 festgestellt werden (Posada-Izquierdo et al. 2013).

#### 1.4.4. Toxin-bildende *Staphylococcus aureus* und *Bacillus cereus*

*Staphylococcus (St.) aureus* sind Gram-positive Kokken, die keine Sporen bilden (RKI 2021a). *St. aureus* besiedelt bei Säugetieren oft den Nasen- und Rachenraum, wird häufig beim Menschen nachgewiesen und gehört zu den bedeutendsten antibiotikaresistenten Infektionserregern (RKI 2021a). Diese Infektionen stehen grundsätzlich nicht mit dem Vorkommen von *St. aureus* in Lebensmitteln in Verbindung (Weber 2013). Im Lebensmittelbereich sind seine krankmachenden Eigenschaften durch die Bildung verschiedener hitzebeständiger Toxine in kontaminierten Lebensmitteln gekennzeichnet (Weber 2013). Diese werden *St. aureus* Enterotoxine (SAE) genannt und verursachen nach kurzer Inkubationszeit von 1-6 Stunden die typischen Symptome wie Erbrechen und Durchfall (Weber 2013). Dafür sind mehr als 100.000 Zellen je Gramm Lebensmittel und demnach sehr hohe Kontaminationen notwendig, um genügend Toxin im Lebensmittel zu produzieren und eine Intoxikation durch den Lebensmittelverzehr hervorzurufen (Weber 2013). Nach der Aufnahme kommt es im Magen-Darm-Trakt zu keiner nennenswerten Toxinproduktion (Weber 2013). In der Regel begrenzt das limitierte Nährstoffangebot auf frischen pflanzlichen Lebensmitteln die Vermehrung von *St. aureus*, so dass lebensmittelbedingte Ausbrüche fast ausnahmslos durch nährstoffreiche Lebensmittel, wie Fleisch-, Ei-, Milchprodukte und kohlenhydratreiche Lebensmittel verursacht werden (Weber 2013; RKI 2021a).

*Bacillus (B.) cereus* sind Gram-positive, Endosporen-bildende Stäbchen. *B. cereus* bildet verschiedene Toxine, die zu Durchfall oder Erbrechen führen können (Stenfors Arnesen et al. 2008; Granum 2017). Taxonomisch werden verschiedene Vertreter mit sehr ähnlichen genetischen Eigenschaften zur *B. cereus*-Gruppe (*B. cereus sensu lato*) zusammengefasst (Liu et al. 2015).

Die *B. cereus sensu lato* Gruppe besteht aus *B. anthracis*, *B. cereus sensu stricto (s.s.)*, *B. cytotoxicus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis* und *B. toyonensis* (Liu et al. 2015). Trotz hoher genetischer Ähnlichkeit gibt es große Unterschiede im Bezug zur Pathogenität, was beispielsweise *B. anthracis* mit zwei zusätzlichen Plasmiden voller Virulenzgene als Milzbranderreger zeigt (RKI 2021a). Bis auf *B. anthracis* sind die genannten Spezies als Umweltkeime ubiquitär vorhanden und kommen in Böden und auf Pflanzen vor (Stenfors Arnesen et al. 2008; RKI 2021a). Eine Eintragsquelle in der Landwirtschaft ist die Anwendung von Biopestiziden auf Basis von *B. thuringiensis* (Bonis et al. 2021). Zur biologischen Schädlingsbekämpfung werden aktive *B. thuringiensis* Stämme großflächig auf Anbauflächen ausgebracht (Bonis et al. 2021). Durch die Produktion des insektiziden Bt-Toxins werden Schadorganismen bekämpft (Bonis et al. 2021).

Im Gegensatz zum nicht humantoxischen Bt-Toxin bildet die *B. cereus*-Gruppe eine Vielzahl an weiteren humanrelevanten Toxinen (Stenfors Arnesen et al. 2008; Samapundo et al. 2011; Granum 2017; Berthold-Pluta et al. 2019; Bonis et al. 2021). Hier sind die Enterotoxine Hämolyisin BL, nicht-hämolytisches Enterotoxin, Cytotoxin K und das emetische Toxin Cereulid zu nennen (Granum 2017). Die Toxinproduktion und die Potenz der verschiedenen Toxine sind äußerst variabel und von genetischen und Umwelt Faktoren abhängig (Granum 2017; Berthold-Pluta et al. 2019). Aufgrund dieser Heterogenität der Toxine lässt sich die notwendige Infektionsdosis nur annähernd beziffern. Sie wurde im Allgemeinen mit 10.000-100.000 Bakterienzellen je Gramm Lebensmittel angegeben (Weber 2013; Granum 2017). In den letzten Jahren wurde von Ausbrüchen mit Lebensmitteln berichtet, in denen deutlich geringere Zellzahlen gefunden wurden (Bonis et al. 2021). Gegenwärtig findet daher eine intensive Diskussion über einen unbedenklichen Schwellenwert statt. Ähnlich zu den *St. aureus* Toxinen wird das hitzestabile, emetische Cereulid im Lebensmittel gebildet, welches beim Verzehr zu einer Intoxikation führt (Weber 2013). Nach kurzer Inkubationszeit von 1-6 Stunden beginnen die typischen Symptome wie Erbrechen und Durchfall (Weber 2013; Granum 2017). Die Enterotoxine wiederum werden erst nach Aufnahme der vitalen Zellen im Darm-Trakt gebildet (Lebensmittelinfektion bzw. Toxin-Infektion) (Weber 2013; Granum 2017). Nach einer Inkubationszeit von 3-16 Stunden kommt es zu schwerem Durchfall (Weber 2013; Granum 2017).

Lebensmittelbedingte Ausbrüche betreffen zumeist kohlenhydratreiche Lebensmittel, wie unsachgemäß gekühlte Reis- und Nudelprodukte, selten sind auch Milchprodukte involviert (Weber 2013). In der Regel begrenzt das geringe Nährstoffangebot und die konkurrierenden Bakterien die Vermehrung von *B. cereus* auf Salat und Gemüse. Die wenigen Literaturangaben für Gemüse beschreiben einen regelmäßigen Nachweis von *B. cereus* (Beuchat 1996). Bei Stämmen die von Möhren isoliert wurden, konnten die Toxingene *hbl*, *nhe* und *cytK* nachgewiesen werden (Samapundo et al. 2011). Prinzipiell wurde auch ein stammspezifisches Wachstum bei 8 °C gezeigt, sodass eine Vermehrung in gekühlten Fresh-Cut Produkten möglich erscheint (Samapundo et al. 2011).

#### 1.4.5. Antibiotikaresistente Bakterien

Antibiotika sind chemische Verbindungen, welche Mikroorganismen beim Wachstum hemmen oder abtöten (Davies und Davies 2010). Wichtige Angriffsorte von Antibiotika sind beispielsweise die Zellwand ( $\beta$ -Laktame), die Nukleinsäuresynthese (Chinolone), die ribosomale Proteinbiosynthese (Tetracycline und Aminoglykoside) und die Cytoplasmamembran (Polymyxine und Daptomycin) (Hächler et al. 2017).  $\beta$ -Laktam-Antibiotika sind kostengünstig, gut verträglich, oft wirkungsvoll und gehören daher zu den am häufigsten eingesetzten Substanzgruppen in der Humanmedizin (Bush und Bradford 2016). In den vergangenen Jahren wurde weltweit ein Anstieg von Resistenzen gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika bei Gramnegativen Bakterien festgestellt (Pitout et al. 2005; Davies und Davies 2010; Vasoo et al. 2015). Verschiedene molekulare und substratabhängige Klassifizierungen kategorisieren die Resistenz- verursachenden  $\beta$ -Laktamasen (Bush und Jacoby 2010; Vasoo et al. 2015; Bush 2018). So können  $\beta$ -Laktamasen beispielsweise in AmpC, ESBL und Carbapenemasen unterschieden werden (Bush und Jacoby 2010). Als „Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases“ (ESBLs) werden Enzyme bezeichnet, die Oxyimino-Cephalosporine (wie z. B. Ceftazidim, Cefotaxim und Cefpodoxim), nicht jedoch Carbapeneme und Cephamycine, inaktivieren (Bush und Jacoby 2010). Diese ESBLs werden durch  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren wie Clavulansäure inhibiert (Bush und Bradford 2016). Ihre Einteilung wird aufgrund hunderter verschiedener ESBL-Gene mit tausenden Genvarianten ständig weiterentwickelt (Bush und Jacoby 2010; Bush 2018). Die Cefotaximase-Munich (CTX-M) hat sich seit ihrer Entdeckung (1989) zu der einflussreichsten ESBL-Familie entwickelt (Cantón und Coque 2006; Bevan et al. 2017; Bush 2018; EFSA 2021b). Eine sehr hohe Enzymaktivität und eine weltweite Verbreitung sorgen für die höhere Relevanz von CTX-M im Vergleich zu anderen ESBL Enzymen wie TEM, SHV, PER, VEB und OXA (Bevan et al. 2017). Die

Carbapenemasen verschlechtern die Therapieoptionen noch massiver als ESBL (Bush 2018). Auch wenn Carbapenemasen weltweit verbreitet sind, wurden diese bisher nur selten in Deutschland nachgewiesen (Lübbert et al. 2015; Köck et al. 2018; EFSA 2021b). Die notwendigen Resistenzgene werden in der Regel über Plasmide weitergegeben (Davies und Davies 2010; Hächler et al. 2017; Bush 2018). Der Gen-Austausch zwischen Bakterien ist ein natürlicher und notwendiger Mechanismus und wird horizontaler Gentransfer (HGT) genannt (Davies und Davies 2010; Hächler et al. 2017). Der HGT ist elementar für die genomische Plastizität, die für eine Anpassung an Umweltbedingungen notwendig ist. Dabei dienen mobile genetische Elemente (MGE) dem Ein-, Aus- und Umbau von Genen und genomischen Regionen zwischen chromosomaler und Plasmid-DNA (Davies und Davies 2010; Smet et al. 2010).

Parallel zum Auftreten von Antibiotikaresistenzen im humanmedizinischen Bereich, wurden auch Resistenzen im Veterinärbereich festgestellt (Davies und Davies 2010). Wenig später wurden diese Resistenzen auch in Lebensmitteln und anderen Umweltsystemen nachgewiesen (Cantón und Coque 2006; Davies und Davies 2010). Pflanzliche Lebensmittel beherbergen eine große Vielfalt an Bakterien und demnach auch an Resistenzgenen (Alegbeleye et al. 2018). Dies fand lange Zeit wenig Beachtung, da Antibiotika in der pflanzlichen Lebensmittelproduktion nicht eingesetzt werden (Gekenidis et al. 2018). Das Ökosystem der pflanzlichen Erzeugung ist aber auf natürliche Art und Weise zahlreichen Kontaminationsquellen ausgesetzt (Gekenidis et al. 2018; Plaza-Rodríguez et al. 2020). Über den Boden, Wasser und Luft werden antibiotikaresistente Bakterien eingetragen, etablieren sich in der Umwelt und werden auf pflanzliche Produkte übertragen (Heuer et al. 2011; Hartmann et al. 2012; Gekenidis et al. 2020; Siller et al. 2021). Durch den häufig rohen Verzehr von Gemüse und Salat können diese Produkte als potentielle Überträger von humanpathogenen und auch antibiotikaresistenten Bakterien fungieren (Blau et al. 2018). Bei asymptomatischer Trägerschaft können Menschen ein höheres Risiko im Fall einer medizinischen Behandlung besitzen (Denkel et al. 2020).

In pflanzlichen Produkten wurden regelmäßig antibiotikaresistente Bakterien gefunden (Schwaiger et al. 2011; Bengtsson-Palme et al. 2018). Neben Aminoglykosiden, Penicillinen und Makroliden sind Tetracykline die am häufigsten in der Nutztierhaltung eingesetzten Wirkstoffgruppen (Köper et al. 2020). Über organische Dünger wurden deren Stoffwechselprodukte in die Umwelt gebracht, sodass sich Antibiotikaresistenzen gegenüber diesen Stoffen in der Umwelt angereichert haben (Heuer et al. 2011; Pruden et al. 2013). Die Ausbreitung von ESBL-bildenden Enterobakterien in die Umwelt wird erst seit den 2000er Jahren beschrieben,

sodass von einer „genetischen Umweltverschmutzung“ gesprochen werden kann (Pitout et al. 2005; Cantón und Coque 2006; Guenther et al. 2011; Bevan et al. 2017). Neben den hohen ESBL-Nachweisraten von 10-80 % in Fleischprodukten (EFSA 2021b), wurden diese Bakterien mittlerweile auch in pflanzlichen Produkten (Egea et al. 2011; Reuland et al. 2014), Böden (Hartmann et al. 2012; Gekenidis et al. 2020), Gewässern (Zurfluh et al. 2013; Gekenidis et al. 2018) und in Wildtieren (Carattoli 2008; Plaza-Rodríguez et al. 2020) nachgewiesen. Eine Transmission über Wind ist zwar möglich, aber nach neusten Untersuchungen wohl von geringer Bedeutung (Siller et al. 2021).

## 1.5. Ganzgenomsequenzierung in der Lebensmittelsicherheit

Die Differenzierung und Typisierung (pathogener) Bakterien erfolgte im 20. Jahrhundert zumeist über biochemische und klassisch serologische Methoden (Weber 2013). Die in den 1980ern entwickelten molekularen Methoden, wie DNA Sequenzierung nach Sanger, Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) und Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) erweiterten die Möglichkeiten der Charakterisierung immens (Weber 2013). So wurden viele dieser molekularen Methoden in den 1990ern etabliert und stetig weiterentwickelt, so dass verschiedene Populationen einer Spezies in molekulare Phylogruppen eingeteilt werden konnten (Denamur et al. 2021). Markergene, Virulenzfaktor-Gene und Resistenzgene wurden ermittelt und verglichen und die molekulare Serotypisierung ersetzte zum Teil die klassische Serotypisierung, die fast 100 Jahre Anwendung fand (Ochman und Selander 1984; Versalovic et al. 1991; Doumith et al. 2004; Achtman et al. 2012). Parallel dazu wurde die PFGE zum „Goldstandard“ für genomische Vergleiche und zur Aufdeckung von phylogenetischen Verwandtschaften (Tenover et al. 1995). Ein Nachteil der PFGE ist die geringe phylogenetische Aussagekraft zwischen genomisch sehr unterschiedlichen Stämmen. Die Nukleotidsequenz-basierten Methoden (PCR, Sequenzierung) ermöglichen eine semiquantitative Aussage zur klonalen Verwandtschaft anhand von Sequenzvergleichen, auch von sehr unterschiedlichen Genomen. Anhand von geeigneten Markergenen wurde die Multilokus-Sequenztypisierung (MLST) entwickelt (Maiden et al. 1998), wodurch genetische Strukturen der Bakterienpopulation in einen vergleichenden Kontext gesetzt werden konnten und Verwandtschaften identifiziert wurden (z. B. klonalen Linien). Zwar besitzt die PFGE eine sehr hohe Auflösung (hoch diskriminierend) um

Stammunterschiede zu detektieren, eine phylogenetische Struktur von sehr heterogenen Populationen ist allerdings nicht ableitbar. Durch die Etablierung der Ganzgenomsequenzierung in den 2010ern konnten die Vorteile der MLST und PFGE vereinigt werden. Die Erweiterung der MLST auf das Kerngenom (core genome, cgMLST) oder das ganze Genom (whole genome, wgMLST) bieten sehr hohe Auflösungen zur verwandtschaftlichen Analyse und zur phylogenetischen Einordnung von Stämmen (Chen et al. 2017; Li et al. 2017).

Werden sehr eng verwandte Stämme verglichen (Ausbruchsgeschehen etc.), besitzen SNP (Single Nucleotide Polymorphism)-basierte Analysen die höchste Auflösungskraft und detektieren Unterschiede zwischen einzelnen Nukleotiden (Chen et al. 2017; Li et al. 2017). Da bei SNP-Analysen kodierende Sequenzabschnitte und intergenische Regionen berücksichtigt werden, sind diese in ihrem Auflösungsvermögen den MLST Techniken überlegen. Alle diese Ganzgenombasierten Methoden befinden sich in stetiger Weiterentwicklung (Bush et al. 2020). Wie bei der klassischen MLST gibt es verschiedene Techniken, aus denen sich im Laufe der Zeit eine Referenztechnik bzw. ein standardisiertes Typisierungsschema entwickelte. Bei der klassischen MLST waren es beispielsweise für *E. coli* ursprünglich 3 unterschiedliche MLST-Schemata, aus denen sich das „Warwick“ Schema zum internationalen Standard verbreitete (Maiden et al. 1998; Denamur et al. 2021). Bei cgMLST und wgMLST sind aktuell ebenfalls verschiedene Techniken publiziert, wobei spezifische Datenbanken und Schemata wie *Enterobase* vornehmlich genutzt werden (Zhou et al. 2020b). Bei SNP-Analysen gibt es hunderte technische Möglichkeiten, eine Vielzahl an publizierten Pipelines und eine äußerst aktive Weiterentwicklung (Bush et al. 2020). Die auf ein universelles Kern-Genom (core genome) reduzierten SNP-Analysen bieten Ansatzpunkte für direkte Vergleiche, jedoch reduziert diese Herangehensweise das potentielle Auflösungsvermögen (Bush et al. 2020). Demnach bleibt auf absehbare Zeit die Schwierigkeit bestehen, das ermittelte SNP-Werte nicht ohne methodische Prüfung mit den Ergebnissen anderer Studien vergleichbar sind. Gegenüber der PFGE, der bisherigen Referenzmethode für den Vergleich von Isolaten, zeigen SNP-Analysen deutlich Vorteile in der Präzision. Die PFGE zeigt Unterschiede bei genomischen Integrationen oder Deletionen an, wie bei Prophagen-Integration (Harrand et al. 2020). Dadurch können klonale Zusammenhänge unentdeckt bleiben, was gerade für persistierende *L. monocytogenes* in Lebensmittelbetrieben oder nosokomiale Infektionserreger zu falsch negativer Bewertung der klonalen Verwandtschaft führen kann (Stasiewicz et al. 2015; Li et al. 2017; Harrand et al. 2020). Auf der anderen Seite zeigen Spezies oder Subpopulationen, die eine geringe Genomvariabilität besitzen, identische PFGE Muster, obwohl diese über SNP-Analysen eindeutig Unterschiede (>50 SNPs) aufweisen (Keefer et al. 2019).

Neben phylogenetischen Analysen bieten vollständig sequenzierte Genome vielfältige Möglichkeiten, um Virulenzfaktoren, Antibiotikaresistenzen und Stoffwechselwege aufzuklären. Einmal gewonnene Sequenzdaten sind auch Jahre später für weitere Fragestellungen zugänglich und können zu jeder Zeit für vergleichende Untersuchungen einbezogen werden. Digitale Daten sind einfach und schnell austauschbar, was auch im Fall eines Ausbruchsgeschehens größte Vorteile mit sich bringt. Die Zahl der sequenzierten Genome steigt jährlich exponentiell an und damit auch die Möglichkeiten, mikrobiologische Veränderungen und Zusammenhänge im globalen Maßstab erkennen zu können.

## 1.6. Ziele dieser Arbeit

Bestimmte Bakterien können auf pflanzlichen Produkten eine Gefahr für den Verbraucher darstellen. Gerade beim Rohverzehr ist ein mikrobiologisch unbedenklicher Status des Produkts notwendig. Lebensmittelinfektionen durch pflanzliche Produkte wurden in den letzten Jahrzehnten vermehrt wahrgenommen, wobei Eintragswege von Bakterien und Interaktionen mit der Umwelt nicht ausreichend aufgeklärt sind (Callejón et al. 2015). Vertiefende mikrobiologische Studien mit modernen Analysemethoden sind notwendig, um Bakterien in Lebensmitteln ausreichend zu charakterisieren und letztendlich auch den anthropogenen Einfluss auf die Umwelt und dementsprechend auf pflanzliche Lebensmittel einschätzen zu können. Diese Studie zielte daher darauf ab, das Vorkommen humanpathogener und antibiotikaresistenter Bakterien, sowie den allgemeinen mikrobiologischen Status von frischen pflanzlichen Produkten eingehend zu untersuchen. Daraus ergaben sich die folgenden drei Themenfelder und zu beantwortenden Fragestellungen:

1. Untersuchung der kompletten Lebensmittelkette vom Feld bis zum Endprodukt mit dem Schwerpunkt auf der Verarbeitung zu Fresh-Cut Produkten, sowie auf Handelsebene mit dem Fokus auf Gemüse und Salate:

- Wie verändert sich der mikrobiologische Status bzw. die Mikrobiota während der Verarbeitung von Salat und Gemüse zu Fresh-Cut Produkten?
- Welchen mikrobiologischen Status besitzen verschiedene Produktgruppen von Gemüse und Salat?

Dafür wurden 240 Salat- und Gemüseproben während der Produktion auf den Stufen Feld, Lager, Vorputzbereich, Reinraum und Endprodukt untersucht, um die Produktkette zu analysieren. Der Fokus wurde dabei auf die Produktion von Fresh-Cut Produkten, einschließlich dem industriellen Waschprozess gelegt. Zusätzlich wurden 321 Salat- und Gemüseproben aus dem Einzelhandel auf deren mikrobiologischen Status hin untersucht.

2. Vorkommen und Charakterisierung von humanpathogenen (*Salmonella*, *L. monocytogenes*, STEC) und toxinogenen Bakterien in pflanzlichen Produkten und deren Verarbeitung:

- Welche Prävalenzen von pathogenen Bakterien sind bei Gemüse und Salat nachweisbar?
- Werden Unterschiede auf den verschiedenen Stufen der Verarbeitung festgestellt und können daraus Eintragswege identifiziert werden?



- Besitzen die eingehend charakterisierten Isolate einen Kontext zu medizinisch relevanten Isolaten oder zu Umweltisolaten und können Transferwege identifiziert werden, um Handlungsoptionen abzuleiten?

Dafür wurden 561 Salat- und Gemüseproben entlang der Produktkette auf *Salmonella*, *L. monocytogenes* und STEC untersucht. Die nachgewiesenen Pathogene wurden anhand von Ganzgenomsequenzierung eingehend charakterisiert und molekular mit bisher veröffentlichten Isolaten verglichen. Außerdem wurden 319 Proben auf das Vorkommen von *B. cereus* und deren Toxinbildungsvermögen hin untersucht, sowie 200 Proben auf das Vorkommen von *St. aureus*.

3. Untersuchung von durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) als kritisch definierten Antibiotikaresistenzen (ESBL und Carbapenemasen) bei frischen pflanzlichen Produkten (WHO 2017):

- Können ESBL- oder Carbapenemase-produzierende Enterobakterien in frischen pflanzlichen Produkten nachgewiesen werden?
- Können diese Spezies mit klinisch relevanten Stämmen oder Umweltisolaten in Verbindung gebracht werden?
- Können potentielle Eintragswege identifiziert werden?

Dafür wurden 239 Salat- und Gemüseproben auf das Vorkommen von ESBL-bildenden Enterobakterien geprüft. Davon wurden 112 Proben zusätzlich auf Carbapenemase-bildende Enterobakterien untersucht. Die antibiotikaresistenten Isolate wurden anhand ihrer Resistenzprofile und durch Ganzgenomsequenzierung eingehend charakterisiert und molekular mit bisher veröffentlichten Isolaten verglichen.

Mit der vorliegenden, umfassenden Untersuchung soll der mikrobiologische Status quo von Salat und Gemüseprodukten in Deutschland festgestellt werden, auf Grundlage dessen auch zukünftige Veränderungen im mikrobiologischen Status erfasst werden können.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Geräte

In Tabelle A 1 (Anhang) werden die in dieser Arbeit verwendeten Geräte, Modelle und deren Hersteller aufgeführt.

#### 2.1.2. Verbrauchsmaterialien, Enzyme und Kits

In Tabelle A 2 (Anhang) werden die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien und Kits mit deren Beschreibungen und Hersteller aufgeführt.

#### 2.1.3. Chemikalien, Lösungen und Puffer

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien werden in Tabelle A 3 (Anhang) dargestellt. Die verwendeten Lösungen und Puffer werden in Tabelle A 4 (Anhang) aufgelistet. Lösungen und Puffer wurden unter Verwendung von Reinstwasser (Sartorius AG) angesetzt. Deren pH-Wert wurde jeweils mit Salzsäure, Essigsäure, Milchsäure oder Natriumhydroxid am pH-Meter (Delta 340, Mettler-Toledo) eingestellt. Für sterile Arbeiten wurden vor Gebrauch die Lösungen und Puffer autoklaviert (15 min bei 121 °C) oder bei Hitzeempfindlichkeit steril-filtriert (Sarstedt).

#### 2.1.4. Nährmedien

Die in dieser Arbeit verwendeten festen Nährmedien werden in Tabelle 2 genannt. Die verwendeten flüssigen Nährmedien werden in Tabelle 3 aufgeführt.

Alle Nährmedien wurden grundsätzlich nach Herstellerangaben angesetzt, verarbeitet, pH-Wert geprüft und für 15 min bei 121 °C autoklaviert. VRBD-Agar wurde aufgeköcht und abgefüllt. Der pH-Wert wurde bei einem Abweichen von den Herstellervorgaben mit steriler 1 mol/l Salzsäure, 1 mol/l Essigsäure oder 1 mol/l Natriumhydroxidlösung adjustiert. Hitzesensitive Bestandteile wurden nach dem Autoklavieren und Abkühlen der Medien auf 50 °C hinzugegeben. Alle festen Medien wurden aseptisch, mittels Plattenabfüllautomat (Integra) zu je 20 ml pro Petrischale abgefüllt. Feste sowie flüssige Nährmedien wurden bis zur Benutzung bei 4 °C gelagert. YGC-Agar wurde nach dem Autoklavieren, zur Inhibierung von Pseudomonaden, mit steriler 10%iger Milchsäure auf pH 4,6 angesäuert (nach VDLUFA M7.7.1).

Tabelle 2

*Feste Nährböden, deren Verwendung und Herkunft.*

Name	Beschreibung	Firma
ALOA-Agar	Listerien-Agar nach Ottaviani und Agosti	VWR International GmbH, Darmstadt
ALOA-Agar Supplement	Listerien-Agar Supplement	VWR International GmbH, Darmstadt
BACARA®-Agar	BACARA®- <i>Bacillus cereus</i> Agar	bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen
Baird Parker-Agar	Agarmedium nach Baird-Parker	VWR International GmbH, Darmstadt
Baird Parker-Agar Supplement	Eigelb-Kaliumtellurit-Emulsion	VWR International GmbH, Darmstadt
CASO-Agar	Casein-Soja-Pepton (CASO) Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
CCA	Brilliance™ <i>E. coli</i> /coliform Agar	Oxoid Ltd., Hampshire, UK
Columbia-Agar	Blutagar	Oxoid Ltd., Hampshire, UK
CRE-Agar	Brilliance CRE Fertigplatten	Oxoid Ltd., Hampshire, UK
Enterohämolyisin-Agar	Enterohämolyisin Agar für STEC	Oxoid Ltd., Hampshire, UK
ESBL-Agar	Brilliance ESBL Fertigplatten	Oxoid Ltd., Hampshire, UK
MRS-Agar	<i>Lactobacillus</i> -Agar nach De Man, Rogosa und Sharpe	Merck KGaA, Darmstadt
Müller-Hinton-Agar	Zur Resistenztestung nach EUCAST	Oxoid Ltd., Hampshire, UK
Palcam-Agar	Palcam- <i>Listeria</i> -Selektiv-Agar nach VAN NETTEN et al.	Merck KGaA, Darmstadt
Palcam-Agar Supplement	Palcam- <i>Listeria</i> -Selektiv-Supplement	Merck KGaA, Darmstadt
PC-Agar	Plate count-Agar	VWR International GmbH, Darmstadt
PEMBA-Agar	Polymyxin pyruvate egg yolk mannitol bromothymol blue Agar	Sifin diagnostics GmbH, Berlin
PEMBA -Agar Supplement 1	Selektiv-Supplement Polymyxin B	Sifin diagnostics GmbH, Berlin
PEMBA -Agar Supplement 2	Eigelb Emulsion	Sifin diagnostics GmbH, Berlin
SSA-Agar	<i>Salmonella Shigella</i> (SS) Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Name	Beschreibung	Firma
STEC-Agar	CHROMagar STEC Fertigplatten	Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld
TBX-Agar	Tryptone Bile X-Glucuronide Agar	VWR International GmbH, Darmstadt
VRBD-Agar	Violet Red Bile Dextrose Agar	VWR International GmbH, Darmstadt
XLD-Agar	Xylose-Lysin-Desoxycholat- Agar	Oxoid Ltd., Hampshire, UK
YGC-Agar	Hefeextrakt-Glucose- Chloramphenicol-Agar	Merck KGaA, Darmstadt

Die Flüssigmedien (Tabelle 3) wurden unter sterilen Bedingungen zu je 9 ml in Reagenzröhrchen abgefüllt oder in 1 L Glasflaschen bei 4 °C bis zur Nutzung aufbewahrt.

**Tabelle 3**

*Flüssigmedien, deren Verwendung und Herkunft.*

Name	Beschreibung	Firma
BRILA (Brillantgrün-Galle- Laktose) Bouillon	<i>Enterobacteriales</i> Anreicherungsbouillon	Merck KGaA, Darmstadt
Fraser-Listerien-Selektiv- Bouillon	<i>Listeria</i> Anreicherungsbouillon	Merck KGaA, Darmstadt
Fraser-Listerien- Anreicherung-Supplement	Supplement	Merck KGaA, Darmstadt
Fraser-Listerien-Selektiv- Supplement	Supplement	Merck KGaA, Darmstadt
Gepuffertes Peptonwasser (BPW)	Nicht selektive Anreicherungsbouillon	VWR International GmbH, Darmstadt
Muller-Kauffmann- Tetrathionat-Novobiocin- Supplement	Supplement	Merck KGaA, Darmstadt
Müller-Kauffmann- Tetrathionat-Novobiocin- Anreicherungsbouillon (MKTTn)	<i>Salmonella</i> Anreicherungsbouillon	Merck KGaA, Darmstadt
<i>Salmonella</i> - Anreicherungsbouillon nach Rappaport und Vassiliadis (RVS-Bouillon)	<i>Salmonella</i> Anreicherungsbouillon	Oxoid Ltd., Hampshire, UK

### 2.1.5. Stammhaltung und Bakterienstämme

Die Bakterienstämme wurden wie in Tabelle 4 beschrieben auf den entsprechenden Agarplatten oder in Flüssigkulturen kultiviert. Zur Langzeitaufbewahrung von Bakterienstämmen wurden 700 µl einer Übernachtskultur zu 300 µl einer Glycerinlösung (80 %, AppliChem GmbH, Darmstadt) gegeben, durchmischt und bei -80 °C gelagert. Alternativ zur Glycerin-Konservierung wurden Roti Store-Cryoröhrchen (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) nach Herstellerangaben verwendet und bei -80 °C gelagert.

**Tabelle 4**

*Referenzstämme, deren Herkunft und Verwendung.*

Stamm	Herkunft	Verwendung
<i>B. cereus</i> ATCC® 10987	MRI Karlsruhe	Positiv-Kontrolle (Multiplex PCR für <i>cytK</i> )
<i>B. cereus</i> DSM 4312	MRI Karlsruhe	Positiv-Kontrolle (Multiplex PCR für <i>ces</i> )
<i>B. cereus</i> DSM 2301	MRI Karlsruhe	Positiv-Kontrolle (Multiplex PCR für <i>nhe</i> ), Medienkontrolle (PEMBA)
<i>B. cereus</i> MRI B200	MRI Kulmbach	Positiv-Kontrolle (Multiplex PCR für <i>hbl</i> )
<i>B. cereus</i> ATCC® 11778	MRI Karlsruhe	Medien- und Qualitätskontrolle, Resistenztestung (EUCAST, CLSI)
<i>E. coli</i> (ESBL+)	Bundeswehrkrankenhaus Kronshagen	Qualitätskontrolle, Resistenztestung (EUCAST, CLSI)
<i>E. coli</i> CCUG 58537	MRI Kiel	Qualitätskontrolle, Resistenztestung (EUCAST, CLSI)
<i>E. coli</i> O157:H7 (EDL 933) ATCC® 43895	MRI Kulmbach	Positiv-Kontrolle (Real Time und Multiplex PCR für <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>eae</i> )
<i>E. coli</i> O6:H1 ATCC® 25922	MRI Kiel	Medien- und Qualitätskontrolle (TBX, CCA), Resistenztestung (EUCAST, CLSI)
<i>L. monocytogenes</i> Serotype 1/2a	MRI Kiel	Positiv-Kontrolle (Multiplex PCR für Serovar Gruppe 1/2a, 3a)
<i>L. monocytogenes</i> Serotype 1/2b	MRI Kiel	Positiv-Kontrolle (Multiplex PCR für Serovar Gruppe 1/2b, 3b, 7), Medienkontrolle (ALOA-, Palcam-Agar)
<i>L. monocytogenes</i> Serotype 4b	MRI Kiel	Positiv-Kontrolle (Multiplex PCR für Serovar Gruppe 4b, 4d, 4e)
<i>Salmonella</i> Braenderup H9812 ATCC® 664	MRI Kiel	Medienkontrolle (XLD, SSA), Referenzmarker PFGE

Stamm	Herkunft	Verwendung
<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 2569	IMIKRO Uniklinik Rostock	Medienkontrolle (Baired Parker)

### 2.1.6. Software und Online-Tools

Die in Tabelle 5 aufgeführten Programme und Anwendungen wurden im Rahmen dieser Arbeit benutzt.

**Tabelle 5**

*Software und bioinformatische Programme.*

Name	Anwendung	Hersteller/Quelle	Quelle
MS Office (MS Word, MS Excel)	Text und Datenverarbeitung	Microsoft Cooperation, Redmond, USA	-
Integrated Microbial Next Generation Sequencing (IMNGS) 1.0	Analyse der <i>reads</i> der Mikrobiotadaten	<a href="https://www.imngs.org/">https://www.imngs.org/</a>	(Lagkouvardos et al. 2016)
RStudio	Scriptbasierte Verarbeitung der Mikrobiotadaten	<a href="https://www.rstudio.com/">https://www.rstudio.com/</a>	(RStudio Team 2015)
Enterobase	Genomdatenbank für <i>E. coli</i> und <i>Salmonella</i> , Serotypisierung SISTR1+SeqSero, cgMLST wgMLST	<a href="http://enterobase.warwick.ac.uk">http://enterobase.warwick.ac.uk</a>	(Zhou et al. 2020b; Alikhan et al. 2018)
FastQC	Qualitätskontrolle von Illumina- <i>reads</i>	<a href="https://www.patricbrc.org/">https://www.patricbrc.org/</a>	(Davis et al. 2020)
SPAdes	<i>de novo</i> Assembly	<a href="https://www.patricbrc.org/">https://www.patricbrc.org/</a>	(Bankevich et al. 2012)
RASTtk	Annotation	<a href="https://www.patricbrc.org/">https://www.patricbrc.org/</a>	(Brettin et al. 2015)
PATRIC (BRC) Bioinformatik Plattform	Phylogenetic Tree Building Service	<a href="https://www.patricbrc.org/">https://www.patricbrc.org/</a>	(Davis et al. 2020)
<i>Salmonella</i> Pathogenicity Islands	Detektion von Pathogenitätsinseln bei <i>Salmonella</i>	<a href="https://cge.cbs.dtu.dk/services/SPIFinder/">https://cge.cbs.dtu.dk/services/SPIFinder/</a>	(Roer et al. 2016)
PasteurMLST	Genomdatenbank für <i>Listeria</i> , MLST, cgMLST1748, wgMLST	<a href="https://bigsd.bpasteur.fr/listeria/listeria.html">https://bigsd.bpasteur.fr/listeria/listeria.html</a>	(Moura et al. 2016)

Name	Anwendung	Hersteller/Quelle	Quelle
CFSAN	SNP Pipeline	<a href="https://github.com/CFSAN-Biostatistics/snp-pipeline">https://github.com/CFSAN-Biostatistics/snp-pipeline</a>	(Davis et al. 2015)
Mash distance calculator	Genomische Abstandsschätzung mit MinHash	<a href="https://github.com/marbl/mash">https://github.com/marbl/mash</a>	(Ondov et al. 2016)
Type Genome Server (Strain)	Zur Spezies Identifikation	<a href="https://tygs.dsmz.de/">https://tygs.dsmz.de/</a>	(Meier-Kolthoff und Göker 2019)
ISfinder	Identifikation von Insertionselementen	<a href="https://www-is.biotoul.fr/">https://www-is.biotoul.fr/</a>	(Siguier et al. 2006)
NanoDrop 1.6.198	DNA-Konzentrationsmessung	Thermo Scientific, Waltham, USA	VWR, Darmstadt
MLST 2.0	MLST-Analyse	<a href="https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/">https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/</a>	(Larsen et al. 2012)
VirulenceFinder 2.0	Detektion von Virulenzfaktoren-Gene	<a href="https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/">https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/</a>	(Malberg Tetzschner et al. 2020)
VWR Image Capture Software 1.5.6.0	Geldokumentation	VWR International GmbH, Darmstadt	-
PlasmidFinder 2.1	Detektion von Plasmidsequenzen	<a href="https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/">https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/</a>	(Carattoli et al. 2014)
CFX Manager™ 2.1	<i>real-time</i> PCR Auswertung	Bio-Rad Laboratories GmbH, München	-
Genome-to-Genome distance calculator 2.1	Digitale Genom Hybridisierung	<a href="https://ggdc.dsmz.de/ggdc.php#">https://ggdc.dsmz.de/ggdc.php#</a>	(Meier-Kolthoff et al. 2013)
ResFinder 4.1	Detektion von Resistenzgenen	<a href="https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/">https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/</a>	(Bortolaia et al. 2020)
Geneious R9.1	Sequenzanalyse, Alignment, Vergleich und Visualisierung	Biomatters Ltd, Auckland, New Zealand	(Kearse et al. 2012)
JMP v.15.1	Statistische Analysen und Visualisierung	SAS Institute, Cary, North Carolina, USA	-
CSI Phylogeny 1.4	SNP Pipeline	<a href="https://cge.cbs.dtu.dk/services/CSIPhylogeny/">https://cge.cbs.dtu.dk/services/CSIPhylogeny/</a>	(Kaas et al. 2014)
Rhea Pipeline 1.6	Script zur Mikrobiota-Analyse	<a href="https://lagkouvardos.github.io/Rhea/">https://lagkouvardos.github.io/Rhea/</a>	(Lagkouvardos et al. 2017)
Inkscape 1.0.2-2	Visualisierung von Vektorgrafiken	<a href="https://inkscape.org/de/">https://inkscape.org/de/</a>	Software Freedom Conservancy

## 2.2. Probennahme

### 2.2.1. Handelsproben

Die Auswahl der pflanzlichen Frischeprodukte erfolgte auf Grundlage ihrer überdurchschnittlichen Verzehrmenge und zudem risikobasiert aufgrund von Literaturbeschreibungen (Harris et al. 2003; Olaimat und Holley 2012; MRI 2013; Da Silva Felício et al. 2015; Callejón et al. 2015; Gose et al. 2016). Alle Proben (Tabelle 6) wurden in norddeutschen Einzelhandels-, Super-, Discount- und Wochenmärkten gekauft (Kiel, Hamburg, Flensburg, Eckernförde, Plön, Preetz, Gelting, Friedrichstadt, Rostock, Berlin). Kühlpflichtige Proben (bei 4-7 °C angebotene Waren) wie verzehrfertige Mischsalate, Blattsalate und teilweise auch Sprossen und Kräuter wurden gekühlt bei <7 °C in das Labor transportiert und direkt analysiert oder bis zur Analyse bei 4 °C für maximal 36 h gelagert. Produkte, die nicht gekühlt angeboten wurden, wie Möhren, Gurken, Blattgemüse, Salatpflanzen, frische Kräuter und frische Pilze, wurden bei Umgebungstemperatur in das Labor transportiert und direkt analysiert oder bis zur Analyse bei 4 °C für maximal 36 h gelagert. Alle Produkte mit einem Mindesthaltbarkeitsdatum (MHD) wurden vor Ablauf verarbeitet. Obwohl Pilze systematisch keine pflanzlichen Produkte sind, wurden diese innerhalb dieser Studie ebenfalls als pflanzliche Frischeprodukte miteinbezogen.

**Tabelle 6**

*Produktproben aus Einzelhandels-, Super-, Discount- und Wochenmärkten.*

Zeitraum	Produktgruppe	Probenanzahl
2015	Blattgemüse (Blatt-, Pflück- und Schnittsalate, Feldsalat, Rucola)	n=40
	Gurken	n=40
	Möhren	n=40
	Geschnittene, verzehrfertige Salate	n=40
	frische Kräuter	n=40
	Sprossen	n=7
2016	Möhren	n=40
	frische Pilze	n=40
	Sprossen	n=32



### 2.2.2. Herstellerproben

Der beteiligte Betrieb verarbeitet Salat und Frischgemüse und befindet sich im süddeutschen Raum. Das Unternehmen nutzt täglich bis zu 120 Tonnen Rohwaren (v.a. Gemüse) zur Produktion von Fresh-Cut Produkten für den Einzelhandel- und Gastronomiesektor. Die Rohwaren werden auf eigenen Anbauflächen in Deutschland und Europa angebaut und auch von externen Erzeugern in Europa zugekauft.

Die Proben wurden im Betrieb an vier unabhängigen Zeitpunkten innerhalb von 12 Monaten (10.05.2016, 07.07.2016, 14.02.2017 und 17.05.2017) gesammelt (Tabelle 7). Alle Proben wurden bei  $<7\text{ °C}$  gekühlt in das Labor transportiert und innerhalb von 36 h analysiert.

**Tabelle 7**

*Produktproben aus der industriellen Verarbeitung.*

Zeitraum	Produktgruppe	Probenanzahl
2016-2017	Feldsalat	n=3
	Gartensalate (Bataviasalat, Eissalat, Romana, Salanova, Lollo Rosso, Lollo Bionda, Eichblatt – rot/grün, Baby Leaf)	n=77
	Gurke	n=9
	Kohl (Chinakohl, Pak Choi, Tatsoi, Weißkohl, Wirsing)	n=8
	Möhren	n=8
	Rucola	n=6
	Spinat	n=4
	Tomate	n=3
	Zichorie (Zuckerhut, Frisee, Radicchio, Chicorée)	n=54
	Salatmix (verzehrfertige, gemischte Salate)	n=51
	Diverse (Lauch, Fenchel, Rettich, Tomate, Aubergine, Brokkoli, Zucchini, Paprika, Kohlrabi, Champignons, frische Kräuter, Mangold, Radieschen)	n=17
	Gesamt	240 Produktproben in 11 Produktgruppen

*Waschwasserproben*

Beprobte wurde das zweite Wasserbad der am häufigsten genutzten Waschstraße. Die Waschstraße bestand aus der Schneideanlage, welche die geschnittenen Produkte in das erste Wasserbad überführte. Nach jedem Wasserbad wurde die Ware beim Transport auf den Förderbändern mit Frischwasser besprüht. Dieses Förderband transportierte die Produkte vom ersten Wasserbad in das zweite Wasserbad. Nach diesem Waschschrift wurde die Ware auf einem Förderband zur industriellen Salatschleuder verbracht, mittels Zentrifugalkraft getrocknet und in die Portionierungs- und Verpackungsmaschine transportiert. Die Wasserproben zur kulturellen Mikrobiologie wurden aseptisch in sterilen Behältnissen aus der Mitte der Wasserbadoberfläche abgefüllt. Für kulturelle Analysen wurden 50 ml Zentrifugenröhrchen verwendet. Für die Wasserproben zur Analyse des Mikrobioms wurden 200 ml Laborflaschen verwendet. Die Behältnisse wurden bei  $<7\text{ }^{\circ}\text{C}$  transportiert und innerhalb von 48 h bearbeitet.

**Tabelle 8**

*Waschwasserproben aus der industriellen Verarbeitung. Die Probennahme erfolgte am 10.05.2017.*

Probencode	Uhrzeit der Probennahme	Beladung der Waschstraße (mit Uhrzeit)
WP1	4:10	4:05 Uhr: Romanasalat (Produktionsstart)
WP2	4:30	Ab 4:20 Uhr: Frissee
WP3	4:50	Ab 4:36 Uhr: Lollo Rosso, Spinat Ab 5:05 Uhr: Lollo Bionda, Frissee, Romanasalat
WP4	5:10	Ab 5:27 Uhr: Eissalat, Radiccio
WP5	5:30	Eissalat, Radiccio
WP6	5:50	Eissalat, Radiccio
WP7	6:20	Ab 6:05 Uhr: Endivie, Frissee, Radiccio
WP8	6:50	Endivie, Frissee, Radiccio
WP9	7:20	Endivie, Frissee, Radiccio
WP10	7:52	Endivie, Frissee, Radiccio
WP11	8:22	Endivie, Frissee, Radiccio
WP12	8:52	Endivie, Frissee, Radiccio
WP13	9:30	Endivie, Frissee, Radiccio
WP14	9:50	Endivie, Frissee, Radiccio
WP15	10:20	Endivie, Frissee, Radiccio
WP16	10:50	Endivie, Frissee, Radiccio
WP17	11:20	Endivie, Frissee, Radiccio
WP18	11:50	Endivie, Frissee, Radiccio

## 2.3. Mikrobiologische Methoden

Grundsätzlich erfolgten die mikrobiologischen Untersuchungen und Auswertungen in Anlehnung an die amtliche Sammlung von Untersuchungsmethoden nach §64 LFGB, welche weitgehend mit den gültigen DIN/ISO Normen in Einklang stehen. Etwaige Anpassungen und spezifische Untersuchungsmethoden sind im Folgenden aufgeführt. Eine Übersicht der verwendeten mikrobiologischen Methoden ist in Tabelle 9 zu sehen.

**Tabelle 9**

*Übersicht der verwendeten mikrobiologischen Methoden.*

Proben	Quantitative Untersuchungen	Qualitative Untersuchungen
Handelsproben	Aerobe mesophile Koloniezahl	<i>Salmonella</i>
	L 00.00-88/2:2015-06 (LFGB)	ISO 6579:2007-10
	DIN EN ISO 4833-2 (DIN/ISO)	
	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	L 00.00-133/1-2 (LFGB)	L 00.00-32/1
	ISO 21528-2:2019-05 (DIN/ISO)	ISO 11290-1:2005-01
	präsumtive <i>Bacillus cereus</i>	Shigatoxin-produzierende
	L 00.00-33 (LFGB)	<i>E. coli</i> (STEC)
	ISO 7932:2005-03 (DIN/ISO)	L 00.00-150
		ISO 13136:2012
	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	L 00.00-56 (LFGB)	
	ISO 6888-1:2003-12 (DIN/ISO)	
	<i>L. monocytogenes</i>	
L 00.00-22 (LFGB)		
ISO 11290-2:2005-01 (DIN/ISO)		
<i>E. coli</i>		
L 00.00-132/3 (LFGB)		
ISO/TS 16649-3:2009-12 (DIN/ISO)		
Hefen und Schimmelpilze		
M 7.7.2 (LFGB)		
DIN 10186:2005-10 (DIN/ISO)		
Herstellerproben und Waschwasserproben	Aerobe mesophile Koloniezahl	<i>Salmonella</i>
	L 00.00-88/2:2015-06 (LFGB)	ISO 6579:2007-10
	DIN EN ISO 4833-2 (DIN/ISO)	

Proben	Quantitative Untersuchungen	Qualitative Untersuchungen
	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	L 00.00-133/1-2 (LFGB)	L 00.00-32/1
	ISO 21528-2:2019-05 (DIN/ISO)	ISO 11290-1:2005-01
	Hefen und Schimmelpilze	Shigatoxin-produzierende
	M 7.7.2	<i>E. coli</i> (STEC)
	DIN 10186:2005-10 (DIN/ISO)	L 00.00-150
		ISO 13136:2012
	<i>L. monocytogenes</i>	
	L 00.00-22 (LFGB)	
	ISO 11290-2:2005-01 (DIN/ISO)	
	<i>E. coli</i>	
	L 00.00-132/3 (LFGB)	
	ISO/TS 16649-3:2009-12 (DIN/ISO)	

Für die Detektion von STEC wurde neben der kulturellen Analyse auch der molekulare Nachweis nach ISO 13136:2012 mittels real-time PCR durchgeführt.

### 2.3.1. Kulturabhängige, quantitative Nachweise

#### 2.3.1.1. Produktproben

Jeweils 25 g, bestehend aus äußeren, mittleren und inneren Teilen der zu untersuchenden Lebensmittelprobe wurden aseptisch in einen sterilen Stomacherbeutel (VWR International GmbH, Darmstadt) überführt und mit 225 ml sterilem, gepuffertem Peptonwasser (BPW, VWR) vermischt (1:10 Verdünnung). Bei Möhren und Gurken wurden ca. 2 mm dicke Streifen der äußeren Schicht für die Analysen verwendet. Das gepufferte Peptonwasser sowie die Verdünnungslösung wurden vor Verwendung auf RT temperiert. Die Homogenisierung erfolgte für 2 min bei 200 rpm im Stomacher (Seward Ltd., Worthing, UK). Aus dieser homogenisierten Erstverdünnung wurde je 1 ml entnommen und eine dezimale Verdünnungsreihe in je 9 ml Verdünnungslösung hergestellt. Diese Verdünnungsreihe wurde für die bakteriologischen Untersuchungen verwendet.

Zur quantitativen Bestimmung der mesophilen Gesamtkeimzahl, coliformen/mesophilen *Enterobacteriaceae*, Milchsäurebakterien, präsumtive *B. cereus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *St. aureus*, Hefen und Schimmelpilze wurde das Spatelverfahren verwendet. Dafür wurden auf je 2 Agarplatten jeweils 500 µl der 10<sup>-1</sup> Verdünnung bzw. je 100 µl der Verdünnungsstufen 10<sup>-2</sup> – 10<sup>-6</sup> aus den entsprechenden

Verdünnungen gleichmäßig ausgespatelt. Die jeweiligen Bedingungen der verwendeten Kulturmethoden sind in Tabelle 10 dargestellt.

**Tabelle 10**

*Übersicht zu den verwendeten Parametern der mikrobiologischen Analysen von Produktproben (weitgehend nach §64 LFGB).*

Kulturmethode	Nährboden	Verdünnungsstufen	Inkubationsbedingungen	Ausgewertete Kolonienanzahl
Mesophile Gesamtkeimzahl (2015, 2016)	Plate Count	$10^{-3} - 10^{-6}$	30 °C, 72 ± 2 h, aerob	5-300
Coliforme <i>Enterobacteriaceae</i> (2015)	VRBD	$10^{-2} - 10^{-6}$	37 °C, 24 ± 2 h, aerob;	2-300
Mesophile <i>Enterobacteriaceae</i> (2016)			30 °C, 24 ± 2 h, anaerob	
Präsumtive <i>Bacillus cereus</i> (2015, 2016)	PEMBA Bacara™	$10^{-1} - 10^{-3}$	30 °C, 48 ± 2 h, aerob	2-200
<i>Escherichia coli</i> (2015, 2016)	CCA TBX	$10^{-1} - 10^{-3}$	41,5 °C, 20 ± 2 h, aerob;	1-300
<i>Listeria monocytogenes</i> (2015, 2016)	ALOA	$10^{-1} - 10^{-2}$	37 °C, 20 ± 2 h, aerob;	1-300
<i>Staphylococcus aureus</i> (2015)	Baird-Parker	$10^{-1} - 10^{-2}$	37 °C, 48 ± 2 h, aerob;	1-300
Hefen und Schimmelpilze (2015, 2016)	YGC, angesäuert auf pH 4,6 mit Milchsäure	$10^{-2} - 10^{-4}$	25 °C, 120 ± 2 h, aerob	5-200

### 2.3.1.2. Wasserproben

Aus den durch Invertieren durchmischten Wasserproben wurde je 1 ml entnommen und eine dezimale Verdünnungsreihe in je 9 ml Verdünnungslösung hergestellt. Für die bakteriologischen Untersuchungen wurden entweder die Wasserproben direkt oder deren Verdünnungsreihe verwendet. Es wurden jeweils 100 µl gleichmäßig ausgespatelt. Zur quantitativen Bestimmung der mesophilen Gesamtkeimzahl, coliformen *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, Hefen und Schimmelpilze

wurde das Spatelverfahren verwendet. Die jeweiligen Bedingungen sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11

*Übersicht zu den verwendeten Parametern der mikrobiologischen Analysen von Wasserproben.*

Kulturmethode	Nährboden	Verdünnungsstufen	Inkubationsbedingungen	Kolonieanzahl
Mesophile Gesamtkeimzahl	Plate Count	$10^{-3} - 10^{-5}$	30 °C, 72 ± 2 h, aerob	5-300
Coliforme <i>Enterobacteriaceae</i>	VRBD	$10^{-2} - 10^{-4}$	37 °C, 24 ± 2 h, aerob;	2-300
<i>E. coli</i>	TBX	$10^{-1}$	41,5 °C, 20 ± 2 h, aerob;	1-300
<i>L. monocytogenes</i>	ALOA	$10^{-1}$	37 °C, 20 ± 2 h, aerob;	1-300
Hefen und Schimmelpilze	YGC, angesäuert	$10^{-2} - 10^{-3}$	25 °C, 120 ± 2 h, aerob	5-200

### 2.3.1.3. Auswertung der ermittelten Keimzahlen bei Produkt- und Wasserproben

Zur Berechnung der Kolonie bildende Einheiten je Gramm (KbE/g) wurde die folgende Formel für alle aufgeführten Spatelverfahren verwendet.

$$\bar{C} = \frac{\sum C}{n_1 \times 1 + n_2 \times 0,1} \times d$$

$\bar{C}$  gewichteter arithmetischer Mittelwert der Koloniezahlen

$\sum C$  Summe der Kolonien aller auswertbaren Platten (niedrigste auswertbare Verdünnungsstufe und wenn auswertbar die folgende Höhere)

$n_1$  Anzahl der Platten der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe

$n_2$  Anzahl der Platten nächsthöheren auswertbaren Verdünnungsstufe

$d$  Verdünnungsfaktor der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe

Für Proben, welche kein Wachstum in der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe aufwiesen und die somit das untere Detektionslimit unterschritten, wurde eine Keimzahl von  $5 \cdot (\text{niedrigste Verdünnungsstufe} + 1)$  festgesetzt. Beispielsweise wurde beim Unterschreiten der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe von  $10^{-2}$  bei VRBD die Keimzahl mit  $5 \cdot 10^{-1}$  (50) festgelegt. Wurde

die Kolonie Anzahl in der höchsten auswertbaren Verdünnungsstufe überschritten, folgte entsprechend eine Keimzahlfestlegung von  $5^*(\text{höchste Verdünnungsstufe}-1)$ .

### 2.3.2. Kulturabhängige, qualitative Nachweise

Der quantitative Nachweis von Pathogenen nach Anreicherung, wurde wie in Tabelle 12 ersichtlich durchgeführt.

Tabelle 12

Übersicht der selektiven Anreicherungen für den Pathogennachweis.

Pathogennachweis	Unspezifische Anreicherung	Selektive Anreicherung	Selektivnährböden
<i>Salmonella</i> (ISO 6579:2007-10)		10 ml MKTTn (+1 ml BPW); (37 °C, 24 h)	XLD-Agar; SSA, (37 °C, 20-24 h)
<i>L. monocytogenes</i> (ISO 11290-1:2005-01)	10 ml BPW (37 °C, 16-20 h) bzw. 10 ml Halbfraser B. (37 °C, 16-20 h) bei	10 ml Vollfraser oder Palcam Bouillon (+0,1 ml BPW); (37 °C, 48 h)	ALOA-Agar; PALCAM-Agar (37 °C, 48 h)
STEC (ISO 13136:2012)	<i>L. monocytogenes</i>	9 ml BRILA (+1 ml BPW); (41,5 °C, 24 h)	Chromagar™ STEC, Enterohämölysin- Agar, TBX; (41,5 °C, 24 h)

#### 2.3.2.1. *Salmonella* spp.

Zur Untersuchung auf *Salmonella* wurden 25 g Probe in 225 ml BPW für 2 min bei 200 rpm homogenisiert und bei 37 °C für 16-20 h inkubiert. Anschließend wurden 0,1 ml des BPW in 10 ml RVS-Bouillon überführt bzw. 1 ml BPW in 9 ml MKTTn-Bouillon. Die Inkubation erfolgte aerob bei 41,5 °C für RVS und 37 °C für MKTTn für 24 h. Aus diesen selektiven Anreicherungen wurden je 10 µl mittels Impföse auf XLD-Agar und SSA-Agar fraktioniert ausgestrichen. Beide Agar wurden für 24 h bei 37 °C aerob bebrütet. Kolonien mit typischer Morphologie (*Salmonella*) wurden vereinzelt und durch Objektträger-Agglutination und 16S-rDNA Gensequenzierung bestätigt. Die Bestimmung des Serovars wurde am Nationalen Referenzzentrum (NRZ) für Salmonellen am Robert Koch-Institut (RKI) in Wernigerode durchgeführt. *Shigella* spp.

verdächtige Kolonien (SSA) wurden ebenfalls mittels Objektträger-Agglutination geprüft.

#### 2.3.2.2. *Listeria monocytogenes*

Zur Untersuchung auf *L. monocytogenes* wurde die folgende „Analyse A“ für die Produktproben auf Handelsebene verwendet. 25 g Probe wurden in 225 ml PALCAM-Bouillon für 2 min bei 200 rpm homogenisiert und bei 37 °C für 18-20 h inkubiert. Anschließend wurden jeweils 10 µl mittels Impföse auf ALOA- und PALCAM-Agar ausgestrichen und bei 37 °C für 48 h inkubiert. Die Produktproben der Industriebeprobung wurden durch „Analyse B“ auf das Vorhandensein von *L. monocytogenes* untersucht. 10 g Probe wurden in 90 ml Halbfraser-Bouillon für 2 min bei 200 rpm homogenisiert und bei 30 °C für 18-20 h inkubiert. Anschließend wurde erneut homogenisiert und jeweils 100 µl in 10 ml Vollfraser-Bouillon überführt und bei 37 °C für 48 h inkubiert. Mittels Impföse wurden danach jeweils 10 µl auf ALOA-Agar ausgestrichen und bei 37 °C für 48 h inkubiert.

#### 2.3.2.3. *Shigatoxin-produzierende E. coli (STEC)*

Zur Untersuchung auf Shigatoxin-produzierende *E. coli* wurden 25 g Probe in 225 ml BPW für 2 min bei 200 rpm homogenisiert und bei 37 °C für 16-20 h inkubiert. Anschließend wurde 1 ml des BPW in 9 ml BRILA-Bouillon überführt. Die Inkubation erfolgte aerob bei 41,5 °C für 24 h. Aus diesen selektiven Anreicherungen wurden je 10 µl mittels Impföse auf Chromagar™ STEC und Enterohämolysin-Agar fraktioniert ausgestrichen. Beide Agar wurden für 24 h bei 37 °C aerob bebrütet. Kolonien mit typischer Morphologie wurden vereinzelt und durch real time PCR oder multiplex PCR auf das Vorhandensein der Virulenzgene *stx1*, *stx2* und *eae* überprüft (siehe 2.4.2). Die Bestimmung des Serovars und die Bestätigung der Virulenzgene wurden am Nationalen Referenzlabor (NRL) für *Escherichia coli* am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) in Berlin durchgeführt.

#### 2.3.2.4. *Detektion von Pathogenen in Wasserproben*

Für die qualitative Detektion von *Salmonella*, *L. monocytogenes* und Shigatoxin-produzierende *E. coli* wurde jeweils 1 ml der Wasserprobe in 10 ml BPW (im Reagenzröhrchen) gebracht und 10 Sekunden gevortext. Die Inkubation erfolgte für 16-20 h bei 37 °C. Zur Detektion wurden aus diesem bebrüteten BPW die selektiven Anreicherungen beimpft und nach Inkubation auf dem jeweiligen Selektivmedium ausgestrichen, wie in Tabelle 12 beschrieben.



### 2.3.2.5. *ESBL-produzierende Enterobakterien und Carbapenemase-produzierende Enterobakterien*

Zur Untersuchung auf ESBL-produzierende und Carbapenemase-produzierende Enterobakterien wurden 25 g Probe in 225 ml BPW für 2 min bei 200 rpm homogenisiert und bei 37 °C für 16-20 h inkubiert. Anschließend wurde 1 ml des BPW in 9 ml BRILA-Bouillon überführt. Die Inkubation erfolgte aerob bei 41,5 °C für 24 h. Aus diesen selektiven Anreicherungen wurden je 10 µl mittels Impföse auf Brilliance™ ESBL- Agar und/oder Brilliance™ CRE-Agar (Oxoid) fraktioniert ausgestrichen. Beide Agar wurden für 24 h bei 41,5 °C aerob bebrütet. Kolonien mit typischer Morphologie wurden vereinzelt und einer phänotypischen Resistenztestung unterzogen.

### 2.3.3. Antibiotika-Resistenztestung

Die antimikrobiellen Empfindlichkeitstestungen wurden mittels Agardiffusionsmethode (Kirby-Bauer) auf Müller-Hinton-Agar durchgeführt. Durch Auflegen von antibiotikahaltigen Filterpapierscheibchen kommt es zu einem Diffusionsgradienten der Substanz im Agar und zu Bildung eines Hemmhofes. Für die Enterobakterien erfolgte die Vorgehensweise und Auswertung nach den Richtlinien des „The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing“ (EUCAST) ([http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints; v9.0 2019.](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints; v9.0 2019.)). Nach EUCAST erfolgte die Tigecyclin Auswertung nur für *E. coli*. Bei Tetrazyklin erfolgte die Bewertung nach Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Vorgaben. Die getesteten Antibiotika sind mit ihrer eingesetzten Konzentration und deren Auswertungskriterien in Tabelle 13 ersichtlich.

**Tabelle 13**

*Antibiotika und deren Bewertungskriterien nach EUCAST (R=Resistent, S=Sensitiv).*

Substanzklasse	Antibiotikum	Kürzel und Konzentration (µg)	Grenzwerte (mm)	
Cephalosporine	Cefotaxim	CTX5	R<17	S≥20
	Cefepim	FEP30	R<24	S≥27
	Cefoxitin	FOX30	R<19	S≥19
	Ceftaroline	CPT30	R<21	S≥21
	Ceftazidime/Avibactam	CZA14	R<13	S≥13
Monobactame	Aztreonam	ATM30	R<21	S≥26
Penicilline	Ampicillin/Sulbactam	SAM20	R<14	S≥14

Substanzklasse	Antibiotikum	Kürzel und Konzentration ( $\mu\text{g}$ )	Grenzwerte (mm)	
	Piperacillin/Tazobactam	TZP36	R<20	S $\geq$ 20
Carbapeneme	Imipenem	IPM10	R<19	S $\geq$ 22
	Meropenem	MEM10	R<16	S $\geq$ 22
Fluorchinolone	Ciprofloxacin	CIP5	R<22	S $\geq$ 25
Aminoglykoside	Gentamicin	CN10	R<17	S $\geq$ 17
	Tobramycin	TOB10	R<16	S $\geq$ 16
Tetrazykline	Tetracyclin	TE30	R<11 (CLSI)	S $\geq$ 15 (CLSI)
	Tigecyclin	TGC15	R<18	S $\geq$ 18
Weitere Antibiotika	Fosfomycin/Trometamol	FOT200	R<24	S $\geq$ 24
	Nalidixinsäure	NA30	R<13 (CLSI)	S $\geq$ 19 (CLSI)
	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	SXT25	R<11	S $\geq$ 14
	Chloramphenicol	C30	R<17	S $\geq$ 17

## 2.4. Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1. DNA-Isolierung

Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte mittels ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ Kit nach Herstellerangaben oder mittels thermischer Lyse (Tabelle 14). Im Anschluss an die Extraktionen wurde die Qualität und Konzentration der DNA photometrisch mittels NanoDrop2000 (VWR) oder fluoreszenzoptisch mittels Qubit (Thermo Fisher Scientific, Inc.) mit einem Qubit dsDNA HS/BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.) ermittelt.

Für die thermische Lyse wurden je 1,6 ml der inkubierten Übernackkultur für 2 min bei 13.000 x g pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml sterilem *aqua dest.* gewaschen. Anschließend wurde bei 13.000 x g für 1 min zentrifugiert und erneut mit 1 ml *aqua dest.* gewaschen. Das Pellet wurde mit 0,5 ml sterilem nukleasefreiem *aqua dest.* resuspendiert und für 15 min bei 95 °C im Thermoblock (Eppendorf) erhitzt. Im Anschluss wurde das Reaktionsgefäß auf Eis abgekühlt und für 2 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Der Überstand von 300  $\mu\text{l}$  wurde vorsichtig in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und umgehend für die PCR eingesetzt. Bei einer

Verwendung innerhalb von 48 h wurde die DNA bei 4 °C gelagert, in allen anderen Fällen bei -20 °C bis zur Benutzung aufbewahrt.

Für Ganzgenomsequenzierungen wurden 1,6 ml Übernackkultur für 1 min bei 13.000 x g pelletiert, der Überstand verworfen und mit 1 ml sterilem *aqua dest.* gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das entstandene Pellet wurde dann nach Herstellerangaben verarbeitet (ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep).

**Tabelle 14**

*DNA Isolierungsmethoden und deren Verwendung.*

Methode/Kit	Eingesetztes Volumen	Endvolumen/ Eluat	Verwendet für
Thermische Lyse	1,6 ml Über Nacht Kultur (ÜNK)	300 µl	STEC Bestätigung (Multiplex PCR) <i>L. monocytogenes</i> Bestätigung (multiplex PCR) STEC Detektion ( <i>real-time</i> PCR)
Zymo DNA MiniPrep™	1,0 ml BPW 1,6 ml ÜNK (Gram-negative) 3,2 ml ÜNK (Gram-positive)	30-50 µl	STEC Detektion ( <i>real-time</i> PCR) gDNA-Aufreinigung (Genom Sequenzierung) <i>Bacillus</i> Toxingen Nachweis (Multiplex PCR)
ZymoBIOMICS® DNA Mini Kit	100 ml (Produktproben) 200 ml (Wasserproben)	100 µl	16S-rDNA Sequenzierung (Metabiom)

#### 2.4.2. Nachweis Shigatoxin-produzierender *E. coli* (STEC) durch *real-time* PCR

Für den molekularen Nachweis der STEC spezifischen Virulenzgene Shigatoxin 1 (*stx1*), Shigatoxin 2 (*stx2*), und Intimin (*eae*) wurde eine *real-time* PCR nach Pavlovic et al. verwendet (2010). Diese PCR kann alle bisher bekannten Subtypen von *stx1* (*stx1a*, *stx1c*, *stx1d*), *stx2* (*stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*, *stx2g*) und *eae* (18 Subtypen (Ito et al. 2007)) detektieren. Die Detektion erfolgte bei den Proben aus dem Jahr 2015 direkt aus der BPW Anreicherung und für alle weiteren Proben aus der Enterobakterien-Anreicherung (BRILA). Die Anreicherungen, wie im kulturellen Teil beschrieben, wurden zur DNA-Extraktion verwendet und in die *real-time* PCR eingesetzt.

Die Primer und Sonden wurden jeweils auf eine Arbeitskonzentration von 10 mM verdünnt und in den angegebenen Mengen in die PCR eingesetzt (Tabelle 15).

Tabelle 15

*Verwendete real time PCR-Primer und Sonden für den molekularen STEC Nachweis.*

Gen	Primer/Sonde	Sequenz (5'-3')	PCR Produkt (bp)	Referenz
stx1	VS1 (fwd)	CATAGTGGAACCTCACGACGCAGT	87	(Pavlovic et al. 2010)
	VS2 (rev)	TTTGCCGAAAACGTAAAGCTTCA		
	VS3 (Sonde)	TGTGGCAAGAGCGATGTTACGGTTTG-BHQ1		
stx2	stx2_for4	GTTTCCATGACAACGGACAGCAG	114	
	stx2_rev2	GTGACGACTGATTTGCATTCCGG		
	stx2_rev2f	ACGCCCAATCTGCATCCCT		
	stx2_t_p1 (Sonde)	RED-CAACGTGTCGCAGCGCTGGAAC-BHQ2		
	stx2f_t_p2 (Sonde)	RED-ACAGCGAATCGCAGATCTGGAAC-BHQ2		
eae	eae_t_for1	TCGTGTCTGCTAAAACCGCGGAG	107	
	eae_t_rev1	TTGTCTTATCAGCCTTAATCTCAG		
	eae_t_p1 (Sonde)	CY5-TTGTTGATCAAACCAAGGCCAGCA-BHQ2		
	eae_t_p2 (Sonde)	CY5-TTGTTGATCAAAGCAAGGCTAGTA-BHQ2		

Jeweils 4,75 µl genomische DNA wurden in die PCR (Tabelle 16) eingesetzt und auf das Vorhandensein von *stx*- und *eae*-Genen hin untersucht.

Tabelle 16

*Primerkonzentrationen und PCR-Pipettierschema für den molekularen STEC Nachweis.*

Reagenz	Konzentration	Volumen
Polymerase IQ Mastermix (2x)	1x	12,5 µl
Primer VS1	0,3 µM	0,75 µl
Primer VS2	0,3 µM	0,75 µl
Primer stx2f4	0,3 µM	0,75 µl

Reagenz	Konzentration	Volumen
Primer stx2r2	0,3 µM	0,75 µl
Primer stx2r2f	0,3 µM	0,75 µl
Primer eaetf1	0,3 µM	0,75 µl
Primer eaetr1	0,3 µM	0,75 µl
Sonde VS3	0,2 µM	0,5 µl
Sonde stx2p1	0,2 µM	0,5 µl
Sonde stx 2p2	0,2 µM	0,5 µl
Sonde eaetp1	0,2 µM	0,5 µl
Sonde eaetp2	0,2 µM	0,5 µl
Template		4,75 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>		0 µl
Gesamt		25 µl

Die Amplifikationsbedingungen der *real time* PCR sind in Tabelle 17 beschrieben. Eine Negativkontrolle (Wasser) und eine Positiv-Kontrolle (*E. coli* EDL 933, *stx1+*, *stx2+*, *eaet+*, 1 ng/µl) wurden in jeder PCR mitgeführt. Für die PCR wurde ein CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System von BioRad verwendet.

**Tabelle 17**

*Amplifikationsbedingungen für den molekularen STEC Nachweis.*

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	7 min	1x
Denaturierung	95 °C	5 s	40x
Annealing	58 °C	30 s	
Fluoreszenzdetektion nach jedem Zyklus			

Die Auswertung erfolgte über die Software CFX Manager™ 2.1 (Bio-Rad).

### 2.4.3. PCR zur Bestätigung von STEC und *L. monocytogenes* verdächtiger Kolonien

#### 2.4.3.1. STEC

Wurden phänotypisch verdächtige Kolonien von *E. coli*-Selektivagar (Chromagar™ STEC, Enterohämolyisin-Agar, TBX) oder *Listeria* Selektivagar (ALOA, PALCAM) isoliert, so wurden diese mittels Multiplex-PCR oder real-time PCR überprüft. Die Kolonien wurden vereinzelt und deren genomische DNA durch thermische Lyse

(2.4.1) gewonnen. Die Bestätigung STEC-verdächtiger Kolonien erfolgte durch eine Multiplex PCR (Paton und Paton 1998), durch den Nachweis der Virulenzgene *stx1* (Shigatoxin 1), *stx2* (Shigatoxin 2) und *eae* (Intimin). Die Primer wurden jeweils auf eine Arbeitskonzentration von 10 mM verdünnt und in den angehenden Mengen in die PCR eingesetzt (Tabelle 18).

Tabelle 18

*PCR-Primer für die molekulare STEC Bestätigung.*

Gen	Primernamen	Sequenz (5'-3')	PCR Produkt (bp)	Referenz
<i>stx1</i>	stx1F	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	180	Paton & Paton. 1998
	stx1R	AGAACGCCCACTGAGATCATC		
<i>stx2</i>	stx2F	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	255	
	stx2R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG		
<i>eae</i>	eaeAF	GACCCGGCACAAGCATAAGC	384	
	eaeAR	CCACCTGCAGCAACAAGAGG		

Jeweils 5 µl genomische DNA wurden in die PCR (Tabelle 19) eingesetzt und auf das Vorhandensein von *stx*- und *eae*-Genen hin untersucht.

Tabelle 19

*Primerkonzentrationen und PCR-Pipettierschema für die molekulare STEC Bestätigung.*

Reagenz	Konzentration	Volumen
DreamTaq PCR Mix Green (2x)	1x	12,5 µl
Primer stx1F	0,25 µM	0,625 µl
Primer stx1R	0,25 µM	0,625 µl
Primer stx2F	0,25 µM	0,625 µl
Primer stx2R	0,25 µM	0,625 µl
Primer eaeAF	0,25 µM	0,625 µl
Primer eaeAR	0,25 µM	0,625 µl
Nuklease freies Wasser		3,75 µl
Template DNA		5 µl
Gesamt		25 µl

Eine Negativkontrolle (Wasser) und eine Positiv-Kontrolle (*E. coli* EDL 933, *stx1*, *stx2*, *eae*; 10 ng/µl) wurden in jeder PCR mitgeführt und mit den in Tabelle 20 angegebenen

Bedingungen durchgeführt. Für die PCR wurde ein peqSTAR Thermocycler von Peqlab verwendet.

**Tabelle 20**

*Amplifikationsbedingungen für die molekulare STEC Bestätigung.*

Reagenz	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	1
Denaturierung	95 °C	60 s	
Annealing	65 °C	120 s	10x
Elongation	72 °C	90 s	
Denaturierung	95 °C	60 s	
Annealing	65-60 °C (Touchdown 0,3 °C/Zyklus)	120 s	15x
Elongation	72 °C	90 s	
Denaturierung	95 °C	60 s	
Annealing	65 °C	120 s	10x
Elongation	72 °C	150 s	

Je 6 µl der PCR Produkte wurden neben 3,5 µl DNA Ladder Mix low range auf ein 2%iges Agarosegel geladen und die Gelelektrophorese bei 80 V für 60 min in 1x TAE-Puffer durchgeführt. Im Anschluss wurde im Ethidiumbromid-Bad für 30 min gefärbt und in *aqua dest.* für 10 min entfärbt. Die Auswertung der resultierenden Bandenmuster erfolgte visuell über eine Fotodokumentation (VWR).

#### 2.4.3.2. *Listeria monocytogenes*

Zur Bestätigung *L. monocytogenes* verdächtiger Kolonien wurde eine multiplex PCR nach Doumith et al. durchgeführt (Doumith et al. 2004). Durch diese PCR ist eine Differenzierung der vier häufigsten *L. monocytogenes* Serovare (SV 1/2a, 3a; SV 1/2b, 3b, 7; SV 1/2c, 3c; SV 4b, 4d, 4e) möglich. Gleichzeitig erfolgt der Nachweis des Listerien-spezifischen Gens *prs* (Putative phosphoribosyl pyrophosphate synthetase). Die Primer wurden jeweils auf eine Arbeitskonzentration von 50 mM verdünnt und in den angegebenen Mengen in die PCR eingesetzt (Tabelle 21).

Tabelle 21

Verwendete multiplex PCR-Primer für die molekulare Serotypisierung von *L. monocytogenes*.

Gen	Primernamen	Sequenz (5'-3')	PCR Produkt (bp)	Referenz
<i>lmo0737</i> ( <i>L. monocytogenes</i> Serovare 1/2a, 1/2c, 3a, and 3c)	Imo0737F	AGGGCTTCAAGGACTT ACCC	691	(Doumith et al. 2004)
	Imo0737R	ACGATTTCTGCTTGCCA TTC		
<i>lmo1118</i> ( <i>L. monocytogenes</i> Serovare 1/2c and 3c)	Imo1118F	AGGGGTCTTAAATCCT GGAA	906	
	Imo1118R	CGGCTTGTTCCGGCATA CTTA		
ORF2819 ( <i>L. monocytogenes</i> serovars 1/2b, 3b, 4b, 4d, and 4e)	ORF2819F	AGCAAAATGCCAAAA CTCGT	471	
	ORF2819R	CATCACTAAAGCCTCC CATTG		
ORF2110 ( <i>L. monocytogenes</i> serovars 4b, 4d, and 4e)	ORF2110F	AGTGGACAATTGATTG GTGAA	597	
	ORF2110R	CATCCATCCCTTACTTT GGAC		
<i>prs</i> (Alle <i>Listeria</i> Spezies)	prsF	GCTGAAGAGATTGCGA AAGAAG	370	
	prsR	CAAAGAAACCTTGGAT TTGCGG		

Jeweils 5 µl genomische DNA wurden in die PCR (Tabelle 22) eingesetzt und auf das Vorhandensein der *L. monocytogenes* spezifischen Gene hin untersucht.

Tabelle 22

Primerkonzentrationen und PCR-Pipettierschema für die molekulare Serotypisierung von *L. monocytogenes*.

Reagenz	Konzentration	Volumen
DreamTaq PCR Mix Green (2x)	1x	12,5 µl
Primer Imo0737F	1,0 µM	0,5 µl
Primer Imo0737R	1,0 µM	0,5 µl



Reagenz	Konzentration	Volumen
Primer Imo1118F	1,5 µM	0,75 µl
Primer Imo1118R	1,5 µM	0,75 µl
Primer ORF2819F	1,0 µM	0,5 µl
Primer ORF2819R	1,0 µM	0,5 µl
Primer ORF2110F	1,0 µM	0,5 µl
Primer ORF2110R	1,0 µM	0,5 µl
Primer prsF	0,2 µM	0,1 µl
Primer prsR	0,2 µM	0,1 µl
Nuklease freies Wasser		2,8 µl
Template DNA		5 µl
Gesamt		25 µl

Eine Negativkontrolle (Wasser) und die jeweiligen Positiv-Kontrollen (1 ng/µl) der Serovare 1/2a, 1/2b und 4b wurden in jeder PCR (Tabelle 23) mitgeführt.

**Tabelle 23**

*Amplifikationsbedingungen für die molekulare Serotypisierung von L. monocytogenes.*

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	1
Denaturierung	95 °C	40 s	
Annealing	53 °C	75 s	35x
Elongation	72 °C	75 s	
Finale Elongation	72 °C	7 min	1

Je 5 µl der PCR Produkte wurden neben 3,5 µl DNA Ladder Mix low range auf ein 1%iges Agarosegel geladen und die Gelelektrophorese bei 80 V für 80 min in 1x TAE-Puffer durchgeführt. Im Anschluss wurde im Ethidiumbromid-Bad für 30 min gefärbt und in *aqua dest.* für 10 min entfärbt. Die Auswertung der resultierenden Bandenmuster erfolgte visuell über eine Fotodokumentation (VWR).

#### **2.4.4. Nachweis von *Bacillus cereus* Toxingenen mittels multiplex PCR und Toxinproteinen mittels Serologie**

Um das toxinogene Potenzial der isolierten *B. cereus* sensu lato Isolate zu prüfen, wurden mittels Multiplex-PCR nach Ehling-Schulz et al. (2006) das Vorkommen der Toxingene *hblD* (Hämolyisin BL (*hbl*)-Komponente D), *nheA* (nicht-hämolytischen

Enterotoxin (*nhe*)-Komponente A), *cytK-2* (Cytotoxin K-2) und *ces* (Cereulid-Toxin) untersucht. Zusätzlich wurde ein serologischer Test (Duo Path® immuno assay) zum Nachweis der Hbl- und Nhe-Toxine durchgeführt. Die Durchführung und verwendete Materialien wurde in Fiedler et al. (2019) detailliert beschrieben (Fiedler et al. 2019).

## 2.5. Ganzgenomsequenzierung

Die Illumina-Sequenzierung ist ein Hochdurchsatzsequenzierverfahren zur *whole genome* Sequenzierung (WGS) von Genomen. Hierbei werden basenspezifische Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt, die zusätzlich als reversible 3' Terminatoren agieren und daher die Identifizierung einzelner Basen während des Einbaus in den DNA-Strang ermöglichen. Die Sequenziermethode beruht demnach auf der Illumina Methode „Sequencing by Synthesis“.

Durch die Illumina-Sequenzierung können nur relativ kurze Fragmente (75-300 Nukleotide) amplifiziert und sequenziert werden. Technisch ist dafür eine initiale Fragmentierung der DNA notwendig. Anschließend werden die 3'-Enden der fragmentierten DNA an DNA-Oligonukleotid Adapter ligiert. Diese dienen zur Identifizierung der DNA-Fragmente und zur Bindung an die „Flusszelle“. In der „Flusszelle“ des Sequenziergerätes findet die eigentliche Sequenzierung statt. Die auf der „Flusszelle“ gebundenen DNA-Fragmente werden durch die sogenannte „Brückenamplifikation“ amplifiziert, wodurch Cluster identischer DNA Fragmente entstehen. Die folgende Sequenzierreaktion erfolgt zyklisch in mehreren Schritten. Die dNTPs (basenspezifisch mit Fluoreszenzfarbstoffen versehen) lagern sich an die DNA an und dienen als Terminator der Polymerisation. Durch jede Inkorporation der dNTPs wird die ausgestrahlte Fluoreszenz zur Identifikation der eingebauten Base verwendet. Nach der Fluoreszenzdetektion werden die Farbstoffe enzymatisch abgetrennt und der nächste Zyklus zum dNTP-Einbau beginnt. Dies begründet auch die Limitation der Anzahl von möglichen Zyklen auf 75 bis maximal 300, da die Enzyme eine begrenzte Aktivität besitzen. Dadurch können nur Sequenzen bis zu 300 Nukleotiden direkt sequenziert werden und es handelt sich um eine *short-read* Sequenziermethode.

Im Gegensatz zur *short-read* Technik können *long-read* Sequenziermethoden längere Fragmente von mehreren Kilobasen sequenzieren. Die Genauigkeit ist gegenüber der Illumina Sequenzierung bedeutend schlechter, die Kombination beider Technologien bietet allerdings entscheidende Vorteile. So können Genome, welche mit beiden Technologien sequenziert wurden, mittels *Hybrid Assembly* oftmals vollständig entschlüsselt werden. Die repetitiven Elemente im Genom sowie auf Plasmiden

können so durch die *long-reads* vollständig abgebildet und die korrekte Basensequenz durch die passenden *short-reads* korrigiert werden.

Die Sequenzierungen der humanpathogenen Bakterien wurden in der Publikation Fiedler et al. 2020 ausführlich beschrieben. Verkürzt dargestellt wurden hauptsächlich *short-read* Sequenzierungen durchgeführt. Dafür wurde die genomische DNA enzymatisch (Nextera Kits) oder mechanisch durch Ultraschall (Covaris, bei TruSeq Kits) fragmentiert. Anschließend wurde nach den Illumina Protokollen der Nextera oder TruSeq Kits (Illumina) nach Herstellervorgaben gearbeitet und mittels Reagent Kit v2 oder v3 sequenziert. Die generierten *reads* wurden mit FastQC (PATRIC) auf ihre Qualität geprüft und zur Assemblierung benutzt.

Für die *long-read* Sequenzierung des STEC Isolats (1507MS25EC) wurde zuerst hochmolekulare DNA durch den Genomic Micro AX Bacteria+ Kit (A&A Biotechnology) gewonnen. Diese genomische DNA wurde nach Herstellerangaben durch den SQK-LSK109 Kit (Oxford Nanopore) vorbereitet und mit einem MinION MK1B (Oxford Nanopore) sequenziert. Die generierten *reads* wurden mit FastQC (PATRIC) auf ihre Qualität geprüft und mit den *short-reads* zur Assemblierung benutzt (Fiedler et al. 2020).

## 2.6. 16S-rDNA Metagenomics

Zur Aufreinigung von bakterieller, genomischer DNA für die Metabiomanalysen wurde das ZymoBIOMICS DNA Mini Kit (Zymo) eingesetzt. Für die Produktproben wurden im Stomacherbeutel 25 g der Probe mit 225 ml BPW für 2 min bei 200 rpm homogenisiert. Aus dieser Verdünnung wurden jeweils im Duplikat 50 ml bei 4 °C, 13.000 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 10 ml sterilem *aqua dest.* suspendiert. Das Duplikat wurde vereinigt und erneut bei 4 °C, 13.000 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit 750 µl mit Lyse-Lösung (ZymoBIOMICS™ Kit) versetzt und nach Herstellerangaben prozessiert.

Für die Waschwasserproben wurden 200 ml bei 4 °C, 13.000 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 10 ml sterilem *aqua dest.* suspendiert und erneut bei 4 °C, 13.000 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 750 µl mit Lyse-Lösung (ZymoBIOMICS™ Kit) versetzt und Herstellerangaben prozessiert.

Da pflanzliche Produkte untersucht wurden, wurden die Primer 799Fwd+1193Rev verwendet, um möglichst wenig Chloroplasten-DNA zu amplifizieren (16S V5, V6, V7) (Beckers et al. 2016). Für die Amplikon PCR wurde die HiFi HotStart DNA

Polymerase (KAPA Biosystems) verwendet. Als Index Kit wurde Nextera (Illumina) verwendet und zur Sequenzierung der MiSeq Reagent Kit v3 mit 2 x 300 Zyklen verwendet. Alle Proben wurden im Duplikat sequenziert.

Die Sequenzdaten wurden mittels der *Integrated Microbial Next Generation Sequencing* (imngs) Pipeline prozessiert, was eine Qualitätskontrolle, Trimmung und Detektion von chimären Sequenzen beinhaltet (Lagkouvardos et al. 2016). Die *operational taxonomic unit* (OTU) Sequenzen wurden anhand der *Ribosomal Database Project* (RDP) Datenbank identifiziert. Die Ergebnisdateien wurden anschließend mit Rhea analysiert (Lagkouvardos et al. 2017). Die Ergebnisse wurden manuell geprüft und die OTUs mit übereinstimmender bakterieller Familienzugehörigkeit wurden für die Stapeldiagramme zusammengefasst. Zur Clusteranalyse wurden die ursprünglichen OTU Tabellen auf Familienebene verwendet und in JMP (SAS Institute, USA) berechnet. Die grafische Auswertung erfolgte in JMP.

## 2.7. Bioinformatik

Alle Programme wurden mit den Standard Parametern benutzt, soweit im Folgenden nicht anderweitig beschrieben.

### 2.7.1. PATRIC (BRC)-Qualitätskontrolle der Sequenzdaten, Assemblierung, Annotation, Phylogenetische Analysen

Die Qualitätsprüfung der Sequenzierrohdaten erfolgte durch das Programm FastQC über die PATRIC (BRC) Bioinformatik Plattform (Tabelle 5). Die Assemblierung der Genome erfolgte ebenfalls über PATRIC. Hierbei wurde der SPAdes Algorithmus für Illumina Rohdaten oder der Unicycler Algorithmus zum Hybrid Assembly verwendet. Für die Assemblierung wurde eine minimale *coverage* von 30 ausgewählt. Die initiale Annotierung erfolgte auf der Plattform PATRIC mittels RASTtk Pipeline für die entsprechende Gattung oder Spezies. Die finale Annotation für die bei Fiedler et al. 2020 beschriebenen Stämme erfolgte durch die Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) von NCBI.

Zur Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen verschiedener Genome wurde der Phylogenetic Tree Building Service benutzt. Hierbei werden *single copy* Gene ausgewählt, die in allen zu untersuchenden Genomen vorkommen (sog. „core“ Gene) und diese auf DNA und Proteinebene miteinander verglichen. Zur Berechnung der Verwandtschaftsbeziehung wurden jeweils 1.000 core Gene ausgewählt und mittels

RAxML (maximum likelihood) Algorithmus in Beziehung gebracht. Die berechneten, phylogenetischen Bäume wurden mit Inkscape beschriftet.

### **2.7.2. Multi-Lokus-Sequenz-Typisierung MLST, cgMLST und wgMLST**

Für die Bestimmung des Multi-Lokus-Sequenz-Typs wurden die entsprechenden Genabschnitte automatisiert aus den assemblierten Genomen oder den Rohdaten über die Programme extrahiert, verglichen und den hinterlegten (cg/wg) MLST Nummern der Datenbank zugeordnet (Tabelle 5). Für neue (cg/wg) MLST Schemata wurden neue Datenbankeinträge vorgenommen und neue (cg/wg) MLST Nummern generiert.

Die Standard MLST wurde für *E. coli* (*E. coli* Schema 1) und *Salmonella* über die online Plattform des „Center for Genomic and Epidemiology“ durch die MLST 2.0 analysis Pipeline durchgeführt (Tabelle 5). Für *L. monocytogenes* wurde die MLST-Analyse der PasteurMLST benutzt (Tabelle 5).

Die cgMLST und wgMLST wurde für *E. coli* und *Salmonella* auf Enterobase durchgeführt (Tabelle 5). Bei *L. monocytogenes* wurde die Plattform PasteurMLST verwendet.

### **2.7.3. Molekulare Serotypisierung**

*E. coli* und *Salmonella* wurde durch den Serotyper (SISTR1+SeqSero) auf der online Plattform Enterobase serotypisiert (Tabelle 5). Für *L. monocytogenes* wurde die Plattform PasteurMLST verwendet (Tabelle 5).

### **2.7.4. Identifizierung von Resistenzgenen**

Die Resistenzgene wurden über die ResFinder 4.1 Pipeline der online Plattform des „Center for Genomic and Epidemiology“ ermittelt (Tabelle 5). Hierfür wurden die assemblierten Genome oder die Rohdaten der Genome verwendet (Tabelle 5).

### **2.7.5. Identifizierung von Virulenzfaktoren-Genen**

Für *E. coli* und *L. monocytogenes* wurde das online Tool VirulenceFinder 2.0 verwendet (Tabelle 5).

Pathogenitätsinseln (Pathogenicity Islands (SPI)) wurden bei *Salmonella* mittels SPIFinder 2.0 ermittelt (Tabelle 5).

### 2.7.6. Identifizierung von Plasmidsequenzen

Die Identifizierung von Plasmid assoziierten Repliksequenzen wurde mit Hilfe des online Tools PlasmidFinder 2.1 durchgeführt (Tabelle 5). Hierfür wurden die assemblierten contigs mit der hinterlegten Repliksequenz Datenbank abgeglichen.

### 2.7.7. Spezies Identifizierung durch den Type (Strain) Genome Server

Die assemblierten Genome wurden als fasta Dateien durch das online Tool Type (Strain) Genome Server (TYGS) mit den Typstämmen der 15.002 hinterlegten Spezies (Stand 07/2021) verglichen. Anhand der höchsten genomischen Verwandtschaft (>70 %), basierend auf digitaler DNA-DNA Hybridisierung, wurde das Isolat der entsprechenden Spezies zugeordnet.

### 2.7.8. Identifizierung von verwandten Stämmen in den online Datenbanken

Für *E. coli* wurden die Datenbanken von Enterobase auf die am nächsten verwandten Stämme bis zu 20 Allele Unterschied nach cgMLST V1 Schemata (cgMLST) durchsucht (Tabelle 5). Für *Salmonella* wurden die Datenbanken von Enterobase auf die am nächsten verwandten Stämme mit identischem MLST durchsucht.

Für *L. monocytogenes* wurde die PasteurMLST Datenbank nach dem cgMLST1748 locus schema <https://bigsd.bpasteur.fr/Listeria/Listeria.html> durchsucht (Tabelle 5). Die ähnlichsten Isolate wurden mit Standardeinstellungen gesucht („Exact or nearest match“).

Mit der Pathogen Detection beta (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/>) wurde innerhalb der NCBI Datenbank für die bisher veröffentlichten *E. coli* und *L. monocytogenes* nach Beteiligung an SNP-Clustern gesucht (Fiedler et al. 2020).

### 2.7.9. Vergleichende genomische Analysen mittels digitaler DNA-DNA Hybridisierung (dDDH) und kmer basierter Mash Distanzberechnung (*mash*)

Die genetischen Abstände zwischen Genomen wurden mit den Programmen Genome-to-Genome Distance Calculator 2.1 (Meier-Kolthoff et al. 2013) und Mash (Ondov et al. 2016) berechnet (Tabelle 5). Dafür wurden die assemblierten Genome und voreingestellten Parameter verwendet. Für den Genome-to-Genome Distance Calculator 2.1 wurde die empfohlene Formel 2 zur Auswertung einbezogen. Beide Programme schätzen den genomischen Abstand anhand von Sequenzvergleichen und

berechnen prozentuale (dDDH) oder verhältnismäßige (Mash) Übereinstimmungen zum gewählten Referenzgenom.

#### **2.7.10. Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP)-Analysen mittels CSI Phylogeny und CFSAN**

Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) zwischen Genomen wurden mit dem online Tool CSI Phylogeny (Center for Genomic Epidemiology (Kaas et al. 2014)) und dem Programm CFSAN SNP Pipeline (Davis et al. 2015) durchgeführt (Tabelle 5). Dabei werden Variationen der Basenpaare in homologen kodierenden und nicht kodierenden Bereichen der zu vergleichenden Genome detektiert. Als Referenz wurden jeweils die assemblierten Genome der in dieser Studie gewonnenen Isolate eingesetzt. Für die zum Vergleich mit der Referenz eingesetzten Genome wurden jeweils die Rohdaten (SRA Daten) verwendet. Falls keine SRA zugänglich waren, wurden die assemblierten Genome verwendet.

## **2.8. Statistik**

Statistische Analysen wurden in dieser Arbeit zur Bewertung von unterschiedlichen, zentralen Tendenzen der zu untersuchenden Gruppen verwendet.

Alle statistischen Analysen wurden unter Verwendung von JMP 15 (SAS) durchgeführt (Tabelle 5). Signifikante Ergebnisse lagen bei  $p < 0,05$  vor.

Für statistische Analysen der Keimzahlen wurden die ermittelten Werte (KbE/g) in  $\log_{10}$  transformiert und auf Normalverteilung geprüft. In Abhängigkeit der Normalverteilung, Varianz und Probenzahl wurde die geeignete Testmethode ausgewählt. Da eine  $\log_{10}$  Transformation nicht in jedem Fall zur gewünschten Normalverteilung der Daten führt, wurden die Keimgruppen Gesamtkeimzahl, Enterobakterien, präsumtive *B. cereus*, Hefen und Schimmelpilze grafisch (Histogramm, Schiefe, Wölbung) und analytisch (Shapiro-Wilk und Anderson-Darling Test) auf Normalverteilung geprüft. Durch die große Stichprobenanzahl ( $n > 300$ ) und Proben am unteren kulturellen Detektionslimit können analytische Tests häufig zu falsch signifikanten Ergebnissen mit dementsprechender Verwerfung der Nullhypothese führen. Daher wurde zur endgültigen Auswahl der Teststatistik eine zusätzliche, manuelle Prüfung der Verteilungen im Histogramm durchgeführt. Hierbei wurden auch die berechnete Schiefe und Wölbung miteinbezogen. Da dadurch nur vereinzelt eine Normalverteilung festgestellt wurde, folgte die Untersuchung der Varianzen zwischen den zu untersuchenden Gruppen durch den

Levene- und Bartlett-Test. Hierbei wurden häufig signifikante Varianzunterschiede festgestellt, so dass grundsätzlich nicht-parametrische Tests verwendet wurden.

Um Unterschiede zwischen den Mittelwerten der untersuchten Gruppen zu erkennen, wurde bei normalverteilten Werten mit gleichen Varianzen die ANOVA (einfaktorielle Varianzanalyse) durchgeführt. Bei grafisch und analytisch nicht normalverteilten Daten sowie bei signifikanten Varianzunterschieden, wurde der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Bei diesem Rangsummen-Test werden signifikante Unterschiede zwischen den zentralen Tendenzen der untersuchten Gruppen durch die Berechnung des  $\chi^2$  Wertes erkannt. Der Kruskal-Wallis-Test als ein nicht-parametrischer Test ist robust gegenüber nicht normalverteilten Variablen, unterschiedlicher Stichprobengröße und Ausreißern (hoher Varianz) und wurde aus diesen Gründen hier überwiegend verwendet. Die analytischen Auswertungen und die jeweils eingesetzten Teststatistiken sind im Anhang Tabelle A 5 dargestellt.

Für den paarweisen Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen wurde grundsätzlich der Wilcoxon Rank-Sum Test durchgeführt.



## 3. Ergebnisse

### 3.1. Mikrobiologische Qualität von Salat und Gemüse auf Produktionsebene

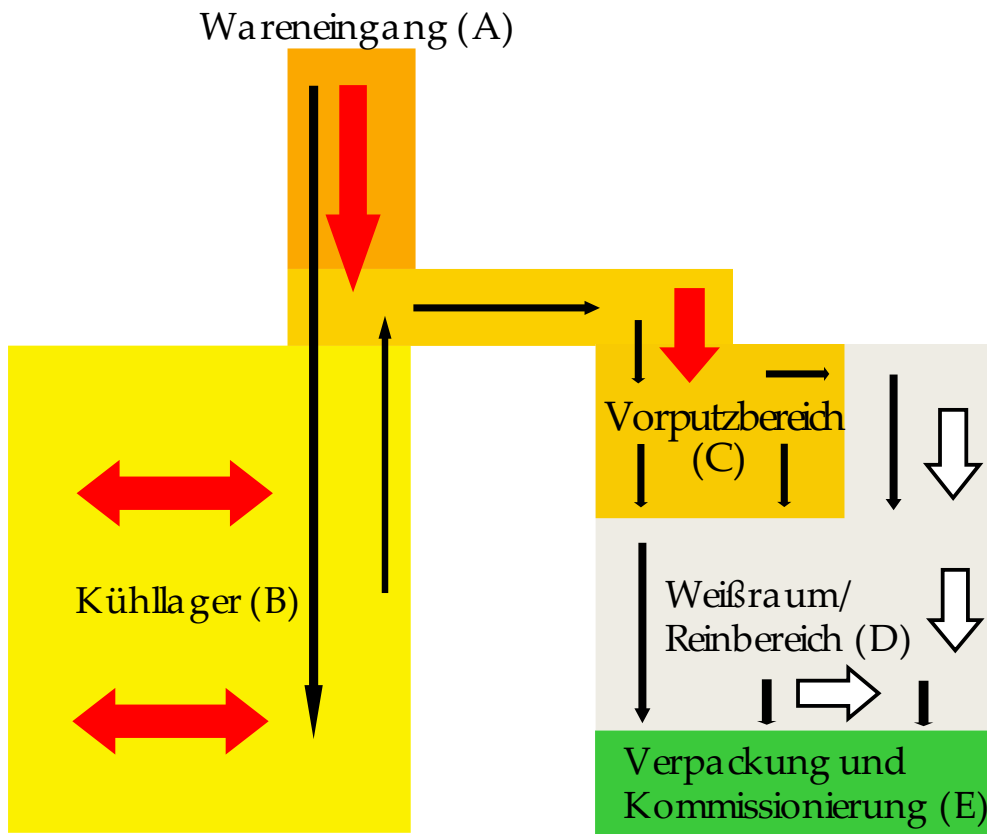
Die Verarbeitung von Salat und Gemüse ist neben der Primärerzeugung ein elementarer Einflussfaktor für die mikrobielle Besiedlung der Produkte. Die mikrobiologischen Veränderungen während der Stufen vom Feld bis in den Handel wurden für Misch-/Schnittsalat bisher nicht untersucht. Um die Belastung und den Eintrag von pathogenen Bakterien für diese Produktkette zu analysieren, wurden zwischen 2016 und 2017 in einem großen Verarbeitungsbetrieb für Gemüse und Salat im süddeutschen Raum Proben von Salat und Gemüse während der Produktion gesammelt.

#### 3.1.1. Mikrobiologischer Status und Nachweis von Humanpathogenen

Auf Produktionsebene wurden 240 Proben verschiedener pflanzlicher Produkte auf ihre mikrobiologische Qualität und das Vorkommen von humanpathogenen Bakterien untersucht. Die mikrobiologische Qualität wurde anhand der Gesamtkeimzahl sowie der Anzahl an Enterobakterien, Hefen und Schimmelpilzen eingeschätzt.

Die Proben wurden zudem auf das Vorkommen relevanter humanpathogener Bakterien wie *L. monocytogenes*, *Salmonella* und STEC untersucht. Dabei sollte der mikrobiologische Status entlang der Prozessierungsschritte analysiert werden, um Rückschlüsse auf den Einfluss der Verarbeitungsschritte ziehen zu können. Zudem sollten mögliche Unterschiede zwischen den Produktgruppen detektiert werden. Aus diesen Analysen können Rückschlüsse gezogen werden, welchen Einfluss die Produktgruppe der Rohware und die Prozessierungsschritte auf die Mikrobiologie des Endproduktes (Fresh-Cut Salat) besitzen.

Der Betrieb zur Verarbeitung von Salat und Gemüse in verschiedene Produkte (v.a. Fresh-Cut Mischsalate), welcher beprobt wurde, ist folgendermaßen strukturiert (Abbildung 4).



**Abbildung 4**

*Betriebsstruktur und Grundriss des beprobten Unternehmens mit (A) Wareneingang, (B) Kühlager, (C) Vorputzbereich, (D) Weißraum und (E) Verpackung und Kommissionierung. Die roten, großen Pfeile zeigen die Bewegung der Mitarbeiter im „unreinen“ Bereich; die hellen, großen Pfeile die Bewegung der Mitarbeiter im Reinbereich; die schwarze, schmalen Pfeile zeigen den Verarbeitungsweg der Rohware durch den Betrieb.*

Alle Bereiche des Unternehmens waren, abhängig von Aufgaben bzw. Tätigkeiten, auf 4 °C bis 10 °C klimatisiert. Angelieferte Rohware wurde am Wareneingang qualitativ überprüft, bewertet und gegebenenfalls sortiert. Zur Verwendung freigegebene Ware wurde im Kühlager bis zur Verarbeitung gelagert. In dieser Studie wurden Wareneingang und das Lager zu einem Bereich zusammengefasst, da der überwiegende Teil der angelieferten Ware ohne Umlagerung in das Kühlager gebracht wurde. Entsprechend dem Produktionsplan wurde die Rohware in den Vorputzbereich transportiert, wo beispielsweise die äußeren Blätter und qualitativ minderwertigen Bereiche (z. B. Strunk) entfernt wurden. Anschließend wurde die Ware in den räumlich strikt getrennten Weißbereich verbracht. Der Weißbereich war dadurch charakterisiert, dass hier nur die von allen äußeren Verschmutzungen befreite Ware eintraf und auch die Mitarbeiter aus den „unreinen“ Bereichen (z. B. Lager, Vorputzbereich, Kommissionierung) keinen Zutritt hatten. Der überwiegende Anteil der vorgeputzten Ware wurde durch ein Fließband in die mechanischen Schneideanlagen verbracht, um anschließend durch Waschstraßen gereinigt zu

werden. Nach diesem Waschschrift fand das Vermischen und Verpacken der Fresh-Cut Schnitt- und Mischsalate statt. Räumlich getrennt, aber ebenfalls im Weißbereich, wurde der individuelle Zuschnitt für den Gastronomiebereich vorbereitet. Hier waren Sektionen vorzufinden, die ausschließlich "produktbezogen" arbeiteten und z. B. Möhren, Tomaten, Paprika etc. verarbeiteten. Neben produktspezifischen Reinigungs- und Schneidemaschinen (z. B. Möhren, Zwiebeln, Sellerie) diente ein Eiswasserbad (<4 °C) mit turbulenter Strömung zur (Vor)Reinigung von weniger robusten Produkten wie Feldsalat und Rucola. Das Verpacken der Ware fand maschinell (Mischsalate in Kunststofftüten) oder durch Mitarbeiter (Monoprodukte, Gastronomiebedarf, Salatschalen) im Weißbereich statt. Dem Weißbereich schloss sich der räumlich getrennte Bereich die Produktlagerung und Kommissionierung an. Die Proben wurden 11 Kategorien zugeordnet, um eine differenzierte Betrachtung nach Produktgruppen zu ermöglichen (Tabelle 24).

**Tabelle 24**

*Übersicht zu den untersuchten Proben auf Produktionsebene. Es wurden im Zeitraum 2016 und 2017 die aufgeführten Produkte auf den Verarbeitungsstufen Feld, Lager, Vorputzbereich, Reinraum und Endprodukt beprobt. Insgesamt wurden 240 Proben gesammelt und diese den 11 Produktgruppen zugeordnet.*

Zeitraum	Produktgruppe	Probenanzahl
2016-	1 Feldsalat	n=3
2017	2 Gartensalate (Bataviasalat, Eissalat, Romana, Salanova, Lollo Rosso, Lollo Bionda, Eichblatt – rot/grün, Baby Leaf)	n=77
	3 Gurke	n=9
	4 Kohl (Chinakohl, Pak Choi, Tatsoi, Weißkohl, Wirsing)	n=8
	5 Möhren	n=8
	6 Rucola	n=6
	7 Spinat	n=4
	8 Tomate	n=3
	9 Zichorie (Zichoriengewächse: Zuckerhut, Frisee, Radicchio, Chicorée)	n=54
	10 Salatmix (verzehrfertige, gemischte Salate)	n=51
	11 Diverse (Lauch, Fenchel, Rettich, Tomate, Aubergine, Brokkoli, Zucchini, Paprika, Kohlrabi, Champignons, frische Kräuter, Mangold, Radieschen)	n=17
	Gesamt	240 Produktproben in 11 Produktgruppen

### 3.1.1.1. Mikrobiologische Qualität entlang der Produktionskette

Die Produktionsstufen Feld (n=28 Proben), Lager (n=63), Vorputzbereich (n=53), Reinraum (n=60) und Endprodukt (n=36) wurden auf Gesamtkeimzahl, Enterobakterien, Hefen und Schimmelpilze untersucht. Zur Darstellung und statistischen Berechnung wurden die ermittelten Keimzahlen logarithmiert (log10), um die charakteristische hohe Varianz bakterieller Zellzahlen in eine annähernde Normalverteilung zu transformieren.

Die Gesamtkeimzahl zeigte auf den Stufen Feld und Lager mit 6,79 und 6,78 log KbE/g im Median die höchste, auf den Stufen Reinraum und Endprodukt mit 6,19 und 6,41 log KbE/g die niedrigste Belastung (Tabelle 25). Bei Enterobakterien und Schimmelpilzen zeigten Feld- und Lagerproben ebenfalls eine höhere Belastung, als die Proben der nachfolgenden Prozessstufen Reinraum und Endprodukt.

Die Mittelwerte waren grundsätzlich mit den Medianen vergleichbar (Tabelle 25). Einzig die Mittelwerte der Schimmelbelastung zeigten im Reinraum und Endprodukt höhere Werte als im Median.

Die Standard Abweichung (Std.-Abw.) zeigte grundsätzlich eine Streuung von ca. +/- 1 log KbE/g mit den höchsten Streuungswerten bei Enterobakterien (>1,2). Auffällig war die Std.-Abw. der Gesamtkeimzahlen im Endprodukt mit 0,52, welche eine deutlich geringere Varianz als die übrigen Stufen mit 0,90-1,23 aufwies. Diese geringere Streuung der Endprodukte wurde auch durch weniger extreme Minimal- und Maximalwerte sichtbar, die (bis auf Schimmelpilze) geringere Extremwerte im Endprodukt zeigten.

**Tabelle 25**

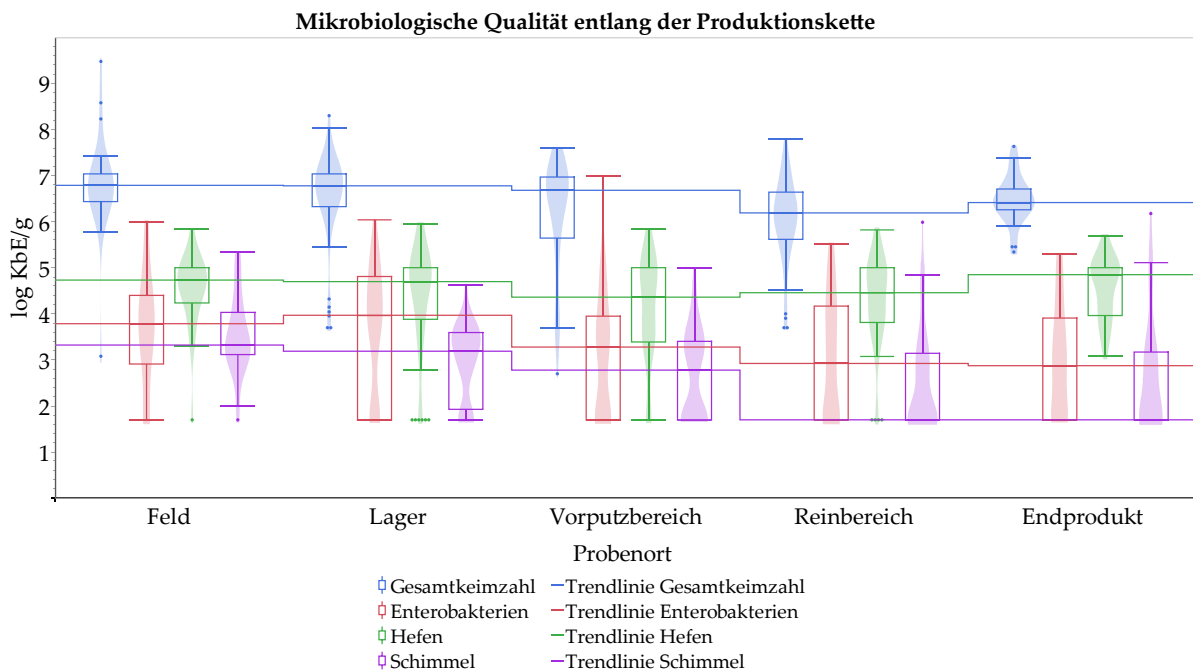
*Mikrobiologischer Status frischer, pflanzlicher Produkte entlang der Produktionskette. Angegeben sind die Ergebnisse der Gesamtkeimzahl, Anzahl der Enterobakterien, Hefen und Schimmelpilze (in log KbE/g) auf den Stufen Feld, Lager, Vorputz, Reinraum und Endprodukt. Die Anzahl der jeweils untersuchten Proben und deren deskriptive Statistik (Median, Mittelwert, Standardabweichung, Minimum, Maximum) sind angegeben.*

	Anzahl	Median	Mittelwert	Std.-Abw.	Min.	Max.
Gesamtkeimzahl in log KbE/g						
Feld	28	6,79	6,81	1,05	3,08	9,48
Lager	63	6,78	6,54	0,97	3,70	8,30
Vorputz	53	6,68	6,16	1,23	2,70*	7,60
Reinbereich	60	6,19	6,06	0,90	3,70	7,79
Endprodukt	36	6,41	6,47	0,52	5,34	7,63
Gesamt	240	6,54	6,36	1,00	2,70*	9,48

	Anzahl	Median	Mittelwert	Std.-Abw.	Min.	Max.
<b>Enterobakterien in log KbE/g</b>						
Feld	28	3,79	3,68	1,25	1,70*	6,00
Lager	63	3,97	3,65	1,36	1,70*	6,04
Vorputz	53	3,28	3,08	1,33	1,70*	7,00
Reinbereich	60	2,92	3,09	1,31	1,70*	5,51
Endprodukt	36	2,87	2,99	1,21	1,70*	5,30
Gesamt	240	3,43	3,29	1,33	1,70*	7,00
<b>Hefen in log KbE/g</b>						
Feld	27	4,73	4,52	0,80	1,70*	5,83
Lager	63	4,70	4,39	1,13	1,70*	5,96
Vorputz	53	4,36	4,04	1,18	1,70*	5,83
Reinbereich	60	4,46	4,30	0,97	1,70*	5,83
Endprodukt	36	4,85	4,58	0,68	3,08	5,70
Gesamt	239	4,65	4,33	1,02	1,70*	5,96
<b>Schimmelpilze in log KbE/g</b>						
Feld	28	3,32	3,54	0,86	1,70*	5,34
Lager	62	3,19	2,96	0,82	1,70*	4,63
Vorputz	53	2,78	2,65	0,99	1,70*	4,99
Reinbereich	60	1,70	2,50	1,08	1,70*	5,99
Endprodukt	36	1,70	2,63	1,23	1,70*	6,18
Gesamt	239	2,90	2,80	1,04	1,70*	6,18

\*untere Nachweisgrenze

Im Box-Plot Diagramm (Abbildung 5) konnte anhand der Trendlinie eine tendenzielle Abnahme der Gesamtkeimzahl, Enterobakterien und Schimmelpilze erkannt werden. Für Hefen war dies nicht der Fall. Die Fläche des Violinendiagramms (Pastellfarben) zeigte für die Gesamtkeimzahl und Hefen eine komprimierte Form im Endprodukt, im Vergleich zu den übrigen Prozessierungsstufen. Das bestätigt die homogeneren Keimzahlen im Endprodukt, die in der geringeren Standardabweichung in Tabelle 25 sichtbar wurden. Ausserdem konnte ein regelmäßiges Erreichen des unteren Detektionslimits von 1,70 log KbE/g bei Enterobakterien und Schimmelpilzen auf den Stufen Vorputz-, Reinbereich und im Endprodukt gezeigt werden.

**Abbildung 5**

**Mikrobiologischer Status frischer pflanzlicher Produkte entlang der Produktionskette als Box-Plot Diagramm.** Die mittlere Linie im Box-Plot beschreibt den Median (mittels Trendlinie verbunden), innerhalb der Box liegen 50 % der Datenpunkte, die Whisker geben den Wertebereich des unteren und oberen 1,5fachen Interquartilsabstand an. Daten ausserhalb des 1,5fachen Interquartilsabstandes werden als punktförmige Ausreißer dargestellt. Die dem Boxplot hinterlegten Violiniendiagramme (Pastellfarben) visualisieren die Verteilung der Daten. Die Trendlinien zeichnen die Veränderungen zwischen den Medianen der Prozessstufen (Probenorte) ein.

Bei der Gesamtkeimzahl wurden signifikante Unterschiede zwischen den zentralen Tendenzen je Probenort durch den Kruskal-Wallis-Test ermittelt ( $\chi^2=23,19$ ;  $\text{Wahrsch.}>\chi^2=0,0001$ ). Demnach wurden signifikante Unterschiede zwischen den Gesamtkeimzahlen der Verarbeitungsstufen (Probenort) festgestellt. Die Wahrscheinlichkeit  $>\chi^2$  entspricht in diesem Fall dem p-Wert und wird im Folgenden als p-Wert angegeben. Der  $\chi^2$  Wert beschreibt, inwieweit sich die erwarteten und beobachteten Häufigkeiten unterscheiden. Je höher dieser Wert liegt, desto eher ist mit signifikanten Unterschieden zu rechnen. Um die signifikanten Differenzen zwischen den Verarbeitungsstufen zu ermitteln, wurde jedes Paar (Probenort) mittels Wilcoxon-Methode verglichen. Die Gesamtkeimzahlen der Feld- und Lager-Proben lagen signifikant höher als die Proben aus dem Reinbereich ( $p<0,0001$ ) und der Endprodukte ( $p<0,05$ ) (Median: 6,79 und 6,78 vs. 6,19 und 6,41 log KbE/g). Außerdem wurde eine signifikante Veränderung der Gesamtkeimzahl von Proben aus dem Reinbereich (6,19 log KbE/g) gegenüber Proben der Endprodukte (6,41 log KbE/g) festgestellt ( $p<0,05$ ).

Auch die Anzahl der Enterobakterien unterschied sich zwischen den Probenorten signifikant ( $\text{Chi}^2=12,70$ ;  $p=0,0128$ ). So wiesen Feldproben signifikant höhere Enterobakterienzahlen auf als die Proben aus dem Vorputzbereich und der Endprodukte ( $p<0,05$ ) (Median 3,79 vs. 3,28 und 2,87 log KbE/g). Die Enterobakterienzahlen der Lagerproben lagen signifikant höher als die Proben aus dem Vorputzbereich ( $p<0,0091$ ), Reinbereich und der Endprodukte ( $p<0,05$ ) (3,97 vs. 3,28; 2,92 und 2,87 log KbE/g).

Bei den Hefen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Medianen je Probenort ermittelt ( $\text{Chi}^2=5,04$ ;  $p=0,2830$ ).

Bei den Schimmelpilzen konnten signifikante Unterschiede zwischen den Medianen je Probenort ermittelt werden ( $\text{Chi}^2=29,31$ ;  $p=0,0001$ ). Die Schimmelpilzzahlen der Feldproben lagen signifikant höher als die übrigen Proben aus dem Lager-, Vorputz-, Reinbereich und dem Endprodukt ( $p<0,05$ ) (3,32 vs. 3,19; 2,78; 1,70 und 1,70 log KbE/g). Außerdem wurde eine signifikant geringere Schimmelpilz-Keimzahl von Proben aus dem Reinbereich und der Endprodukte gegenüber Proben aus dem Lager festgestellt ( $p<0,0089$ ) (Median 1,70 und 1,70 vs. 3,19 log KbE/g).

Alle Keimzahlen, außer die der Hefepilze, verringerten sich signifikant im Verlauf der Verarbeitung. Vom Feld bis zum Endprodukt verringerte sich die Gesamtkeimzahl um 0,28 log KbE/g, die Enterobakterienzahlen gingen um 0,92 log KbE/g zurück und die Schimmelpilzbelastung wurde um 1,62 log KbE/g reduziert. Die Verarbeitungsschritte des Vorputzens und des anschließenden Schneidens und Waschens führten zu den größten Veränderungen im mikrobiologischen Status während der Produktionskette.

### ***3.1.1.2. Mikrobiologische Unterschiede zwischen den Produktgruppen***

Die Proben wurden in 11 Produktgruppen eingeteilt, um hygienisch auffällige Kategorien und deren potentiellen Einfluss auf das Endprodukt zu ermitteln. Hierfür wurden alle Probenorte zusammengefasst.

Die Gesamtkeimzahl zeigte im Median bei den Produktgruppen Spinat, Feldsalat, Zichorie und Rucola die höchste Belastung (Median: 7,36; 7,04; 6,86; 6,71 log KbE/g). Diese Kategorien zeigten auch bei Enterobakterien und Schimmelpilze die höchste Belastung (Tabelle 26). Bei Tomaten, Gurken und Möhren wurden vergleichsweise die geringsten Belastungen in den Gesamtkeimzahlen (3,70; 4,32; 5,15 log KbE/g), aber auch bei Enterobakterien und Schimmelpilzen festgestellt (Tabelle 26). Bei Hefen lagen allen Kategorien recht einheitlich bei 4-5 log KbE/g. Die Mittelwerte sind grundsätzlich mit den Medianen vergleichbar, was auf weniger starke Ausreißer bzw. eine Annäherung an eine Normalverteilung schließen lässt (Tabelle 26).

Tabelle 26

*Mikrobiologischer Status verschiedener, pflanzlicher Produktgruppen auf Produktionsebene. Angegeben sind die Ergebnisse der Gesamtkeimzahl, Anzahl der Enterobakterien, Hefen und Schimmelpilze (in log KbE/g) für verschiedene Produktkategorien. Die Anzahl der jeweils untersuchten Proben und deren deskriptive Statistik (Median, Mittelwert, Standardabweichung, Minimum, Maximum) sind angegeben.*

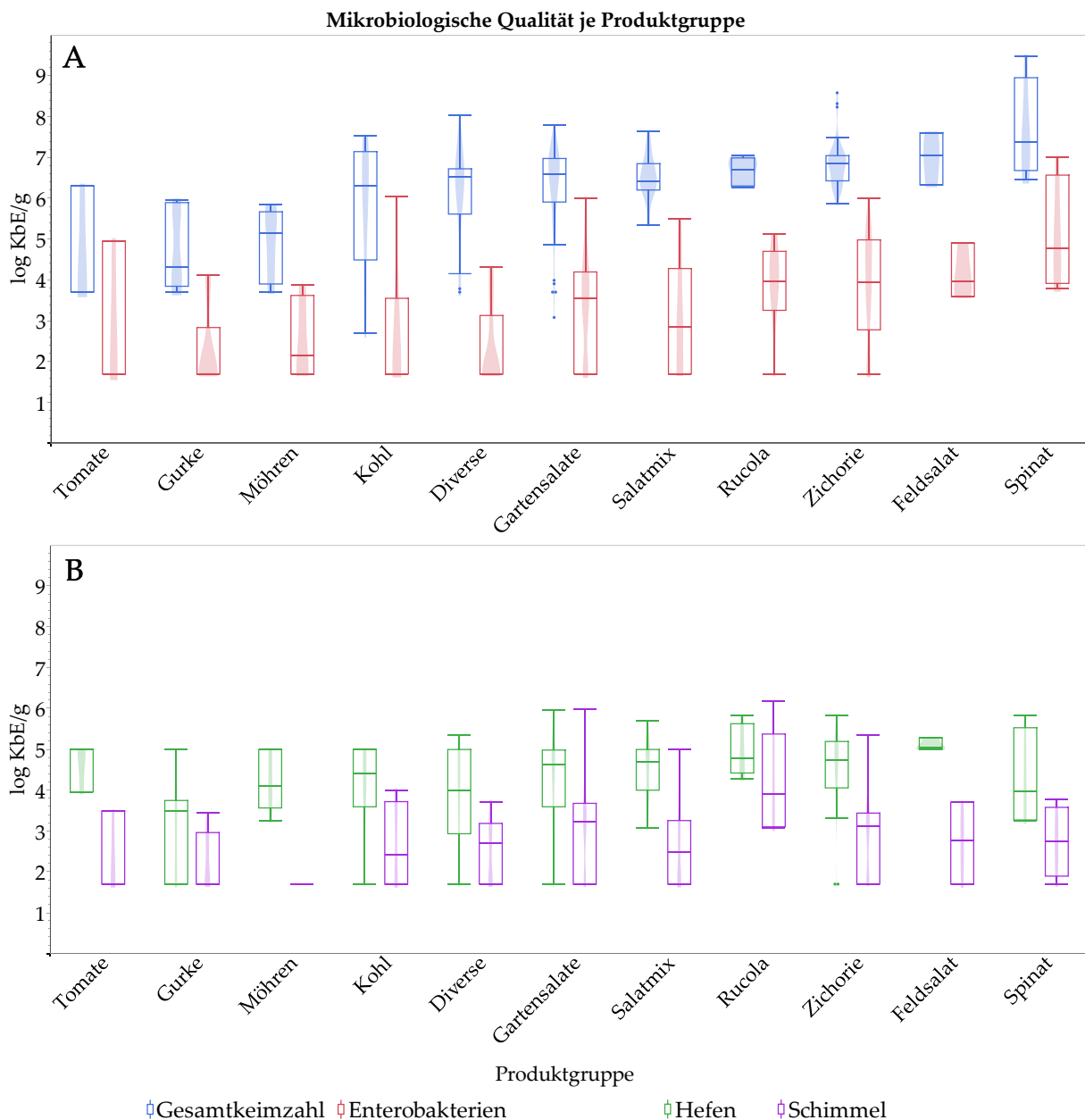
	Anzahl	Median	Mittelwert	Std.-Abw.	Min.	Max.
<b>Gesamtkeimzahl in log KbE/g</b>						
Feldsalat	3	7,04	6,99	0,64	6,32	7,60
Gartensalate	77	6,59	6,32	0,96	3,08	7,79
Gurke	9	4,32	4,78	1,00	3,70	5,96
Kohl	8	6,32	5,86	1,67	3,70	7,52
Möhren	8	5,15	4,92	0,88	3,70	5,85
Rucola	6	6,71	6,67	0,33	6,26	7,04
Spinat	4	7,36	7,67	1,28	6,46	9,48
Tomate	3	3,70	4,57	1,50	3,70	6,30
Zichorie	54	6,86	6,83	0,53	5,88	8,58
Salatmix	51	6,41	6,51	0,53	5,34	7,63
Diverse	17	6,52	6,11	1,20	3,70	8,04
<b>Enterobakterien in log KbE/g</b>						
Feldsalat	3	3,96	4,15	0,68	3,59	4,90
Gartensalate	77	3,54	3,37	1,20	1,70*	6,00
Gurke	9	1,70	2,22	1,04	1,70*	4,11
Kohl	8	1,70	2,69	1,58	1,70*	6,04
Möhren	8	2,15	2,51	0,96	1,70*	3,88
Rucola	6	3,98	3,85	1,16	1,70*	5,11
Spinat	4	4,78	5,09	1,42	3,79	7,00
Tomate	3	1,70	2,78	1,88	1,70*	4,95
Zichorie	54	3,94	3,78	1,33	1,70*	6,00
Salatmix	51	2,85	3,15	1,28	1,70*	5,51
Diverse	17	1,70	2,29	0,98	1,70*	4,30
<b>Hefen in log KbE/g</b>						
Feldsalat	3	5,04	5,11	0,15	5,00	5,28
Gartensalate	77	4,62	4,21	1,09	1,70*	5,96
Gurke	9	3,49	2,93	1,24	1,70*	5,00
Kohl	8	4,40	4,10	1,13	1,70*	5,00
Möhren	8	4,09	4,23	0,71	3,26	5,00
Rucola	6	4,78	4,95	0,63	4,28	5,83



	Anzahl	Median	Mittelwert	Std.-Abw.	Min.	Max.
Spinat	4	3,97	4,26	1,23	3,26	5,83
Tomate	3	5,00	4,65	0,60	3,95	5,00
Zichorie	53	4,75	4,59	0,88	1,70*	5,83
Salatmix	51	4,70	4,59	0,68	3,08	5,70
Diverse	17	4,00	3,85	1,27	1,70*	5,34
Schimmelpilze in log KbE/g						
Feldsalat	3	2,78	2,73	1,00	1,70*	3,70
Gartensalate	77	3,23	3,06	1,02	1,70*	5,99
Gurke	9	1,70	2,28	0,72	1,70*	3,43
Kohl	8	2,41	2,67	1,06	1,70*	4,00
Möhren	8	1,70	1,70	0,00	1,70*	1,70
Rucola	6	3,92	4,22	1,31	3,08	6,18
Spinat	4	2,74	2,74	0,88	1,70*	3,78
Tomate	3	1,70	2,30	1,03	1,70*	3,49
Zichorie	53	3,11	2,82	0,96	1,70*	5,34
Salatmix	51	2,48	2,63	1,09	1,70*	4,99
Diverse	17	2,70	2,47	0,79	1,70*	3,72

\*untere Nachweisgrenze

Zur besseren Visualisierung sind die Daten aus Tabelle 26 in Abbildung 6 als Boxplot Diagramm veranschaulicht. Die im Boxplot dargestellte Fläche des Violinendiagramms zeigte bei der Gesamtkeim- und Enterobakterienzahl eine ähnliche, komprimierte Form zwischen den Gruppen Gartensalate, Zichorie und Salatmix. Somit konnte für diese Gruppen und Keimzahlen eine Annäherung an eine Normalverteilung festgestellt werden. Grundsätzlich zeigte die Gesamtkeimzahl eine geringere Varianz in den Ergebnisswerten als die Enterobakterienzahlen. Aufgrund geringerer Probenanzahl wurden die Varianzen der übrigen Produktgruppen nicht näher betrachtet. Es konnte generell festgestellt werden, dass sich die Produktgruppen deutlich in ihrer mikrobiologischen Belastung unterscheiden.

**Abbildung 6**

*Mikrobiologischer Status verschiedener, pflanzlicher Produktgruppen auf Produktionsebene als Box-Plot Diagramm. Abgebildet sind im Diagramm (A) die Ergebnisse der Gesamtkeimzahl und Anzahl der Enterobakterien; im Diagramm (B) die Hefen und Schimmelpilze jeweils für die verschiedenen Produktgruppen. Die mittlere Linie im Box-Plot beschreibt den Median, innerhalb der Box liegen 50 % der Datenpunkte, die Whisker geben den Wertebereich des unteren und oberen 1,5fachen Interquartilsabstand an. Daten außerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstandes werden als punktförmige Ausreißer dargestellt. Die dem Boxplot hinterlegten Violinendiagramme (Pastellfarben) visualisieren die Verteilung der Daten. Die Produktgruppen wurden im Box-Plot nach aufsteigender Gesamtkeimzahl geordnet.*

Aufgrund der Unterschiede in der Anzahl der untersuchten Proben je Produktgruppe (siehe oben) sollte ausgeschlossen werden, dass einzelne Produktgruppen durch eine unausgewogene Probennahme in den stärker belasteten Stufen Feld und Lager

verzerrt dargestellt werden. Aus diesem Grund wurde der statistische Vergleich zwischen den Produktgruppen auf den einzelnen Produktionsstufen (Feld, Lager, Vorputzbereich, Reinbereich, Endprodukt) nur für die Gruppen Gartensalate und Zichorie (Endivie) durchgeführt (Wilcoxon-Methode). Auf der Prozessierungsstufe Reinbereich wurde zusätzlich die Gruppe Salatmix in diesen statistischen Vergleich zu Gartensalaten und Zichorie (Endivie) einbezogen.

Auf den Stufen Feld und Lager wurden keine signifikanten Unterschiede der Keimzahlen zwischen Gartensalate und Zichorie (Endivie) festgestellt. Im Vorputzbereich zeigten Zichorien eine signifikant höhere Gesamtkeimzahl ( $p=0,0096$ ) und Hefenanzahl ( $p=0,0341$ ) als Gartensalate.

Im Reinbereich zeigte die Gruppe Salatmix eine signifikant höhere Gesamtkeimzahl als Gartensalate ( $p=0,0246$ ) und Zichorien ( $p=0,0256$ ). Zusätzlich Salatmix eine signifikant höhere Hefenanzahl ( $p=0,0326$ ) als Gartensalate.

### ***3.1.1.3. Effekt-Analysen der Prozessierungsschritte und Produktgruppen auf die Keimzahlen***

Um den Einfluss der einzelnen Produktgruppen (Rohware) und der Prozessierungsschritte auf die Mikrobiologie des Endproduktes (Fresh-Cut Salate) abzuschätzen, wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt. Zur Modellierung der Effekte wurde das Verfahren der kleinsten Quadrate angewendet. Das Ziel dieser linearen Analyse ist es signifikante Faktoren zu finden, die den größten, potentiell kausalen Einfluss auf die spezifischen Keimzahlen (Zielgröße) besitzen. Da der  $r^2$ -Wert für diese Modellierungen zwischen 0,16 und 0,34 lag, gab diese Analyse nur Hinweise zu Einflussfaktoren und konnte nicht zum Prognostizieren von Keimzahlen verwendet werden. Auch die Produktgruppen mit geringer Probenanzahl ( $n < 20$ ) wurden zur Modellierung verwendet, aber aufgrund der statistischen Unsicherheit nicht in die Ergebnisbetrachtung mit einbezogen.

Die Gesamtkeimzahl wurde am stärksten durch die Zugehörigkeit zu den Produktgruppen Zichorien und Salatmix (Reinbereich und Endprodukte) beeinflusst (Tabelle 27). Der Ursprung Feld zeigte ebenfalls einen positiven skalierten Schätzer, was eine höhere Gesamtkeimzahl für diese Einflussfaktoren prognostiziert. Bei Proben von der Stufe Feld musste bei den Produktgruppen Zichorien und Salatmix somit mit einer erhöhten Gesamtkeimzahl gerechnet werden.

Proben aus dem Lager zeigten den größten positiven Schätzer (höhere Enterobakterienanzahl) und wurden als größter, negativer Effekt prognostiziert.

Dahingegen wiesen gewaschene und geschnittene Endprodukte den größten positiven Effekt für eine geringere Enterobakterienanzahl auf.

Für Hefen wurde kein signifikanter Einflussfaktor durch die Analyse errechnet.

Für die Schimmelpilzbelastung stellt der Ursprung Feld den größten Einflussfaktor dar. Hier ist mit einer höheren Belastung zu rechnen. Die Probenorte Reinbereich und Endprodukt zeigen einen positiven Effekt (geringere Keimzahl) auf den Schimmelpilzgehalt der Proben.

**Tabelle 27**

*Signifikante Einflussfaktoren auf die bakteriellen Keimzahlen von Salat und Gemüse. Die Variable wird durch den Einflussfaktor positiv (+) oder negativ (-) beeinflusst. Der skalierte Schätzer gibt dabei die Stärke des Einflusses (+/-) an. Anhand des Standardfehlers kann auf die Varianz geschlossen werden, wobei eine hohe Varianz auf Proben hindeutet, die nicht dem prognostizierten Modelleffekt entsprechen. Der t-Wert beschreibt den Mittelwertvergleich zwischen dem Einflussfaktor und dem Erwartungswert.*

Variable (Zielgröße)	Einflussfaktor (Prädiktor)	Skalierter Schätzer	Std. Fehler	t- Wert	Wahrsch.<t (=p)
Gesamtkeimzahl	Probenort [Feld]	0,3343	0,1529	2,19	0,0298
Gesamtkeimzahl	Produktgruppe [Zichorie]	0,6554	0,1494	4,39	<,0001
Gesamtkeimzahl	Produktgruppe [Salatmix]	0,5401	0,2159	2,5	0,0131
Enterobakterien	Probenort [Lager]	0,5249	0,1718	3,06	0,0025
Enterobakterien	Probenort [Endprodukt]	-0,6333	0,3026	-2,09	0,0375
Schimmelpilze	Probenort [Feld]	0,7281	0,1737	4,19	<,0001
Schimmelpilze	Probenort [Reinbereich]	-0,2900	0,1233	-2,35	0,0195
Schimmelpilze	Probenort [Endprodukt]	-0,5232	0,2379	-2,2	0,0289

### 3.1.2. 16S-rDNA Mikrobiota-Analysen

Durch die traditionellen, kulturabhängigen Analysen ist es nahezu unmöglich, die komplexe Gemeinschaft der Bakterien eines Habitats umfassend zu bestimmen. Die kultivierbaren Mikroorganismen bilden nur einen Teil der tatsächlichen Besiedlung von Pflanzen ab und Veränderungen in der Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft bleiben mit kulturabhängigen Analysen meist verborgen. Aus diesen Gründen wurden 16S-rDNA Sequenzierungen durchgeführt, um umfassende Aussagen zur Zusammensetzung der Mikrobiota zu erhalten. Dabei sollten die bakteriellen Gemeinschaften der Produkte in den Stufen Feld, Lager, Vorputzbereich und Endprodukt ermittelt werden. Da der Verarbeitungsschritt des Schneidens und Waschens in den bisherigen Ergebnissen einen großen Einfluss zeigte, sollte außerdem die Mikrobiota des Wassers der Waschstraße zwischen Vorputzbereich und Endprodukt bestimmt werden. Für die Mikrobiota-Analysen der Produktproben und des Waschwassers wurden zwischen 89.071 und 244.134 bzw. 266.985-459.999 16S-rDNA Sequenzen (*reads*) je Probe generiert (Anhang Tabelle A 6).

#### 3.1.2.1. *Produktproben entlang der Prozessierungsstufen Feld, Lager, Vorputzbereich und Endprodukt*

Die häufig verarbeiteten Produkte Endivie, Lollo Bionda und Romanasalat wurden auf den Prozessierungsstufen Feld, Lager (Kühllager), Vorputzbereich (vorgeputzt) und Endprodukt (geschnitten, gewaschen, verzehrfertig) auf ihre Mikrobiota hin untersucht. Die zuvor kulturell bestimmten Gesamtkeimzahlen lagen mit 6,34 bis 7,04 log KbE/g in den Feldproben gering über den übrigen Verarbeitungsstufen mit Werten von 5,38 bis 6,96 log KbE/g (Abbildung 7). Bei den Enterobakterien wurde der höchste Wert mit 5,22-5,28 log KbE/g bei Endivie im Vorputz und Endprodukt ermittelt. Die kulturellen Ergebnisse zeigten keine generelle Reduktion der Gesamtkeimzahl und Enterobakterien während der Verarbeitung bei den untersuchten Proben. Während in den Prozessierungsschritten zwischen Feld und Endprodukt die Gesamtkeimzahlen der drei Salatsorten sich zum Teil deutlich unterschieden, glichen sich diese im bei allen gewaschenen Endprodukten auf ca. 6,25 log KbE/g an.

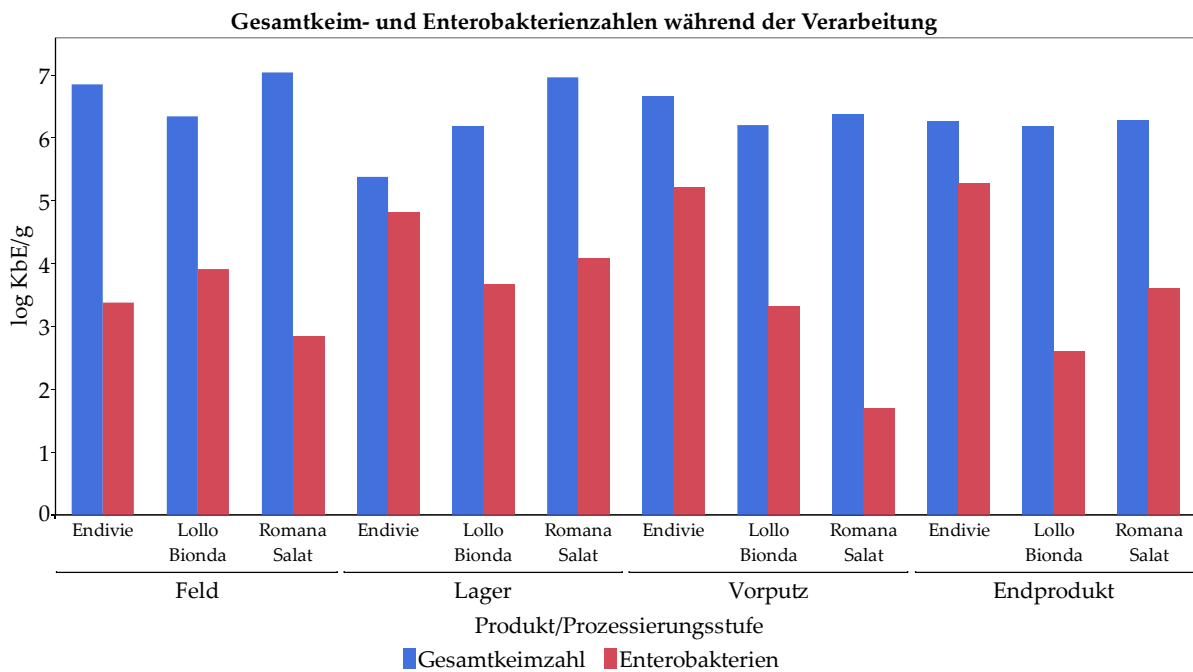
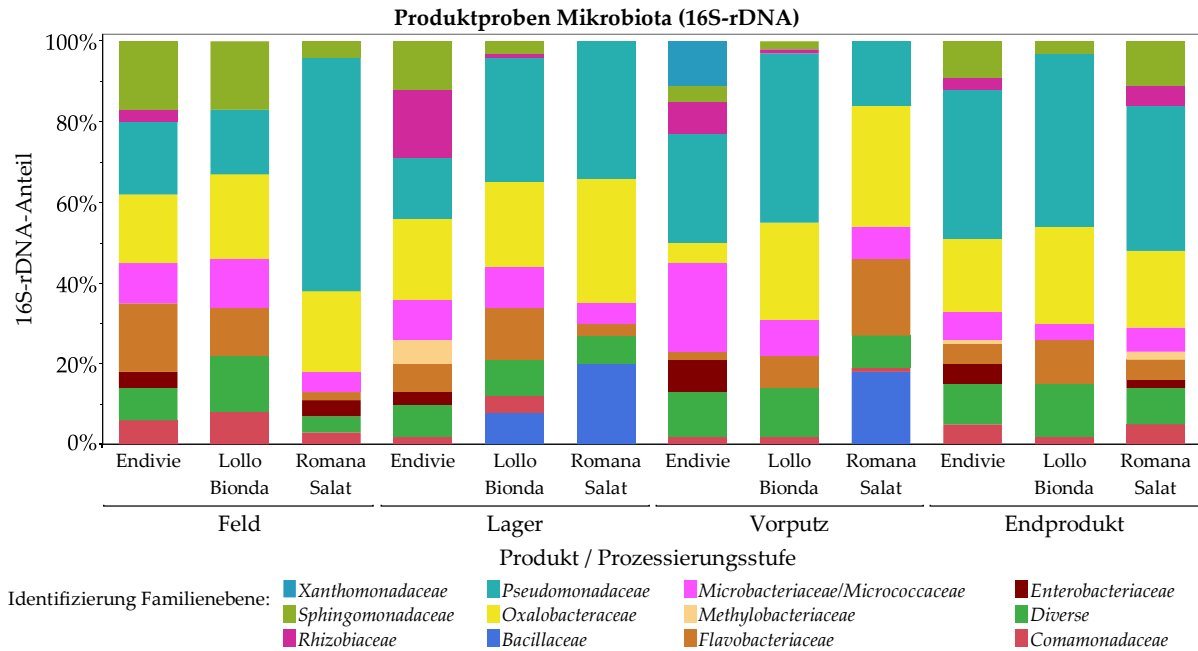


Abbildung 7

*Kulturell ermittelte Gesamtkeim- und Enterobakterienzahlen der zur Mikrobiota-Analyse verwendeten Produktproben (n=1 je Probe).*

Für die Daten der 16S-rDNA Sequenzierungen wurden zur überschaubaren Darstellung die Identifizierungen der *operational taxonomic unit* (OTU) auf die Ebene der bakteriellen Familien zusammengefasst (Abbildung 8). Die Mikrobiota von Endivie, Lollo Bionda und Romanasalat zeigte eine Vielfalt von 11 Bakterienfamilien und einen Anteil von maximal 14 % weiterer bakterieller Familien (Diverse). Bei allen drei Produkten dominierte das Phylum der *Proteobacteria* auf allen Ebenen der Probennahme mit 47-91 % der 16S-Gensequenzen. Dabei waren sowohl *Alpha*-, *Beta*- als auch *Gammaproteobacteria* zu unterschiedlichen Anteilen zu finden.

Im direkten Vergleich zwischen Romanasalat, Endivie und Lollo Bionda konnten Unterschiede in der bakteriellen Gemeinschaft auf den Stufen Feld, Lager und Vorputzbereich nachgewiesen werden (Abbildung 8). Während Ähnlichkeiten in ihrer Mikrobiota bei den Feldproben von Endivie und Lollo Bionda zu erkennen waren, besaß Romanasalat einen deutlich höheren Anteil an *Pseudomonadaceae* und einen geringen Anteil *Sphingomonadaceae* und *Flavobacteriaceae*. Im Lager- und Vorputzbereich konnten zwar Gemeinsamkeiten in der Zusammensetzung der Mikrobiota festgestellt werden, die jeweiligen Anteile der Familien unterschieden sich aber zwischen den Stufen und Produkten. Auffällig war die hohe Ähnlichkeit zwischen den Mikrobiota der geschnittenen und gewaschenen Salate (Endprodukt). Die Mikrobiota aller Endprodukte wurde hauptsächlich von *Pseudomonadaceae* und *Oxalobacteraceae* bestimmt.

**Abbildung 8**

*Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft von Salaten unterschiedlicher Produktionsstufen auf Familienebene. Dargestellt sind die relativen Abundanzen der 16S-rDNA Sequenzen (n=1 je Probe).*

Im Vergleich zwischen den Verarbeitungsstufen aller Salate wurde die Mikrobiota bei Feldproben generell von *Pseudomonadaceae* (Mittelwert 30,6 %), *Oxalobacteraceae* (19,3 %), *Sphingomonadaceae* (12,6 %), *Microbacteriaceae/Micrococcaceae* (9 %) und *Flavobacteriaceae* (10,3 %) bestimmt (Abbildung 8). Diese fünf Familien dominierten auch die weiteren Verarbeitungsschritte in veränderten Anteilen. Im Lagerbereich wurde ein Anstieg der *Bacillaceae* (14 %), *Methylobacteriaceae* (6 %) und *Rhizobiaceae* (18 %) in der Mikrobiota festgestellt. Im Vorputzbereich konnte ein höherer Anteil an *Xanthomonadaceae* (11 %) detektiert werden. Im Endprodukt zeigte sich eine sehr ähnliche Mikrobiota (Abbildung 8), deren Zusammensetzung ähnlich zu den Feldproben ist. Die sporadisch im Lager und Vorputz auftretenden Familien der *Bacillaceae*, *Rhizobiaceae* oder *Xanthomonadaceae* sind nur noch in geringen Anteilen im Endprodukt sichtbar.

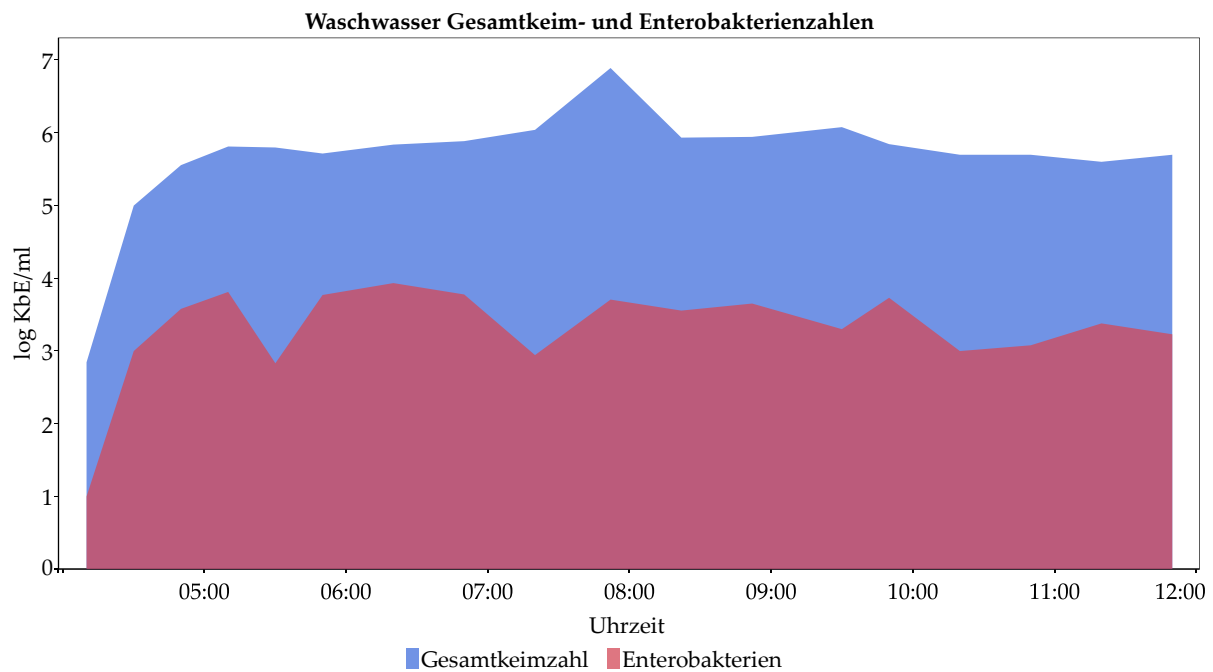
Die Proben Endivie (Lager, Vorputz, Endprodukt) waren kulturell durch erhöhte Enterobakterienzahlen (5,2-5,3 log KbE/g) auffällig, was durch die Mikrobiota-Analysen bestätigt werden konnte.

### 3.1.2.2. *Waschwasser*

Der Einfluss des Waschens auf die Mikrobiota im Bereich Gemüseverarbeitung wurde bisher in anderen Studien nicht untersucht. Die kulturellen Untersuchungen (vgl. Kapitel 3.1.1.1) zeigten keine generelle Reduktion der Gesamtkeimzahl zwischen Vorputzbereich und Endprodukt. Jedoch waren sowohl die Gesamtkeimzahlen als auch die Zusammensetzung der Mikrobiota der Endprodukte deutlich homogener als die der vorherigen Stufen. Dies könnte auf einen Einfluss des Waschwassers auf die Mikrobiota der Endprodukte hinweisen. Daher wurde die Mikrobiota des Waschwassers ab dem Start der Produktion untersucht. Dafür wurden in regelmäßigen Abständen 18 Wasserproben aus dem zweiten Becken der Waschstraße über eine Beprobungszeit von 8 h entnommen.

Die Salat-Waschstraße wurde vor dem Start der Produktion mit frischem Wasser in Trinkwasserqualität befüllt (Probennahme 03:38 Uhr; kulturelle Gesamtkeimzahl < 1 log KbE/ml). Die kulturellen Ergebnisse (Abbildung 9) zur ersten Probenahme (4:10 Uhr) nach Produktionsstart (4:05 Uhr) zeigten eine Gesamtkeimzahl von 2,84 log KbE/ml und 1 log KbE/ml Enterobakterien. Ein Anstieg auf 5,00 log KbE/ml (Gesamtkeimzahl), 3,00 log KbE/ml (Enterobakterien) wurde zum zweiten Probenzeitpunkt (4:30 Uhr) verzeichnet. Ein weiterer Anstieg auf 5,56 log KbE/ml (Gesamtkeimzahl), 3,58 log KbE/ml (Enterobakterien) wurde beim dritten Probenzeitpunkt festgestellt. Ab Probenpunkt vier (05:10 Uhr) wurde eine Plateauphase mit 5,7-6 log KbE/ml (Gesamtkeimzahl), 3-4 log KbE/ml (Enterobakterien) erreicht, auf deren Niveau die Keimzahlen bis zum Ende der Probenahme lagen (Abbildung 9).





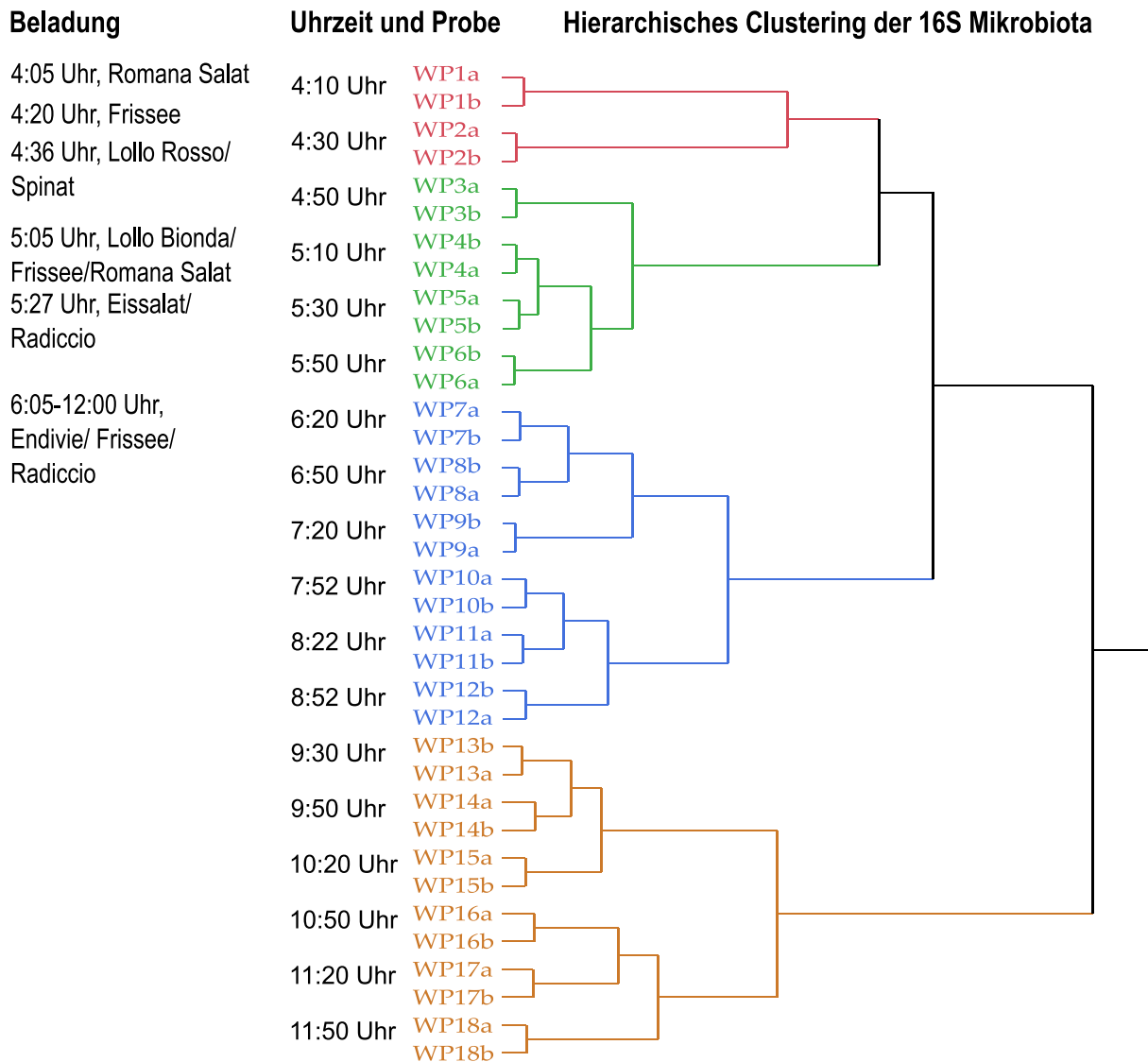
**Abbildung 9**

*Kulturell ermittelte Gesamtkeim- und Enterobakterienzahlen der zur Mikrobiota-Analyse verwendeten Waschwasserproben. Die Wasserproben aus der Waschstraße wurden während der Produktion entnommen und die kulturellen Keimzahlen bestimmt, um den zeitlichen Verlauf abzubilden.*

Um einen Überblick zur generierten Datenstruktur aus der Mikrobiota-Analyse der Waschwasserproben zu bekommen, wurden zuerst die relativen Abundanzen der identifizierten OTUs im Bezug zur Probe hierarchisch geclustert (Abbildung 10). Das Clustern ist eine multivariate Technik, die Beobachtungen gruppiert, die ähnliche Werte in einer Reihe von Variablen aufweisen. Das Ergebnis ist in Form eines Dendrogramms dargestellt.

Deutlich erkennbar war die Clusterbildung, welche die Doppelproben der gleichen Zeitpunkte eindeutig miteinander verbindet (Abbildung 10). Außerdem wurde die zeitliche Reihenfolge der Probennahme durch die Cluster abgebildet. Die Salat-Waschstraße wurde nach der täglichen Grundreinigung, mit frischem Wasser in Trinkwasserqualität befüllt. Der Start der Produktion erfolgte 4:05 Uhr mit Romana Salat bis zur ersten Zwischenreinigung. Die Zwischenreinigung der Anlage wurde 4:15 bis 4:20 Uhr durch das Abspritzen der Förderbänder, Schneideeinrichtung und Salatschleuder mit Trinkwasser und Trocknen mittels Druckluft durchgeführt. Ab 4:20 Uhr wurde Frissee verarbeitet und 4:35 Uhr erfolgte eine Zwischenreinigung. Die Proben Wasserprobe (WP) 1 und WP2 wurden 4:10 Uhr und 4:30 Uhr entnommen (Cluster 1 rot). Ab 4:36 Uhr wurde Lollo Rosso und Spinat verarbeitet, was eine deutliche Trübung des Prozesswassers verursachte. Das zweite Cluster (grün) von WP3 bis WP6 wurde zwischen 4:50 Uhr bis 5:50 Uhr entnommen. Nach einer Zwischenreinigung (5:00 Uhr) wurden von 5:05 Uhr bis zur nächsten

Zwischenreinigung (5:20 Uhr) die Produkte Lollo Bionda, Frissee und Romana verarbeitet. Ab 5:27 Uhr erfolgte die Verarbeitung von Eissalat und Radiccio bis zur erneuten Zwischenreinigung (6:00 Uhr). Die Proben WP7 bis WP12 des dritten Clusters (blau) wurden zwischen 6:20 Uhr und 8:52 Uhr entnommen. Ab 6:05 Uhr wurden Endivie, Frissee und Radiccio bis zum Ende der Probennahme verarbeitet. Die Proben WP13 bis WP18 (9:30 Uhr bis 11:50 Uhr) bildeten ein viertes Cluster (braun).

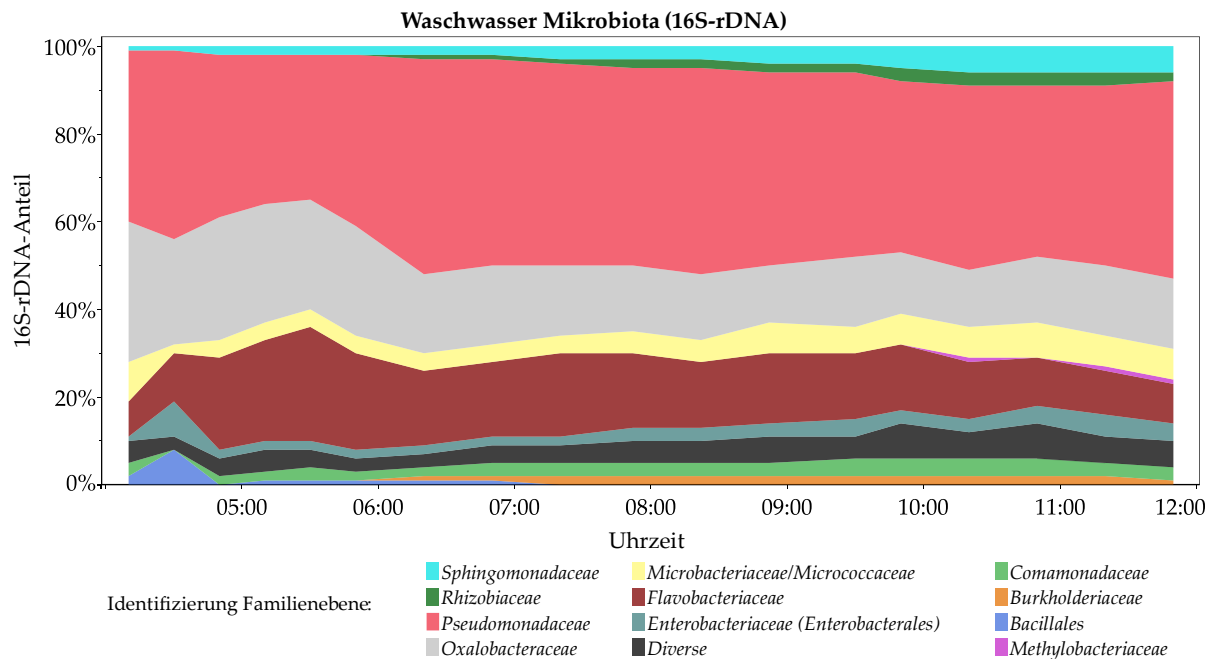


**Abbildung 10**

*Hierarchisches Clustering der 16S-rDNA Mikrobiota der Waschwasserproben.* Es wurde die Ward-Methode (Methode der kleinsten Quadrate) verwendet, um Ähnlichkeiten zwischen den relativen Abundanzen (auf OTU Ebene) zu gruppieren.

Die Mikrobiota des Waschwassers (Abbildung 11) wurde von Anfang bis zum Ende der Probennahme von Pseudomonaden dominiert (33-49 %). Auch die *Oxalobacteriaceae* waren vor allem zu Beginn der Probennahme mit Anteilen von 32 %

die zweithäufigste Bakterienfamilie im Waschwasser. Die Familie der *Flavobacteriaceae* zeigte ebenfalls hohe Anteile von bis zu 26 % der Sequenzen.



**Abbildung 11**

*Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft des Waschwassers auf Familienebene. Dargestellt sind die relativen Abundanzen der 16S-rDNA-Sequenzen im Waschwasser während der Verarbeitung von Salat im zeitlichen Verlauf.*

Die Mikrobiota zeigte generell eine Vielfalt von 11 Bakterienfamilien und einen relativ geringen Anteil von maximal 8 % an weiteren Familien (Diverse). Veränderungen waren vor allem zu Beginn der Produktion sichtbar (bis 5:00 Uhr), was mit dem Aufbau einer stabilen Gesamtkeimzahl (kulturelle Ergebnisse) und der Clusterbildung (Abbildung 11) im Einklang steht. Leichte Veränderungen sind in der Mikrobiota zwischen 5:00 Uhr und 6:00 Uhr sichtbar, beispielsweise die Zunahme der *Flavobacteriaceae*.

Ab 6:00 Uhr zeigte sich eine Kontinuität in den Mikrobiota. Diese Stabilität steht im zeitlichen Einklang mit der alleinigen Verarbeitung von Endivie, Frissee und Radiccio ab 6:05 Uhr bis zum Ende der Probennahme. Leichte Verschiebungen der Mikrobiota (6:00-12:00 Uhr) wie ein sehr schwacher Anstieg der *Sphingomonadaceae*, *Microbacteriaceae/Micrococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Comamonadaceae*, *Rhizobiaceae* und *Methylobacteriaceae*, sowie eine schwache Reduktion der *Flavobacteriaceae* konnten dennoch festgestellt werden.

### 3.1.2.3. Nachweise von Pathogenen im Produktionsbetrieb

Insgesamt wurden 240 Proben (96 im Jahr 2016 und 144 im Jahr 2017) auf das qualitative Vorkommen von *Salmonella*, *L. monocytogenes* und STEC untersucht. *L. monocytogenes* und *E. coli* wurde zudem quantitativ analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 28 dargestellt.

**Tabelle 28**

*Nachweis von Humanpathogenen im Produktionsbetrieb.*

Pathogen	Datum	Proben-code	Produkt	Proben-punkt	Quantitativ	Qualitativ
<i>L. monocytogenes</i>	Februar 2017	PP11	Eissalat	Vorputz-bereich	<10 KbE/g	Ja
	Februar 2017	PP12	Lollo Rosso*	Vorputz-bereich	<10 KbE/g	Ja
	Februar 2017	PP17	Lollo Rosso*	Vorputz-bereich	<10 KbE/g	Ja
	Februar 2017	PP18	Lollo Bionda	Vorputz-bereich	<10 KbE/g	Ja
	Mai 2017	PP2	Lollo Bionda	Feld	<10 KbE/g	Ja
	Mai 2017	PP3	Lollo Rosso	Feld	<10 KbE/g	Ja
Shigatoxin-produzierende <i>E. coli</i>	Juli 2016	PP_End 14	Salatmix	Endprodukt	<10 KbE/g	Ja, STEC (stx2)

\*Doppelprobe des gleichen Produktes

Es wurden keine *Salmonella* in den 240 Proben auf Herstellerebene nachgewiesen (0 %). In sechs Proben (6/240= 2,5 %) konnte *L. monocytogenes* qualitativ nachgewiesen werden. In keiner Probe konnte *L. monocytogenes* quantitativ nachgewiesen werden (Detektionslimit 10 KbE/g). Die sechs Isolate stammten ausschließlich aus dem Feld- und Vorputz-Bereich. Von den Feldproben waren 7,1 % positiv für *L. monocytogenes* (2 von 28 Feldproben), während in 4 von 53 Vorputzproben *L. monocytogenes* nachgewiesen wurde (7,6 %). Die Differenzierungen und Charakterisierungen dieser Isolate werden in Kapitel 3.3 ausführlich beschrieben.

In 17 von 240 Proben (7,1 %) wurden quantitativ *Listeria* spp. festgestellt (v.a. *L. innocua*), die sich phänotypisch auf ALOA-Agar deutlich von *L. monocytogenes* differenzieren ließen. Die Keimzahlen dieser *Listeria* spp. lagen zwischen 2,0 und

4,0 log KbE/g und wurden in allen Prozessierungsstufen und Produktgruppen gefunden.

In einer Probe Salatmix (Endivie, Frisee, Möhren, Lollo Rosso, Radicchio) wurde qualitativ ein STEC (*stx2* positiv) gefunden. Dies entspricht einer Prävalenz von 0,42 % aller Proben des Produktionsbetriebes (1/240) bzw. 2,8 % der Kategorie Endprodukte (1/36). In keiner Probe konnten STEC quantitativ nachgewiesen werden (Detektionslimit 10 KbE/g). Die Differenzierung und Charakterisierung des STEC Isolats wird in Kapitel 3.3 ausführlich beschrieben.

Der quantitative Nachweis von *E. coli* (*stx1* und *stx2* negativ) konnte in 9 von 240 Proben (3,75 %) erbracht werden, dabei wurden *E. coli* hauptsächlich in niedrigen Zahlen (10-30 KbE/g) und bei der Produktgruppe Salatmix als Endprodukt (5 von 9) gefunden.

## 3.2. Mikrobiologische Qualität von Salat und Gemüse auf Handelsebene

Es wurden 321 Proben von pflanzlichen Frischeprodukten (Tabelle 29) in Einzelhandels-, Super-, Discount- und Wochenmärkten gekauft und auf ihre mikrobiologische Qualität hin untersucht. Dabei wurden sowohl konventionell als auch ökologisch erzeugte Produkte untersucht.

Ziel dieser Untersuchung war die Bestimmung des mikrobiologischen Status von pflanzlichen Produkten und Pilzen, sowie das Vorkommen von pathogenen und toxinogenen Bakterien. Die Ergebnisse sollten potentielle Unterschiede zwischen den Produktgruppen und Anbauformen aufdecken, um potentielle Gefahren für den Verbraucher zu identifizieren.

**Tabelle 29**

*Übersicht der untersuchten Proben auf Handelsebene.*

Produktgruppe	Anzahl Proben		
	konventioneller Anbau	ökologischer Anbau	Gesamt
Frische Kräuter	28	12	40
Kopf-/Blatt-/Pflücksalate	30	10	40
Verzehrfertige Mischsalate	38	2	40
Sprossen	27	12	39
Möhren	56	25	81
Speisepilze	28	13	41
Gurken	25	15	40
Gesamt	232	89	321

### 3.2.1. Allgemeiner mikrobiologischer Status

Die Anzahl der untersuchten Proben, der Median, der Mittelwert, die Standardabweichung sowie die minimalen und maximalen Werte sind in Tabelle 30 dargestellt. Die Gesamtkeimzahl zeigte bei Sprossen mit 8,58 log KbE/g im Median die höchste, bei Salatgurken mit 6,22 log KbE/g die niedrigste Belastung. Auch bei Enterobakterien zeigten Sprossen die höchsten Keimzahlen mit 7,04 log KbE/g. Bei den präsumtiven *B. cereus* zeigten frische Kräuter und Kopf-/Blatt-/Pflücksalate höhere Medianwerte (1,48 und 1,48 log KbE/g), als die übrigen Kategorien (1,00 log KbE/g).

Auch bei Hefen zeigten frische Kräuter und Kopf-/Blatt-/Pflücksalate höhere Medianwerte (5,44 und 5,99 log KbE/g), als die übrigen Kategorien (3,70-4,51 log KbE/g). Für die Schimmelpilzbelastung wurde der höchste Median von 4,59 log KbE/g bei frischen Kräutern ermittelt.

Tabelle 30

*Mikrobiologischer Status verschiedener pflanzlicher Produktgruppen aus Einzelhandels-, Super-, Discount- und Wochenmärkten. Die deskriptive Statistik (Anzahl der Proben, Median, Mittelwert, Standardabweichung, Minimum, Maximum) wurde für jede Produktgruppe angegeben.*

	Anzahl	Median	Mittelwert	Std.-Abw.	Min.	Max.
<b>Gesamtkeimzahl in log KbE/g</b>						
FrISCHE Kräuter	40	6,89	6,71	1,21	4,00	9,30
FrISChpilze	41	7,23	6,96	1,74	3,70	9,81
Kopf-/Blatt- /Pflücksalate	40	7,31	7,50	0,99	5,57	9,34
Mischsalate	40	7,30	7,47	0,80	5,85	9,08
Möhren	81	7,15	7,22	0,69	5,72	9,32
Salatgurken	40	6,22	6,15	0,96	4,00	8,34
Sprossen	39	8,58	8,57	0,66	7,15	10,20
<b>Enterobakterien in log KbE/g</b>						
FrISCHE Kräuter	40	4,63	4,69	1,21	1,70	7,48
FrISChpilze	41	4,00	5,02	1,57	3,70	8,88
Kopf-/Blatt- /Pflücksalate	40	5,18	5,27	1,41	2,04	7,84
Mischsalate	40	5,00	5,19	1,01	3,00	6,86
Möhren	81	5,49	5,48	0,77	3,70	7,15
Salatgurken	40	4,00	4,00	1,14	1,70	6,98
Sprossen	39	7,04	7,02	0,93	4,11	9,04
<b>Präsumtive <i>B. cereus</i> in log KbE/g</b>						
FrISCHE Kräuter	40	1,48	1,63	0,96	0,70	3,99
FrISChpilze	40	0,70	0,84	0,40	0,70	2,18
Kopf-/Blatt- /Pflücksalate	39	1,48	1,53	0,67	0,70	2,82
Mischsalate	40	0,70	1,18	0,58	0,70	2,58
Möhren	81	0,70	1,49	0,97	0,70	3,30

	Anzahl	Median	Mittelwert	Std.-Abw.	Min.	Max.
Salatgurken	40	0,70	0,93	0,59	0,70	2,86
Sprossen	39	0,70	1,51	1,05	0,70	3,90
<hr/>						
Hefen in log KbE/g						
Frische Kräuter	40	5,44	5,48	1,02	3,95	7,66
Frischpilze	41	3,70	4,06	1,69	1,70	7,30
Kopf-/Blatt-/Pflücksalate	40	5,99	6,08	0,97	4,40	8,48
Mischsalate	40	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Möhren	81	4,51	4,50	0,59	3,38	5,75
Salatgurken	40	4,14	4,36	0,96	1,70	6,81
Sprossen	39	3,79	4,43	1,98	1,70	9,48
<hr/>						
Schimmelpilze in log KbE/g						
Frische Kräuter	40	4,59	4,65	0,92	2,00	6,48
Frischpilze	41	2,70	2,94	1,18	1,70	6,46
Kopf-/Blatt-/Pflücksalate	40	4,00	3,91	1,37	1,70	8,48
Mischsalate	40	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Möhren	81	3,08	3,04	0,82	1,70	4,70
Salatgurken	40	4,00	3,92	0,99	1,70	5,38
Sprossen	39	2,90	2,91	1,07	1,70	5,04

n.a. nicht auswertbar

Zur besseren Visualisierung sind die Daten aus Tabelle 30 in Abbildung 12 als Boxplot Diagramm dargestellt. Vor allem bei der Gesamtkeimzahl und der Enterobakterienzahl gab es deutliche Unterschiede in der Belastung zwischen den Produktgruppen.

Für präsumtive *B. cereus*, Hefen und Schimmelpilze gab es, rein optisch, weniger Unterschiede. Die Fläche des Violinendiagramms zeigte für die Gesamtkeimzahl und Enterobakterien eine eher kompakte Form bei Mischsalaten, Möhren und Sprossen, d. h. diese Gruppen wiesen durch eine geringere Varianz bei Gesamtkeimzahl und Enterobakterien auf, was auch an der geringen Standardabweichung ersichtlich ist. Ein weniger kompakter Box-Plot bzw. ein gestreckteres Violinendiagramm wie beispielsweise bei frischen Pilzen resultiert entsprechend aus großen Unterschieden in den Keimzahlen innerhalb der jeweiligen Gruppe.



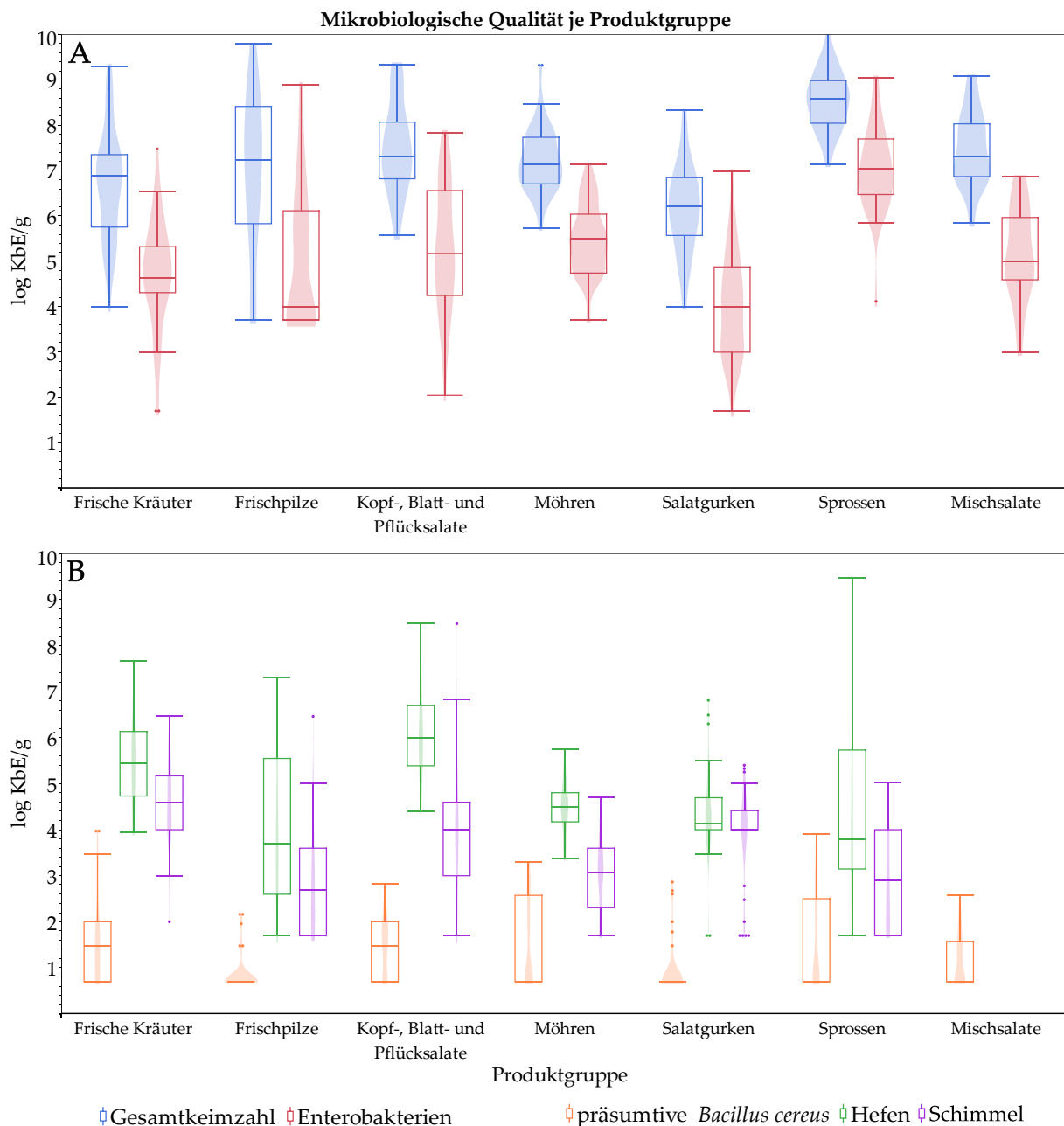


Abbildung 12

**Mikrobiologischer Status verschiedener, pflanzlicher Produktgruppen auf Handelsebene als Box-Plot Diagramm.** Abgebildet sind im Diagramm (A) die Ergebnisse der Gesamtkeimzahl und Anzahl der Enterobakterien; im Diagramm (B) präsumtive *B. cereus*, Hefen und Schimmelpilze jeweils für die verschiedenen Produktgruppen. Die mittlere Linie im Box-Plot beschreibt den Median, innerhalb der Box liegen 50 % der Datenpunkte, die Whisker geben den Wertebereich des unteren und oberen 1,5fachen Interquartilsabstand an. Daten außerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstandes werden als punktförmige Ausreißer dargestellt. Die dem Boxplot hinterlegten Violinendiagramme (Pastellfarben) visualisieren die Verteilung der Daten.

Bei allen Keimzahlen wurden signifikante Unterschiede zwischen den Produktgruppen gefunden.

Bei der Gesamtkeimzahl wurden signifikante Unterschiede zwischen den zentralen Tendenzen je Produktgruppe durch den Kruskal-Wallis-Test ermittelt ( $\text{Chi}^2=98,96$ ;

Wahrsch. $>$ Chi<sup>2</sup>=0,0001). Die Wahrscheinlichkeit $>$ Chi<sup>2</sup> entspricht in diesem Fall dem p-Wert und wird im Folgenden als p-Wert angegeben. Um die signifikanten Differenzen zwischen den Produktgruppen zu ermitteln, wurde jedes Paar mittels Wilcoxon-Methode verglichen.

Die Gesamtkeimzahlen der Sprossenproben lagen signifikant höher als alle anderen Gruppen (p $<$ 0,0001). Außerdem besaßen frische Kräuter und Salatgurken signifikant geringere Gesamtkeimzahlen gegenüber den übrigen Gruppen (p $<$ 0,0199 bis  $<$ 0,0001). Einzig zwischen frischen Kräutern und Frischpilzen wurde in der Gesamtkeimzahl kein signifikanter Unterschied festgestellt.

Auch bei den Enterobakterien wurden signifikante Unterschiede zwischen den Produktgruppen ermittelt (Chi<sup>2</sup>=103,96; p $<$ 0,0001). Die Enterobakterienbelastung der Sprossenproben war signifikant höher als in allen anderen Gruppen (p $<$ 0,0001). Außerdem besaßen Salatgurken signifikant geringere Enterobakterienzahlen gegenüber den übrigen Gruppen (p $<$ 0,0093 bis  $<$ 0,0001). Zusätzlich zeigten Möhren signifikant höhere Enterobakteriengehalte als frische Kräuter und frische Pilze (p $<$ 0,0192 bis  $<$ 0,0001).

Bei den präsumtiven *B. cereus* wurden signifikante Unterschiede zwischen den Produktgruppen ermittelt (Chi<sup>2</sup>=34,30; p $<$ 0,0001). Die präsumtiven *B. cereus* Keimzahlen der frischen Kräuter waren signifikant höher als bei frischen Pilzen, Mischsalaten, Möhren, Salatgurken und Sprossen (p $<$ 0,0493 bis  $<$ 0,0001). Die *B. cereus* Gehalte lagen bei frischen Pilzen signifikant niedriger als bei Kopf-, Blatt- und Pflücksalate und Mischsalaten (p $<$ 0,0001). Außerdem waren Salatgurken signifikant geringer mit präsumtiven *B. cereus* belastet als Kopf-, Blatt- und Pflücksalate (p $<$ 0,0001) und Mischsalate (p=0,0082). Zusätzlich zeigten Kopf-, Blatt- und Pflücksalate signifikant höhere *B. cereus* Keimzahlen als Mischsalate (p=0,0128).

Bei den Hefen wurden signifikante Unterschiede zwischen den Produktgruppen ermittelt (Chi<sup>2</sup>=34,30; p $<$ 0,0001). Die Produktgruppen Kopf-, Blatt- und Pflücksalate und frische Kräuter zeigten signifikant erhöhte Hefenzahlen gegenüber den übrigen untersuchten Produktgruppen (p $<$ 0,0025 bis  $>$ 0,0001). Außerdem zeigten Möhren eine signifikant höhere Hefenanzahl als frische Pilze (p=0,0139).

Bei den Schimmelpilzen wurden signifikante Unterschiede zwischen den Produktgruppen ermittelt (Chi<sup>2</sup>=79,48; p $<$ 0,0001). Die Produktgruppen frische Kräuter, Kopf-, Blatt- und Pflücksalate und Salatgurken zeigten signifikant erhöhte Schimmelpilzzahlen gegenüber den übrigen untersuchten Produktgruppen (p $<$ 0,0025 bis  $>$ 0,0001).

### 3.2.2. Unterschiede zwischen ökologischem und konventionellem Anbau auf Handelsebene

Es wurden jeweils die Produktgruppen (Frische Kräuter, Kopf-/Blatt-/Pflücksalate, Verzehrfertige Mischsalate, Sprossen, Möhren, Speisepilze, Gurken) auf signifikante Unterschiede (Wilcoxon- Test) zwischen ökologischer und konventioneller Erzeugung anhand der Gesamtkeimzahlen, Enterobakterien, präsumtive *B. cereus*, Hefen und Schimmelpilze untersucht. Aufgrund von nur zwei (n=2/40) ökologisch produzierten Mischsalaten in der Analyse, wurde diese Produktgruppe nicht für eine statistische Auswertung herangezogen. Bei den übrigen Produktgruppen stammten mindestens 10 von 40 Proben aus ökologischer Erzeugung (Tabelle 29).

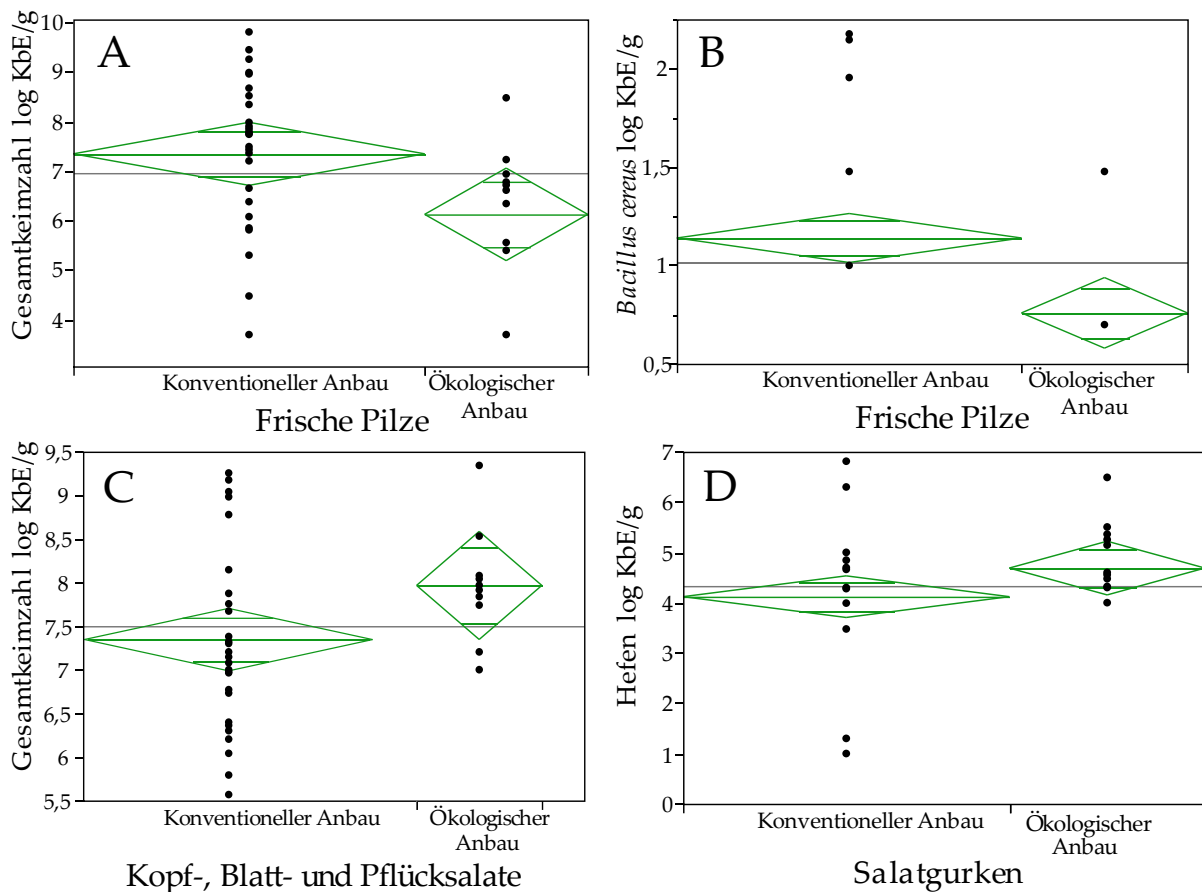
Bei den Gesamtkeimzahlen zeigte sich bei frischen Pilzen eine signifikant geringere Gesamtkeimzahl 6,12 log KbE/g (Mittelwert) bei ökologischer Erzeugung ( $p=0,0267$ ) gegenüber 7,35 log KbE/g aus konventioneller Erzeugung (Abbildung 13 A). Zusätzlich zeigte die ökologische Erzeugung signifikant niedrigere präsumtive *B. cereus* Gehalte von 0,76 log KbE/g bei frischen Pilzen ( $p<0,0001$ ), als bei konventioneller Erzeugung (1,14 log KbE/g) (Abbildung 13 B).

Bei Kopf-, Blatt- und Pflücksalaten zeigte sich eine signifikant höhere Gesamtkeimzahl von 7,97 log KbE/g in der ökologischen Erzeugung gegenüber 7,35 log KbE/g im konventionellen Anbau ( $p=0,0378$ ) (Abbildung 13 C).

Bei Salatgurken zeigte sich eine signifikant höhere Anzahl von Hefen von 4,69 log KbE/g in der ökologischen Erzeugung gegenüber 4,12 log KbE/g im konventionellen Anbau ( $p=0,0208$ ) (Abbildung 13 D).

Bei den Produktgruppen frischen Kräutern, Möhren und Sprossen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Anbauformen ermittelt.

Es wurden keine generellen Unterschiede in der mikrobiologischen Belastung zwischen konventionellem und ökologischem Anbau gefunden.



**Abbildung 13**

*Darstellung der signifikanten Unterschiede in den Keimzahlen zwischen konventionellem und ökologischem Anbau. (A) Gesamtkeimzahl bei frischen Pilzen, (B) Präsumtiven B. cereus bei frischen Pilzen, (C) Gesamtkeimzahl bei Kopf-, Blatt- und Pflücksalate und (D) Anzahl der Hefen bei Salatgurken.*

### 3.2.3. Nachweise von Pathogenen auf Handelsebene

Insgesamt wurden 321 Proben auf das Vorkommen von *Salmonella*, *L. monocytogenes* und STEC untersucht.

Hierbei wurde in einer der 321 Proben *Salmonella* (0,31 %) in verzehrfertigem Mischsalat (Bull's Blood, Rucola, Roter Mangold, Roter Tatsoi, Tatsoi) qualitativ nachgewiesen (Tabelle 31).

In drei von 321 Proben (0,94 %) konnte *L. monocytogenes* qualitativ nachgewiesen werden. Zwei Isolate wurden in verzehrfertigem Mischsalat detektiert (Salat 1: Lollo Rossa, Spinat, Lollo Bionda; Salat 2: Endivie, Weißkohl, Möhren) und ein Isolat stammte aus frischen Enokipilzen. In der positiven Probe der Enokipilze konnte *L. monocytogenes* auch quantitativ mit einer Keimzahl von 5 log KbE/g nachgewiesen werden.

STEC wurden in zwei Salat- und Gemüseproben auf Handelsebene detektiert (0,62 %). Ein STEC (O26:H11) wurde aus Mischsalat (Frisée, Möhren, Lollo Bionda, Lollo Rossa,

Radiccio) gewonnen. Auch in weiteren Proben der gleichen Charge konnte dieser STEC Stamm nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Ein weiterer STEC (O146:H28) wurde aus Möhren isoliert.

Die Differenzierungen und Charakterisierungen dieser Isolate werden in Kapitel 3.3 ausführlich beschrieben.

**Tabelle 31**

*Nachweis von Humanpathogenen auf Handelsebene.*

Pathogen	Datum	Proben-code	Produkt	Qualitativ	Quantitativ
<i>Salmonella</i>	20.04.2015	15MS06	Mischsalat	<i>Salmonella</i> positiv	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	22.06.2015	15MS22	Mischsalat	<i>L. monocytogenes</i> positiv	n.d.
	15.09.2015	15MS40	Mischsalat	<i>L. monocytogenes</i> positiv	n.d.
	20.09.2016	16P18	Frische Pilze (Enoki)	<i>L. monocytogenes</i> positiv	5 log KbE/g
STEC	20.07.2015	15MS22	Mischsalat	STEC ( <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>eae</i> ) positiv	<10 KbE/g
	06.06.2016	16M07	Möhre	STEC ( <i>stx2</i> ) positiv	<10 KbE/g

n.d. nicht durchgeführt

Der quantitative Nachweis von >10 KbE/g von *E. coli* (*stx1* und *stx2* negativ) konnte in sechs von 116 untersuchten Proben (5,17 %) erbracht werden. Dabei wurden *E. coli* zwischen 2-4,9 log KbE/g nachgewiesen und diese wurden hauptsächlich bei der Produktgruppe Sprossen gefunden (fünf der sechs *E. coli* Nachweise bei Sprossen, ein Mal bei Möhren).

### 3.3. Differenzierung der humanpathogenen Bakterien und deren Charakterisierung

In den 240 entlang der Produktion (Feld bis zum Verbraucherprodukt) gewonnenen Proben und den 321 auf Handelsebene entnommenen Proben wurden insgesamt 13 humanpathogene Bakterien (*Salmonella*, *L. monocytogenes* und STEC) nachgewiesen (2,3 %) (Tabelle 32).

Tabelle 32

Übersicht über Nachweis und Prävalenz von *Salmonella*, *L. monocytogenes* und STEC in den untersuchten Produkten.

	Produktgruppe	Anteil belasteter Produkte (Pathogen)	Anteil in Prozent	Bezeichnung der Isolate
Proben aus der Produktion n=321	Feldproben	2/28 ( <i>L. monocytogenes</i> )	7,1 %	1705PP02LM 1705PP03LM
	Lagerproben	0/63	0 %	
	Vorputzbereich	4/53 ( <i>L. monocytogenes</i> )	7,6 %	1702PP11LM 1702PP12LM* 1702PP17LM* 1702PP18LM
	Reinbereich	0/60	0 %	
	Endprodukt	1/36 (STEC)	2,8 %	1607PPE14EC
Proben aus dem Handel n=240	Frische Kräuter	0/40	0 %	
	Kopf-/Blatt-/Pflücksalate	0/41	0 %	
	Verzehrfertige Mischsalate	4/40 (1x <i>Salmonella</i> , 2x <i>L. monocytogenes</i> und 1x STEC)	10 %	1504MS06SA 1506MS22LM 1509MS40LM 1507MS25EC
	Sprossen	0/39	0 %	
	Möhren	1/81 (STEC)	1,24 %	1606M07EC
	Speisepilze	1/40 ( <i>L. monocytogenes</i> )	2,5 %	1609P18LM
	Gurken	0/40	0 %	
Gesamt-nachweise		13/561 ( <i>Salmonella</i> , <i>L. monocytogenes</i> , STEC)	2,3 %	

\*1702PP12 und 1702PP17 wurden aus zwei Proben des gleichen Produktes von Lollo Rosso isoliert. Daher wurde nur 1702PP12 weiter differenziert.

*Salmonella* wurde in einem Fresh-Cut Mischsalat gefunden und ist damit das humanpathogene Bakterium mit der geringsten Abundanz (1/561; 0,18 %). STEC wurden in drei Produkten (2x Mischsalat, 1x Möhre) (3/561; 0,54 %) und *L. monocytogenes* in 9 Proben (Feld-, Vorputzproben, Mischsalate, Speisepilz) nachgewiesen (9/561; 1,6 %). Bei Betrachtung der Produktgruppen zeigten Feld und Vorputz, sowie verzehrfertige Mischsalate die höchsten Prävalenzen von den untersuchten Pathogenen mit 7,1-10 % positiven Proben.

Die Genome der pathogenen Isolate wurden zur weiteren Differenzierung und Charakterisierung sequenziert (Tabelle 33).

Tabelle 33

Übersicht und Charakteristika der Ganzgenom-sequenzierten *Salmonella*, *L. monocytogenes* und STEC.

	Isolat	Genomgröße (bp)	GC Gehalt (mol %)	Anzahl contigs	N50 (bp)
<i>Salmonella</i>	1504MS06SA	4.639.137	52,2	42	349.082
<i>L. monocytogenes</i>	1506MS22LM*	2.879.121	37,9	21	515.847
	1509MS40LM*	2.975.327	37,8	24	482.161
	1609P18LM	2.924.450	37,9	21	476.697
	1702PP11LM	2.868.189	37,9	26	500.822
	1702PP12LM	2.874.712	37,9	28	475.226
	1702PP18LM	2.867.754	37,9	27	500.822
	1705PP02LM	2.910.739	37,9	18	434.700
	1705PP03LM	2.948.327	37,8	14	541.074
	STEC	1507MS25EC*	5.705.580	50,7	7 (6 Plasmide)
1606M07EC		5.523.509	50,6	266	126.571
1607PPE14EC		5.528.138	50,6	220	139.621

\*veröffentlicht (Fiedler et al. 2020)

### 3.3.1. *Salmonella*

Das *Salmonella* Isolat 1504MS06SA wurde aus Mischsalat (Bull's Blood, Rucola, Roter Mangold, Roter Tatsoi, Tatsoi) gewonnen. Nach serologischer Untersuchung handelte es sich um das Serovar *Salmonella* Szentés (Seroformel 16:k:1,2). Das Genom wurde zur weiteren Charakterisierung sequenziert. Die molekulare Serotypisierung bestätigte die immunologische Ersttypisierung mit der Seroformel 16:k:1,2. Als *multi-locus-sequence type* (MLST) wurde ST427 und als *core genome* MLST (cgMLST) wurde ST179996 (99,87 % der Allele gefunden) bestimmt. Als Pathogenitätsfaktoren konnten die *Salmonella Pathogenicity Islands* (SPI) SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4, SPI-5, SPI-9, SPI-13 und SPI-14 mittels SPIFinder 2.0 gefunden werden. Es wurde das Aminoglykosidresistenz Gen *aac(6')-Iaa* nachgewiesen. Außerdem wurde die Punktmutation parC:p.T57S detektiert, welche Auswirkungen auf die Nalidixinsäure und Fluorchinolonsenibilität haben kann. Plasmidsequenzen wurden mittels PlasmidFinder nicht detektiert.

Da es sich bei *Salmonella* Szentes um ein seltenes Serovar handelt, wurde nach weiteren Genom-sequenzierten Stämmen dieses Serovars in den öffentlichen Datenbanken (NCBI) gesucht. Dadurch konnten 12 weitere Genome gefunden werden, deren Sequenzierdaten zur Verfügung standen (Anhang Tabelle A 7). Diese 12 Stämme wurden zusammen mit dem *Salmonella* Isolat 1504MS06SA für phylogenetische und epidemiologische Untersuchungen verwendet. Die weiteren *Salmonella* Szentes Stämme wurden in verschiedenen Ländern (Großbritannien, Deutschland, Bulgarien) aus verschiedenen Quellen (Human, Nahrungsmittel, Umwelt) isoliert (Tabelle A 7). Die Rohdaten wurden assembliert und die Genome annotiert (Tabelle 34). Alle *Salmonella* Szentes Stämme zeigten ähnliche Genomgrößen, Anzahl von *coding sequences* (CDS) und Virulenzfaktoren-Gene (Tabelle 34).

Tabelle 34

*Vergleichende genomische Charakterisierung des Isolats 1504MS06SA und weitere Vertreter des Salmonella Szentes Serovars.*

<i>Salmonella</i> Szentes Stamm	Genomgröße (bp)	contigs	CDS	tRNA	rRNA	Virulenz Faktoren (VFDB)	Sequence Read Archive (SRA) Accession
<b>1504MS06SA (diese Studie)</b>	4.639.137	42	4.593	78	12	129	un-veröffentlicht
FMA0171	4.657.661	60	4.593	77	12	125	SRR1346306
MS170183	4.767.966	94	4.739	69	7	126	ERS1855865
56995	4.646.987	96	4.594	67	8	126	SRR3048756
63873	4.646.893	98	4.596	67	5	127	SRS904907
70656	4.646.842	95	4.607	72	7	128	SRS900701
FL_FLDACS-43692	4.659.761	100	4.623	80	13	125	SRR1015723
FDA00009199	4.659.939	61	4.587	78	11	127	SRR2086588
FDA00009200	4.658.347	68	4.601	78	10	126	SRR2086572
FDA00013413	4.686.358	93	4.634	77	11	125	SRR7718994
FDA00013412	4.685.464	87	4.645	78	12	125	SRR7718993
453249	4.649.371	164	4.647	65	3	132	SRS4323524
274292	4.648.491	145	4.620	66	3	130	SRS4443890

Um die genomischen Ähnlichkeiten zu bestimmen, wurden im polyphasischen Ansatz die Methoden der digitalen DNA-DNA Hybridisierung (dDDH), kmer basierte *Mash* Distanzberechnung (*mash*), MLST, *whole genome* MLST und *core genome* MLST durchgeführt (Tabelle 35). Die dDDH und *mash* Ergebnisse zeigen äußerst hohe Ähnlichkeiten, aber dennoch individuelle Unterschiede zum Referenzgenom



1504MS06SA. Die Sequenzbasierte MLST-Analyse zeigte die Zugehörigkeit zum ST427 bei allen Isolaten. Mittels wgMLST wurde jedem Isolat ein individueller Sequenztyp zugeordnet. Durch die cgMLST wurden identische Sequenztypen bei FDA00009199/FDA00009200 (cgMLST35757) und bei FDA00013413/FDA00013412 (cgMLST140395) identifiziert. Diese beiden Paare besitzen jeweils einen identischen Ursprung (Anhang Tabelle A 7). Die cgMLST V2 HC10 Einordnung gruppiert die ursprünglichen cgMLST-Typen in feste Clustergruppen, wobei sich bei HC10 bis zu 10 Allele unterscheiden können. Dieses System nennt sich *Hierarchical Clustering* oder kurz *HierCC* (of cgMLST) und kann für verschiedene cgMLST-Allelabstände durchgeführt werden (HC1=1 Allel, HC2=2 Allele, HC10=10 Allele, etc.). In der *HierCC*-Analyse der *S. Szentes* Stämme zeigte sich bei cgMLST V2 HC10 ein identischer Sequenztyp zwischen 1504MS06SA und dem Isolat 453249 (Tabelle 35). Beide Stämme unterscheiden sich demnach in maximal 10 Allelen des Kerngenoms. Der Stamm 453249 wurde im Dezember 2017 von einer erkrankten Person in Großbritannien isoliert (Tabelle A 7).

Ein identischer HC10 Sequenztyp wurde zudem bei den Stämme 56995 und 63873 festgestellt. Erwartungsgemäß besitzen FDA00009199 und FDA00009200 bzw. FDA00013413 und FDA00013412 neben dem identischen cgMLST auch identische cgMLST HC10 Typen. Bei bis zu 50 Allelen Unterschied (cgMLST V2 HC50) konnten alle Stämme demselben Sequenztyp zugeordnet werden.

**Tabelle 35**

*Genomische Ähnlichkeit von weiteren Salmonella Szentes Stämmen gegenüber dem Stamm 1504MS06SA und die Ergebnisse der Multi-Locus-Sequenztypisierung (MLST, wgMLST, cgMLST und HierCC).*

<i>Salmonella</i> Szentes Stamm	dDDH (F. 2)	mash distance	MLST	wgMLST Enterobase	cgMLST V2	cgMLST V2 HC10	cgMLST V2 HC50
<b>1504MS06SA</b>	Referenz	Referenz	ST427	223682	179996	168905	6876
FMA0171	99,62	1.000/1.000	ST427	20332	16337	16337	6876
MS170183	99,9	977/1.000	ST427	96520	81812	81812	6876
56995	99,4	999/1.000	ST427	10645	6876	6876	6876
63873	99,4	998/1.000	ST427	33385	29055	6876	6876
70656	99,4	1.000/1.000	ST427	30290	25986	25986	6876
FL_FLDACS- 43692	100	998/1.000	ST427	3174	35901	35901	6876
FDA00009199	100	998/1.000	ST427	40696	35.757	16.337	6.876
FDA00009200	100	998/1.000	ST427	40668	35757	16337	6876
FDA00013413	100	991/1.000	ST427	172600	140395	140395	6876

<i>Salmonella</i> Szentes Stamm	dDDH (F. 2)	mash distance	MLST	wgMLST Enterobase	cgMLST V2	cgMLST V2 HC10	cgMLST V2 HC50
FDA00013412	100	992/1.000	ST427	172601	140395	140395	6876
453249	99,5	1.000/1.000	ST427	210250	168905	168905	6876
274292	99,5	1.000/1.000	ST427	215752	173382	173382	6876

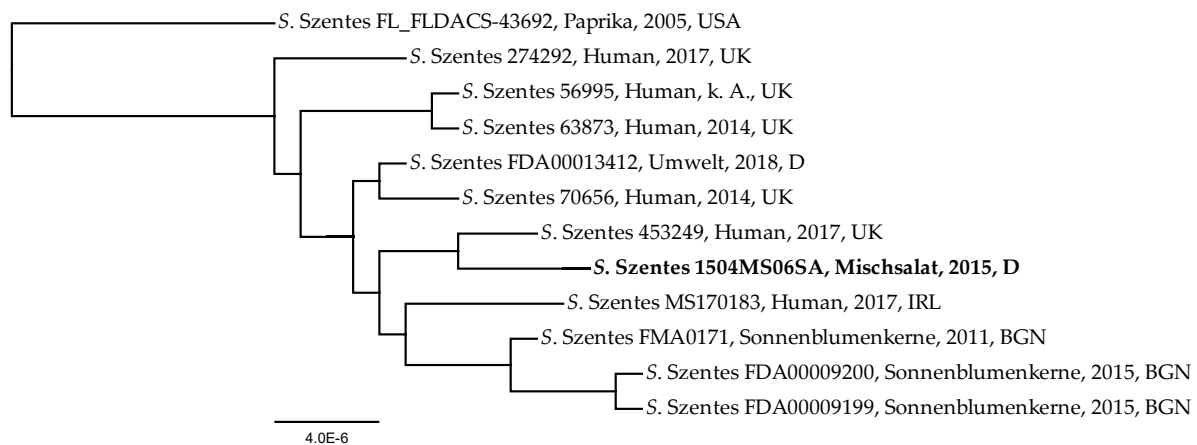
Da alle *S. Szentes* Stämme eine außergewöhnlich hohe Genomähnlichkeit aufwiesen, wurde eine Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP)-Analyse durchgeführt (Tabelle 36). Diese Technik gehört zu den molekularen Techniken mit der höchsten diskriminatorischen Aussagekraft bei Genom-Vergleichen und der Analyse von klonalen Verwandtschaftsbeziehungen. In der SNP-Analyse zeigte der Stamm 453249 die höchste Verwandtschaft zu *S. Szentes* 1504MS06SA (aus der vorliegenden Studie) mit 6 bzw. 13 SNPs (CSI bzw. CFSAN). Für die übrigen Stämme wurden 16-56 SNPs mittels der CSI Pipeline und 22-93 SNPs mittels der CFSAN Pipeline erkannt.

**Tabelle 36**

*Ergebnisse der SNP-Analyse gegenüber der Referenz 1504MS06SA. Dargestellt ist die Anzahl der SNPs im Bezug zum Referenzgenom (diese Studie). Es wurden die SNP Pipelines CSI Phylogeny 1.4 (Center for Genomic Epidemiology, Technical University of Denmark) und CFSAN 2.2.1 (United States Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition) verwendet.*

<i>Salmonella</i> Szentes Stamm	Anzahl der Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) gegenüber der Referenz <i>Salmonella Szentes 1504MS06SA</i>	
	SNP Pipeline 1 (CSI Phylogeny)	SNP Pipeline 1 (CFSAN, Phase2_Preserved_SNPs)
56995	30	52
63873	30	52
70656	16	22
FDA00009199	32	53
FDA00009200	32	52
FDA00010809	26	41
FDA00013412	29	44
FDA00013413	29	44
FL_FLDACS_43 692	56	93
FMA0171	27	45
MS170183	27	45
274292	47	45
453249	6	13
Referenz	0	0

Zur visuellen Darstellung wurde ein phylogenetischer Baum auf Grundlage von 1.000 *core genome* Genen berechnet (Abbildung 14). Hier zeigten sich die intraspezifischen Beziehungen, welche die MLST und SNP-Analysen bestätigen.



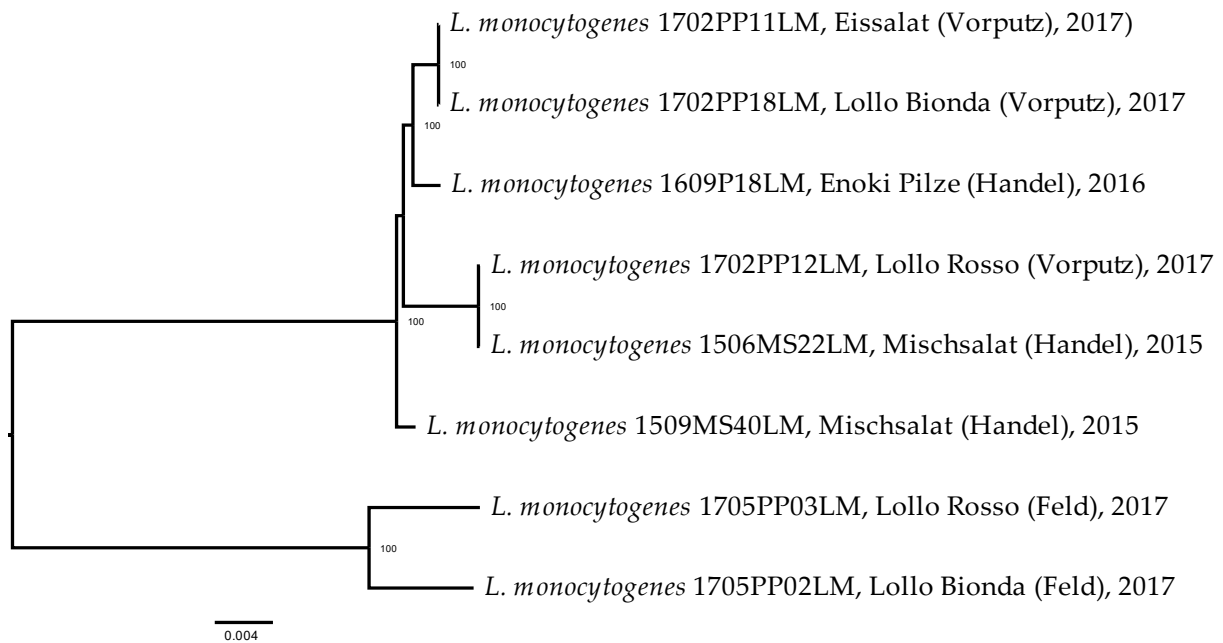
**Abbildung 14**

**Phylogenetische Analyse der *Salmonella Szentes* Stämme.** 1.000 *single-copy-Gene* (PATRIC PGFams) wurden ausgewählt und basierend auf deren Protein und DNA Sequenz mit dem Programm RAXML Version 8.2.11 analysiert. Neben Stammbezeichnung, Isolationsquelle und Isolationsjahr wurde das Ursprungsland angegeben (USA= Vereinigte Staaten von Amerika, UK= Großbritannien, D= Deutschland, IRL= Irland, BGN= Bulgarien). Der Maßstabsbalken entspricht 0,000004 substituierten Positionen im vollständigem Alignment (DNA/AS).

### 3.3.2. *Listeria monocytogenes*

Es wurden acht der neun Isolate aus den untersuchten Proben sequenziert. Da zwei Isolate (1702PP12LM, 1702PP17LM) von dem identischen Produkt stammten und einen identischen Serotyp aufwiesen (nicht gezeigt) wurde nur eines der beiden Isolate sequenziert (1702PP12LM), da angenommen wurde, dass es sich um multiple Isolate des gleichen Stamms handelt. Zwei Isolate stammten aus dem Anbau (Feld). Drei Isolate wurden im Vorputzbereich gewonnen. Zwei weitere Isolate wurden aus zwei Mischsalaten und ein Isolat wurde aus frischen Pilzen gewonnen.

Zur Visualisierung der genomischen Verwandtschaft wurde ein phylogenetischer Baum, basierend auf 1.000 *core genome* Genen berechnet (Abbildung 15).

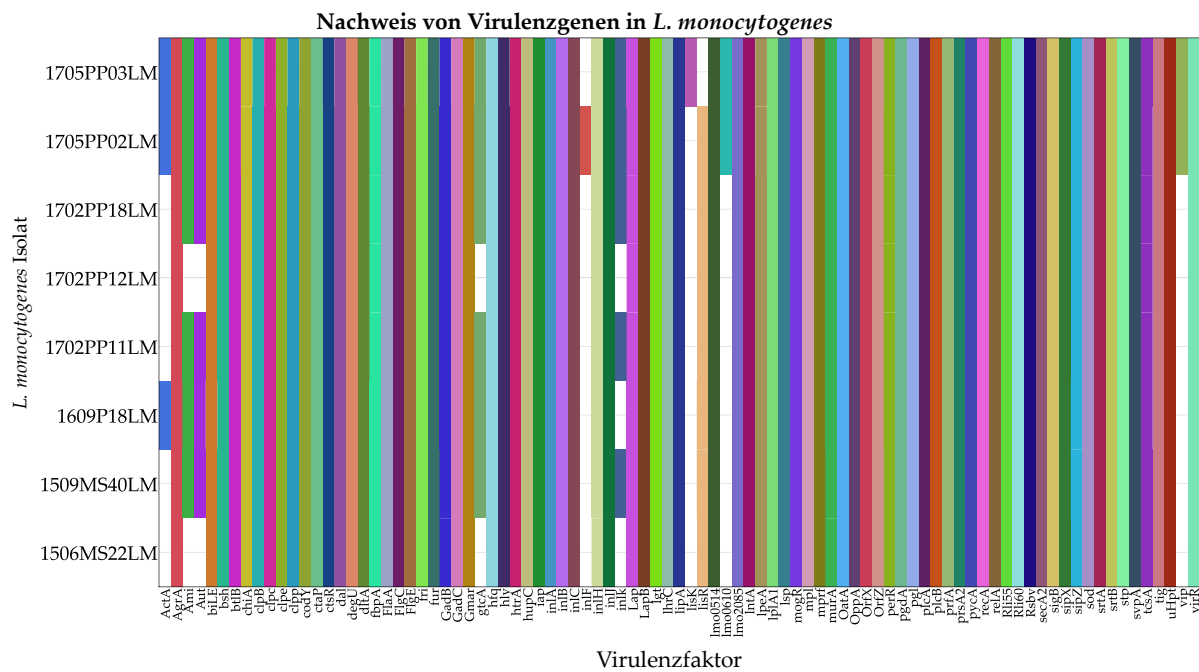


**Abbildung 15**

**Phylogenetische Analyse der isolierten *L. monocytogenes* Stämme.** 1.000 single-copy-Gene (PATRIC PGFams) wurden ausgewählt und basierend auf deren Protein und DNA Sequenz mit dem Programm RAxML Version 8.2.11 analysiert. Der Maßstabsbalken entspricht 0,000004 substituierten Positionen im vollständigem Alignment (DNA/AS).

Die Genome der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Isolate wurden mithilfe der Tools ResFinder v4.1 und VirulenceFinder v2.0 auf die Präsenz von Antibiotikaresistenz-, Plasmid- und Virulenzfaktor-kodierenden Genen untersucht. Außer dem intrinsischen *fosX* Gen in allen Stämmen (Fosfomycin-Resistenz) wurden keine weiteren Resistenzgene identifiziert. In keinem der Isolate konnten Plasmidsequenzen detektiert werden.

Insgesamt wurden 89 Virulenzfaktor-Gene in den *L. monocytogenes* Stämmen gefunden (Abbildung 16). Davon kamen 79 in allen Isolaten vor. Das Gen *inlF* wurde nur in 1705PP02LM gefunden und das Gen *lisK* war lediglich in 1705PP03LM vorhanden. Die Gene *actA*, *ami*, *aut*, *gtcA*, *inlK*, *lisR*, *lmo0610* und *vip* wurden nur vereinzelt (2/8-7/8) in den untersuchten Stämmen nachgewiesen. Das Virulenzgen *lhrC* wurde in mehreren Kopien (1-3) in den Genomen gefunden.

**Abbildung 16**

*Genetische Virulenzfaktoren der isolierten L. monocytogenes Stämme.*

In Tabelle 37 sind die Ergebnisse der genomischen Differenzierung dargestellt. Vier von acht Stämmen konnten dem molekularen Serotyp 1/2b zugeordnet werden, zwei von acht Stämmen gehören zum Serotyp 4b und weitere zwei gehören dem Serotyp 1/2a an. Der MLST ST1 wurde bei zwei Isolaten identifiziert, der ST736 bei zwei weiteren Isolaten. ST59, ST87, ST451 und ST399 wurden bei den vier weiteren Stämmen erkannt. Durch die *core genome* MLST konnte der identische cg-24602 Typ bei 1702PP11LM und 1702PP18LM identifiziert werden (MLST ST736).

Die Suche nach genomisch ähnlichen Isolaten gestaltete sich aufgrund der Vielzahl der in Datenbanken vorkommenden Stämmen mit gleichem Serotyp bzw. MLST-Typ schwieriger als bei *Salmonella* Szentés. Über die Internet Plattform PasteurMLST wurde nach den ähnlichsten Einträgen (nach cgMLST1748 Schemata) für die jeweiligen cgMLST-Typen gesucht (Tabelle 37). Zusätzlich konnte für die publizierten Stämme 1506MS22LM und 1509MS40LM die SNP basierte Pathogen Detection des National Center for Biotechnology Information (NCBI) genutzt werden. Damit wurde für das Isolat 1506MS22LM das Isolat 16-00028 (ERR2261478, 2016, Deutschland, humane Listeriose) mit nur 3 SNPs ermittelt. Die Suche nach verwandten Isolaten zu 1509MS40LM war ergebnislos.

Tabelle 37

*Genomische Differenzierung und vergleichende Charakterisierung der isolierten L. monocytogenes Stämme.*

Isolat	Mol. Serotyp	MLST	cgMLST	Ähnlichstes Isolat (Bezeichnung, SRR, cgMLST und Info)
1506MS22LM	4b	ST1	cg-11965 (99,9 %)	FDA00006218, (SRR6926317), ct-4903, 2011, Peru, Nahrungsmittel
1509MS40LM	1/2b	ST59	cg-22433 (99,3 %)	Kein Ergebnis
1609P18LM	1/2b	ST87	cg-25587 (99,6 %)	FDA00005603, (SRR7359081), ct-58, 2007, Süd-Korea, Nahrungsmittel
1702PP11LM	1/2b	ST736	cg-24602 (99,4 %)	SENASICA_Li_U16 (SRR7786756), ct-4914, 2017, Chile, Nahrungsmittel
1702PP12LM	4b	ST1	cg-24201 (99,1 %)	104 (keine Angabe), ct-230, 2015, Polen, Nahrungsmittel
1702PP18LM	1/2b	ST736	cg-24602 (99,4 %)	SENASICA_Li_U16 (SRR7786756), ct-4914, 2017, Chile, Nahrungsmittel
1705PP02LM	1/2a	ST451	cg-22021 (99,5 %)	sam_2A310D68-7040-4E0F-8347-8FB10D6BE32B (ERR2522588), ct-798, 2015, Polen, Human
1705PP03LM	1/2a	ST399	cg-12055 (99,7 %)	sam_B989AF5F-DD79-4C2F-93D4-46DEA4FD90B4, (ERR2522452), ct-5631, 2012, Polen, Human

Für alle in dieser Studie isolierten Stämme und ihren jeweils nächsten Verwandten wurde eine SNP-Analyse (CSI Phylogeny) durchgeführt um die genomische Ähnlichkeit abzuschätzen (Anhang Tabelle A 8). Dabei wurde das Genom von *L. monocytogenes* EGD-e als Referenz benutzt. So konnten 2.626.483 Positionen in jedem Genom verglichen werden. 1506MS22LM zeigte 25 SNPs zu 16-00028 (Pathogen Detection NCBI =3 SNPs) und 46 SNPs zu FDA00006218. Für 1609P18LM wurden 25 SNPs zu FDA00005603 ermittelt. 1702PP11LM zeigte 104 SNPs zu SENASICA\_Li\_U16. Bei 1702PP12LM wurden 103 bis 118 SNPs zu den Stämmen 104, 1506MS22LM, 16\_00028 und FDA00006218 ermittelt. 1702PP18LM zeigte 8 SNPS zu 1702PP11LM und 102 SNPs zu SENASICA\_Li\_U16. 1705PP02LM zeigte 29 SNPs zu sam\_2A310D68-7040-4E0F-8347-8FB10D6BE32B. Und 1705PP03LM zeigte 37 SNPs zu sam\_B989AF5F-DD79-4C2F-93D4-46DEA4FD90B4.

### 3.3.3. Shigatoxin-produzierende *Escherichia coli*

Es wurden insgesamt drei STEC aus 561 Proben isoliert. Ein STEC Isolat (O26:H11, *stx1+*, *stx2+*, *eae+*) wurde aus Mischsalat (Frisée, Möhren, Lollo Bionda, Lollo Rosso, Radicchio) gewonnen. Auch in weiteren Proben der gleichen Charge konnte dieser STEC nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Ein weiterer STEC (O146:H28, *stx2+*) wurde in Möhren gefunden. Außerdem wurde in Mischsalat (Endivie, Frisee, Möhren, Lollo Rosso, Radicchio) ein STEC (O146:H28, *stx2+*) nachgewiesen. Die immunologisch ermittelten Serovare konnten auch molekular anhand der *fliC* und *wzy/wzx* Gene bestätigt werden (SerotypeFinder-2.0). Eine Übersicht zur molekularen Differenzierung ist in Tabelle 38 zu finden.

**Tabelle 38**

*Genomische Differenzierung der isolierten STEC Stämme.*

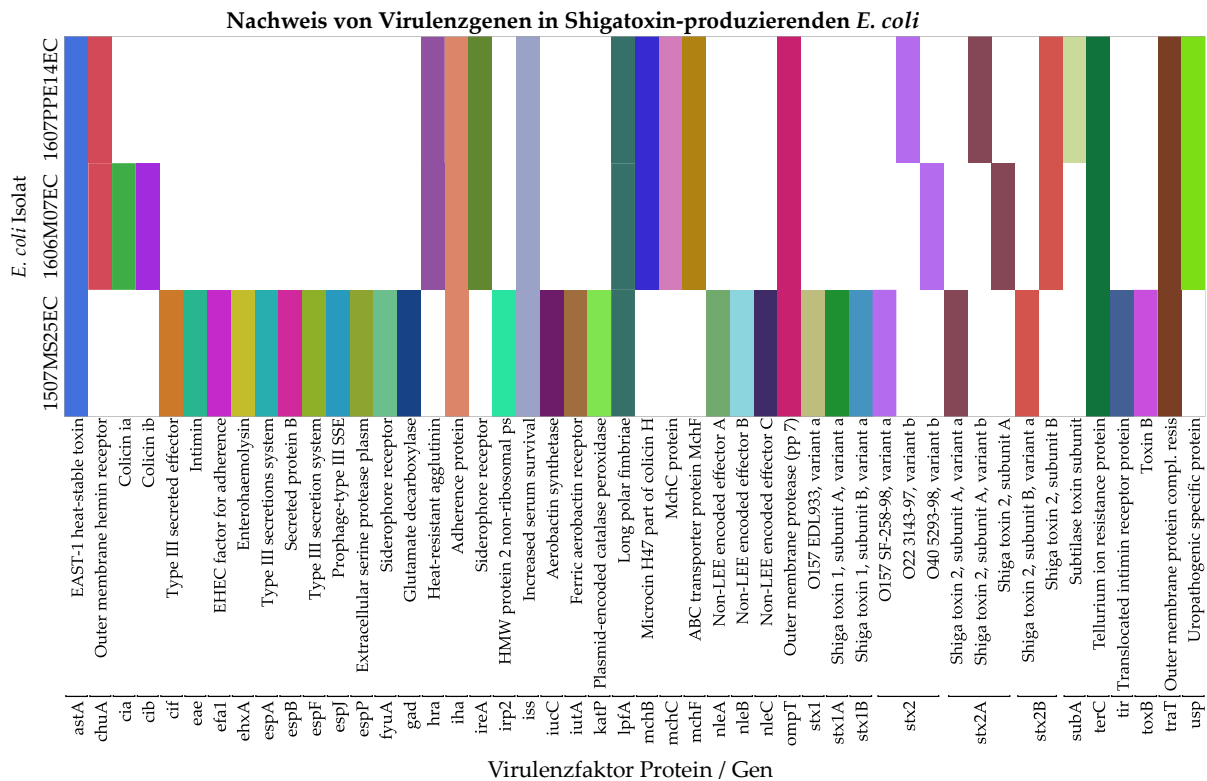
Isolat	Serotyp	Phyl o- type	MLST	cgMLST (Entero- base Schema)	Virulenz faktoren (n)	Plasmid- sequenzen
1507MS25EC	O26:H11	B1	ST21	cgST100034 (98,85 %*)	29 (u.a. <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>eae</i> )	IncB/O/K/Z, IncFIB(AP001918), p0111, pEC4115
1606M07EC	O146:H28	F	ST738	cgST167767 (99,01 %*)	17 (u.a. <i>stx2</i> )	Col(MP18), IncB/O/K/Z, IncFII(29)
1607PPE14EC	O146:H28	F	ST738	cgST166117 (98,65 %*)	16 (u.a. <i>stx2</i> )	Col(MP18), IncB/O/K/Z, IncFII(29)

\*Prozent der gefundenen Allele

Neben dem intrinsischen Resistenzgen *mdf(A)* wurden keine weiteren Resistenzgene mittels ResFinder detektiert (Tabelle 38). Der Transporter Mdf(A) hat ein breites Spektrum, das Erythromycin, Tetracyclin, Rifampicin, Kanamycin, Chloramphenicol und Ciprofloxacin einschließt. Allerdings ist es ist unklar, welchen Grad an Resistenz dieser verleiht.

Durch die Hybridsequenzierung (Illumina+MinION) bei 1507MS25EC konnten sechs Plasmide vollständig assembliert und identifiziert werden (Fiedler et al. 2020). Es wurden mittels Plasmidfinder jedoch nur vier plasmidäre Replikonsequenzen identifiziert (Tabelle 38). Bei den Stämmen 1606M07EC, 1607PPE14EC wurden jeweils drei identische Plasmid-Replikonsequenzen nachgewiesen.

Wie in Abbildung 17 ersichtlich, wurden 29 Gene für Virulenzfaktoren bei 1507MS25EC, 17 Virulenzfaktoren-Gene bei 1606M07EC und 16 Virulenzfaktoren-Gene bei 1607PPE14EC identifiziert (Stx1- bzw. Stx2-Untereinheiten jeweils als ein Virulenzfaktor zusammengefasst). Trotz ähnlicher Virulenzgene wurde bei 1606M07EC Colicin Ia und Ib identifiziert, welches bei 1607PPE14EC nicht vorhanden war. 1607PPE14EC wies jedoch das Subtilase Untereinheit A Gen *subA* auf, welches bei 1606M07EC fehlte (Abbildung 17).



**Abbildung 17**

**Genetische Virulenzfaktoren der isolierten STEC Stämme.**

Über die Internet Plattform Enterobase wurde nach den ähnlichsten Einträgen (bis 20 Allele Unterschied nach cgMLST V1 Schemata) für die jeweiligen cgMLST-Typen gesucht. Zusätzlich konnte für den publizierten Stamm 1507MS25EC die SNP basierte Pathogen Detection des National Center for Biotechnology Information (NCBI) genutzt werden. Für 1507MS25EC wurden keine Stämme gefunden, die eine sehr hohe Ähnlichkeit aufwiesen (bis 20 Allele Unterschied in der cgMLST und bis zu 50 SNPs in der Pathogen Detection). Für 1606M07EC wurde das Isolat „877248“ mit identischer cgMLST gefunden. Dieser STEC 877248 stammt aus einer humanen Probe (erkrankte Person) aus Großbritannien aus dem Jahr 2020 (SRR10971416). Für 1607PPE14EC wurde kein Isolat mit identischer oder ähnlicher cgMLST gefunden.



In der SNP-Analyse wurden 320 SNPs zwischen 1606M07EC und 1607PPE14EC identifiziert. Zwischen 1606M07EC und dem, in den öffentlichen Datenbanken gefundenen, nah verwandten Stamm 877248 wurden 47 SNPs identifiziert.

### 3.4. Nachweis von *Staphylococcus aureus* und *Bacillus cereus* als Toxinbildner in pflanzlichen Frischeprodukten

#### *St. aureus*

Zweihundert pflanzliche Frischeprodukte (Handelsebene: Gurken, Möhren, frische Kräuter, Kopf-, Blatt- und Pflücksalate und verzehrfertige Mischsalate) wurden auf das Vorkommen von *St. aureus* untersucht. Isolate, die auf Baird-Parker-Selektiv-Agar durch ein für *St. aureus* typisches Aussehen (schwarze Kolonien mit trübem Hof) und Wachstum (Koloniegröße >2mm) gekennzeichnet waren, wurden im weiteren Verlauf biochemisch bestätigt. *St. aureus* wurde aus jeweils einer Kopf-/Blatt-/Pflücksalat-, einer Gurke- und einer Möhrenprobe, sowie aus zwei Kräuterproben isoliert und identifiziert. Alle fünf *St. aureus* Keimzahlen lagen bei <100 KbE/g. Die Prävalenz von *St. aureus* (>10 KbE/g) lag demnach bei 5 von 200 Proben (2,5 %). Aufgrund der geringen Prävalenz und Keimzahlen wurden keine weiteren Untersuchungen zu den toxinogenen Eigenschaften der *St. aureus* Isolate durchgeführt.

#### *B. cereus*

Dreihundertneunzehn pflanzliche Frischeprodukte (Handelsebene: frische Kräuter, Frischpilze, Kopf-/Blatt-/Pflücksalate, Mischsalate, Möhren, Salatgurken, Sprossen) wurden auf das Vorkommen von präsumtiven *B. cereus* untersucht.

Wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, lagen die durchschnittlichen, präsumtiven *B. cereus* Keimzahlen bei den 319 untersuchten Proben zwischen 1,02 bis 1,73 log KbE/g. Die am höchsten belasteten Proben besaßen *B. cereus* Keimzahlen zwischen 3 und 4 log KbE/g. Dies traf auf acht Möhrenproben, sechs frischen Kräutern und drei Sprossenproben, also insgesamt 17 von 319 (5,3 %) Proben zu.

Um das toxinogene Potential dieser präsumtiven *B. cereus* zu bestimmen, wurden 147 Isolate aus den Produktgruppen eingehend charakterisiert. Mittels 16S-rDNA-Analyse wurde deren Zugehörigkeit zur *B. cereus* sensu lato (s.l.) bestätigt (Fiedler et al. 2019). Diese 147 Isolate wurden auf das Vorkommen von Toxingenen (molekularbiologisch) und die Expression von Toxinen (serologisch) geprüft.

Die molekulare Detektion der Enterotoxine Hbl, Nhe und CytK und des emetischen Toxins Ces erfolgte mittels PCR Nachweis der Gene der Toxinuntereinheiten *hblDA*,

*nheAB*, bzw. der Toxingene *cytK* und *ces*. Der immunologische Nachweis erfolgte mit einem kommerziellen *lateral flow* Assay, welcher die Toxinuntereinheiten NheB und HblC serologisch erfasst. Dabei wurde bei 91,2 % der Isolate *hbl*, bei 73,5 % *nhe*, bei 37,4 % *cytK* und in 0 % *ces* durch die PCR nachgewiesen (Tabelle 39). Im serologischen Nachweis zeigten 63,3 % der Stämme die Toxinproduktion von Hbl und 83 % die Bildung von Nhe (Tabelle 39).

Tabelle 39

*Nachweis der Toxingene hbl, nhe, cytK und ces bei B. cereus.*

	PCR Nachweis		Serologischer Nachweis	
	Isolate	Prozent	Isolate	Prozent
<i>hbl/Hbl</i>	134/147	91,2 %	93/147	63,3 %
<i>nhe/Nhe</i>	108/147	73,5 %	122/147	83,0 %
<i>cytK</i>	55/147	37,4 %	-	-
<i>ces</i>	0/147	0 %	-	-

Die Zusammenführung der Ergebnisse ergab, dass bei 93,0 % der Isolate das Toxin Hbl mittels PCR und/oder serologisch nachweisbar war (Abbildung 18). Für Nhe konnte für jedes Isolat der Toxinnachweis entweder per PCR und/oder serologisch erbracht werden, die Positivrate betrug also 100 %.

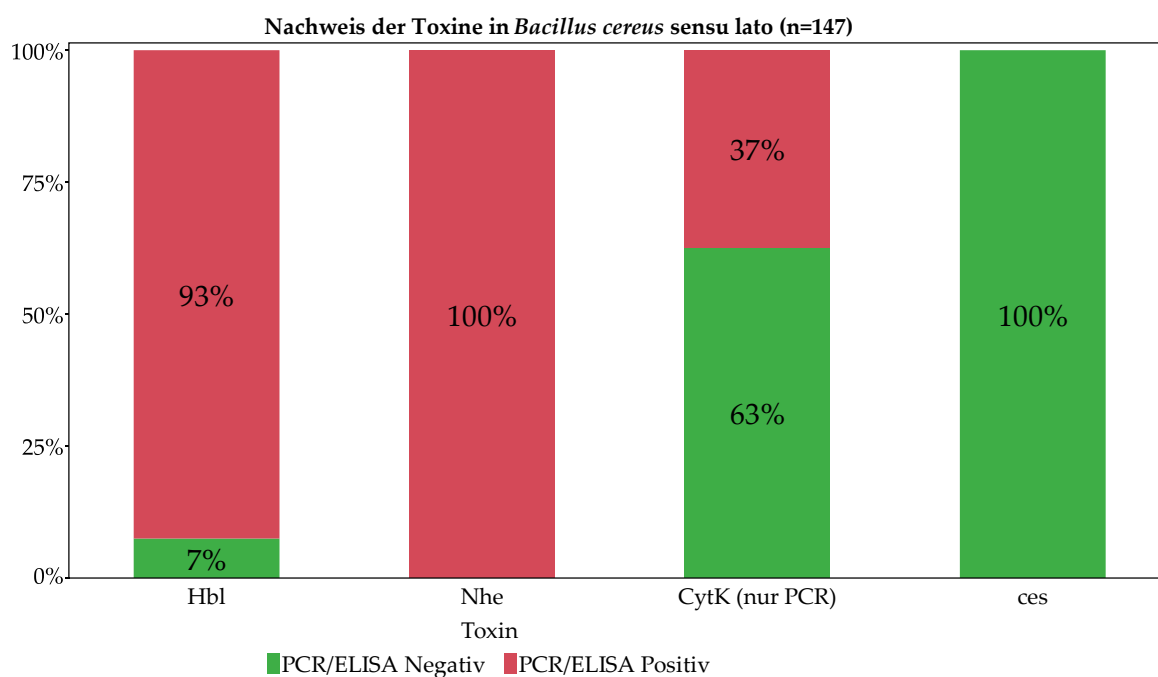


Abbildung 18

*Kombinierte Ergebnisse der Toxinnaehweise mittels PCR und/oder ELISA (serologisch) für die 147 untersuchten B. cereus sensu lato Stämme.*

### 3.5. Nachweis ESBL-produzierender Enterobakterien

Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL) bildende Enterobakterien stellen eine große Herausforderung bei einer antibiotischen Behandlung dar. Da auch pflanzliche Lebensmittel relevante Verbreitungswege darstellen können und durch den Frischverzehr eine Übertragung auf den Menschen denkbar ist, wurden 239 Proben (Sprossen, Gurken, Möhren, frische Kräuter, Kopf-, Blatt- und Pflücksalate und verzehrfertige Mischsalate) auf das Vorkommen von ESBL-bildenden Enterobakterien geprüft. Typische Kolonien wurden von ESBL-Selektivagar isoliert und vereinzelt. Alle phänotypisch unterschiedlichen Kolonien, die von der gleichen Probe stammten, wurden gesichert. Die so gewonnenen Isolate wurden mittels ESBL-AmpC Test (Mast Diagnostics) auf ihre Resistenzeigenschaften (ESBL und/oder AmpC) geprüft. Nur ESBL positive Enterobakterien wurden differenziert und charakterisiert. Aus 19 positiven Proben (19/239, 8 %) konnten so 22 ESBL-bildende Enterobakterien isoliert werden (Tabelle 40).

**Tabelle 40**

*Prävalenz von ESBL-bildenden Enterobakterien in frischen pflanzlichen Produkten.*

Produktgruppe	Untersuchte Proben	ESBL positiv	Zur Sequenzierung ausgewählte Isolate
Sprossen	39	17 (43,6 %)	19
Gurken	40	0 (0 %)	-
Möhren	40	0 (0 %)	-
frische Kräuter	40	0 (0 %)	-
Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	40	1 (2,5 %)	1
Mischsalate	40	1 (2,5 %)	2
Gesamt	239	19 (8 %)	22

Es zeigte sich eine hohe ESBL Nachweisrate von 43,6 % bei Sprossenproben. Diese Proben wurden von einem deutschen und einem niederländischen Betrieb produziert. Geringe Nachweisraten von jeweils 2,5 % wurden für Kopf-, Blatt- und Pflücksalate (Feldsalat) und Mischsalate (Batavia rot, Batavia grün, Mangold, Rucola, Blattspinat) festgestellt. In Gurken, Möhren, frischen Kräutern wurden keine ESBL-bildende Enterobakterien nachgewiesen.

Tabelle 41

*Übersicht der ESBL-bildenden Enterobakterien, die zur vollständigen Charakterisierung sequenziert wurden.*

Produktgruppe	Bezeichnung	Datum der Probennahme	Probe
Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	15E1	18.05.2015	B13 Feldsalat
Sprossen	15E2A	28.07.2015	S7 Alfalfa Sprossen
Sprossen	15E2B	28.07.2015	S7 Alfalfa Sprossen
Sprossen	15E2C	28.07.2015	S7 Alfalfa Sprossen
Mischsalat	15E3A	21.07.2015	MS27 Mischsalat (Batavia rot, Batavia grün, Mangold, Rucola, Blattspinat)
Mischsalat	15E3B	21.07.2015	MS27 Mischsalat (siehe 15E3A)
Sprossen	15E4A	09.06.2015	15S1 Sprossenmix
Sprossen	15E4B	09.06.2015	15S1 Sprossenmix
Sprossen	15E5A	28.07.2015	15S6 Radieschen Sprossen
Sprossen	15E5B	28.07.2015	15S6 Radieschen Sprossen
Sprossen	15E6	28.07.2015	15S5 Zwiebel Sprossen
Sprossen	16E1	06.09.2016	16S4 Mungbohne Sprossen
Sprossen	16E2A	26.09.2016	16S6 Sprossenmix (Fenchel, Brokkoli, Alfalfa)
Sprossen	16E2B	26.09.2016	16S6 Sprossenmix
Sprossen	16E3A	26.09.2016	16S9 Sprossenmix (rote Radieschen, Radieschen, Rettich)
Sprossen	16E3B	26.09.2016	16S9 Sprossenmix
Sprossen	16E4	26.09.2016	16S13 Sprossenmix (Kichererbsen, Adzuki, Mini Alfalfa)
Sprossen	16E5	26.09.2016	16S14 Rote Beete Sprossen
Sprossen	16E6	07.11.2016	16S20 Alfalfa Sprossen
Sprossen	16E7	29.11.2016	16S24 Rettich Sprossen
Sprossen	16E8	26.09.2016	16S15 Sprossenmix (rote Radieschen, Radieschen, Rettich)
Sprossen	16E9	26.09.2016	16S26 Sprossenmix (Roggen-, Weizen-, Mini Alfalfa-, Radieschen-, Adzukibohnen-, Luzernen- und Leinsamen Sprossen)

In Tabelle 41 sind alle Isolate aufgeführt, deren ESBL Produktion phänotypisch bestätigt wurde (ESBL/AmpC Test, Mast) und die für weiterführende phänotypische Resistenztestungen und zur Ganzgenomsequenzierung ausgewählt wurden.

### 3.5.1. Speziesidentifizierung

Die Genomsequenzen wurden für die Speziesbestimmung verwendet und jedes Isolat konnte eindeutig identifiziert werden (Tabelle 42). Es handelt sich bei den 22 Isolaten um drei *Enterobacter* (*En.*) spp. (*En. mori*, *hormaechei*), sechs *E. coli*, ein *E. hermannii* und 12 *Klebsiella* (*K.*) spp. (*K. pneumoniae*, *grimontii* und *oxytoca*). Als häufigste Spezies wurde *K. pneumoniae* mit 10/22 (45 %) identifiziert, als zweithäufigste *E. coli* mit 6/22 (27 %). Es wurden diverse MLST-Typen gefunden, beispielsweise ST10, ST410 für *E. coli* und ST14 für drei *K. pneumoniae* Stämme (Tabelle 42).

Tabelle 42 Übersicht der Ganzgenom sequenzierten ESBL-bildenden Enterobakterien und deren Genom Charakteristika.

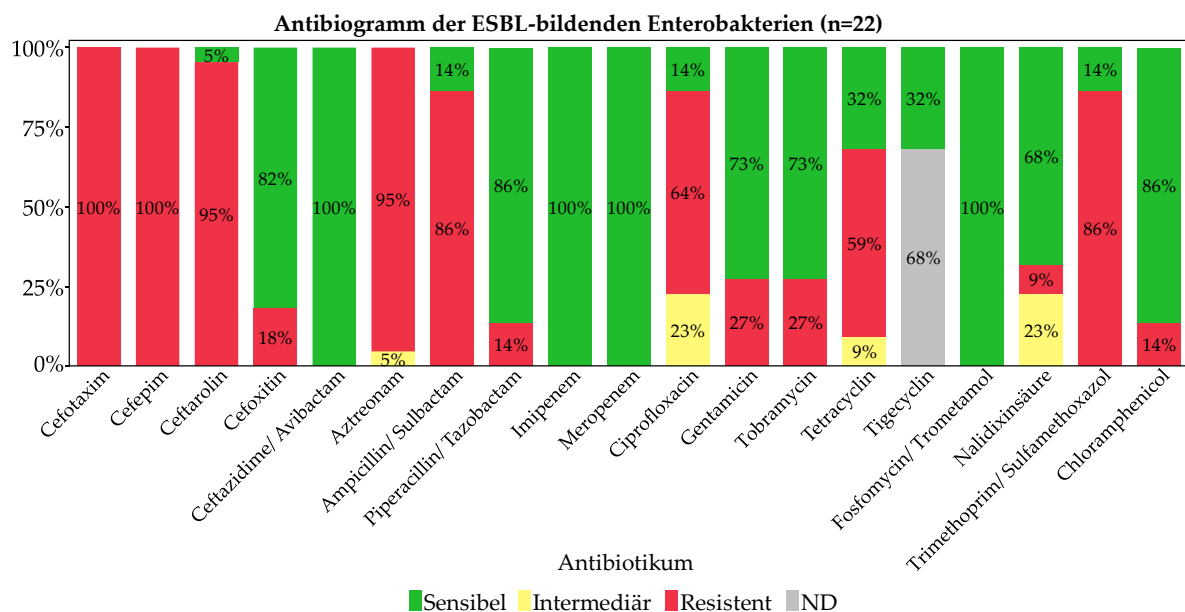
	Genomgröße	GC Gehalt (mol %)	Spezies (WGS)	Sequence type (MLST)	Serovar ( <i>E. coli</i> )	contigs	reads	N50	cov
15E1	4.849.432	55,4	<i>Enterobacter mori</i> (dDDH 89,8 %)	Unbekannt ( <i>En. cloacae</i> )	n.d.	36	1.628.410	418.920	136,3
15E2A	4.889.655	54,9	<i>Enterobacter hormaechei</i> (dDDH 94,6 %)	Unbekannt ( <i>En. cloacae</i> )	n.d.	61	1.152.225	502.208	116,3
15E2B	4.960.119	50,6	<i>Escherichia coli</i> (dDDH 74,9 %)*	ST410	O132:H9	113	1.842.615	127.703	142,6
15E2C	5.442.197	57,3	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (dDDH 93,4 %)	ST464	n.d.	81	1.225.885	231.291	93,6
15E3A	4.765.340	50,8	<i>Escherichia coli</i> (dDDH 75,6 %)*	ST10	O16:H48	116	894.102	139.269	82,9
15E3B	4.825.336	50,7	<i>Escherichia coli</i> (dDDH 74,5 %)*	ST3676	:-H2	78	2.109.971	181.243	150,2
15E4A	4.917.755	50,7	<i>Escherichia coli</i> (dDDH 74,2 %)*	ST162	O27:H19	131	1.594.825	154.498	130,4
15E4B	5.139.935	50,6	<i>Escherichia coli</i> (dDDH 73,9 %)*	ST977	:-H5	126	752.261	173.077	47,4
15E5A	4.429.383	54,0	<i>Escherichia hermannii</i> (dDDH 91,9 %)	Unbekannt ( <i>E. coli</i> )	n.d.	42	1.342.621	310.440	98,3
15E5B	5.484.972	57,4	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (dDDH 92,9 %)	ST25	n.d.	63	2.441.437	266.338	208,7
15E6	5.432.721	57,3	<i>Klebsiella pneumoniae</i> dDDH 93,7 %)	ST391	n.d.	61	1.936.859	422.908	142,7
16E1	4.919.054	55,4	<i>Enterobacter hormaechei</i> (dDDH 91,3 %)	ST134 ( <i>En. cloacae</i> )	n.d.	109	959.149	280.158	89,2
16E2A	5.548.603	57,2	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (dDDH 93,1 %)	ST278	n.d.	95	698.924	276.111	58,4
16E2B	5.470.792	57,3	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (dDDH 93,4 %)	ST776	n.d.	107	1.027.390	431.040	83,1
16E3A	5.580.737	57,0	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (dDDH 93,6 %)	ST14	n.d.	123	1.186.035	247.770	96,9
16E3B	5.485.430	57,1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (dDDH 93,3 %)	ST37	n.d.	74	473.076	297.994	42,2
16E4	5.764.124	55,9	<i>Klebsiella grimontii</i> (dDDH 95,9 %)	Unbekannt	n.d.	54	1.375.534	335.679	107,4
16E5	4.824.020	50,9	<i>Escherichia coli</i> (dDDH 73,9 %)*	ST155	:-H25	95	1.905.738	264.966	171,1
16E6	6.173.835	54,7	<i>Klebsiella oxytoca</i> (dDDH 94,9 %)	ST58	n.d.	115	1.834.814	207.042	128,5
16E7	5.308.070	57,4	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (dDDH 93,1 %)	ST4	n.d.	75	1.611.180	370.363	129,2
16E8	5.526.627	57,1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (dDDH 93,7 %)	ST14	n.d.	117	1.260.334	228.079	82,5
16E9	5.740.529	56,7	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (dDDH 93,5 %)	ST14	n.d.	83	1.704.280	252.936	111,6

\*die höchste dDDH>80 % wurde für *Shigella* spp. festgestellt. Aufgrund der hohen genomischen Übereinstimmung zu *Shigella* Typstämmen ist dies ein bekannter Fehler und die Isolate wurden durch den Type (Strain) Genome Server richtigerweise *E. coli* zugeordnet.

### 3.5.2. Phänotypische Resistenz

Alle ESBL-bildenden Isolate waren mehrfach resistent (Abbildung 19). Erwartungsgemäß wurde bei allen Isolaten eine Resistenz gegenüber Cefotaxim (3. Generation der Cephalosporine und Leitsubstanz für ESBL) und Cefepim (4. Generation Cephalosporine) nachgewiesen. Gegenüber Ceftarolin (5. Generation) waren 95 % resistent. Gegenüber Cefoxitin, einem zu den Cephalosporinen gehörenden Cephamycin, wurden bei 18 % der Stämme eine Resistenz gefunden. Während gegenüber Aztreonam 95 % der Stämme resistent waren, zeigten 5 % eine intermediäre Empfindlichkeit gegenüber diesem Antibiotikum.

Die seit 2016 zugelassene  $\beta$ -Lactamase-Inhibitore/Cephalosporin-Kombination Avibactam/Ceftazidim zeigte sich bei 100 % der Isolate als wirksam. Auch gegenüber den Carbapenemen waren alle Isolate sensibel. Bei den Aminoglykosiden Gentamicin und Tobramycin zeigten 27 % der Isolate eine Resistenz. Hingegen wurden gegenüber Ciprofloxacin, Tetrazyklin und Trimethoprim/Sulfamethoxazol hohe Resistenzraten von 59 bis 86 % ermittelt.



**Abbildung 19**

**Übersicht zu den phänotypischen Antibiotikaresistenzen der ESBL-bildenden Enterobakterien.**

Zu den häufigsten detektierten Resistenzen (neben den ESBL vermittelten) gehörten Fluorchinolon-, Aminoglykosid-, Tetrazyklin- und Trimethoprim/Sulfamethoxazol-Unempfindlichkeiten (Abbildung 20). Ein häufiges Resistenzprofil (wie beispielsweise 15E2A) zeigte Mehrfachresistenz gegenüber Cephalosporinen, Penicillinen, Monobactamen, Fluorchinolonen, Aminoglykosiden, Tetrazyklinen und

Trimethoprim/Sulfamethoxazol. Für Cefoxitin, Piperacillin/Tazobactam, Nalidixinsäure und Chloramphenicol wurden bei nur zwei bis vier von 22 Stämmen Resistenzen gefunden. Bei den vier Isolaten 15E1, 15E2A, 16E1 und 16E2B wurde eine Cefoxitin-Resistenz festgestellt, was bei ESBL Enzymen ungewöhnlich ist. Eine Piperacillin/Tazobactam-Resistenz wurde bei 15E2, 16E3A und 16E8 nachgewiesen, während sich eine Nalidixinsäure-Resistenz bei 15E2B und 15E4B zeigte. Die Stämme 15E2A, 16E1 und 16E6 waren gegenüber Chloramphenicol unempfindlich.



**Antibiogramm der ESBL-bildenden Enterobakterien**

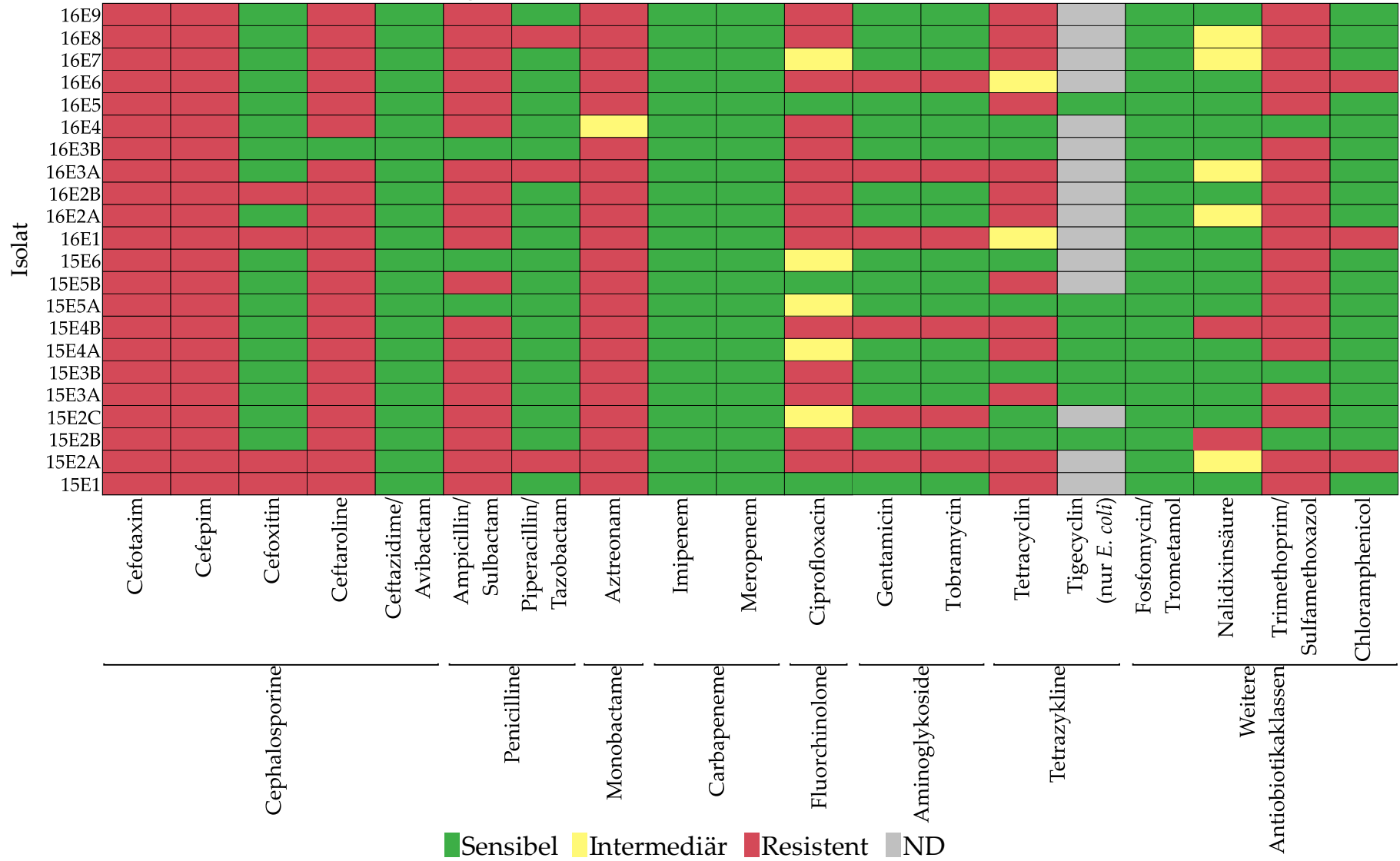


Abbildung 20 Übersicht zu den phänotypische Antibiotikaresistenzen je Isolat der ESBL-bildenden Enterobakterien.

### 3.5.3. Nachweis von Resistenzgenen

Durch die bioinformatische Suche nach bekannten Resistenzgenen (ResFinder) wurden 462 Resistenzgene in den 22 ESBL-Stämmen gefunden. Insgesamt wurden 52 Varianten von Resistenzgenen gefunden (Abbildung 21). Resistenzgene gegenüber den Beta-Laktamen (Cephalosporine) wurde mit n=58 am häufigsten detektiert. Mit n=52 konnten viele Gene identifiziert werden, die an einer Fluorchinolone-Resistenz beteiligt sind. An einer Aminoglykosid-Resistenz beteiligte Gene wurden mit n=49 identifiziert. Als potentielle genetische Ursache von Tetrazyklin-Resistenz wurden 15 Gene identifiziert, während 35 Gene für eine Dihydrofolatreduktase (DHFR)-Inhibitor+ Sulfonamid-Resistenz und 29 Gene für weitere antibiotische Substanzgruppen gefunden wurden.

Die nachgewiesenen ESBL Enzyme waren überwiegend der CTX-M Familie zuzuordnen (20/22). Hier wurde CTX-M-15 am häufigsten (16/22) nachgewiesen, weitere Varianten waren CTX-M-1 und CTX-M-14 (je 2/20). Die ESBL Enzyme der TEM Familie wurden bei 18/22 Isolaten und die der SHV Familie bei 10/22 Isolaten detektiert. Weiterhin konnten die ESBL Enzyme OXA und SFO in jeweils einem Isolat gefunden werden. Es wurden außerdem einige AmpC beta-Laktamasen identifiziert (ACT, OXY, DHA, HERA). Zur Vorauswahl der zu untersuchenden ESBL Produzenten wurde ein Screening-Test verwendet, der mittels selektivem ESBL-Inhibitor zwischen AmpC und ESBL Enzymen unterscheiden sollte. Im Fall von ACT-16 (15E2A) führte dieser Test zu einer falsch positiven ESBL Bestätigung, da ACT-16 zu den AmpC beta-Laktamasen gehört.

Als weitere häufig auftretende Resistenzgenfamilien konnten *qnr* und *oqx* (Fluorchinolone), *aac* und *aph* (Aminoglykoside), *tet* (Tetrazykline), *dfr* und *sul* (DHFR) identifiziert werden.

Dabei war festzustellen, dass der Nachweis von Resistenzgenen nicht zwangsläufig zu einer phänotypischen Resistenz führt, wie am Beispiel der häufig detektierten *aph* Gene und der oftmals sensiblen Reaktion auf das Aminoglykosid Tobramycin ersichtlich wurde.

Durch die kombinierte Betrachtung der Einzelsubstanz-Resistenzen (Abbildung 20) und der identifizierten Gene (Abbildung 21) konnten die folgenden Verknüpfungen identifiziert werden. Die Cefoxitin-Resistenz von 15E1, 15E2A, 16E1 und 162B kam zusammen mit den AmpC beta-Laktamasen ACT-16, ACT-7 und DHA-1 und der ESBL SFO-1 vor. Eine Nalidixinsäure-Resistenz (15E2B und 15E4B) war mit der Mutation von *gyrA* und *parC/E* assoziiert. Die Chloramphenicol (15E2A, 16E1 und 16E6) unempfindlichen Isolate besaßen mindestens ein *cat* Gen.

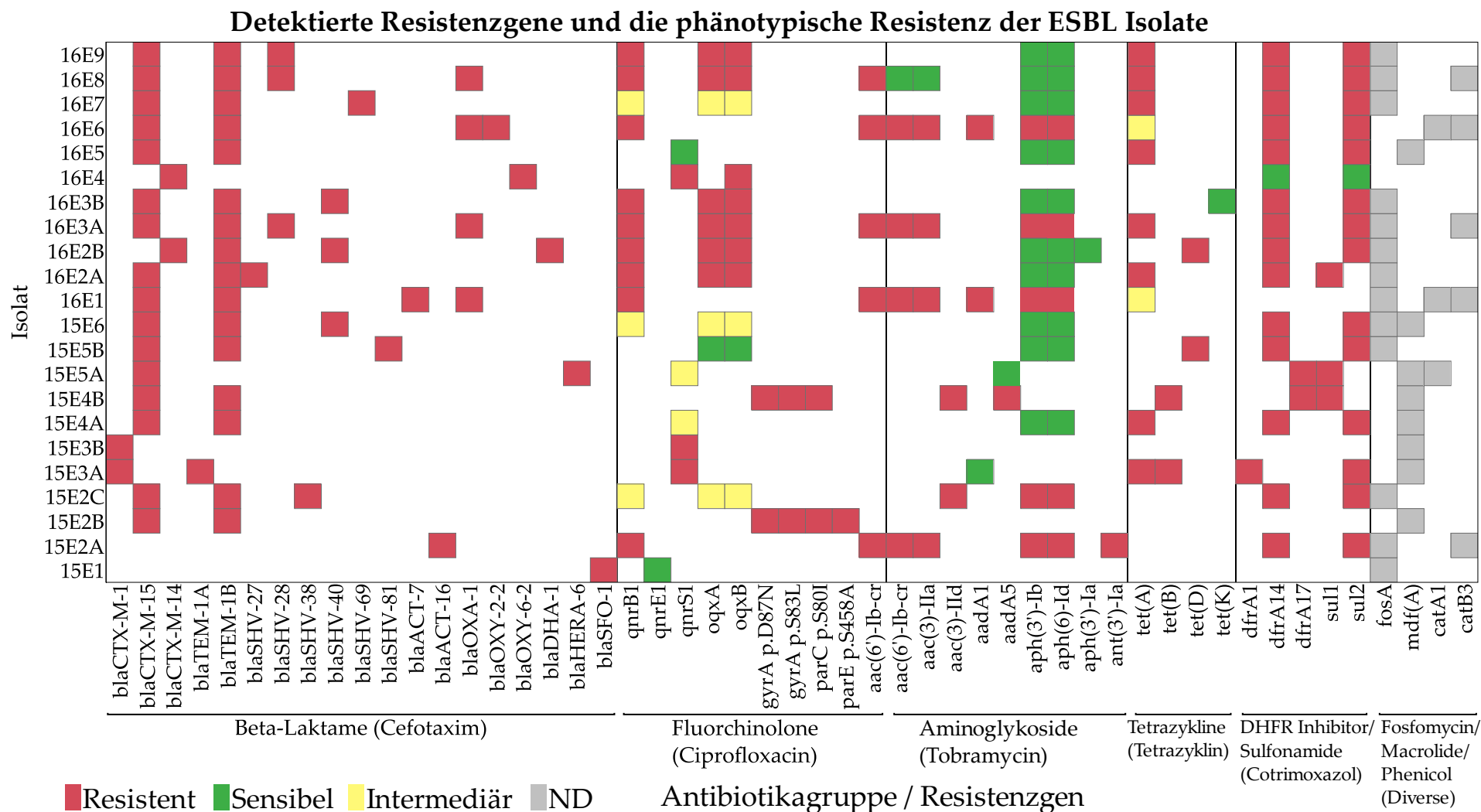


Abbildung 21 Identifizierte Resistenzgene und phänotypische Reaktion auf Antibiotika der ESBL-bildenden Enterobakterien.

In der Resistenzgenausstattung gab es klare gattungsspezifische Unterschiede (Abbildung 22). In *Enterobacter* konnten die AmpC beta-Laktamasen ACT-7/-16 und die ESBL SFO-1 detektiert werden. Nur bei dem Isolat 16E1 wurden die ESBL CTX-M, TEM und OXA zusätzlich gefunden. Bei *Escherichia* wurde die CTX-M-1 Variante gefunden, die in keiner der anderen Gattungen nachgewiesen wurde. Das ESBL Enzym SHV wurde bei *Escherichia* nicht detektiert, dafür konnten *mdf(A)* und *qnrS1* häufiger als in den anderen Gattungen gefunden werden. Bei *Klebsiella* wurde neben der CTX-M-15 auch die CTX-M-14 Variante identifiziert. Die Resistenzgene *blaSHV*, *qnrB1*, *oqxA/B*, *aph* und *dfrA14* kamen häufiger in *Klebsiella* als bei *Enterobacter* und *Escherichia* vor.

### Übersicht der Resistenzgene nach den Gattungen

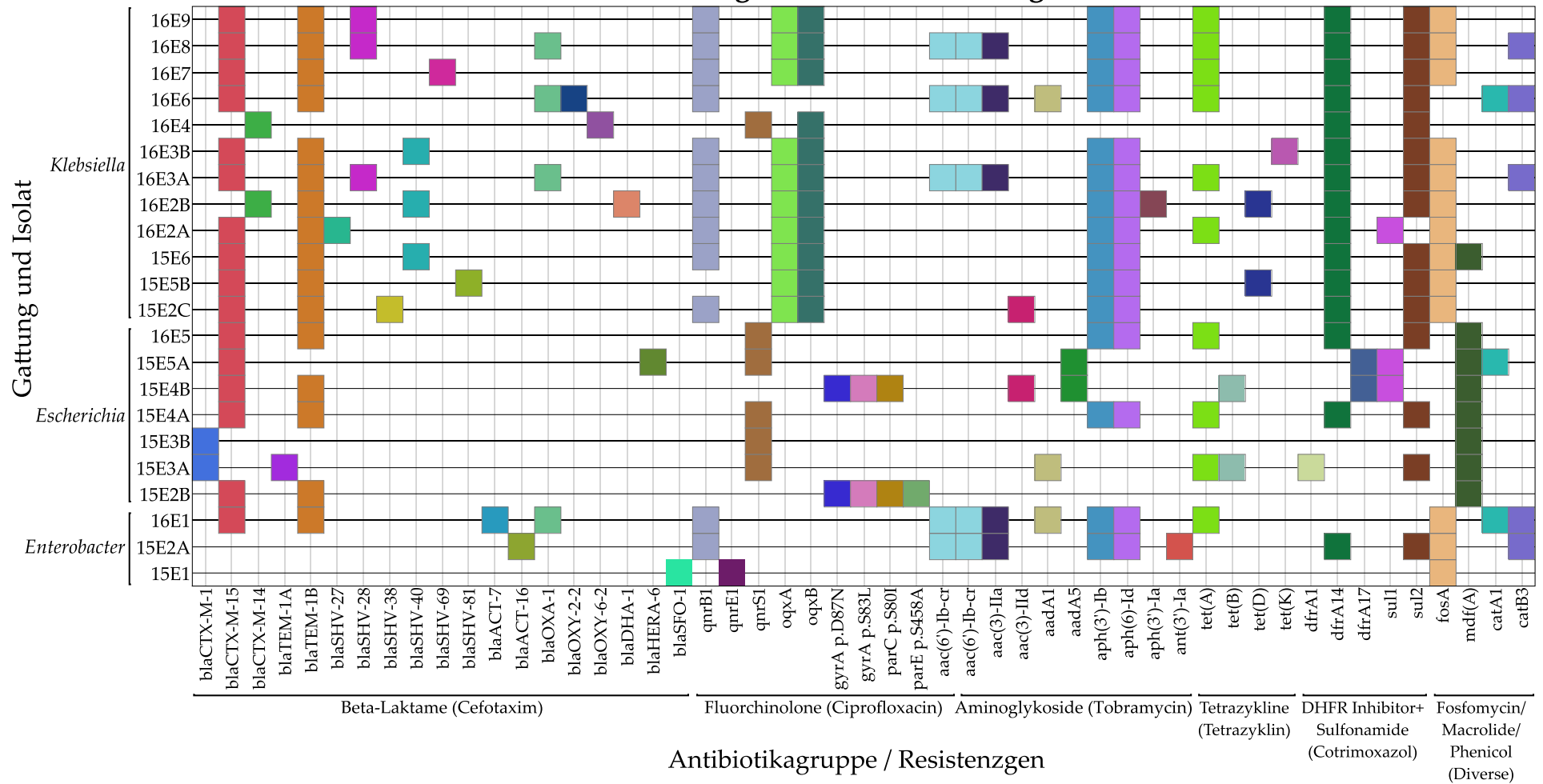
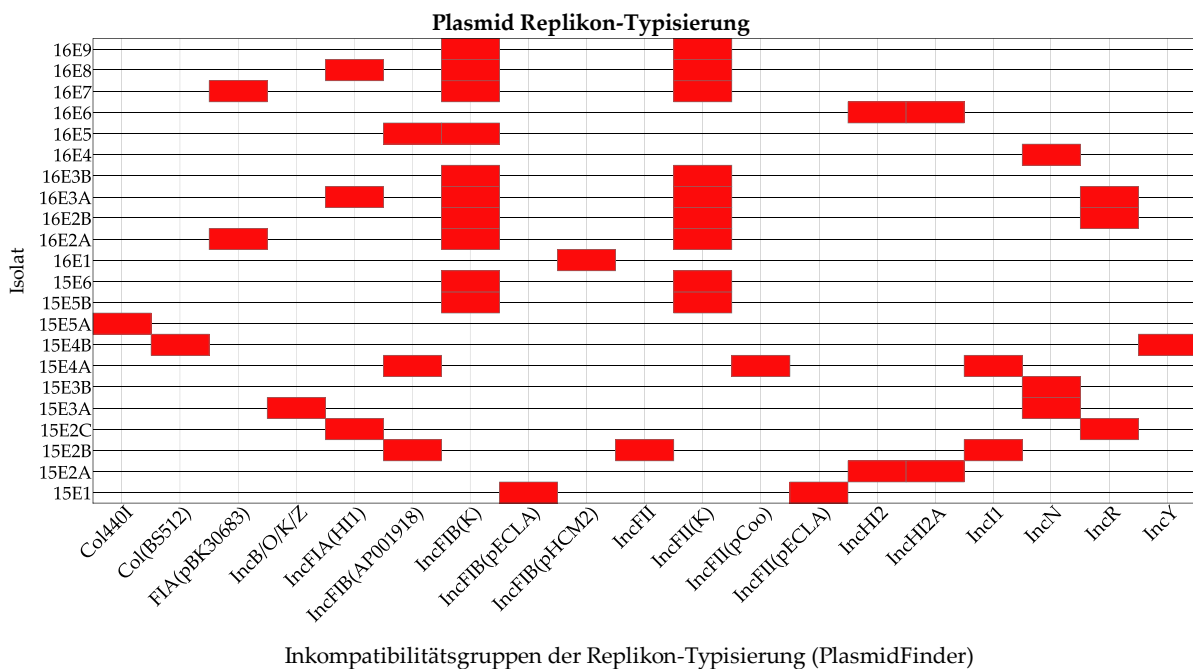


Abbildung 22 Gattungsspezifische Resistenzgenverteilung der ESBL-bildenden Enterobakterien.

### 3.5.4. Nachweis von Plasmidsequenzen

Da Resistenzgene häufig über horizontalen Gentransfer (Plasmide) ausgetauscht werden können, wurde mittels PlasmidFinder nach plasmidspezifischen Replikonsequenzen gesucht.

Es konnten insgesamt 43 Replikonsequenzen mit 19 verschiedenen Replikon-Typen in den Sequenzdaten gefunden werden (Abbildung 23 und Anhang Tabelle A 9). Als häufigster Replikontyp trat IncFIB(K) mit  $n=8$  und IncFII(K) mit  $n=7$  auf. Alle übrigen Replikon-Typen wurden 1-3-mal nachgewiesen. Bei Gruppierung der Replikon-Typen in Col, IncFI, IncFII, IncB/O/K/Z, IncH, IncI1, IncN, IncR, IncY konnte die IncFI Replikon-Gruppe bei 77 % der Isolate nachgewiesen werden (Anhang Tabelle A 10). Als zweit häufigste Gruppe wurde IncFII mit 45 % ermittelt.

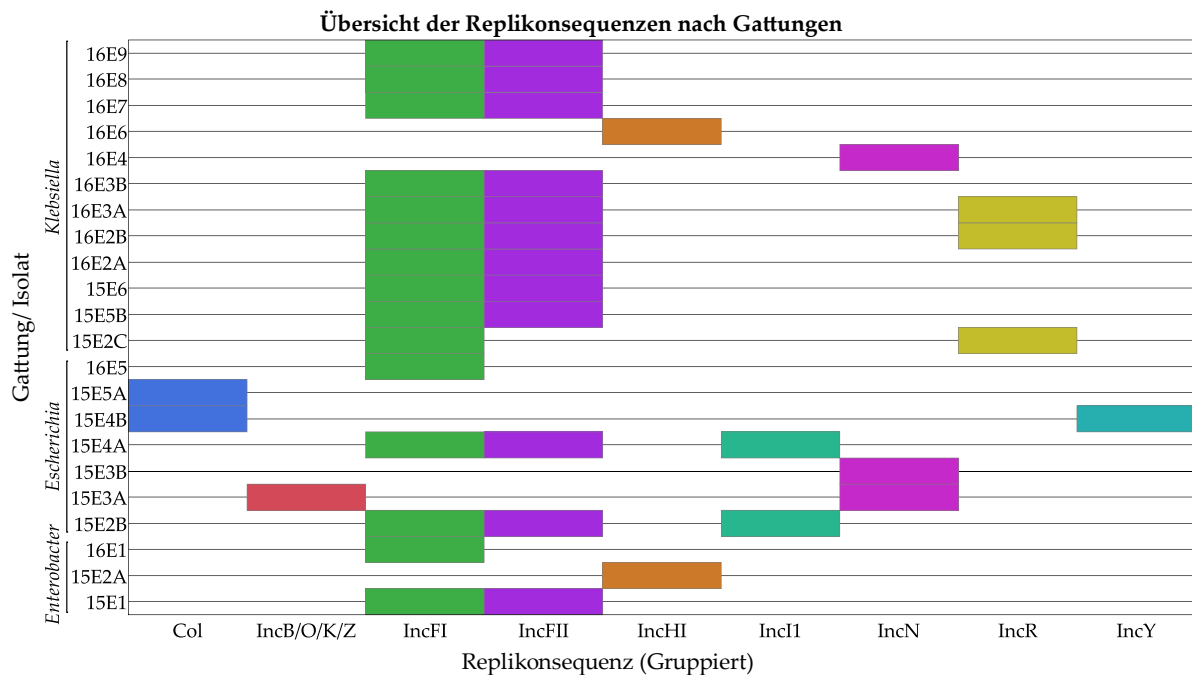


**Abbildung 23**

*Einzeldarstellung der identifizierten Plasmid Replikon-Typen.*

Auch bei den Replikonsequenzen gab es gattungsspezifische Unterschiede. Die Replikon-Gruppen Col, IncB/O/K/Z, IncI1 und IncY wurden nur bei *Escherichia* gefunden (Abbildung 24), während die IncR-Gruppe nur in *Klebsiella* vorkam. Bei Betrachtung der Replikon-Typen (nicht die zusammengefassten Gruppen) konnten gattungsspezifische Plasmidsequenzen identifiziert werden (Anhang Tabelle A 11). Nur bei *Enterobacter* wurden IncFIB(pECLA), IncFIB(pHCM2) und IncFII(pECLA) nachgewiesen, während Col440I, Col(BS512), IncB/O/K/Z, IncFIB(AP001918), IncFII,

IncI1, IncN und IncY nur bei *Escherichia* und FIA(pBK30683), IncFIA(HI1), IncFII(K) und IncR nur in *Klebsiella* detektiert wurden (Tabelle A 11). Kein gemeinsamer Replikon-Typ war in allen drei Gattungen nachweisbar (Tabelle A 11). Für *Enterobacter* konnten IncHI2 und IncHI2A als potentielle Transferplasmide mit *Klebsiella* (ebenfalls Nachweis IncHI2 und IncHI2A) identifiziert werden (Tabelle A 11). Bei *Escherichia* und *Klebsiella* wurden die gemeinsamen Replikon-Typen IncFIB(K) und IncN identifiziert (Tabelle A 11).



**Abbildung 24**

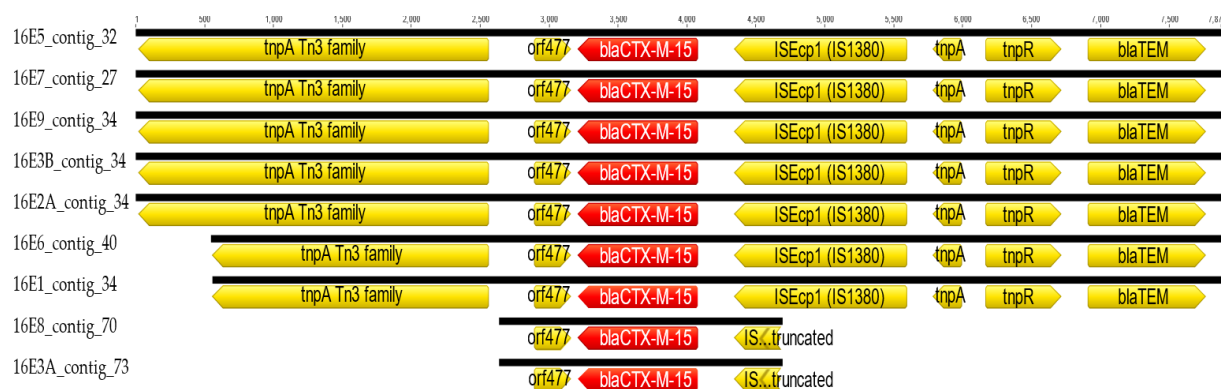
*Identifizierte Replikon-Gruppen nach Gattung.*

### 3.5.5. Genetische Positionierung der ESBL Gene CTX-M

Um das am häufigsten identifizierte ESBL Enzym CTX-M näher zu charakterisieren, wurden die 3' und 5' Regionen der Gene näher untersucht. Hierfür wurden alle ESBL Isolate aus dem Jahr 2016 ausgewählt, da bei diesen Isolaten auch identische MLST-Typen und Plasmid-Replikonsequenzen und Resistenzgene nachgewiesen wurden. So sollte die Frage geklärt werden, ob sich die CTX-M Gene in ihrer genetischen Lokalisierung unterscheiden. Die initiale Annotation erfolgte über RASTtk. Die contigs, auf denen die CTX-M Gene lokalisiert waren, zeigten sehr unterschiedliche Größen von mehreren Hundert bis mehreren Tausend Basenpaaren.

Die 3' und 5' Regionen konnten bei allen Isolaten charakterisiert werden (11/11 Isolate aus 2016). Es zeigten sich Übereinstimmungen in den umgebenden Bereichen der

CTX-M Gene (Tabelle 43). Auf beiden Seiten konnten mobile Elemente nachgewiesen werden. Bei CTX-M-15 wurde nach manueller Annotation (ISfinder) im 5' Bereich die Insertionssequenz *ISEcp1* und im 3' Bereich die mobilen Elemente *orf477* und *tnpA* (Transposase) festgestellt. Diese transposablen Genabschnitte waren in allen CTX-M-15 Bereichen bei allen Gattungen vorhanden (Abbildung 25).



**Abbildung 25**

*Genetische Lokalisation der CTX-M-15 Gene. Das beta-Laktamase Gen liegt in allen Isolaten zwischen Transposon Bereichen.*

In einigen Fällen war dem CTX-M-15 das TEM Gen in 5'-Richtung nachgeschaltet. Die zwei untersuchten CTX-M-14 Regionen zeigten einen abweichenden Aufbau (Tabelle 43). Bei 16E4 konnte wie bei CTX-M-15 das *ISEcp1* Element im 5'-Bereich identifiziert werden mit einem *IS903B* Element im 3'-Bereich. Das zweite CTX-M-14 Isolat (16E2B) zeigte das *IS903D* Element im 3'-Bereich und *ISCR1* (*IS91* like), *tnpA* (Transposase) im 5'-Bereich.

**Tabelle 43**

*Das genetische Umfeld der CTX-M (ESBL) Gene. Die genetische Orientierung wurde anhand der blaCTX-M Gene festgesetzt.*

Isolat	ESBL Gen	5' (upstream) Bereich	3' (downstream) Bereich
16E1 <i>Enterobacter</i>	CTX-M-15	<i>ISEcp1</i> (IS1380 family), <i>tnpA</i> , <i>tnpR</i> , blaTEM	<i>orf477</i> , <i>tnpA</i> transposase (Tn3 family) truncated
16E2A <i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-15	<i>ISEcp1</i> (IS1380 family), <i>tnpA</i> , <i>tnpR</i> , blaTEM	<i>orf477</i> , <i>tnpA</i> transposase (Tn3 family)
16E2B <i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-14	<i>ISCR1</i> (IS91 like), <i>tnpA</i>	<i>IS903D</i>
16E3A <i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-15	<i>ISEcp1</i> truncated (IS1380 family)	<i>orf477</i> (contig Ende)
16E3B <i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-15	<i>ISEcp1</i> (IS1380 family), <i>tnpA</i> , <i>tnpR</i> , blaTEM	<i>orf477</i> , <i>tnpA</i> transposase (Tn3 family)



Isolat	ESBL Gen	5' (upstream) Bereich	3' (downstream) Bereich
16E4 <i>K. grimontii</i>	CTX-M-14	ISEcp1 (IS1380 family)	IS903B
16E5 <i>E. coli</i>	CTX-M-15	ISEcp1 (IS1380 family), <i>tnpA</i> , <i>tnpR</i> , blaTEM	<i>orf477</i> , <i>tnpA</i> transposase (Tn3 family)
16E6 <i>K. oxytoca</i>	CTX-M-15	ISEcp1 (IS1380 family), <i>tnpA</i> , <i>tnpR</i> , blaTEM	<i>orf477</i> , <i>tnpA</i> transposase (Tn3 family) truncated
16E7 <i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-15	ISEcp1 (IS1380 family), <i>tnpA</i> , <i>tnpR</i> , blaTEM	<i>orf477</i> , <i>tnpA</i> transposase (Tn3 family)
16E8 <i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-15	ISEcp1 truncated (IS1380 family)	<i>orf477</i> (contig Ende)
16E9 <i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-15	ISEcp1 (IS1380 family), <i>tnpA</i> , <i>tnpR</i> , blaTEM	<i>orf477</i> , <i>tnpA</i> transposase (Tn3 family)

### 3.6. Nachweis von Carbapenemase-produzierenden Enterobakterien

Es wurden 112 Proben (Sprossen, frische Pilze und Möhren) auf das Vorkommen Carbapenemase-bildenden Enterobakterien untersucht. Dafür wurde ein Carbapenemhaltiger Selektivagar (CRE-Agar) verwendet. Vereinzelt waren nach 24 Stunden Inkubation typische Kolonien (dunkelblau und 1-2 mm) sichtbar. Die Isolate wurden mittels Agardiffusionstest auf Carbapenem-Resistenz (Imipenem, Meropenem) geprüft. Alle Isolate erwiesen sich jedoch als ESBL-bildende Enterobakterien (v.a. *Klebsiella* spp. und *Enterobacter* spp.) ohne Carbapenem-Resistenz. Bei einer Vereinzellung und erneuten Kultivierung auf CRE-Agar zeigte sich ein verbessertes Wachstum (2-3 mm), was auf eine gewisse Anpassungsfähigkeit auf Carbapenemhaltigem Medium schließen lässt.

Es konnten keine Carbapenemase-produzierenden Enterobakterien in den 112 untersuchten Proben (Sprossen, frische Pilze und Möhren) nachgewiesen werden (0/112= 0 %).

## 4. Diskussion

Frisches Gemüse ist ein wichtiger Bestandteil einer gesunden Ernährung. Werden diese Produkte roh verzehrt, können pathogene oder toxinogene Bakterien, die das Gemüse besiedeln, zu Infektionen oder Lebensmittelvergiftungen führen. Durch veränderte Konsumgewohnheiten (beispielsweise Ready-to-eat Produkte), Produktionstechniken (Fresh-Cut in Großbetrieben) und globalisierte Warenketten können pflanzliche Produkte schwerwiegende Krankheitsausbrüche mit vielen Infizierten auslösen (Sagoo et al. 2003; Ramos et al. 2013; Goodburn und Wallace 2013; Jung et al. 2014; Carstens et al. 2019). Über die mikrobiologischen Veränderungen entlang der Produktions- und Verarbeitungskette wurde bei pflanzlichen Produkten bisher nur vereinzelt berichtet (Beuchat und Ryu 1997; Jung et al. 2014; Rosberg et al. 2021; Kokkinakis et al. 2008; Gao et al. 2018). Der Einfluss der Verarbeitungsschritte auf den mikrobiologischen Status und deren Rolle auf das Vorkommen von humanpathogenen Bakterien wurde bisher nur unzureichend betrachtet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der mikrobiologische Status in Bezug auf Keimzahlen, Prävalenz humanpathogener Bakterien und Biodiversität vom Feld über die Verarbeitungsschritte bis zum Endprodukt im Handel untersucht.

### 4.1. Pflanzliche Produkte während der Verarbeitung vom Feld bis zum Endprodukt

Anhand der Beprobung eines Salat- und Gemüseverarbeitenden Betriebs wurden die mikrobiologischen Veränderungen entlang der Stufen Feld, Kühllager, Vorputzbereich, Reinbereich und Endprodukt analysiert.

Die Feldproben zeigten erwartungsgemäß die höchste Gesamtkeimzahl (6,79 log KbE/g) in der Verarbeitungskette. Das konnte sowohl statistisch, als auch in der Modellierung der Einflussfaktoren bestätigt werden. Eine hohe Belastung mit Schimmelpilzen korrelierte stark mit dem Probenort Feld. Die Exposition mit Schimmelpilzen auf den Anbauflächen ist demnach der größte Einflussfaktor und bestimmt maßgeblich diesen Parameter. Proben aus dem Kühllager waren grundsätzlich und signifikant höher belastet als Proben aus dem Reinbereich und die Endprodukte (6,78 vs. 6,19 und 6,41 log KbE Gesamtkeimzahl). Die Kühllagerung zeigte hingegen nur einen geringen Einfluss auf den mikrobiologischen Status im Vergleich zu den Feldproben. Einzig die Enterobakterien stiegen mit 0,18 log KbE/g leicht, jedoch nicht signifikant an, hier können psychrotolerante Enterobakterien wie *Erwinia* spp., *Enterobacter* spp. und *Yersinia* spp. verantwortlich sein (Blackburn 2006;

Söderqvist et al. 2017). Die Anzahl der Hefen blieben auf allen Stufen nahezu konstant (4,36-4,85 log KbE/g). In der Literatur wurden hierzu keine vergleichbaren Studien gefunden. Durch den Vorputz wurden der Strunk sowie die äußeren Blätter mitsamt deren Anhaftungen wie Erde, Sand und anderes organisches Material (tierische Ausscheidungen etc.) entfernt. Dadurch verringerten sich vor allem die Anzahl der Enterobakterien signifikant um 0,69 log KbE/g, sowie die Schimmelbelastung um 0,41 KbE/g. Die Gesamtkeimzahl verringerte sich mit 0,10 log KbE/g kaum, sodass von einer homogenen Besiedlung der inneren Blätter ausgegangen werden muss. Der nachfolgende Schritt des Schneidens und Waschens führte zu einer Reduktion der Gesamtkeimzahl im Reinbereich und im Endprodukt von 0,49 und 0,27 log KbE/g, sowie der Anzahl der Enterobakterien um 0,36 und 0,41 log KbE/g und der Schimmelbelastung um jeweils 1,08 log KbE/g. Die relativ starke Verringerung der Schimmelpilze spricht für die Effektivität des Waschschriffs.

Im Reinbereich, für die gewaschenen, teils geschnittenen Produkte wurden hingegen niedrigere Gesamtkeimzahlen als in den gewaschenen, geschnittenen und verpackten Endprodukten beobachtet (6,19 vs. 6,41 log KbE/g). Da im geschnittenen Endprodukt zum größten Teil verzehrfertige Mischsalate untersucht wurden und diese Mischsalate als Hauptzutat aus Zichoriensalaten bestehen, wurde die Keimzahl maßgeblich durch diese Zutat bestimmt. Zichoriensalate zeigten signifikant höhere Gesamtkeimzahlen, Enterobakterien- und Schimmelpilzzahlen als Gartensalate. Das bestätigt die Studie von Wulfkühler et al., in der Endivie im Vergleich zu Eissalat eine deutlich höhere Gesamtkeimzahl (7 vs. 4 log KbE/g) und Pseudomonadenbelastung (6,2 vs. 3,8 log KbE/g) zeigte (Wulfkuehler et al. 2013). Im Fresh-Cut Sektor zählen Endivien zu den am häufigsten genutzten Zichorien, zu denen auch Frisee, Radiccio und Zuckerhut zählen. Dementsprechend kommt es durch Zichoriensalate zu einem erhöhten Eintrag von Gesamtbakterien, Enterobakterien und Schimmelpilzen in das Endprodukt der verzehrfertigen Mischsalate. Auch in der Modellierung von Einflussfaktoren auf die Keimzahlen zeigte die Produktgruppe der Zichoriengewächse den stärksten Einfluss mit einer Erhöhung der Gesamtkeimzahl um 0,65 log KbE/g. Einen weniger starken Einfluss hatte die Produktgruppe Salatmix als Endprodukt, mit einer Zunahme der Gesamtkeimzahl von 0,54 log KbE/g, was durch die Hauptzutat Zichoriengewächse (Endivie) eher als abhängiger Faktor gewertet werden sollte. Als Grund für den ermittelten schlechteren mikrobiologischen Status der Zichoriensalate ist die gute Lagerfähigkeit dieser Gewächse zu nennen. Vor allem glatte Endivien wie der Zuckerhut (*Cichorium intybus* var. *foliosum*) werden über Wochen, mitunter Monate gelagert und bei Bedarf verarbeitet (persönliche Kommunikation Verarbeitungsbetrieb). Auch wenn bei Zuckerhut während der

Kühlagerung optisch und sensorisch nur geringe Veränderungen sichtbar werden, besteht ein langsamer mikrobiologischer Verderb und die Vorratslagerung sollte soweit wie möglich reduziert werden.

Der Vorputz der Produkte und das Schneiden und Waschen zeigten den größten Einfluss auf die mikrobiologische Qualität. Der Dekontaminationsschritt Waschen während der Prozessierung besitzt demnach eine moderate Wirksamkeit mit einer Reduktion von ca. 0,5 log KbE/g in der Gesamtkeimzahl, ca. 1 log KbE/g der Enterobakterienanzahl und 1,5 log KbE/g der Schimmelpilze im Vergleich zu Lagerproben. Demnach ist der industrielle Waschvorgang in seiner Dekontaminationsleistung mit dem Waschen im privaten Haushalt (-0,3-0,9 log KbE/g) vergleichbar (Nastou et al. 2012; Uhlig et al. 2017).

Vor dem Waschen findet bei der Produktion von Fresh-Cut Produkten das Schneiden statt. Dabei führt das Zerschneiden zur Öffnung der pflanzlichen Oberfläche und zum Austritt von Pflanzensaft (Hägele et al. 2016). Neben dem Austritt von Nährstoffen ist die Aktivierung von Enzymen, die zur Bräunung führen, der wichtigste physiologische Vorgang, der durch das Zerteilen ausgelöst wird (Corato 2020). Durch das Wasserbad wird ein Teil der Bakterien und restliche (Boden-) Anhaftungen von der Oberfläche gelöst. Diese gehen in die planktonische Phase des Waschwassers über und können dadurch auf die zuvor sterile Schnittkante verteilt werden (Corato 2020; Rosberg et al. 2021). Außerdem werden austretende Pflanzensäfte und Bräunungsenzyme durch das Waschwasser verdünnt (Corato 2020). Im Gegensatz zu Ländern wie den USA, ist in Deutschland der Einsatz von Desinfektionsmitteln im Waschwasser unzulässig (EFSA 2015; Corato 2020; Rosberg et al. 2021). In weiten Teilen der Welt hingegen ist der Einsatz von Chlor zur Reduktion von Mikroorganismen üblich (Pezzuto et al. 2016; Corato 2020). Dabei werden 50-200 mg/l freies Chlor dem Waschwasser zugesetzt (Corato 2020). In Deutschland ist nach der Trinkwasserverordnung ein maximaler Chlorgehalt von 0,3 mg/L im Trinkwasser zulässig. Aufgrund der Bildung von potentiell krebserregenden Verbindungen wie Chloraminen, Dichloraminen, Trichlormethan und Trihalomethanen wird der Einsatz von Chlor in Lebensmitteln kontrovers diskutiert (Corato 2020). Es wird angenommen, dass 10-40 % der bakteriellen Population in einem schützenden Biofilm auf den Pflanzen lebt, daher sind Wasch- und Desinfektionsschritte mitunter von verminderter Effizienz (Morris et al. 1998). Auch wenn bei einem Einsatz von Desinfektionsmitteln wie Chlor weniger als 100 KbE/ml im Waschwasser nachgewiesen wurden, zeigte sich in der Gesamtkeimzahl der Salate nur eine Reduktion von maximal 2 log KbE/g (Corato 2020). Für das Waschen ohne Chlor wurde auch von Reduktionen um 1-1,5 log KbE/g bei der Gesamtkeimzahl und

0,5 log KbE/g bei Enterobakterien berichtet (Li et al. 2001; Wulfkuehler et al. 2013; Rosberg et al. 2021).

In dieser Studie konnte nur eine schwache Reduktion um 0,49 log KbE/g durch das Waschen mit Trinkwasser festgestellt werden. Zudem führte das Waschen zu einer Verteilung und Angleichung der Mikrobiota von unterschiedlichen Produkten. Ausschlaggebend hierfür war eine nahezu konstante Mikrobiota des Waschwassers, welche durch die am höchsten belasteten Produkte bestimmt wurde.

Durch die gesetzlichen Rahmenbedingungen kommt es demnach nur zu einer geringen Reduktion der bakteriellen Besiedlung, und vielmehr zu einem Vereinheitlichen der Mikrobiota. Dieser Effekt war auch an der geringeren kulturellen Standardabweichung/Varianz der Endprodukt-Produktproben gegenüber den Proben der übrigen Stufen zu sehen ( $SD \pm 0,52$  log KbE/g Endprodukt vs.  $\pm 0,90-1,23$  log KbE/g übrige Stufen). Es konnte somit gezeigt werden, dass es durch den Waschvorgang zu einer sehr homogenen Angleichung der Mikrobiota und auch der Gesamtkeimzahl im Endprodukt kam.

Die geschnittenen und gewaschenen Produkte besaßen eine nahezu identische Mikrobiota, obwohl diese sich auf den Stufen Feld, Lager und Vorputz noch deutlich unterschieden haben. Die Befreiung von Schmutz und die Verteilung der Bakterien durch den Waschschrift, aber auch eine fehlende Reduktion der Keimzahlen während der industriellen Verarbeitung wurde auch von Rosberg et al gezeigt (Rosberg et al. 2021). Rosberg et al. beschrieben außerdem für die Monoprodukte Spinat und Rucola einen Diversitätsverlust während der Verarbeitung vom Feld bis zum gewaschenen Endprodukt sowie einen starken jahreszeitlichen Einfluss auf die Zusammensetzung der Mikrobiota (Rosberg et al. 2021).

Hierbei sollte beachtet werden, dass Kreuzkontamination dem gleichen Prinzip folgend über das Waschwasser verteilt werden. Rosberg et al. zeigten eine höhere *E. coli* Nachweisrate im gewaschenen Produkt als in der Rohware und erklärten dies mit der festgestellten Verteilung der Bakterien über das Waschwasser (Rosberg et al. 2021). Punktuelle Kontaminationen werden so auf große Mengen Endprodukt übertragen. Jedoch ist mit sehr geringen Keimzahlen von pathogenen Keimen zu rechnen, da durch den Vorputz die offensichtlichen oberflächlichen Anhaftungen entfernt wurden.

Durch das Waschen war für Enterobakterien eine höhere Reduktion von 0,36 log KbE/g (Vorputz vs. Endprodukt) nachweisbar, als bei der Gesamtkeimzahl mit 0,27 log KbE/g festgestellt wurde. Die Schimmelbelastung verringert sich zwischen Vorputzbereich und den gewaschenen Produkten mit 1,08 log KbE/g am

stärksten. Das turbulente Waschen mit 4-7 °C kaltem Wasser ist für Schimmelpilze demnach effektiv, um die Belastung zu reduzieren. Bakterien oder Hefen können in Form eines Biofilms fester an die pflanzliche Oberfläche gebunden sein als Schimmelpilze oder verfügen über Adhäsionsmechanismen um sich effektiver aus der planktonischen Phase des Waschwassers auf der pflanzlichen Oberfläche niederzulassen (Kimkes und Heinemann 2020).

Die Phyllosphäre von Pflanzen ist im Allgemeinen dicht besiedelt. Die Mikrobiota auf der Oberfläche der Blätter interagiert mit der Pflanze in komplexer Art und Weise (Schlechter et al. 2019; Vandenkoornhuysen et al. 2015). Zwar können Bakterien auch in die Pflanze internalisieren, beispielsweise über Blüten oder Wurzeln, dies scheint jedoch auch aufgrund der Immunabwehr von Pflanzen ein eher seltenes Phänomen zu sein (Erickson 2012). Internalisierte Bakterien wie beispielsweise *Salmonella*, welche Erkrankungen bei Menschen auslösten, wurden vor allem in Fruchtkörpern wie Tomaten, Gurken und Melonen gefunden (Gurtler et al. 2018; Burris et al. 2020; Esteban-Cuesta et al. 2018). Innen liegendes Pflanzengewebe wird im Gegensatz zur dicht besiedelten Pflanzenoberfläche hingegen als nahezu keimfrei angesehen. In den Mikrobiota-Analysen zeigten die pflanzlichen Produkte eine überwiegende Besiedlung mit Proteobakterien (47-91 %), was mit den Literaturangaben von 60-87 % (Dees et al. 2015), 78-82 % (Gu et al. 2020a), 76-85 % (Rosberg et al. 2021) übereinstimmt. Die Zusammensetzung der Mikrobiota zwischen den untersuchten Produktgruppen unterschieden sich auf den Stufen Feld, Lager und Vorputzbereich. Jedoch blieb die Diversität konstant (Daten nicht gezeigt), wobei sich während der Verarbeitung die Anteile an der Mikrobiota änderten, wie in dieser Studie anhand der Hochdurchsatzsequenzierdaten gezeigt werden konnte. Die Feldproben besaßen eine produktabhängige heterogene Gemeinschaft an Bakterien, dominiert von *Pseudomonadaceae*, *Oxalobacteraceae*, *Sphingomonadaceae*, *Microbacteriaceae*/*Micrococcaceae* und *Flavobacteriaceae*, welche sich während der Lagerung und im Vorputz änderte. Durch den Einfluss der Kühlagerung kam es zu einer Verschiebung der Anteile in Richtung der psychrotoleranten Bakterien, wie z. B. die Familien *Bacillaceae*, *Methylobacteriaceae* und *Rhizobiaceae*. Durch den Vorputz wurden die äußeren Blätter entfernt, was weitere Veränderungen der Mikrobiota wie den Anstieg der *Xanthomonadaceae* auslöste. Allen Produkten gemeinsam war eine gewisse Kern-Mikrobiota, die hauptsächlich aus den Familien *Pseudomonadaceae*, *Oxalobacteriaceae* und *Flavobacteriaceae* bestand. Während der gesamten Prozessierung dominierten diese Familien die Mikrobiota der untersuchten Produkte (Endivie, Lollo Bionda und Romana). Sehr ähnliche Zusammensetzungen der Mikrobiota wurden für die

Produkte Gartensalate, Spinat und Rucola gezeigt (Dees et al. 2015; Gu et al. 2020a; Rosberg et al. 2021).

Im Endprodukt zeigten alle drei untersuchten Produkte eine annähernd gleiche Mikrobiota, was auf den Effekt der bakteriellen Verteilung durch das Waschwasser zurückzuführen ist. Im Waschwasser etablierte sich innerhalb von ein bis zwei Stunden nach Produktionsstart deutlich eine stabile Mikrobiota, was sowohl Gesamtkeimzahl und Enterobakterienzahl als auch die 16S-rDNA Sequenzanteile betrifft. In der Cluster-Analyse des Waschwassers, die ähnliche Mikrobiota in einem Dendrogramm gruppiert, wurden vier Cluster gebildet (Abbildung 10). Diese Clusterbildung zeigte deutlich den zeitlichen Verlauf der Probenahme und somit, dass jede Mikrobiota mit der vorherigen und nachfolgenden Mikrobiota (Probenzeitpunkt) in Verbindung steht. Als erstes Produkt wurde Romanasalat verarbeitet und die Mikrobiota des Waschwassers nahm langsam die Mikrobiota dieses Produktes an, wobei die erste Waschwasserprobe, 5 Minuten nach Produktionsstart, noch gering belastet war ( $<3 \log \text{ KbE/ml}$ ). Die nachfolgende Verarbeitung von Frisee veränderte die Mikrobiota und auch die Gesamtkeimzahl stieg auf  $5 \log \text{ KbE/ml}$  (25 Minuten nach Start), wobei die initiale Mikrobiota des Romanasalates das Waschwasser immer noch beeinflusste, sodass die erste und zweite Probe in ein gemeinsames Cluster gruppiert wurden (Cluster 1). Erst bei der anschließenden Verarbeitung von Lollo Rosso und Spinat überlagerte deren Mikrobiota die bisherige Wasser-Mikrobiota und es bildete sich ein neues Cluster (Cluster 2) aus den vier folgenden Probenahmen (45-105 Minuten nach Start). Nach 120 Minuten wurde Endivie, Frisee und Radiccio verarbeitet und die Mikrobiota änderte sich erneut entsprechend dieser Produkte, was durch ein neues Cluster (Cluster 3) für sechs Probenahmen sichtbar wurde. Obwohl weiterhin die gleichen Produkte verarbeitet wurden, zeigte die Clusteranalyse ein viertes Cluster für die letzten sechs Probenzeitpunkte. Hier könnte ein Wechsel der Rohprodukt-Charge zu einer Änderung der Mikrobiota geführt haben. Insgesamt baute sich innerhalb von einer Stunde eine produktabhängige Mikrobiota im Waschwasser auf. Hauptsächlich bestimmten *Pseudomonadaceae*, *Oxalobacteriaceae* und *Flavobacteriaceae* die Mikrobiota, was der zuvor nachgewiesenen Kern-Mikrobiota der Produkte entsprach. Leichte Veränderungen waren beim Wechsel der Produkte zu sehen. Bei der Verarbeitung gleicher Produkte wurden nur geringe Schwankungen in der Waschwasser-Mikrobiota und Gesamtkeimzahl festgestellt, so dass auch die Rohware von sehr vergleichbarer Qualität (Mikrobiota) war und die Zufuhr von Frischwasser im Waschbecken einen eher verdünnenden Effekt besaß. Eine Untersuchung der Waschwasser-Mikrobiota im zeitlichen Verlauf wurde in der vorliegenden Studie

erstmalig beschrieben und ist durch andere Autorinnen und Autoren (im Folgenden Autoren genannt) nicht bekannt.

Die ermittelten kulturellen Keimzahlen von 5,7-6 log KbE/g (Waschwasser) und 5,9-6,6 log KbE/g (gewaschene Produkte) stimmten grundlegend mit den Literaturangaben für Washwasser (3,7-5,3 log KbE/g) und gewaschene Produkte (4,2-6,5 log KbE/g) überein (Anhang Tabelle A 12), auch wenn generell etwas geringere Gesamtkeimzahlen für das Washwasser und für gewaschene Produkte beschrieben wurden (Li et al. 2001; Wulfkuehler et al. 2013; Rosberg et al. 2021). Hierbei muss beachtet werden, dass die meisten Studien ihre Ergebnisse im Labormaßstab oder im experimentellen Praxisbetrieb ermittelt haben. Dabei wurden geringe Mengen an Gemüse oder Salat verarbeitet und die realistische Sättigung des Washwassers nicht erreicht. In der vorliegenden Studie hingegen wurden die Proben im Normalbetrieb gezogen, wobei mehrere hundert Kilo Salat bis zum Erreichen der stabilen Mikrobiota (ca. 2 h) im Washwasser verarbeitet wurden. Während der Beprobung der Washstraße wurden damit innerhalb von 8 Stunden mehr als 10 Tonnen Rohware verarbeitet. Aus diesen Gründen sollten die durch Waschen ermittelten Reduktionen von  $\leq 2$  log KbE/g (Li et al. 2001; Wulfkuehler et al. 2013; Rosberg et al. 2021) stets im Kontext mit dem methodischen Aufbau der Studien betrachtet werden.

Zwischen den untersuchten Produktgruppen auf Handelsebene wurden signifikante Unterschiede in den Keimzahlen festgestellt. Produktgruppen wie Sprossen, Kopf-/Blatt-/Pflücksalate (Spinat, Feldsalat, Zichorien, Rucola) und verzehrfertiger Salatmix zeigten generell die höchste Belastung in der Gesamtkeimzahl (6,71-8,58 log KbE/g), wohingegen Tomaten und Gurken mit 3,70-6,22 log KbE/g vergleichsweise geringe Belastungen aufwiesen.

Wird von einer ähnlichen Bakteriendichte je  $\text{cm}^2$  auf pflanzlichen Produkten ausgegangen, ist die festgestellte erhöhte Gesamtkeimzahl bei den bodennah wachsenden Sorten wie Rucola, Feldsalat und Spinat erklärbar. Diese Produkte besitzen eine filigrane Blattstruktur, was auf ein hohes Verhältnis von Oberfläche zu Gewicht schließen lässt. Die sehr hohen Keimzahlen bei Sprossen können dadurch allerdings nicht erklärt werden. Hier sind vor allem die Produktionsbedingungen entscheidend. Sprossen werden durch feuchtwarme Inkubation über mehrere Tage aus dem Saatgut gezüchtet. Durch anschließendes Waschen wird versucht, die entstandene, bakterielle Vorbelastung zu reduzieren. Wie oben geschrieben ist der Schritt des Waschens jedoch nur sehr moderat keimreduzierend. In der Literatur werden ähnliche Gesamtkeimzahlen für die unterschiedlichen Produktgruppen auf



Handelsebene beschrieben: für geschnittene, gewaschene Produkte werden 6,41-6,95 log KbE/g (Eisberg, Romanasalat, Spinat (Zhang et al. 2018)) und für ungeschnittene Produkte 7,06-7,51 log KbE/g (Petersilie, Koriander, Spinat und Kopfsalat (Zhang und Lampel 2010)), 7,49-8,06 log KbE/g (Basilikum, Koriander, Kopfsalat, Frühlingszwiebeln, Spinat und Petersilie (Korir et al. 2016)), 8,0-9,35 log KbE/g (Gartensalate und Sprossen (Tango et al. 2018)) angegeben. Neben den individuell-produktspezifischen Keimzahlen berichteten Rosberg et al. von jahreszeitlichen Schwankungen in der Gesamtkeimzahl (Rosberg et al. 2021). Hier wurden insbesondere im Herbst bei Spinat und Rucola um 1-2 log KbE/g höhere Keimzahlen als im Frühjahr nachgewiesen. Dadurch wird deutlich, dass der mikrobiologische Status von pflanzlichen Frischeprodukten vom Zusammenspiel abiotischer und biotischer Faktoren abhängt, die nicht selten zu Schwankungen von bis zu 99 % in der Gesamtkeimzahl führen können. Bei industriell prozessierten Produkten, wie verzehrfertigen Salaten, sollten möglichst niedrige Keimzahlen angestrebt werden, um den mikrobiellen Verderb zu begrenzen und potentielle Unterbrechungen der Kühlkette beim Transport und beim Konsumenten abzufuffern. Die Gesamtkeimzahl der verzehrfertigen Mischsalate lag bei ca. 6,5 log KbE/g beim Verlassen des Produktionsbetriebs. Die auf Handelsebene beprobten Mischsalate zeigten 7,3 log KbE/g am Ende der Mindesthaltbarkeit bei optimaler Kühlung von 4 °C. Diese kühlpflichtigen Salate waren zwischen vier und sieben Tagen ab Produktionsdatum haltbar. Somit ist bei diesen Produkten grundsätzlich mit einem Anstieg von ca. 1 log KbE/g bei einer Lagerung <7 °C bis zum Verbrauchsdatum zu rechnen.

Beim Vergleich von ökologischem und konventionellem Anbau konnten geringere Gesamtkeimzahlen und präsumtive *Bacillus cereus* bei ökologisch erzeugten frischen Pilzen festgestellt werden. Bei Kopf-, Blatt- und Pflücksalaten wurde hingegen eine erhöhte Gesamtkeimzahl bei ökologischer Erzeugung festgestellt, wie auch bei Salatgurken, wo die Hefen-Anzahl im ökologischen Anbau höher lag als in konventionellem Anbau. Es zeigte sich insgesamt ein diverses Bild, was keinen grundlegenden Unterschied im mikrobiologischen Status zwischen beiden Anbauformen erkennen ließ. In der Literatur werden teils kontroverse Ergebnisse bei mikrobiologischen Vergleichen zwischen konventionell und ökologisch produziertem Gemüse vorgestellt. Die Gesamtkeimzahlen liegen meist auf ähnlichem Niveau, wobei einige Autoren bei ökologischer Produktion von signifikant erhöhten Gesamtkeim-, Enterobakterien- und *E. coli*-Belastungen berichten (Oliveira et al. 2010; Maffei et al. 2016; Szczech et al. 2018). Die auffällig erhöhten Enterobakterien-Keimzahlen im ökologischen Anbau führten die Autoren auf die ausschließlich organische Gülle- und

Stallmistdüngung im Gegensatz zur konventionellen Düngung zurück, die auch mineralische Dünger beinhalten (Szczzech et al. 2018).

Eine niedrige Gesamtkeimzahl bzw. Enterobakterienanzahl wird grundsätzlich mit einer guten Hygienepraxis und einem niedrigeren Risiko zum Vorkommen pathogener Bakterien assoziiert.

Allerdings zeigten die Forschungen der letzten Jahre im Bereich der humanen Darm-Mikrobiota auch, dass neben dem Nähr- und Ballaststoffgehalt von pflanzlichen Produkten auch die über die Nahrung aufgenommenen Bakterien einen positiven Einfluss auf die menschliche Gesundheit haben können (Tuohy et al. 2014). Zivilisationserkrankungen, die mit einer unausgewogenen Ernährung und einer gestörten Mikrobiota (Dysbiose) in Verbindung gebracht werden, sind beispielsweise entzündliche Darmerkrankungen, Diabetes Typ 2, Allergien und Übergewicht (David et al. 2014). Hier wurde gezeigt, dass eine ballaststoffreiche pflanzliche Ernährung die individuelle Mikrobiota im Darm positiv beeinflusst und Auswirkungen auf die geistige und körperliche Gesundheit hat (David et al. 2014). Jedoch ist noch unklar, ob diese ernährungsbedingten Veränderungen eine direkte Kausalität zu den aufgenommenen Nahrungsmitteln oder deren Mikrobiota besitzen (Hanski et al. 2012; Tomasik und Tomasik 2020). Die sehr individuellen menschlichen Faktoren, wie genetische Ausstattung, Alter, Lebensstil und Umweltfaktoren, erschweren generalisierte Aussagen (Singh et al. 2017).

## 4.2. Humanpathogene

Der Eintrag von pathogenen Bakterien in die Produktionskette konnte für *Listeria monocytogenes* durch Feldproben mit einer Nachweisrate von 7,1 % gezeigt werden. Als ubiquitärer Keim wird *L. monocytogenes* regelmäßig durch Rohstoffe in den Verarbeitungsbetrieb eingetragen (Buchanan et al. 2017).

Weller et al. konnte *L. monocytogenes* in ca. 10 % der untersuchten Erdproben von Feldern nachweisen, auf welchen Gemüse angebaut wurde (Weller et al. 2015). In den Proben der Kühllagerung wurden hingegen keine Pathogene detektiert. Im Vorputzbereich wurden in 7,6 % der Proben *L. monocytogenes* nachgewiesen, was auf eine initiale Kontamination der äußeren Blätter schließen lässt. Dabei wurden aus den Produkten Eissalat und Lollo Bionda, die nachfolgend am gleichen Arbeitsplatz beprobt wurden, zwei Isolate mit identischen cgMLST cg-24602 isoliert. Da auf dieser Prozessierungsstufe quantitativ keine Nachweise erbracht wurden, ist eine Kreuzkontamination über Schneide-Werkzeuge und Arbeitsflächen auf die folgenden Produkte wahrscheinlicher als eine grundlegende Kontamination der verschiedenen Rohprodukte mit der identischen klonalen Linie. Von zwei Proben der identischen Charge von Lollo Rosso wurden ebenfalls *L. monocytogenes* isoliert (ST1), was wiederum eher auf eine grundlegende Kontamination dieser Ernteeinheit hindeutet. Da im Reinbereich keine *L. monocytogenes* Nachweise erbracht wurden, führte der Waschschrift zu einer Entfernung der geringen Kontaminationen, welche im gewaschenen Endprodukt qualitativ nicht mehr nachweisbar waren. Jedoch muss bei einem höheren Eintragsgeschehen von einer Verteilung durch das Waschwasser ausgegangen werden (Allende et al. 2008; Holvoet et al. 2012; López-Gálvez et al. 2021), da geschnittene, verzehrfertige Mischsalate mit 5 % an *L. monocytogenes* Nachweisen (n=2/40) die höchste Prävalenz der untersuchten Handelsprodukte aufwiesen. In den verzehrfertigen Mischsalaten wurden keine pathogenen Mikroorganismen mit Keimzahlen >100 KBE/g nachgewiesen. Die Detektion erfolgte qualitativ durch Anreicherung, daher kann von sehr niedrigen Keimzahlen ausgegangen werden. Punktuelle und sporadisch vorkommende Kontaminationen in den Rohstoffen können demnach über das Waschwasser auf große Produktmengen übertragen werden, jedoch in sehr geringen Keimzahlen. Im Gegensatz zu den Enterobakterien *E. coli* und *Salmonella* können sich *L. monocytogenes* unter gekühlten Bedingungen vermehren (Carrasco et al. 2008; Posada-Izquierdo et al. 2013; Tarlak et al. 2020). Einzig *L. monocytogenes* besitzt prinzipiell die Fähigkeit, sich auch bei unter 8 °C in Salat nennenswert zu vervielfältigen (Culliney und Schmalenberger 2020). In der Literatur wird *L. monocytogenes* im Gegensatz zu *Salmonella* und pathogenen *E. coli* relativ selten als Ursache für Ausbrüche mit frischen pflanzlichen Produkten in

Verbindung gebracht (Da Silva Felício et al. 2015; Buchanan et al. 2017). Dass *L. monocytogenes* in frischen pflanzlichen Produkten regelmäßig vorkommt, ist lange bekannt (Smith et al. 2018). Allerdings wurden bisher nur wenige *L. monocytogenes* Ausbrüche mit frischen pflanzlichen Produkten assoziiert (Zhu et al. 2017). Während *L. monocytogenes* Erkrankungen nur selten gesunde Personen betreffen, können vulnerable Personen wie Immungeschwächte, Schwangere und ältere Menschen die schwerwiegende Listeriose entwickeln (Buchanan et al. 2017). Allgemein wird von einer Infektionsdosis von 5-7 log *L. monocytogenes* Zellen ausgegangen (Farber et al. 1996), jedoch scheint auch eine weit geringere Dosis bei anfälligen Personengruppen für eine Infektion auszureichen (Pouillot et al. 2016; Buchanan et al. 2017). In den hier untersuchten Proben wurde nur bei einer Probe von Enokipilzen quantitativ eine extrem hohe Keimzahl von 5 log KbE/g *L. monocytogenes* nachgewiesen (ST87). Bei Frischverzehr dieses Produktes müsste somit von einer akuten Gefährdung der Verbraucher ausgegangen werden. Die Vakuumverpackung und die Herstellungsmethode der Pilze sind als Gründe für die hohe Keimzahl anzusehen. Ein Ausbruch von *L. monocytogenes* durch dieses Produkt wurde erst kürzlich in den USA beschrieben, was darauf hindeutet, dass es sich um ein generelles Risikoprodukt handelt (CDC/FDA 2020).

Die von verschiedenen Autoren beschriebene Prävalenz von *L. monocytogenes* in frischen pflanzlichen Produkten lag bei 0,7 bis 4,3 % in Fresh-Cut Salaten aus Ländern wie Brasilien, Australien, Kroatien, Korea, Finnland, Spanien und Schweiz (Sant'Anna et al. 2020). In den USA wurden in 1,12 % der pflanzlichen Fresh-Cut Produkte (1.689 Proben) und in 0,19 % der Sprossen (2.652 Proben) *L. monocytogenes* nachgewiesen (Luchansky et al. 2017). Dabei wurden maximale *L. monocytogenes* Keimzahlen von 2,51-3,04 log KbE/g festgestellt. Industriell geschnittene, pflanzliche Produkte wiesen mit 1,32 % *L. monocytogenes* Kontamination einen höheren Wert auf als vorgeschchnittene Ware im Supermarkt mit 0,54 % (Luchansky et al. 2017). Andere Autoren haben in 0,05-0,11 % (unverarbeitete Salate und Gemüse, USA), 0,7 % (Fresh-Cut, Sprossen und Gemüse, Spanien), 2,7 % (Obst, Gemüse, Nüsse, Pilze u.a., Europa), 1,3-2,6 % (Salate, Fresh-Cut, Sprossen, Deutschland), 3,5 % (Salate, Fresh-Cut, Sprossen, Schweiz) der untersuchten Produkte qualitativ *L. monocytogenes* ermittelt (Zhang et al. 2018; Wijnands et al. 2014; Abadias et al. 2008; Da Silva Felício et al. 2015). In der vorliegenden Studie wurden in 9 von 561 (1,6 %) untersuchten Proben *L. monocytogenes* nachgewiesen, wovon 2 von 28 Feldproben (7,1 %); 4 von 53 Proben im Vorputzbereich (7,6 %) und 2 von 40 verzehrfertigen Mischsalate (5 %) *L. monocytogenes* positiv waren. Damit ist die Prävalenz mit 1,6 % in allen untersuchten

Produkten sehr ähnlich zu den Literaturangaben. Die deutlich höhere Nachweisrate bei verzehrfertigen Mischsalaten bestätigt ebenfalls die von anderen Autoren beschriebene höhere Belastung an Humanpathogenen bei dieser Produktgruppe (BfR 2011; Wijnands et al. 2014; Luchansky et al. 2017; Sant'Anna et al. 2020).

Leong et al. untersuchte in einem Zeitraum von drei Jahren 54 industrielle Verarbeitungsbetriebe für Meeresfrüchte, pflanzliche Produkte, Milchprodukte und Fleischprodukte auf das Vorkommen von *L. monocytogenes* (Leong et al. 2017). Hier wurden Prävalenzen zwischen 1,6-9,5 % in der Produktionsumgebung und 1,8-7,5 % in den Nahrungsmitteln ermittelt. Dabei zeigten Gemüse-verarbeitende Betriebe mit 9,5 % die höchste Prävalenz von *L. monocytogenes* und die zweithöchste in den hergestellten Produkten (5,8 %) (Leong et al. 2017). Die hohen Nachweisraten in den Feldproben (7,1 %) zusammen mit den Literaturangaben, dass 10 % der untersuchten Erdproben bei Gemüsefeldern *L. monocytogenes* positiv waren (Weller et al. 2015), lassen auf einen regelmäßigen Eintrag von *L. monocytogenes* durch die Rohprodukte schließen, wobei persistierende Stämme bei Gemüse- und Salat-verarbeitenden Betrieben ebenfalls eine Rolle spielen können (Stephan et al. 2015). Dementsprechend ist eine gründliche Reinigung und Desinfektion in allen Lebensmittel-verarbeitenden Betriebe essentiell und schützt vor persistierenden Stämmen (Møretrø und Langsrud 2017). Durch das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) wurden geschnittene und verzehrfertige Salate mit *L. monocytogenes* Nachweisraten von ca. 2-5 %, neben Rohfisch- und Rohfleischzubereitungen, als Risikoprodukte für sensible Personengruppen bewertet (BfR 2011, 2021). Bei Konsumenten sollte das Bewusstsein für frische pflanzliche Produkte als mögliche Risikoprodukte weiter gestärkt werden, um sensible Bevölkerungsgruppen bestmöglich zu schützen.

Für die *L. monocytogenes* Isolate wurden drei verschiedene Serotypen (1/2a, 1/2b und 4b) und sechs MLST-Typen (ST1, ST59, ST87, ST399, ST451 und ST736) nachgewiesen. In Europa und Deutschland führen die Serotypen 1/2a und 4b am häufigsten zu schweren Erkrankungen von Menschen (Halbedel et al. 2018; Cabal et al. 2019; ECDC/EFSA 2021b). Dabei wurden die 2014-2019 in Deutschland gemeldeten Listeriosen zu 36-56 % von dem Serotyp 1/2a, 8-15 % von 1/2b und 36-52 % von 4b verursacht (RKI 2021b). Die MLST-Typen ST1, ST6 und ST8 sind bei Infektionen die verbreitetsten Linien in Europa und Deutschland (Halbedel et al. 2018; Cabal et al. 2019; ECDC/EFSA 2021b). ST1 wurde in zwei Proben nachgewiesen (Mischsalat, Lollo Rosso).

In China wurde ST87 als häufigster MLST-Typ bei humaner Listeriose und auf pflanzlichen Produkten identifiziert (Chen et al. 2019; Li et al. 2018b), was die Kontamination der Enokipilze (ST87, 5 log KbE/g) als Gefährdung für den Verbraucher bestätigt und eine hohe Verbreitung der klonalen Line in Ostasien vermuten lässt. In Österreich ist ST451 der dritthäufigste MLST-Typ bei humanen Erkrankungen und der häufigste MLST-Typ bei Nicht-Human-Isolaten (Cabal et al. 2019). In Deutschland wird ST451 an siebter und ST399 an neunter Stelle der häufigsten MLST-Typen bei humanen Erkrankungen beschrieben (Halbedel et al. 2018). ST451 und ST399 wurden in je einer Feldprobe Lollo Bionda und Lollo Rosso nachgewiesen. Die in Mischsalat (ST59) sowie Eissalat und Lollo Bionda (ST736) isolierten *L. monocytogenes* gehören zu den selten beschriebenen Serotypen (Linke et al. 2014; Ulloa et al. 2019). Bis auf ST59 und ST736 handelt es sich bei den in dieser Studie isolierten Stämmen ST1, ST87, ST399 und ST451 um hypervirulente Linien von *L. monocytogenes* (Halbedel et al. 2018; Cabal et al. 2019; Li et al. 2018b; ECDC/EFSA 2021b). Somit konnten 4 von 6 identifizierten MLST-Typen mit relevanten Erkrankungsfällen in Verbindung gebracht werden. Auf Grundlage dieser Untersuchung und unter Berücksichtigung der Literaturdaten ist damit zu rechnen, dass die Populationen von ST1, ST87, ST399 und ST451 auch in der Umwelt weit verbreitet sind. Bestimmte genetische Ausstattungen bieten Vorteile bei der Persistenz, Vermehrung und dem Überleben in Umwelt, Nahrungsmitteln und während der Verarbeitung. Als besonders erfolgreich kann der beinahe ubiquitär vorkommende hypervirulente MLST-Typ ST1 (CC1) angesehen werden, der selbst in Oberflächengewässern nachgewiesen worden ist (Raschle et al. 2021). Einige genetische Linien kommen geographisch vermehrt vor, wie am Beispiel des aus Enokipilzen stammenden *L. monocytogenes* Isolates (ST87) verdeutlicht wurde. Diese Pilze wurden in Südkorea hergestellt, vakuumverpackt und im globalisierten Lebensmittelhandel über die Niederlande auf den deutschen Markt gebracht. Der am nächsten verwandte Stamm zu diesem Isolat wurde ebenfalls in Südkorea aus Nahrungsmitteln isoliert. Bei diesem und bei allen übrigen Stämmen wurden 25-104 SNPs Unterschied zu den genomisch ähnlichsten Isolaten mithilfe von diversen Datenbanken nachgewiesen, die Genomdaten zu weltweit isolierten *L. monocytogenes* aus Human-, Lebensmittel, Veterinär- und Umweltproben beinhalten. Die Resultate der SNP-Analysen (>25 SNPs) zeigten demnach keinen direkten Zusammenhang zwischen den hinterlegten Stämmen aus Humanproben und den in dieser Studie isolierten Stämmen. Andere Autoren berichteten allerdings von Unterschieden bis zu 9-67 SNPs zwischen beteiligten *L. monocytogenes* Isolaten während einer Ausbruchs- bzw. Kontaminationsverfolgung (Pightling et al. 2018). Die verwendeten

SNP-Methoden sind jedoch nicht direkt miteinander vergleichbar und die SNP-Werte (>21) erscheinen bei aktueller Betrachtung sehr hoch (Pightling et al. 2018). In der vorliegenden Studie wurde für *L. monocytogenes* die CSI Phylogeny 1.4 Pipeline benutzt, welche im Vergleich zur CFSAN Pipeline weniger SNPs feststellte (siehe Ergebnisse Tabelle 36), was die Ergebnisse von Saltykova et al. bestätigt (2018). Für diese CSI Phylogeny Analyse wurden 0-4 SNPs für direkte Klonalität, also für identische Ausbruchserreger von *Salmonella* beschrieben (Saltykova et al. 2018). Für *L. monocytogenes* wurden beispielsweise genomische Veränderungen zu ca. 0,35 SNPs pro Jahr aufgezeigt (Harrand et al. 2020), sodass trotz hoher Ähnlichkeit (20-100 SNPs) nicht mit einem direkten epidemiologischen Zusammenhang zu rechnen ist. Es zeigt jedoch, dass diese genetischen Linien weit verbreitet sind und durchaus zu Erkrankungen führen können.

Für SNP-Analysen wäre ein universaler „cutoff“ Wert (z. B. <10 SNPs) für direkte Klonalität sicherlich nützlich. Solch ein Wert ist jedoch nur individuell für jede Spezies (Stamm) und im Bezug zu den epidemiologischen Informationen festzusetzen. So wird die Anzahl der SNPs von vielen technischen Faktoren wie der Qualität der Sequenzierung, verwendete Software und deren Einstellungen maßgeblich bestimmt (Bush et al. 2020). Zusätzlich wirken biologische Faktoren wie spezies- und gattungsspezifische Unterschiede in der Mutationsrate, horizontaler Gentransfer, selbst Umweltbedingungen auf die genomische Stabilität ein (Pightling et al. 2018; Harrand et al. 2020). Zusätzlich müssen die Zeitpunkte der Isolation berücksichtigt werden, da beispielsweise bei einem zeitlich begrenzten Ausbruch in einem Krankenhaus mit weniger SNPs zu rechnen ist, als bei einer Untersuchung im Lebensmittelbetrieb von persistierenden *L. monocytogenes* über 10 Jahre hinweg (Harrand et al. 2020).

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 89 verschiedene genetische Virulenzfaktoren in den acht genomsequenzierten Stämmen gefunden, wovon 79 Virulenzgene in allen Isolaten auftraten. Als hauptsächliche Virulenzgene für *L. monocytogenes* wurden unter anderem *hly* (Listeriolysin O), *inlA/inlB/inlC* (Internalin), *plcA/plcB* (Phospholipase), *actA* (Actin assembly-inducing protein) und *lntA* (Listeria nuclear targeted protein A) beschrieben, die bei einer Infektion für die Adhäsion, Invasion, Phagosomlyse, Vermehrung und das Überleben wichtig sind (Weber 2013; Radoshevich und Cossart 2018). Bis auf *actA* (n=3/8) wurden diese Virulenzfaktoren in allen Isolaten identifiziert. Eine Vorhersage der Virulenz ist aufgrund der Vielzahl von beteiligten genetischen Faktoren bei *L. monocytogenes* bisher nicht praktikabel und es muss prinzipiell von Humanpathogenität ausgegangen werden (Radoshevich und Cossart 2018; Johansson und Freitag 2019).

Zwischen 2004-2012 wurden in den USA 16 Ausbrüche auf *Salmonella* in Salatprodukten zurückgeführt und 22 Ausbrüche auf pathogene *E. coli* (EHEC) in Salatprodukten (Callejón et al. 2015). Sprossen konnten als Ursache für 14 der Ausbrüche mit *Salmonella* und vier der Ausbrüche mit *E. coli* identifiziert werden (Callejón et al. 2015). In Europa wurden zwischen 2004-2012 durch die EFSA 20 Ausbrüche mit *Salmonella* und drei mit *E. coli* gemeldet, die mit Salatprodukten assoziiert wurden (Callejón et al. 2015). Sprossen wurden in Europa mit 11 *Salmonella* und drei *E. coli* Ausbrüchen in Verbindung gebracht (Callejón et al. 2015). Dadurch gelten *Salmonella* als die häufigste Ursache für Nahrungsmittel bedingte Ausbrüche durch frische pflanzliche Produkte (EFSA 2018).

In dieser Studie wurde *Salmonella* auf den Verarbeitungstufen Feld, Lager, Vorputzbereich und Reinbereich nicht nachgewiesen. Einzig aus einer Handelsprobe verzehrfertiger Mischsalate (Fresh-Cut) wurde *Salmonella* Szentés isoliert. Dieses Isolat zeigte Ähnlichkeiten mit sechs SNPs zu einem Isolat einer erkrankten Person aus Großbritannien. Eine direkte Verbindung zwischen diesen Isolaten ist dennoch ausgeschlossen, da bei >5 SNPs nicht mit einer direkten klonalen Verbindung zu rechnen ist (Saltykova et al. 2018) und zudem mehr als 2 Jahre zwischen den Isolationszeitpunkten lagen. Dies zeigt, wie notwendig auch die Berücksichtigung von epidemiologischen Informationen bei genomischen Clusteranalysen ist. In Deutschland wurden 2010-2020 zwischen 0-4 Salmonellosen pro Jahr durch *S. Szentés* ausgelöst, was *S. Szentés* bei 9.000-25.000 gemeldeten Infektionen zu einem äußerst seltenen Serovar macht (RKI 2021b).

Die hauptsächlichen Virulenzgene sind bei *Salmonella* innerhalb so genannter „Pathogenitätsinseln“ (*Salmonella* pathogenicity islands [SPI]) lokalisiert (Fàbrega und Vila 2013). In *S. Szentés* (diese Studie) wurden SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4 und SPI-5 nachgewiesen, die von Fàbrega und Vila als wichtigste Faktoren für die Pathogenität genannt wurden (2013). Diese Bereiche sind hoch konserviert und codieren eine Vielzahl an Virulenzfaktoren, die für Adhäsion, Internalisierung, Überleben und die systemische Infektion notwendig sind (Fàbrega und Vila 2013). Zusätzlich wurden SPI-9, SPI-13 und SPI-14 identifiziert, welche mit der Persistenz, dem Metabolismus und der Regulation von Virulenzgenen assoziiert wurden (Velásquez et al. 2016; Elder et al. 2018; Li et al. 2018a). Die genetische Ausstattung bestätigt die durch humane Infektionen belegte Pathogenität von *S. Szentés*.

Auffällig ist der hohe Verwandtschaftsgrad aller 12 untersuchten *Salmonella* Szentés Stämme (MLST, Genomen Hybridisierung, cgMLST, SNPs). Hier wurden für alle zur Verfügung stehenden Isolate zwischen 6-93 SNPs detektiert, was ungewöhnlich wenig für seltene *Salmonella* Serovare ist (Siira et al. 2019). In der Schweiz wurde für 2013/2014



ein Ausbruch mit 14 an *Salmonella* Szentés erkrankten Personen beschrieben (Nüesch-Inderbinnen et al. 2015). Diese Ausbruchsstämme zeigten im Vergleich mit weiteren *S. Szentés* Isolaten (Lebensmittel, Schwein, Mensch; 2002-2013) identische MLST und PFGE Muster (Nüesch-Inderbinnen et al. 2015). Der in der vorliegenden Studie isolierte *S. Szentés* besitzt ebenfalls den identischen Typ ST427, gleiches gilt für das PFGE Muster (Daten nicht gezeigt). Leider liegen für die Isolate aus der Schweiz keine Genomdaten vor, sodass diese bei den Analysen nicht berücksichtigt werden konnten. Diese genomische Konserviertheit von *S. Szentés* kann einerseits auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückzuführen sein, der im Maßstab der Evolution erst vor kurzer Zeit existierte. Oder es besteht eine Serovar-spezifische, sehr geringe Mutationsrate bzw. ein geringer horizontaler Gentransfer. Die in den Datenbanken hinterlegten *S. Szentés* Isolate wurden aus erkrankten Personen und pflanzlichen Produkten wie Paprika und Sonnenblumenkerne isoliert. Hier wäre auch der Übertragungsweg auf pflanzliche Lebensmittel durch Wildtiere, wie beispielsweise Zugvögel denkbar. Der Eintrag von pathogenen Enterobakterien über Vögel wird jedoch kontrovers diskutiert (Smith et al. 2020). Grundsätzlich findet der Eintrag von Salmonellen in die Produktionskette von pflanzlichen Produkten auf allen Ebenen der Verarbeitung statt (Abadias et al. 2008). Auch besitzen Salmonellen die Fähigkeit, im Boden über mehrere Monate lebensfähig zu bleiben (Islam et al. 2004), sodass *Salmonella* über verunreinigte Düngemittel, Abwässer, Bewässerung und Ausscheidungen von Wildtieren über den Erdboden auf die Blattoberflächen von Lebensmitteln gelangen können. Nicht nur der direkte Eintrag auf die Anbauflächen ist problematisch, auch die Transmission über Wind und Staub wurde für pathogene Mikroorganismen gezeigt (Glaize et al. 2021).

Die von verschiedenen Autoren beschriebene Prävalenz von *Salmonella* liegt in Fresh-Cut Salaten bei 0,8 bis 3 % aus Ländern wie Brasilien, Korea, Finnland und Spanien und damit höher als bei unverarbeiteten, pflanzlichen Produkten (Abadias et al. 2008; Sant'Anna et al. 2020) (Sant'Anna et al. 2020). Bei frischen pflanzlichen Produkten wurden bei 0,05-0,32 % (unverarbeitete Salate und Gemüse, USA), 0,48 % (Obst, Gemüse, Nüsse, Pilze u.a., Europa), 0,3-1,3 % (Salate, Fresh-Cut, Sprossen, Deutschland), 0,0 % (Salate, Fresh-Cut, Sprossen, Schweiz) der untersuchten Produkte qualitativ *Salmonella* ermittelt (Wijnands et al. 2014; Abadias et al. 2008; Da Silva Felício et al. 2015; Zhang et al. 2018). In der vorliegenden Studie wurde in 1/561 bzw. 0,18 % aller untersuchten Proben *Salmonella* nachgewiesen. Das bestätigt das allgemein niedrige Vorkommen von *Salmonella* in frischen pflanzlichen Produkten. Jedoch wurde in 1/40 bzw. 2,5 % der verzehrfertigen Salate (Fresh-Cut) *Salmonella* detektiert, was eine höhere Prävalenz im Vergleich zu den übrigen Produktgruppen darstellt.

Dies stimmt auch mit aktuellen internationalen Daten überein (BfR 2021). Die Produktgruppe der verzehrfertigen Salate (Fresh-Cut) ist häufiger mit *Salmonella* belastet, als die übrigen Produktgruppen (BfR 2011; EFSA 2021a).

Auch wenn *Salmonella* die häufigsten Erreger bei Ausbrüchen mit frischen pflanzlichen Produkten sind (EFSA 2018), zeigen die großen EHEC Ausbrüche 1999 in Japan (Sprossen), 2007 in den USA (Spinat) und 2011 in Deutschland (Sprossen) das dramatische Potenzial pathogener *E. coli* (Michino et al. 1999; Jay et al. 2007; Mellmann et al. 2011). Diese Ausbrüche betrafen viele Tausend Personen und verursachten neben schweren Erkrankungen und Todesfällen auch hohen ökonomischen Schaden und eine große Verunsicherung in der Bevölkerung. Die von verschiedenen Autoren beschriebenen Prävalenzen von STEC in frischen pflanzlichen Produkten beruhen oft auf unterschiedlichen Methoden, welche sich in früheren Studien einzig auf die Detektion des Serotyps O157:H7 fokussierten. Daher sollten Nachweisraten von pathogenen *E. coli* immer in Bezug zur verwendeten Methode bewertet werden. Grundsätzlich lagen die in der Literatur angegebenen Prävalenzen bei 0,7 bis 7 % in Fresh-Cut Salaten aus Ländern wie Finnland und Spanien (Sant'Anna et al. 2020).

Weitere Autoren haben in 0,05-0,08 % (unverarbeitete Salate und Gemüse, USA), 0 % (Fresh-Cut, Sprossen und Gemüse, Spanien), 0,28 % (Obst, Gemüse, Nüsse, Pilze u.a., Europa), 0-1,1 % (Salate, Fresh-Cut, Sprossen, Deutschland), 0,7 % (Salate, Fresh-Cut, Sprossen, Schweiz) der untersuchten Produkte qualitativ STEC ermittelt (Zhang et al. 2018; Wijnands et al. 2014; Abadias et al. 2008; Da Silva Felício et al. 2015). In der vorliegenden Studie wurde in 3/561 bzw. 0,54 % aller untersuchten Proben STEC nachgewiesen. Das bestätigt das allgemein niedrige Vorkommen von STEC in frischen pflanzlichen Produkten. Jedoch wurde in 1/40 bzw. 2,5 % der verzehrfertigen Salate (Fresh-Cut) STEC nachgewiesen. Dies bestätigt die Untersuchungen anderer Autoren, in welchen die Produktgruppe der verzehrfertigen Salate (Fresh-Cut) häufiger mit STEC belastet waren, als die übrigen Produktgruppen (BfR 2011; EFSA 2021a).

Die in der vorliegenden Studie isolierten STEC Stämme (n=3) gehörten bekannten klonalen Linien an, die von humanmedizinischer Bedeutung sind. O26:H11 ist das häufigste nicht-O157 Serovar, welches hämorrhagische Durchfälle und das Hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) verursachen kann (RKI 2021b; Messens et al. 2015). O146:H28 gehört aktuell ebenfalls zu den am häufigsten isolierten pathogenen STEC Stämmen, der gerade in den letzten Jahren vermehrt zu Infektionen führte (Messens et al. 2015; Fierz et al. 2017; RKI 2021b). In Deutschland wurden in den Jahren 2010 918 Fälle, 2016 1.827 Fälle, 2018 2.227 und 2020 1.371 Fälle von EHEC

gemeldet (RKI 2021b). Von diesen Isolaten wurden nur wenige serologisch typisiert, jedoch zeigt sich im Verhältnis zu O157:H7 eine leicht geringere Abundanz von O26:H11 und ein Anstieg der O146:H28 Isolate im zeitlichen Verlauf der letzten 10 Jahre (Tabelle 44).

**Tabelle 44**

*Nachweise von O157:H7, O26:H11 und O146:H28 bei EHEC Infektionen in Deutschland (Robert Koch-Institut, Abfrage 02.06.2021 (RKI 2021b)).*

	Serologische Nachweise je Meldejahr			
	2010	2016	2018	2020
O157:H7	n=43	n=40	n=48	n=21
O26:H11	n=52	n=28	n=39	n=39
O146:H28	n=12	n=20	n=26	n=10
Kein Serotyp erhoben/ ermittelbar	n=607	n=1506	n=1786	n=1167

Typisch für *E. coli* ist die hohe Anzahl an Plasmiden (Kondratyeva et al. 2020), welche auch in den STEC Stämmen nachgewiesen wurden und die teilweise Virulenzfaktoren codierten.

Die zwei O146 Isolate wurden zu einem ähnlichen Zeitpunkt aus Mischsalat und Möhren isoliert. Sie unterscheiden sich durch 320 SNPs und leicht veränderte Virulenzgen-Ausstattung. Für das Isolat aus Mischsalat (1607PPE14EC) konnte ein ähnliches Human-Isolat aus Großbritannien mit 47 SNPs Unterschied identifiziert werden. Bei SNP-Werten von >5 ist jedoch nicht von einer direkten klonalen Verbindung auszugehen (Saltykova et al. 2018). Für O26:H11 und O146:H28 (1606M07EC) wurde kein ähnliches Isolat (< 50 Allel-Unterschiede im cgMLST) in den öffentlichen Datenbanken gefunden. Wie auch bei *L. monocytogenes* werden bestimmte genetische Linien (MLST) häufiger mit Erkrankungsfällen assoziiert. Die drei STEC Isolate wurden den hypervirulenten Linien ST21 (O26:H11) und ST738 (O146:H28) zugeordnet (Ogura et al. 2017; Fierz et al. 2017; Miko et al. 2009). Allerdings gibt es keinen Hinweis auf einen direkten klonalen Zusammenhang zu humanen Erkrankungsfällen. Es ist damit zu rechnen, dass diese Linien auch in der Umwelt weit verbreitet sind.

Zudem wurde eine unterschiedliche Virulenzgen-Ausstattung der Stämme nachgewiesen. Bis auf die Shigatoxine, die mit schweren Verläufen assoziiert sind, ist eine Aussage zur Infektiosität oder Schwere der Erkrankung anhand der Virulenzgen-Ausstattung bei STEC/EHEC nicht möglich (Denamur et al. 2021). Allerdings zeigte

der isolierte Serotyp O26:H11 Gene für die Typ III Sekretionssystem Effektoren wie *espA/F/J/P*, *nleA/B/C* und Adhäsionsgene *eae*, *tir*, *espB*, die mit einer erhöhten Pathogenität assoziiert sind (Baba et al. 2019). Diese fehlten bei O146:H28, wobei in diesem Isolat die Colicin- und Mikrocingene *cia*, *cib*, *mchB*, *mchC*, *mchF* nachgewiesen wurden. Diese Bacteriocine hemmen konkurrierende Bakterien und bieten einen Vorteil bei der Besiedlung des Darms, werden jedoch nicht als maßgebliche Virulenzfaktoren für EHEC Infektionen betrachtet (Baba et al. 2019). Mit dem Gennachweis von Shigatoxin 2a bzw. 2b ist jedoch mit schwerwiegenden Verläufen im Fall einer Infektion zu rechnen (Melton-Celsa 2014).

Der Eintrag von STEC über Gülle oder Wildtiere auf die Felder ist ebenso wie Kreuzkontaminationen durch den Menschen während Anbau, Ernte und Verarbeitung möglich (Abadias et al. 2008; Mikhail et al. 2018). Für O26:H11 werden Rinder als allgemeines Reservoir angesehen (Hussein 2007). Der Eintrag über Rindergülle bzw. Dung auf die Anbauflächen ist demnach möglich (Fremaux et al. 2008). Allerdings wurde in den letzten Jahren gezeigt, dass O26:H11, wie auch O146:H28 in Fleisch und Fäzes von Wildtieren in Deutschland nachgewiesen wurden, sodass ein Eintrag über diese Lebewesen auf das Feld zunehmend plausibel erscheint (Miko et al. 2009; Plaza-Rodríguez et al. 2020). Auch bei gesunden Menschen wurde O26:H11 im Stuhl als häufigstes Serovar nachgewiesen (Baba et al. 2019), wodurch auch ein Eintrag über den Menschen bei Ernte und Verarbeitung der Produkte möglich ist und was auch die massive Verbreitung dieses Serovars in verschiedenen Reservoiren verdeutlicht (Ogura et al. 2017).

Pflanzliche Produkte wurden in vielen Ausbruchsgeschehen als Überträger für STEC und *Salmonella* identifiziert (Michino et al. 1999; Mellmann et al. 2011; Kozak et al. 2013; Callejón et al. 2015; Da Silva Felício et al. 2015; Buchanan et al. 2017; EFSA 2018; Mikhail et al. 2018). Für beide Spezies sind grundsätzlich geringere Infektionsdosen notwendig, als für *L. monocytogenes*, was auch geringe Kontaminationen mit STEC und *Salmonella* problematisch macht (Pouillot et al. 2016). Der Eintrag von Humanpathogenen, vor allem über die Anbauflächen, ist nicht zu verhindern. Auch die gewissenhafte Sortierung und ein gründlicher Vorputz kann das Risiko eines Eintrags nur senken und nicht eliminieren. Beispielsweise sind innenliegende Blattbereiche von Lollo Bionda für Vorreinigungen unzugänglich. Bei einer Verarbeitung lässt sich die Verteilung von punktuellen Kontaminationen über das Waschwasser auf große Mengen von Fresh-Cut Produkten nicht verhindern. Nur durch chemische (z. B. Chlor, Ozon), physikalische (z. B. Ultrafiltration, UV-B) oder biologische (Bakteriophagen) Wasserbehandlungen könnte die Verteilung von Bakterien weiter reduziert werden. Da chemische Zusätze in Deutschland untersagt

sind und für biologische Zusätze die Rechtslage noch nicht geklärt ist, werden vermehrt physikalische Systeme entwickelt und praxisnah getestet. Dabei dienen komplexe Wasseraufbereitungs- und Abwasserbehandlungsanlagen auch einem nachhaltigen Umgang mit den Ressourcen Wasser, Energie und Rohstoffe (Departement BVU, Abteilung für Umwelt 2017).

Als toxinbildende Bakterien in pflanzlichen Produkten kommen *St. aureus* und *B. cereus* in Betracht. *St. aureus* wurde in nur 2,5 % der Proben und mit Keimzahlen unter 2 log KbE/g gefunden. Die benötigte Keimzahl für eine ausreichende Toxinproduktion bei *St. aureus* wird mit ca. 5 log KbE/g angegeben (Hennekinne et al. 2012; Rajkovic et al. 2020), sodass in den untersuchten Produkten keine relevanten Toxinmengen produziert werden können. Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten *B. cereus* konnten in allen Stämmen Enterotoxine nachgewiesen werden. In der Literatur werden Keimzahlen von 5 log KbE/g beschrieben, um Durchfälle auslösen zu können (Stenfors Arnesen et al. 2008; Granum 2017; Rajkovic et al. 2020). Jedoch zeigen neuere Studien, dass oftmals geringere *B. cereus* s.l. Gehalte (2-3 log KbE/g) in Lebensmitteln nachgewiesen werden, die als Ursache für Lebensmittelausbrüche identifiziert wurden (Denayer et al. 2017; Bonis et al. 2021). Dadurch könnten, neben einer fehlerhaften Lagerung und bei Hygienemängeln, auch die maximal detektierten Keimzahlen zwischen 3-4 log KbE/g bei nur 5,3 % der Proben potentiell zu gesundheitlichen Beschwerden führen. Das für das emetische Toxin kodierende *ces* Gen konnte in keiner der 147 untersuchten Isolate nachgewiesen werden. Eine moderate Belastung von *B. cereus* s.l. stimmte mit anderen Studien überein, welche im Mittelwert 1-2 log KbE/g bei pflanzlichen Frischeprodukten beschreiben, mit seltenen, maximalen Keimzahlen von 3-4 log KbE/g (Fiedler et al. 2017; Berthold-Pluta et al. 2019; Park et al. 2020b). Welchen Anteil die als Biozid eingesetzten *B. thuringiensis* Stämme an den detektierten *B. cereus* s.l. Gehalt auf Gemüse und Salat besitzen, kann allerdings nicht beurteilt werden. Ebenso ist aktuell noch fraglich, ob durch den Einsatz von *B. thuringiensis* eine Gefährdung für den Verbraucher entstehen kann (Bonis et al. 2021).

### 4.3. ESBL-produzierende Enterobakterien

Bei der Untersuchung von 239 Proben (Sprossen, Gurken, Möhren, frische Kräuter, Kopf-, Blatt- und Pflücksalate und verzehrfertige Mischsalate) wurden in 19 Proben ESBL-produzierende Enterobakterien isoliert.

Neben *K. pneumoniae* (n=10), *E. coli* (n=6) und *En. hormaechei* (n=2) wurden *K. oxytoca*, *K. grimontii*, *E. hermannii* und *En. mori* identifiziert (jeweils n=1). *Klebsiella* spp., *Escherichia* spp. und *Enterobacter* spp. gehören zu den häufigsten nosokomialen Infektionserregern beim Menschen (Weiner-Lastinger et al. 2020).

Zwei der drei *Enterobacter* spp. zeigten Mehrfach-Resistenzen gegenüber Cephalosporinen, Fluorchinolonen, Aminoglykosiden, Tetrazyklin, Trimethoprim/Sulfamethoxazol und Chloramphenicol. *En. hormaechei* ST134 wurde als mehrfachresistenter, nosokomialer Infektionserreger beschrieben, ebenso wie SFO-1 tragende *En. hormaechei* (Zhou et al. 2020a). Weltweit kommt es vermehrt zu Infektionen mit mehrfachresistenten *Enterobacter* (u.a. Carbapenem-Resistenz) (Kim und Koo 2018; Annavajhala et al. 2019; Shawa et al. 2021).

Insgesamt konnten sechs unterschiedliche MLST-Typen für *E. coli* und neun unterschiedliche MLST-Typen für *K. pneumoniae* ermittelt werden. Bis auf *E. coli* ST3676 stehen alle MLST-Typen in Verbindung mit humanen Infektionen. So werden für die genetischen *E. coli* Linien ST10 (Pietsch et al. 2017), ST155 (Zhang et al. 2016), ST162 (Coelho et al. 2011), ST410 (Pietsch et al. 2017) und ST977 (Li et al. 2018c) zahlreiche Infektionen und Ausbrüche beschrieben. Vor allem ST10 und ST410 sind bekannte klonalen Linien, die mit pandemischer Ausbreitung weltweit isoliert wurden (Pietsch et al. 2017; Fournier et al. 2021; Feng et al. 2019; Roer et al. 2018). In Deutschland gehören diese MLST-Typen zu den häufigsten ESBL-produzierenden *E. coli* im Ambulanten- und Krankenhausbereich (Pietsch et al. 2017). ST410 konnte auch in Wildvögeln in Deutschland nachgewiesen werden, was einen möglichen Übertragungsweg auf pflanzliche Lebensmittel darstellt (Schaufler et al. 2016). ST 155 ist bei infizierten Menschen und auch häufig in Geflügelbetrieben nachgewiesen worden (Apostolakos et al. 2020; Zhang et al. 2019; Castellanos et al. 2017). Vögel wurden erstaunlich oft als Reservoir für ESBL-produzierende *E. coli* identifiziert. So konnten beispielsweise bei Möwen, Schwänen und Gänsen eine Vielfalt von ESBL-produzierenden *E. coli* nachgewiesen werden, auch ST10, ST155 und ST410 (Hernandez et al. 2013; Schaufler et al. 2016). Die Linie ST10 ist besonders weit verbreitet und zeigt einen hohen horizontalen Gentransfer über Plasmide, was zu besorgniserregenden Resistenzen gegenüber Cephalosporinen, Carbapenemen,

Colistin, Aminoglykosiden und Fluorchinolonen führt (Matamoros et al. 2017). Ein weiteres Reservoir für ST10 konnte bei Schweinen identifiziert werden. Hier wurde diese Linie als häufigster kommensaler *E. coli* isoliert (Johanns et al. 2019; Fournier et al. 2021).

*Klebsiella pneumoniae* werden als bedeutendste Überträger von Antibiotikaresistenzen im Bereich der Enterobakterien angesehen (Navon-Venezia et al. 2017). Über den Austausch von Plasmiden kommt es zur Weitergabe von genetischem Material an andere Gattungen und zu einer Verbreitung von vorteilhaften Resistenzgenen und Resistenzgen-Kombinationen (Carattoli 2013). Navon-Venezia et al. zeigten den Zusammenhang zwischen den Resistenzen gegen Cephalosporine, Aminoglykoside, Fluorchinolone und Carbapeneme und deren horizontalen Gentransfer (Navon-Venezia et al. 2017). Der identifizierte ST14 gehört einer Hochrisiko-Linie an, die weltweit an Infektionen und Ausbrüchen in Krankenhäusern beteiligt, sowie durch Mehrfach-Resistenzen gekennzeichnet ist (Navon-Venezia et al. 2017; Arena et al. 2013). Auch die Linien ST4 (Mansour et al. 2015), ST25 (Li et al. 2019; Li et al. 2016), ST37 (Orsi et al. 2011), ST278 (Lynch et al. 2016), ST391 (Moremi et al. 2018), ST464 (Sands et al. 2021) und ST776 (Zhang et al. 2016) wurden als Ursache für Ausbrüche und Infektionen beim Menschen beschrieben. Auffällig ist, dass viele der identifizierten MLST-Typen bei mehrfachresistenten Isolaten (u.a. Carbapenem und Colistin) gefunden wurden (Feng et al. 2019; Li et al. 2016; Li et al. 2019; Zhou et al. 2020a). Diese klonalen Linien sind demnach weit verbreitet und zeigen einen hohen horizontalen Gentransfer über Plasmide, der zu einer Akquise von Resistenzgenen führt. Alle ESBL-bildenden *Klebsiella* wurden aus Sprossen isoliert. Neben den ESBL-vermittelten Resistenzen konnten bei den meisten Isolaten Mehrfach-Resistenzen gegenüber Ciprofloxacin, Aminoglykosiden, Tetrazyklin und Trimethoprim/Sulfamethoxazol nachgewiesen werden, was häufig für ESBL-bildende Enterobakterien beschrieben wurde und die Therapieoptionen einschränkt (Feng et al. 2019; Navon-Venezia et al. 2017).

In den 22 Isolaten wurde die CTX-M Familie als häufigstes ESBL-Gen nachgewiesen (20/22). Hierbei war die Variante CTX-M-15 bei 16/22 Isolaten detektierbar. Diese Variante wird auch im medizinischen Bereich als häufigster ESBL-Typ in Deutschland nachgewiesen (Brolund 2014; Pietsch et al. 2017). Die ebenfalls gefundene Variante CTX-M-1 (2/22) kommt hingegen häufiger in Nutztierbeständen vor (Schink et al. 2013; Wu et al. 2013). Zwei der 22 Isolate zeigten die CTX-M-14 Variante, welche in Deutschland seltener detektiert wird, aber in Spanien oder vielen asiatischen Ländern

häufig ist (Brolund 2014). Bei zwei *Enterobacter* wurden die ESBL SFO-1 (15E1) und die AmpC beta Laktamase ACT-16 (15E2A) identifiziert. Dieses AmpC Enzym ACT-16 zeigte die phänotypischen Resistenzen von ESBL-Enzymen. Weitere AmpC beta Laktamasen (ACT, OXY, DHA, HERA) wurden zusammen mit den ESBL-Enzymen CTX-M, TEM und SHV nachgewiesen, was eher ungewöhnlich ist, da diese Enzyme ähnliche Substratspektren besitzen. Als weitere Resistenzgene wurden *qnr* und *oqx* (Fluorchinolone), *aac* und *aph* (Aminoglykoside), *tet* (Tetrazykline), *dfr* und *sul* (DHFR) identifiziert. Häufig liegen diese Gene gemeinsam auf einem Plasmid, werden zwischen den Bakterien übertragen und können sich durch mobile Elemente in das Chromosom integrieren (Navon-Venezia et al. 2017).

Die IncFI und IncFII Plasmide sind dabei als überaus erfolgreiche Vektoren zwischen den Gattungen beschrieben (Navon-Venezia et al. 2017). Auch in dieser Studie wurden diese Replikon-Typen am häufigsten gefunden (15/22). Vor allem IncFIB (K) und IncFII (K) traten dabei am häufigsten auf, jedoch nur in *Klebsiella* Spezies, mit der einzigen Ausnahme von IncFIB in einem *E. coli* Isolat. *Klebsiella* spp. sind als „Gen-Vermittler“ für eine Vielzahl von Plasmidtypen geeignet und ermöglichen so den Austausch zwischen verschiedenen Gattungen (Navon-Venezia et al. 2017; Lindblom et al. 2019). In der Literatur wurden eine Vielzahl von CTX-M codierende Plasmide in klinischen Isolaten, Nahrungsmitteln und Umweltproben wie Wasser beschrieben. Die bei *E. coli* und *Klebsiella* spp. identifizierten Plasmide waren häufig IncF (FIA, FIB, FII) und IncI und IncH Replikon-Typen (Zurfluh et al. 2013; Zurfluh et al. 2015a; Blau et al. 2018; Cho et al. 2019; Lindblom et al. 2019; Cha et al. 2020; Caneiras et al. 2019; Kakuta et al. 2020; Smyth et al. 2020).

Hervorzuheben sind die Daten von Freitag et al. (2018), in deren Studie ESBL-bildende *E. coli* aus Milch und Gemüseproben untersucht wurden. Dabei wurden in 9,3 % der Sprossenproben und in 1 % der Salatproben ESBL-bildende *E. coli* nachgewiesen (Freitag et al. 2018). Bei den Isolaten aus Sprossen wurden ebenfalls *E. coli* vom MLST-Typ ST10 und ST410 nachgewiesen (Freitag et al. 2018). Diese Isolate wurden 2011 gewonnen und stammen aus Soja- und Alfalfa Sprossen eines niederländischen Herstellers (Freitag et al. 2018). Der ESBL-bildende *E. coli* ST10 (15E3A) wurde in der vorliegenden Studie aus Mischsalat und der Typ ST410 ebenfalls aus Alfalfa eines niederländischen Herstellers im Jahr 2015 isoliert. Die von Freitag et al. nachgewiesenen Replikonsequenzen IncN (ST10) und IncFIB (ST410) stimmten mit den Nachweisen in der vorliegenden Arbeit überein, jedoch unterscheiden sich die Isolate im Vorkommen der Resistenzgene (z. B. *dfrA14*, *qnrS1*, *strA*, *strB*, *sul2* und *tet(A)*) bei ST410) von Freitag et al.. Allerdings scheinen die Plasmid-Replikon-Typen IncN



für ST10 und IncFIB für ST410 charakteristisch zu sein. Insgesamt besteht eine erstaunliche Ähnlichkeit zu den vier Jahre später aus Sprossen isolierten *E. coli*. Die genomischen Daten der Isolate von Freitag et al. standen allerdings nicht für SNP-Analysen zur Verfügung.

ESBL-bildende Enterobakterien wurden hauptsächlich in Sprossenproben nachgewiesen (17 von 19 positive Proben). Auf welcher Stufe die Kontamination während der Sprossen Produktion stattfand, ist nicht bekannt. Als häufige Ursache wird eine Kontamination der Samen beschrieben (NACMCF 1999; Abadias et al. 2008). Hier kann spekuliert werden, dass aufgrund der Vielzahl von Resistenzgenen und Erreger-Kombinationen eine Kontamination des Saatgutes wahrscheinlicher ist, als dass persistierende ESBL-bildende Enterobakterien ihre Resistenzgene während der Herstellung auf die Mikrobiota übertragen. *Klebsiella* spp. sind auf Sprossen häufig zu finden und das Mikrobiom ist nicht mit der Phyllosphäre anderer pflanzlicher Produkte vergleichbar (Jarvis et al. 2018).

In der Literatur wurden verschiedene ESBL-bildende Enterobakterien (v.a. *E. coli*) in frischen pflanzlichen Produkten nachgewiesen. Zurfluh et al. konnten in 25,4 % der Gemüseproben (importiert aus Dominikanischer Republik, Indien, Thailand und Vietnam) ESBL-Isolate gewinnen und am häufigsten CTX-M-15 nachweisen (Zurfluh et al. 2015b). Freitag et al. (Freitag et al. 2018) beschrieben eine Prävalenz für ESBL *E. coli* von 2,45 %, bei 245 untersuchten Proben (Salat und Sprossen). Hierbei waren 9,3 % der Sprossenproben und 1 % der Salatproben belastet, wobei am häufigsten CTX-M-14/-15 nachgewiesen wurde.

Reuland et al. ermittelten eine Nachweisrate von ESBL-Enterobakterien von 5,9 %, bei 119 untersuchten Proben (Salat, Gemüse und Sprossen) und detektierten CTX-M-15 am häufigsten (Reuland et al. 2014). Van Hoek et al. dokumentieren eine Prävalenz (ESBL-Enterobakterien) von 3,5 %, bei 1.216 untersuchten Salat- und Gemüseproben (van Hoek et al. 2015). Kim et al. (2015) zeigten eine 20%ige Nachweisrate von ESBL-bildenden *E. coli*/*K. pneumoniae* bei Ready-to-eat Sprossen und 1 % bei Fresh-Cut Salaten. Hauptsächlich wurden *K. pneumoniae* (16/19) mit CTX-M-14 isoliert (Kim et al. 2015).

Andere Autoren haben Prävalenzen von 0-12,5 % von ESBL-bildenden Enterobakterien gefunden (Iseppi et al. 2018; Day et al. 2019). Grundsätzlich werden bei pflanzlichen Frischeprodukten in etwa 1 % der Proben ESBL-produzierende *E. coli* bzw. in etwa 2-5 % der Proben ESBL-bildende Enterobakterien nachgewiesen. Hierbei hebt sich die Produktgruppe Sprossen mit Prävalenzen von 10 bis 20 % deutlich ab.

Ein ähnlich hoher Anteil an ESBL-positiven Proben ist häufig bei Fleischprodukten von Geflügel, Rind und Schwein zu finden, welche nicht zum Rohverzehr gedacht sind (Kaesbohrer et al. 2019; EFSA 2021b).

Im genetischen Umfeld der CTX-M-15 Gene wurde im 5'-Bereich die Insertionssequenz *ISEcp1* und im 3'-Bereich die mobilen Elemente *orf477* und die *tnpA* Transposase nachgewiesen. Bei CTX-M-14 wurde im 5'-Bereich die Insertionssequenz *ISEcp1* oder *ISCR1* und im 3'-Bereich die Transposonsequenz *IS903* nachgewiesen. Dieses genetische Umfeld wurde in den letzten Jahren vermehrt bei antibiotikaresistenten Enterobakterien beschrieben (Shawa et al. 2021). Bei ESBL-Genen der CTX-M-1-Gruppe (u.a. CTX-M-1/-15) wurde häufig der *orf477* im 3'-Bereich nach den ESBL-Genen identifiziert, während ESBL-Gene der CTX-M-9-Gruppe (u.a. CTX-M-9/-14) häufig mit Insertionssequenzen vom Typ *IS903* assoziiert waren (Karim et al. 2001; Abbassi et al. 2008; Freitag et al. 2018; Park et al. 2020a; Shawa et al. 2021). Diese Elemente konnten oft in F-Plasmiden nachgewiesen werden und scheinen einen massiven Einfluss auf die chromosomale Integration von Resistenzgenen auszuüben (Irrgang et al. 2017; Cha et al. 2020; Yoon et al. 2020). Ob abiotische Faktoren die Transposonaktivität und dadurch die chromosomale Integration beeinflussen können, ist nicht bekannt. Zusätzlich können Promotorsequenzen durch die Integration übertragen werden, die eine Überexpression von benachbarten Genen auslösen (Kieffer et al. 2020). Da Transposons häufig in chromosomalen Prophagenregionen integrieren, wäre eine dadurch entstehende Überexpression benachbarter Toxingene, wie das Prophagen codierte Shigatoxin, theoretisch möglich. Eine dadurch entstehende Überexpression des Shigatoxins könnte die Virulenz eines STEC deutlich erhöhen.

Circa 4,1- 6,3 % der gesunden Allgemeinbevölkerung in Deutschland sind Träger von ESBL-produzierenden Enterobakterien (Belmar Campos et al. 2014; Köck und Cuny 2020), was ähnlich zu Ländern wie Spanien mit 4-7 % und der Schweiz mit 5,6 % ist (Valenza et al. 2014). Eine direkte Kausalität zwischen Lebensmittelverzehr und humaner ESBL-Besiedlung wurde bisher nicht nachgewiesen und die Darmbesiedlung mit ESBL-Enterobakterien ist bei Vegetariern ähnlich zu omnivoren Konsumenten (Sannes et al. 2008; Königer et al. 2014). Daher ist eine Übertragung durch bestimmte Nahrungsmittel als Hauptursache eher unwahrscheinlich. Reisen in Risikogebiete (z. B. Südostasien) wurden aber als Ursache in verschiedenen Studien bestätigt. Hier führten Reisen in Europa zu einem Anstieg der Besiedlungsrate auf

26 % von ursprünglich 4 % und Reisen nach Indien, Afrika, Asien zu Besiedlungsraten von 46-70 % (Peirano et al. 2011; Idelevich et al. 2016).

Dabei scheint eine Kombination aus Antibiotikaverbrauch der Länder, Kolonisierungsraten der Bevölkerung und allgemeinen Hygienestandards zu einem Risiko der Kontamination mit antibiotikaresistenten Bakterien maßgeblich beizutragen. Sicherlich sind auch Lebensmittel an der Verbreitung beteiligt, mit welchem Anteil kann momentan nicht prognostiziert werden.

Der Einfluss von Risikogebieten betrifft nicht nur Reisende, sondern auch Produkte, die aus diesen Ländern exportiert werden. Diese Verbreitung von Resistenzgenen über globale Warenströme beschleunigt die ohnehin stattfindende Ausbreitung (Valentin et al. 2014; Kawamura et al. 2017; Madec et al. 2017; Yaici et al. 2017; Plaza-Rodríguez et al. 2020). Aufgrund der hohen Bevölkerungsdichte können dabei Menschen als größtes Reservoir für ESBL-produzierende Enterobakterien gelten, da beispielsweise CTX-M-15 nicht nur am häufigsten bei Menschen gefunden wird, sondern mittlerweile auch am häufigsten in der Umwelt nachzuweisen ist (Zurfluh et al. 2013).

#### 4.4. Perspektive der Lebensmittelsicherheit bei frischen pflanzlichen Produkten und Fazit

Frische pflanzliche Produkte sind mikrobiologisch dicht besiedelt, wobei ihr Mikrobiom direkt durch die Umwelt beeinflusst wird. Bei der Produktion von Fresh-Cut Salaten kommt es durch den Waschschrift, neben einer moderaten Reduktion, vor allem zu einer gleichmäßigen Verteilung der Bakterien auf die Produkte. Dies betrifft folglich auch humanpathogene Bakterien. Hier besteht Bedarf an Lösungen, um die bakterielle Verschmutzung im Washwasser effektiv und ressourcenschonend abzutrennen. Die Produktgruppen Fresh-Cut Salate und frische Sprossen waren höher mit Humanpathogenen bzw. ESBL-bildenden Enterobakterien belastet, als andere pflanzliche Frischeprodukte. Dies bestätigt die bisherige Bewertung von Fresh-Cut Salaten und frischen Sprossen als Risikoprodukte für vulnerable Personengruppen (BfR 2011). Der internationale Handel mit einer Vielzahl von pflanzlichen Produkten auf verschiedenen Verarbeitungstufen stellt die Lebensmittelkontrolle vor große Herausforderungen. Nur durch regelmäßige Monitoring-Studien können auffällige Produktgruppen identifiziert und Veränderungen in den Verarbeitungstechniken im aktuellen Kontext bewertet werden.

In dieser Studie wurden insgesamt 34 Humanpathogene und ESBL-bildende Enterobakterien isoliert, wovon 79,4 % (27/34) zu medizinisch-relevanten genetischen Linien gehören. Welchen Anteil Gemüse und Salat bei den auftretenden Infektionen haben, kann nicht abschließend geklärt werden. Vielmehr müssen pflanzliche Produkte vom Feld als „Indikatorprodukte“ angesehen werden, die entsprechend der natürlichen und anthropogenen „Bakterienverschmutzung“ die jeweiligen Bakterien beherbergen, die auch in Böden, Wasser und Wildtieren zu finden sind. Diese Studie zeigte überaus eindrucksvoll die mikrobiologische Verflechtung der einzelnen Umweltkompartimente mit den biotischen und abiotischen Faktoren.

Die durch Menschen und Tiere verbreiteten Bakterien versuchen sich auch in der Umwelt (Böden, Wasser und Pflanzen) zu behaupten. Bestimmte genetische Ausstattungen bieten Vorteile und können sich kompetitiv durchsetzen. Das führt zu pandemisch erfolgreichen genetischen Linien. Das können sowohl Bakterien (*E. coli* MLST ST131/ST410) als auch Plasmide bzw. Gene in mobilen Elementen (CTX-M) sein. In Abhängigkeit von den Umweltbedingungen wie Wetter, Vegetation, Wild-, Nutz- und Haustierhaltung, Gewässer, Landschaftsstruktur und Umweltverschmutzung können sich passende genetische Linien ansiedeln und weiterentwickeln. Der anthropogene Eintrag von Bakterien in die Umwelt, auch über die Nutztierhaltung,

führt zwangsläufig zur Besiedlung von Wildtieren und wiederum werden diese Bakterien auch in pflanzlichen Lebensmitteln gefunden. Eine Begrenzung ist nur durch die Verringerung von bakteriellen Emissionen und chemischen Selektionsstoffen möglich, was etwa durch Abwasser- und Düngerbehandlung, aber auch durch Abluftfilterung und Reduktion von persistenten Chemikalien realisiert werden kann. Hier können nationale Bestrebungen zu Erfolgen führen, wie die Reduktion des Antibiotikaverbrauchs um 60 % innerhalb der letzten 10 Jahre in der Landwirtschaft zeigt. Auf Dauer sind internationale Strategien notwendig, um Ausbreitungsgeschwindigkeit und Prävalenz von Zoonosen und Antibiotikaresistenzen so niedrig wie möglich zu halten.

Die Lebensmittelhygiene bleibt eine Herausforderung im 21. Jahrhundert. Die wissenschaftliche Forschung mit ihren modernen analytischen Methoden ermöglicht erstmals eine kontinuierliche Überwachung von mikrobiologischen Kontaminanten. Durch die Ganzgenomsequenzierung ist eine holistische Surveillance relevanter Bakterien ermöglicht worden, die Infektionserreger aus den verschiedenen Bereichen (Human-, Tiermedizin, Umwelt und Lebensmittel) in Verbindung setzen kann. Diese Dynamiken der Übertragungswege und Reservoirs aufzudecken, ist Ziel von zukünftigen Untersuchungen. Einerseits sollte somit geklärt werden, welchen Anteil die jeweiligen Bereiche (Human-, Tiermedizin, Umwelt und Lebensmittel) an humanen Infektionen haben. Andererseits können dadurch regulatorische Maßnahmen definiert werden, um eine Verbreitung wirkungsvoll zu begrenzen. Momentan werden technische Lösungen für den gemeinsamen Austausch von Genomdaten und deren Analyse sowohl für Antibiotikaresistenzen als auch für humanpathogene Bakterien stetig weiterentwickelt. Es wird dadurch ermöglicht, dass zwischen den verschiedenen Wissenschaftsbereichen ein schnelles und länderübergreifendes Erkennen und Beurteilen von Gesundheitsgefährdungen stattfinden kann. Die Vorteile der Sequenzierung sind dabei eine laborunabhängige Datengenerierung, ein schneller Austausch, die Möglichkeit, weitere Analysen auch Jahre nach Generierung durchführen zu können und ein moderater Kosten- und Zeitaufwand im Verhältnis zu klassischen Differenzierungsmethoden. Mittelfristig werden auch genetische Veränderungen der relevanten Infektionserreger oder neu hervortretende Humanpathogene frühzeitig erkannt und bewertet werden können. Eine vollständige Überwachung der gesamten Produktionskette ist daher erstrebenswert, um die Sicherheit der Verbraucher zu gewährleisten.

## 5. Zusammenfassung

Der mikrobiologische Status und die Veränderungen der Mikrobiota während der Verarbeitungsstufen vom Feld bis in den Handel wurden für frisches Gemüse und Salat untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass in frischem Gemüse und Salat humanpathogene und antibiotikaresistente Bakterien nachweisbar waren, die eine Vielzahl von Antibiotikaresistenzen, Plasmidsequenzen und Virulenzfaktor-Genen, einschließlich Toxin-Genen aufwiesen.

Der allgemeine Status in Form der Gesamtkeimzahl verringerte sich während der Verarbeitung vom Feld bis zum Endprodukt bei Fresh-Cut Salaten nur leicht. Es konnte der Eintrag von Pathogenen über das Feld am Beispiel von *L. monocytogenes* nachgewiesen werden. Die produktspezifische Zusammensetzung der Mikrobiota der Rohprodukte glich sich durch den industriellen Waschschrift der Fresh-Cut Endprodukte an. Während des Waschprozesses konnte im Waschwasser eine stabile Mikrobiota nachgewiesen werden, die mit der Mikrobiota der gewaschenen Endprodukte vergleichbar war. In Fresh-Cut Salaten konnten am häufigsten pathogene Bakterien detektiert werden, was auch für eine Verteilung von pathogenen Bakterien während des Waschens spricht. Hierbei waren 4 von 40 Fresh-Cut Salaten aus dem Handel mit *L. monocytogenes* (n=2), STEC (n=1) und *Salmonella* (n=1) belastet. Auf Handelsebene wurden erhöhte Gesamtkeimzahlen vor allem bei frischen Sprossen festgestellt.

ESBL-bildende *Enterobacter*, *Escherichia* und *Klebsiella* Spezies sind vor allem in frischen Sprossen nachgewiesen worden. Carbapenemresistente Enterobakterien wurden nicht detektiert. Durch die Ganzgenomsequenzierungen war es möglich, die klonalen Linien und genetische Risikofaktoren der isolierten Stämme zu bestimmen. Dabei konnte in den ESBL-Isolaten das CTX-M-15 Gen am häufigsten identifiziert werden. Diese Stämme zeigten häufig Mehrfach-Resistenzen gegenüber Fluorchinolonen, Aminoglykosiden, Tetrazyklinen und Folsäure-Antagonisten. In allen Isolaten konnten Plasmid-Repliksequenzen (z. B. IncFI bei 77 % der Isolate) nachgewiesen werden, was die Bedeutung des horizontalen Gentransfer bei der Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen unterstreicht.

Die geringe Nachweisrate von 2,3 % humanpathogener Bakterien in den 561 untersuchten Proben bestätigt die allgemein sehr hohe Lebensmittelsicherheit in Deutschland. Am häufigsten wurden *L. monocytogenes* (n=9/561) detektiert, gefolgt von STEC (n=3/561) und *Salmonella* (n=1/561). Die nachgewiesenen klonalen Linien und Resistenzgene sind in der Umwelt weit verbreitet und lösen Infektionen aus. Durch den hohen Austausch und Mobilität beschleunigt sich die Evolution und Selektion von

erfolgreichen Genotypen und Plasmiden. Menschen, Tiere, Umwelt und Lebensmittel sind nicht getrennt voneinander, sondern beeinflussen sich stark. Nur ein "one health"-Ansatz kann demnach wirksam sein, um Zoonosen und Antibiotikaresistenzen einzudämmen und damit die Gesundheit der Verbraucher und unsere Lebensgrundlagen zu schützen.

## 6. Literaturverzeichnis

- 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. In: *International journal of food microbiology* 123 (1-2), S. 121–129. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.013.
- Abbassi, Mohamed Salah; Torres, Carmen; Achour, Wafa; Vinué, Laura; Sáenz, Yolanda; Costa, Daniela et al. (2008): Genetic characterisation of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains isolated from stem cell transplant patients in Tunisia. In: *International journal of antimicrobial agents* 32 (4), S. 308–314. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2008.04.009.
- Achtman, Mark; Wain, John; Weill, François-Xavier; Nair, Satheesh; Zhou, Zhemin; Sangal, Vartul et al. (2012): Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. In: *PLoS pathogens* 8 (6), e1002776. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002776.
- Alegbeleye, Oluwadara Oluwaseun; Singleton, Ian; Sant'Ana, Anderson S. (2018): Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. In: *Food Microbiology* 73, S. 177–208. DOI: 10.1016/j.fm.2018.01.003.
- Alikhan, Nabil-Fareed; Zhou, Zhemin; Sergeant, Martin J.; Achtman, Mark (2018): A genomic overview of the population structure of *Salmonella*. In: *PLoS genetics* 14 (4), e1007261. DOI: 10.1371/journal.pgen.1007261.
- Allende, Ana; Selma, Maria V.; López-Gálvez, Francisco; Villaescusa, Raquel; Gil, María I. (2008): Impact of wash water quality on sensory and microbial quality, including *Escherichia coli* cross-contamination, of fresh-cut escarole. In: *Journal of food protection* 71 (12), S. 2514–2518. DOI: 10.4315/0362-028x-71.12.2514.
- Annavajhala, Medini K.; Gomez-Simmonds, Angela; Uhlemann, Anne-Catrin (2019): Multidrug-Resistant *Enterobacter cloacae* Complex Emerging as a Global, Diversifying Threat. In: *Front. Microbiol.* 10, S. 44. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00044.
- Apostolakos, Ilias; Feudi, Claudia; Eichhorn, Inga; Palmieri, Nicola; Fasolato, Luca; Schwarz, Stefan; Piccirillo, Alessandra (2020): High-resolution characterisation of ESBL/pAmpC-producing *Escherichia coli* isolated from the broiler production pyramid. In: *Scientific reports* 10 (1), S. 11123. DOI: 10.1038/s41598-020-68036-9.
- Arena, Fabio; Giani, Tommaso; Becucci, Elisa; Conte, Viola; Zanelli, Giacomo; D'Andrea, Marco Maria et al. (2013): Large oligoclonal outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* ST14 and ST26 producing the FOX-7 AmpC  $\beta$ -lactamase in a neonatal intensive care unit. In: *Journal of clinical microbiology* 51 (12), S. 4067–4072. DOI: 10.1128/JCM.01982-13.
- Baba, Hiroaki; Kanamori, Hajime; Kudo, Hayami; Kuroki, Yasutoshi; Higashi, Seiya; Oka, Kentaro et al. (2019): Genomic analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from patients and asymptomatic food handlers in Japan. In: *PloS one* 14 (11), e0225340. DOI: 10.1371/journal.pone.0225340.
- Bankevich, Anton; Nurk, Sergey; Antipov, Dmitry; Gurevich, Alexey A.; Dvorkin, Mikhail; Kulikov, Alexander S. et al. (2012): SPAdes: a new genome assembly algorithm and its



- applications to single-cell sequencing. In: *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology* 19 (5), S. 455–477. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021.
- Beckers, Bram; Beeck, Michiel op de; Thijs, Sofie; Truyens, Sascha; Weyens, Nele; Boerjan, Wout; Vangronsveld, Jaco (2016): Performance of 16s rDNA Primer Pairs in the Study of Rhizosphere and Endosphere Bacterial Microbiomes in Metabarcoding Studies. In: *Frontiers in microbiology* 7, S. 650. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00650.
- Belmar Campos, Cristina; Fenner, Ines; Wiese, Nicole; Lensing, Carmen; Christner, Martin; Rohde, Holger et al. (2014): Prevalence and genotypes of extended spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* isolated from human stool and chicken meat in Hamburg, Germany. In: *International journal of medical microbiology : IJMM* 304 (5-6), S. 678–684. DOI: 10.1016/j.ijmm.2014.04.012.
- Bengtsson-Palme, Johan; Kristiansson, Erik; Larsson, D. G. Joakim (2018): Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. In: *FEMS microbiology reviews* 42 (1). DOI: 10.1093/femsre/fux053.
- Bennett, S. D.; Sodha, S. V.; Ayers, T. L.; Lynch, M. F.; Gould, L. H.; Tauxe, R. V. (2018): Produce-associated foodborne disease outbreaks, USA, 1998-2013. In: *Epidemiology and infection* 146 (11), S. 1397–1406. DOI: 10.1017/S0950268818001620.
- Berthold-Pluta, Anna; Pluta, Antoni; Garbowska, Monika; Stefańska, Ilona (2019): Prevalence and toxicity characterization of *Bacillus cereus* in food products from Poland. In: *Foods (Basel, Switzerland)* 8 (7). DOI: 10.3390/foods8070269.
- Beuchat, L. R.; Ryu, J. H. (1997): Produce handling and processing practices. In: *Emerging infectious diseases* 3 (4), S. 459–465. DOI: 10.3201/eid0304.970407.
- Beuchat, Larry R. (1996): Pathogenic Microorganisms Associated with Fresh Produce. In: *Journal of food protection* 59 (2), S. 204–216. DOI: 10.4315/0362-028X-59.2.204.
- Beutin, Lothar; Martin, Annett (2012): Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O104:H4 infection in Germany causes a paradigm shift with regard to human pathogenicity of STEC strains. In: *Journal of food protection* 75 (2), S. 408–418. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-11-452.
- Bevan, Edward R.; Jones, Annie M.; Hawkey, Peter M. (2017): Global epidemiology of CTX-M  $\beta$ -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 72 (8), S. 2145–2155. DOI: 10.1093/jac/dkx146.
- BfR (2011): Hohe Keimbelastung in Sprossen und küchenfertigen Salatmischungen. Aktualisierte Stellungnahme Nr. 017/2011 des BfR. Hg. v. Bundesinstitut für Risikobewertung.
- BfR (2021): Listeriose-Erkrankungen nehmen zu - Welche Rolle spielen verzehrfertige Lebensmittel? Stellungnahme Nr. 004/2021 des BfR vom 2. Februar 2021. Unter Mitarbeit von Bundesinstitut für Risikobewertung und Max Rubner-Institut (MRI). Hg. v. Bundesinstitut für Risikobewertung.
- Blackburn, Clive de W. (2006): Food spoilage microorganisms. Boca Raton Fla., Cambridge, England: CRC Press (Woodhead Publishing in food science, technology and nutrition).
- Blau, Khalid; Bettermann, Antje; Jechalke, Sven; Fornefeld, Eva; Vanrobaeys, Yann; Stalder, Thibault et al. (2018): The Transferable Resistome of Produce. In: *mBio* 9 (6). DOI: 10.1128/mBio.01300-18.

- BMEL (2020): Deutschland, wie es isst - Der BMEL-Ernährungsreport 2020. Hg. v. Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft. Online verfügbar unter <https://www.bmel.de/DE/themen/ernaehrung/ernaehrungsreport2020.html>, zuletzt geprüft am 24.07.2021.
- BMEL (2021a): [www.bmel-statistik.de](http://www.bmel-statistik.de) Außenhandelsstatistik: Obst und Gemüse. Hg. v. Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, Statistisches Bundesamt. Online verfügbar unter <https://www.bmel-statistik.de/landwirtschaft/gartenbau/aussenhandel-gartenbauerzeugnisse/obst-und-gemuese/>, zuletzt geprüft am 26.06.2021.
- BMEL (2021b): [www.bmel-statistik.de](http://www.bmel-statistik.de) Marktgemüsebau, Marktobstbau, Blumen und Zierpflanzen, Stauden, Baumschulen. Hg. v. Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, Statistisches Bundesamt. Online verfügbar unter <https://www.bmel-statistik.de/landwirtschaft/gartenbau/produktionsgartenbau/>, zuletzt geprüft am 26.06.2021.
- BMEL (2021c): [www.bmel-statistik.de](http://www.bmel-statistik.de) Versorgungsbilanzen. Hg. v. Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, Statistisches Bundesamt. Online verfügbar unter <https://www.bmel-statistik.de/ernaehrung-fischerei/versorgungsbilanzen/#c8618>, zuletzt geprüft am 24.07.2021.
- Bonis, Mathilde; Felten, Arnaud; Pairaud, Sylvie; Dijoux, Angélie; Maladen, Véronique; Mallet, Ludovic et al. (2021): Comparative phenotypic, genotypic and genomic analyses of *Bacillus thuringiensis* associated with foodborne outbreaks in France. In: *PloS one* 16 (2), e0246885. DOI: 10.1371/journal.pone.0246885.
- Bortolaia, Valeria; Kaas, Rolf S.; Ruppe, Etienne; Roberts, Marilyn C.; Schwarz, Stefan; Cattoir, Vincent et al. (2020): ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 75 (12), S. 3491–3500. DOI: 10.1093/jac/dkaa345.
- Brettin, Thomas; Davis, James J.; Disz, Terry; Edwards, Robert A.; Gerdes, Svetlana; Olsen, Gary J. et al. (2015): RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. In: *Scientific reports* 5, S. 8365. DOI: 10.1038/srep08365.
- Brolund, Alma (2014): Overview of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* from a Nordic perspective. In: *Infection ecology & epidemiology* 4. DOI: 10.3402/iee.v4.24555.
- Buchanan, Robert L.; Gorris, Leon G.M.; Hayman, Melinda M.; Jackson, Timothy C.; Whiting, Richard C. (2017): A review of *Listeria monocytogenes* : An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. In: *Food Control* 75, S. 1–13. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.12.016.
- Bulgarelli, Davide; Schlaeppi, Klaus; Spaepen, Stijn; Ver Loren Themaat, Emiel; Schulze-Lefert, Paul (2013): Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. In: *Annual review of plant biology* 64, S. 807–838. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050312-120106.
- Burris, Kellie P.; Simmons, Otto D.; Webb, Hannah M.; Deese, Lauren M.; Moore, Robin Grant; Jaykus, Lee-Ann et al. (2020): Colonization and Internalization of *Salmonella enterica* and Its Prevalence in Cucumber Plants. In: *Front. Microbiol.* 11, S. 1135. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01135.
- Bush, Karen (2018): Past and Present Perspectives on  $\beta$ -Lactamases. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 62 (10). DOI: 10.1128/AAC.01076-18.

- Bush, Karen; Bradford, Patricia A. (2016):  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors: An Overview. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 6 (8). DOI: 10.1101/cshperspect.a025247.
- Bush, Karen; Jacoby, George A. (2010): Updated functional classification of beta-lactamases. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54 (3), S. 969–976. DOI: 10.1128/AAC.01009-09.
- Bush, Stephen J.; Foster, Dona; Eyre, David W.; Clark, Emily L.; Maio, Nicola de; Shaw, Liam P. et al. (2020): Genomic diversity affects the accuracy of bacterial single-nucleotide polymorphism-calling pipelines. In: *GigaScience* 9 (2). DOI: 10.1093/gigascience/giaa007.
- BZL (2021): Bundesinformationszentrum Landwirtschaft: Pflanzliche Produkte. Hg. v. Bundesanstalt für Landwirtschaft und ernährung (BLE). Online verfügbar unter <https://www.landwirtschaft.de/landwirtschaftliche-produkte/wie-werden-unsere-lebensmittel-erzeugt/pflanzliche-produkte>, zuletzt geprüft am 25.07.2021.
- Cabal, Adriana; Pietzka, Ariane; Huhulescu, Steliana; Allerberger, Franz; Ruppitsch, Werner; Schmid, Daniela (2019): Isolate-Based Surveillance of *Listeria monocytogenes* by Whole Genome Sequencing in Austria. In: *Front. Microbiol.* 10, S. 2282. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02282.
- Callejón, Raquel M.; Rodríguez-Naranjo, M. Isabel; Ubeda, Cristina; Hornedo-Ortega, Ruth; Garcia-Parrilla, M. Carmen; Troncoso, Ana M. (2015): Reported foodborne outbreaks due to fresh produce in the United States and European Union: trends and causes. In: *Foodborne pathogens and disease* 12 (1), S. 32–38. DOI: 10.1089/fpd.2014.1821.
- Caneiras, Cátia; Lito, Luis; Melo-Cristino, José; Duarte, Aida (2019): Community- and Hospital-Acquired *Klebsiella pneumoniae* Urinary Tract Infections in Portugal: Virulence and Antibiotic Resistance. In: *Microorganisms* 7 (5). DOI: 10.3390/microorganisms7050138.
- Cantón, Rafael; Coque, Teresa M. (2006): The CTX-M beta-lactamase pandemic. In: *Current Opinion in Microbiology* 9 (5), S. 466–475. DOI: 10.1016/j.mib.2006.08.011.
- Carattoli, A. (2008): Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. In: *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 14 Suppl 1, S. 117–123. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2007.01851.x.
- Carattoli, Alessandra (2013): Plasmids and the spread of resistance. In: *International journal of medical microbiology : IJMM* 303 (6-7), S. 298–304. DOI: 10.1016/j.ijmm.2013.02.001.
- Carattoli, Alessandra; Zankari, Ea; García-Fernández, Aurora; Voldby Larsen, Mette; Lund, Ole; Villa, Laura et al. (2014): In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 58 (7), S. 3895–3903. DOI: 10.1128/AAC.02412-14.
- Carrasco, E.; Pérez-Rodríguez, F.; Valero, A.; García-Gimeno, R. M.; Zurera, G. (2008): Growth of *Listeria monocytogenes* on shredded, ready-to-eat iceberg lettuce. In: *Food Control* 19 (5), S. 487–494. DOI: 10.1016/j.foodcont.2007.05.014.
- Carstens, Christina K.; Salazar, Joelle K.; Darkoh, Charles (2019): Multistate Outbreaks of Foodborne Illness in the United States Associated With Fresh Produce From 2010 to 2017. In: *Front. Microbiol.* 10, S. 2667. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02667.
- Castellanos, Luis Ricardo; Donado-Godoy, Pilar; León, Maribel; Clavijo, Viviana; Arevalo, Alejandra; Bernal, Johan F. et al. (2017): High Heterogeneity of *Escherichia coli* Sequence Types

- Harbouring ESB/L/AmpC Genes on IncI1 Plasmids in the Colombian Poultry Chain. In: *PloS one* 12 (1), e0170777. DOI: 10.1371/journal.pone.0170777.
- CDC/FDA (2020): Outbreak of *Listeria* infections linked to enoki mushrooms. Online verfügbar unter <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/enoki-mushrooms-03-20/index.html>, zuletzt geprüft am 21.06.2021.
- CDC/FDA (2021): Multistate Outbreaks | Foodborne Outbreaks | Food Safety | CDC. Online verfügbar unter <https://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/multistate-outbreaks/index.html>, zuletzt aktualisiert am 20.07.2021, zuletzt geprüft am 20.07.2021.
- Cha, Min-Hyeok; Ryu, Jae-Gee; Chi, Young-Min; Woo, Gun-Jo (2020): Characterization of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Fresh Produce and Agricultural Environments in Korea. In: *Journal of food protection* 83 (7), S. 1115–1124. DOI: 10.4315/JFP-19-483.
- Chen, Moutong; Chen, Yuetao; Wu, Qingping; Zhang, Jumei; Cheng, Jianheng; Li, Fan et al. (2019): Genetic characteristics and virulence of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh vegetables in China. In: *BMC Microbiol* 19 (1), S. 119. DOI: 10.1186/s12866-019-1488-5.
- Chen, Yi; Luo, Yan; Carleton, Heather; Timme, Ruth; Melka, David; Muruvanda, Tim et al. (2017): Whole Genome and Core Genome Multilocus Sequence Typing and Single Nucleotide Polymorphism Analyses of *Listeria monocytogenes* Isolates Associated with an Outbreak Linked to Cheese, United States, 2013. In: *Applied and environmental microbiology* 83 (15). DOI: 10.1128/AEM.00633-17.
- Cho, Sohyun; Nguyen, Hoang Anh Thi; McDonald, Jacob M.; Woodley, Tiffanie A.; Hiott, Lari M.; Barrett, John B. et al. (2019): Genetic Characterization of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* Isolated from a Mixed-Use Watershed in Northeast Georgia, USA. In: *International journal of environmental research and public health* 16 (19). DOI: 10.3390/ijerph16193761.
- Coelho, Alicia; Mora, Azucena; Mamani, Rosalia; López, Cecilia; González-López, Juan José; Larrosa, María Nieves et al. (2011): Spread of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131 producing CTX-M-15 and SHV-12 with high virulence gene content in Barcelona (Spain). In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 66 (3), S. 517–526. DOI: 10.1093/jac/dkq491.
- Corato, Ugo de (2020): Improving the shelf-life and quality of fresh and minimally-processed fruits and vegetables for a modern food industry: A comprehensive critical review from the traditional technologies into the most promising advancements. In: *Critical reviews in food science and nutrition* 60 (6), S. 940–975. DOI: 10.1080/10408398.2018.1553025.
- Culliney, Paul; Schmalenberger, Achim (2020): Growth Potential of *Listeria monocytogenes* on Refrigerated Spinach and Rocket Leaves in Modified Atmosphere Packaging. In: *Foods (Basel, Switzerland)* 9 (9). DOI: 10.3390/foods9091211.
- Da Silva Felício, M. T.; Hald, T.; Liebana, E.; Allende, A.; Hugas, M.; Nguyen-The, C. et al. (2015): Risk ranking of pathogens in ready-to-eat unprocessed foods of non-animal origin (FoNAO) in the EU: initial evaluation using outbreak data (2007-2011). In: *International journal of food microbiology* 195, S. 9–19. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.005.
- David, Lawrence A.; Maurice, Corinne F.; Carmody, Rachel N.; Gootenberg, David B.; Button, Julie E.; Wolfe, Benjamin E. et al. (2014): Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. In: *Nature* 505 (7484), S. 559–563. DOI: 10.1038/nature12820.

- Davies, Julian; Davies, Dorothy (2010): Origins and evolution of antibiotic resistance. In: *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 74 (3), S. 417–433. DOI: 10.1128/MMBR.00016-10.
- Davis, James J.; Wattam, Alice R.; Aziz, Ramy K.; Brettin, Thomas; Butler, Ralph; Butler, Rory M. et al. (2020): The PATRIC Bioinformatics Resource Center: expanding data and analysis capabilities. In: *Nucleic acids research* 48 (D1), D606–D612. DOI: 10.1093/nar/gkz943.
- Davis, Steve; Pettengill, James B.; Luo, Yan; Payne, Justin; Shpuntoff, Al; Rand, Hugh; Strain, Errol (2015): CFSAN SNP Pipeline: an automated method for constructing SNP matrices from next-generation sequence data. In: *PeerJ Computer Science* 1, e20. DOI: 10.7717/peerj-cs.20.
- Day, Michaela J.; Hopkins, Katie L.; Wareham, David W.; Toleman, Mark A.; Elviss, Nicola; Randall, Luke et al. (2019): Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in human-derived and foodchain-derived samples from England, Wales, and Scotland: an epidemiological surveillance and typing study. In: *The Lancet Infectious Diseases* 19 (12), S. 1325–1335. DOI: 10.1016/S1473-3099(19)30273-7.
- Dees, Merete Wiken; Lysøe, Erik; Nordskog, Berit; Brurberg, May Bente (2015): Bacterial communities associated with surfaces of leafy greens: shift in composition and decrease in richness over time. In: *Applied and environmental microbiology* 81 (4), S. 1530–1539. DOI: 10.1128/AEM.03470-14.
- Denamur, Erick; Clermont, Olivier; Bonacorsi, Stéphane; Gordon, David (2021): The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. In: *Nature reviews. Microbiology* 19 (1), S. 37–54. DOI: 10.1038/s41579-020-0416-x.
- Denayer, Sarah; Delbrassinne, Laurence; Nia, Yacine; Botteldoorn, Nadine (2017): Food-Borne Outbreak Investigation and Molecular Typing: High Diversity of *Staphylococcus aureus* Strains and Importance of Toxin Detection. In: *Toxins* 9 (12). DOI: 10.3390/toxins9120407.
- Denkel, L. A.; Maechler, F.; Schwab, F.; Kola, A.; Weber, A.; Gastmeier, P. et al. (2020): Infections caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacterales* after rectal colonization with ESBL-producing *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae*. In: *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 26 (8), S. 1046–1051. DOI: 10.1016/j.cmi.2019.11.025.
- Departement BVU, Abteilung für Umwelt (2017): Leitfaden: Abwasser aus Gemüse verarbeitenden Betrieben. 1. Auflage. Hg. v. Die Kantone der Schweiz. Umsicht, Agentur für Umwelt und Kommunikation. Aarau. Online verfügbar unter <https://www.fr.ch/de/document/217746>, zuletzt geprüft am 29.07.2021.
- Die Europäische Union (2002): Verordnung (EG) Nr. 178/2002. Online verfügbar unter <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/ALL/?uri=CELEX%3A32002R0178>, zuletzt geprüft am 02.07.2021.
- Doumith, Michel; Buchrieser, Carmen; Glaser, Philippe; Jacquet, Christine; Martin, Paul (2004): Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. In: *Journal of clinical microbiology* 42 (8), S. 3819–3822. DOI: 10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004.
- ECDC/EFSA (2021a): The EFSA Journal 2018-2021. Hg. v. European Centre for Disease Prevention and Control, European Food Safety Authority. Online verfügbar unter <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/journal/18314732>, zuletzt geprüft am 20.07.2021.

- ECDC/EFSA (2021b): European *Listeria* typing exercise (ELiTE). Hg. v. European Centre for Disease Prevention and Control, European Food Safety Authority (EFSA Journal, 2021;19(3):6383).
- EFSA (2015): Risks for public health related to the presence of chlorate in food. In: *EFSA* 13 (6). DOI: 10.2903/j.efsa.2015.4135.
- EFSA (2018): The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. In: *EFSA journal*. 16 (12), e05500. DOI: 10.2903/j.efsa.2018.5500.
- EFSA (2021a): The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. In: *EFSA journal*. 19 (2), e06406. DOI: 10.2903/j.efsa.2021.6406.
- EFSA (2021b): The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019. In: *EFSA Journal* 19 (4), e06490. DOI: 10.2903/j.efsa.2021.6490.
- Egea, P.; López-Cerero, L.; Navarro, M. D.; Rodríguez-Baño, J.; Pascual, A. (2011): Assessment of the presence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in eggshells and ready-to-eat products. In: *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 30 (9), S. 1045–1047. DOI: 10.1007/s10096-011-1168-3.
- Ehling-Schulz, Monika; Guinebretiere, Marie-Hélène; Monthán, Amanda; Berge, Odile; Fricker, Martina; Svensson, Birgitta (2006): Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. In: *FEMS microbiology letters* 260 (2), S. 232–240. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00320.x.
- Elder, Jacob R.; Paul, Narayan C.; Burin, Raquel; Guard, Jean; Shah, Devendra H. (2018): Genomic organization and role of SPI-13 in nutritional fitness of *Salmonella*. In: *International journal of medical microbiology : IJMM* 308 (8), S. 1043–1052. DOI: 10.1016/j.ijmm.2018.10.004.
- Erickson, Marilyn C. (2012): Internalization of fresh produce by foodborne pathogens. In: *Annual review of food science and technology* 3, S. 283–310. DOI: 10.1146/annurev-food-022811-101211.
- Esteban-Cuesta, Irene; Drees, Nathalie; Ulrich, Sebastian; Stauch, Peter; Sperner, Brigitte; Schwaiger, Karin et al. (2018): Endogenous microbial contamination of melons (*Cucumis melo*) from international trade: an underestimated risk for the consumer? In: *Journal of the science of food and agriculture* 98 (13), S. 5074–5081. DOI: 10.1002/jsfa.9045.
- Fàbrega, Anna; Vila, Jordi (2013): *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. In: *Clin Microbiol Rev* 26 (2), S. 308–341. DOI: 10.1128/CMR.00066-12.
- Farber, J. M.; Ross, W. H.; Harwig, J. (1996): Health risk assessment of *Listeria monocytogenes* in Canada. In: *International journal of food microbiology* 30 (1-2), S. 145–156. DOI: 10.1016/0168-1605(96)01107-5.
- Feng, Yu; Liu, Lu; Lin, Ji; Ma, Ke; Long, Haiyan; Wei, Li et al. (2019): Key evolutionary events in the emergence of a globally disseminated, carbapenem resistant clone in the *Escherichia coli* ST410 lineage. In: *Communications biology* 2, S. 322. DOI: 10.1038/s42003-019-0569-1.

- Fiedler, Gregor; Kabisch, Jan; Böhnlein, Christina; Huch, Melanie; Becker, Biserka; Cho, Gyu-Sung; Franz, Charles M. A. P. (2017): Presence of Human Pathogens in Produce from Retail Markets in Northern Germany. In: *Foodborne pathogens and disease* 14 (9), S. 502–509. DOI: 10.1089/fpd.2016.2258.
- Fiedler, Gregor; Kabisch, Jan; Brinks, Erik; Sprotte, Sabrina; Boehnlein, Christina; Franz, Charles M. A. P. (2020): Complete Genome Sequence of a Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O26:H11 Strain (Sequence Type 21) and Two Draft Genome Sequences of *Listeria monocytogenes* Strains (Clonal Complex 1 CC1 and CC59) Isolated from Fresh Produce in Germany. In: *Microbiology resource announcements* 9 (49). DOI: 10.1128/MRA.00973-20.
- Fiedler, Gregor; Schneider, Carmen; Igbinosa, Etinosa O.; Kabisch, Jan; Brinks, Erik; Becker, Biserka et al. (2019): Antibiotics resistance and toxin profiles of *Bacillus cereus*-group isolates from fresh vegetables from German retail markets. In: *BMC Microbiol* 19 (1), S. 250. DOI: 10.1186/s12866-019-1632-2.
- Fierz, Lisa; Cernela, Nicole; Hauser, Elisabeth; Nüesch-Inderbilen, Magdalena; Stephan, Roger (2017): Characteristics of Shigatoxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated during 2010-2014 from Human Infections in Switzerland. In: *Front. Microbiol.* 8, S. 1471. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01471.
- Fournier, Claudine; Nordmann, Patrice; Pittet, Olivier; Poirel, Laurent (2021): Does an Antibiotic Stewardship Applied in a Pig Farm Lead to Low ESBL Prevalence? In: *Antibiotics (Basel, Switzerland)* 10 (5). DOI: 10.3390/antibiotics10050574.
- Freitag, Christin; Michael, G. B.; Li, Jun; Kadlec, Kristina; Wang, Yang; Hassel, Melanie; Schwarz, Stefan (2018): Occurrence and characterisation of ESBL-encoding plasmids among *Escherichia coli* isolates from fresh vegetables. In: *Veterinary microbiology* 219, S. 63–69. DOI: 10.1016/j.vetmic.2018.03.028.
- Fremaux, B.; Prigent-Combaret, C.; Delignette-Muller, M. L.; Mallen, B.; Dothal, M.; Gleizal, A.; Vernozy-Rozand, C. (2008): Persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 in various manure-amended soil types. In: *Journal of applied microbiology* 104 (1), S. 296–304. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03532.x.
- Gao, Xiuzhi; Liu, Yiqian; Chang, Qing; Zhang, Zihao; Guo, Xu; Yi, Xinxin (2018): Microbiological survey of field-grown and retail lettuce in Beijing. In: *J Food Saf* 38 (4), e12479. DOI: 10.1111/jfs.12479.
- Gekenidis, Maria-Theresia; Qi, Weihong; Hummerjohann, Jörg; Zbinden, Reinhard; Walsh, Fiona; Drissner, David (2018): Antibiotic-resistant indicator bacteria in irrigation water: High prevalence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli*. In: *PloS one* 13 (11), e0207857. DOI: 10.1371/journal.pone.0207857.
- Gekenidis, Maria-Theresia; Rigotti, Serena; Hummerjohann, Jörg; Walsh, Fiona; Drissner, David (2020): Long-Term Persistence of blaCTX-M-15 in Soil and Lettuce after Introducing Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* via Manure or Water. In: *Microorganisms* 8 (11). DOI: 10.3390/microorganisms8111646.
- Gelbíčová, Tereza; Florianová, Martina; Tomáštková, Zuzana; Pospíšilová, Lucie; Koláčková, Ivana; Karpíšková, Renáta (2019): Prediction of Persistence of *Listeria monocytogenes* ST451 in a Rabbit Meat Processing Plant in the Czech Republic. In: *Journal of food protection* 82 (8), S. 1350–1356. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-19-030.

- Glaize, Ayanna; Young, Morgan; Harden, Lyndy; Gutierrez-Rodriguez, Eduardo; Thakur, Siddhartha (2021): The effect of vegetation barriers at reducing the transmission of *Salmonella* and *Escherichia coli* from animal operations to fresh produce. In: *International journal of food microbiology* 347, S. 109196. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109196.
- Goodburn, Caroline; Wallace, Carol A. (2013): The microbiological efficacy of decontamination methodologies for fresh produce: A review. In: *Food Control* 32 (2), S. 418–427. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.12.012.
- Gose, Maria; Krems, Carolin; Heuer, Thorsten; Hoffmann, Ingrid (2016): Trends in food consumption and nutrient intake in Germany between 2006 and 2012: results of the German National Nutrition Monitoring (NEMONIT). In: *The British journal of nutrition* 115 (8), S. 1498–1507. DOI: 10.1017/S0007114516000544.
- Granum, Per Einar (2017): Spotlight on *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. In: *FEMS microbiology letters* 364 (10). DOI: 10.1093/femsle/fnx071.
- Gu, Ganyu; Ottesen, Andrea; Bolten, Samantha; Luo, Yaguang; Rideout, Steven; Nou, Xiangwu (2020a): Microbiome convergence following sanitizer treatment and identification of sanitizer resistant species from spinach and lettuce rinse water. In: *International journal of food microbiology* 318, S. 108458. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108458.
- Gu, Ganyu; Strawn, Laura K.; Ottesen, Andrea R.; Ramachandran, Padmini; Reed, Elizabeth A.; Zheng, Jie et al. (2020b): Correlation of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in Irrigation Water to Environmental Factors, Fecal Indicators, and Bacterial Communities. In: *Front. Microbiol.* 11, S. 557289. DOI: 10.3389/fmicb.2020.557289.
- Guenther, Sebastian; Ewers, Christa; Wieler, Lothar H. (2011): Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *E. coli* in Wildlife, yet Another Form of Environmental Pollution? In: *Front. Microbiol.* 2, S. 246. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00246.
- Gurtler, Joshua B.; Harlee, Nia A.; Smelser, Amanda M.; Schneider, Keith R. (2018): *Salmonella enterica* Contamination of Market Fresh Tomatoes: A Review. In: *Journal of food protection* 81 (7), S. 1193–1213. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-17-395.
- Hächler, Herbert; Stephan, Roger; Nüesch-Inderbinen, Magdalena T. (2017): Antibiotika-resistente Bakterien. Grundlagen und lebensmittelhygienische Bedeutung. 1. Auflage. Hamburg: Behr's Verlag (Lebensmittelasoziierte Mikroorganismen).
- Hägele, Florian; Nübling, Simone; Schweiggert, Ralf M.; Nolte, Lena; Weiss, Agnes; Schmidt, Herbert; Carle, Reinhold (2016): Comparison of ultra-high-pressure water jet and conventional rotating blade cutting for the production of fresh-cut iceberg (*Lactuca sativa* L.) and endive (*Cichorium endivia* L.). In: *Eur Food Res Technol* 242 (12), S. 2071–2081. DOI: 10.1007/s00217-016-2704-2.
- Halbedel, Sven; Prager, Rita; Fuchs, Stephan; Trost, Eva; Werner, Guido; Flieger, Antje (2018): Whole-Genome Sequencing of Recent *Listeria monocytogenes* Isolates from Germany Reveals Population Structure and Disease Clusters. In: *Journal of clinical microbiology* 56 (6). DOI: 10.1128/JCM.00119-18.
- Hanski, Ilkka; Herten, Leena von; Fyhrquist, Nanna; Koskinen, Kaisa; Torppa, Kaisa; Laatikainen, Tiina et al. (2012): Environmental biodiversity, human microbiota, and allergy are



- interrelated. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (21), S. 8334–8339. DOI: 10.1073/pnas.1205624109.
- Harrand, Anna Sophia; Jagadeesan, Balamurugan; Baert, Leen; Wiedmann, Martin; Orsi, Renato H. (2020): Evolution of *Listeria monocytogenes* in a Food Processing Plant Involves Limited Single-Nucleotide Substitutions but Considerable Diversification by Gain and Loss of Prophages. In: *Applied and environmental microbiology* 86 (6). DOI: 10.1128/AEM.02493-19.
- Harris, L. J.; Farber, J. N.; Beuchat, L. R.; Parish, M. E.; Suslow, T. V.; Garrett, E. H.; Busta, F. F. (2003): Outbreaks Associated with Fresh Produce: Incidence, Growth, and Survival of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce. In: *Comp Rev Food Sci Food Safety* 2 (s1), S. 78–141. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2003.tb00031.x.
- Hartmann, Alain; Locatelli, Aude; Amoureux, Lucie; Depret, Géraldine; Jolivet, Claudy; Gueneau, Eric; Neuwirth, Catherine (2012): Occurrence of CTX-M Producing *Escherichia coli* in Soils, Cattle, and Farm Environment in France (Burgundy Region). In: *Front. Microbiol.* 3, S. 83. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00083.
- Hennekinne, Jacques-Antoine; Buysier, Marie-Laure de; Dragacci, Sylviane (2012): *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. In: *FEMS microbiology reviews* 36 (4), S. 815–836. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x.
- Hernandez, Jorge; Johansson, Anders; Stedt, Johan; Bengtsson, Stina; Porczak, Aleksandra; Granholm, Susanne et al. (2013): Characterization and comparison of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) resistance genotypes and population structure of *Escherichia coli* isolated from Franklin's gulls (*Leucophaeus pipixcan*) and humans in Chile. In: *PloS one* 8 (9), e76150. DOI: 10.1371/journal.pone.0076150.
- Heuer, Holger; Schmitt, Heike; Smalla, Kornelia (2011): Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. In: *Current Opinion in Microbiology* 14 (3), S. 236–243. DOI: 10.1016/j.mib.2011.04.009.
- Hoffmann, Sandra; Batz, Michael B.; Morris, J. Glenn (2012): Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. In: *Journal of food protection* 75 (7), S. 1292–1302. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-11-417.
- Holvoet, Kevin; Jacxsens, Liesbeth; Sampers, Imca; Uyttendaele, Mieke (2012): Insight into the prevalence and distribution of microbial contamination to evaluate water management in the fresh produce processing industry. In: *Journal of food protection* 75 (4), S. 671–681. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-11-175.
- Hortipendium: Das grüne Lexikon -Hortipendium-. Unter Mitarbeit von DLR Rheinpfalz. Hg. v. BMEL. Online verfügbar unter [https://www.hortipendium.de/Willkommen\\_bei\\_Hortipendium](https://www.hortipendium.de/Willkommen_bei_Hortipendium), zuletzt geprüft am 25.07.2021.
- Hussein, H. S. (2007): Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. In: *Journal of animal science* 85 (13 Suppl), E63-72. DOI: 10.2527/jas.2006-421.
- Idelevich, Evgeny A.; Lanckohr, Christian; Horn, Dagmar; Wieler, Lothar H.; Becker, Karsten; Köck, Robin (2016): Antibiotika-resistente Erreger in Deutschland. Die Rolle von nicht

- nosokomialen Ansteckungsquellen. In: *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 59 (1), S. 113–123. DOI: 10.1007/s00103-015-2261-z.
- Irrgang, Alexandra; Falgenhauer, Linda; Fischer, Jennie; Ghosh, Hiren; Guiral, Elisabet; Guerra, Beatriz et al. (2017): CTX-M-15-Producing *E. coli* Isolates from Food Products in Germany Are Mainly Associated with an IncF-Type Plasmid and Belong to Two Predominant Clonal *E. coli* Lineages. In: *Front. Microbiol.* 8, S. 2318. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02318.
- Iseppi, Ramona; Niederhäusern, Simona de; Bondi, Moreno; Messi, Patrizia; Sabia, Carla (2018): Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase, AmpC, and MBL-Producing Gram-Negative Bacteria on Fresh Vegetables and Ready-to-Eat Salads Sold in Local Markets. In: *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)* 24 (8), S. 1156–1164. DOI: 10.1089/mdr.2017.0198.
- Islam, Mahbub; Morgan, Jennie; Doyle, Michael P.; Phatak, Sharad C.; Millner, Patricia; Jiang, Xiuping (2004): Fate of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on carrots and radishes grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. In: *Applied and environmental microbiology* 70 (4), S. 2497–2502. DOI: 10.1128/AEM.70.4.2497-2502.2004.
- Ito, Kenitiro; Iida, Mariko; Yamazaki, Mitsugu; Moriya, Kazuo; Moroishi, Sanae; Yatsuyanagi, Jun et al. (2007): Intimin types determined by heteroduplex mobility assay of intimin gene (eae)-positive *Escherichia coli* strains. In: *Journal of clinical microbiology* 45 (3), S. 1038–1041. DOI: 10.1128/JCM.01103-06.
- Jarvis, Karen G.; Daquigan, Ninalynn; White, James R.; Morin, Paul M.; Howard, Laura M.; Manetas, Julia E. et al. (2018): Microbiomes Associated With Foods From Plant and Animal Sources. In: *Front. Microbiol.* 9, S. 2540. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02540.
- Jay, Michele T.; Cooley, Michael; Carychao, Diana; Wiscomb, Gerald W.; Sweitzer, Richard A.; Crawford-Miksza, Leta et al. (2007): *Escherichia coli* O157:H7 in feral swine near spinach fields and cattle, central California coast. In: *Emerging infectious diseases* 13 (12), S. 1908–1911. DOI: 10.3201/eid1312.070763.
- Johanns, Vanessa C.; Ghazisaeedi, Fereshteh; Epping, Lennard; Semmler, Torsten; Lübke-Becker, Antina; Pfeifer, Yvonne et al. (2019): Effects of a Four-Week High-Dosage Zinc Oxide Supplemented Diet on Commensal *Escherichia coli* of Weaned Pigs. In: *Front. Microbiol.* 10, S. 2734. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02734.
- Johansson, Jörgen; Freitag, Nancy E. (2019): Regulation of *Listeria monocytogenes* Virulence. In: *Microbiol Spectr* 7 (4). DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0064-2019.
- Jung, Yangjin; Jang, Hyein; Matthews, Karl R. (2014): Effect of the food production chain from farm practices to vegetable processing on outbreak incidence. In: *Microbial biotechnology* 7 (6), S. 517–527. DOI: 10.1111/1751-7915.12178.
- Kaas, Rolf S.; Leekitcharoenphon, Pimlapas; Aarestrup, Frank M.; Lund, Ole (2014): Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. In: *PloS one* 9 (8), e104984. DOI: 10.1371/journal.pone.0104984.
- Kaesbohrer, Annemarie; Bakran-Lebl, Karin; Irrgang, Alexandra; Fischer, Jennie; Kämpf, Peter; Schiffmann, Arthur et al. (2019): Diversity in prevalence and characteristics of ESBL/pAmpC producing *E. coli* in food in Germany. In: *Veterinary microbiology* 233, S. 52–60. DOI: 10.1016/j.vetmic.2019.03.025.

- Kakuta, Naoki; Nakano, Ryuichi; Nakano, Akiyo; Suzuki, Yuki; Masui, Takashi; Horiuchi, Saori et al. (2020): Molecular characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Japan: Predominance of CTX-M-15 and emergence of hypervirulent clones. In: *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* 98, S. 281–286. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.06.083.
- Karch, Helge; Denamur, Erick; Dobrindt, Ulrich; Finlay, B. Brett; Hengge, Regine; Johannes, Ludgers et al. (2012): The enemy within us: lessons from the 2011 European *Escherichia coli* O104:H4 outbreak. In: *EMBO molecular medicine* 4 (9), S. 841–848. DOI: 10.1002/emmm.201201662.
- Karim, A.; Poirel, L.; Nagarajan, S.; Nordmann, P. (2001): Plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence *ISEcp1*. In: *FEMS microbiology letters* 201 (2), S. 237–241. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10762.x.
- Kawamura, Kumiko; Nagano, Noriyuki; Suzuki, Masahiro; Wachino, Jun-Ichi; Kimura, Kouji; Arakawa, Yoshichika (2017): ESBL-producing *Escherichia coli* and Its Rapid Rise among Healthy People. In: *Food safety (Tokyo, Japan)* 5 (4), S. 122–150. DOI: 10.14252/foodsafetyfscj.2017011.
- Kearse, Matthew; Moir, Richard; Wilson, Amy; Stones-Havas, Steven; Cheung, Matthew; Sturrock, Shane et al. (2012): Geneious Basic. An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 28 (12), S. 1647–1649. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts199.
- Keefer, Andrea B.; Xiaoli, Lingzi; M'ikanatha, Nkuchia M.; Yao, Kuan; Hoffmann, Maria; Dudley, Edward G. (2019): Retrospective whole-genome sequencing analysis distinguished PFGE and drug-resistance-matched retail meat and clinical *Salmonella* isolates. In: *Microbiology (Reading, England)* 165 (3), S. 270–286. DOI: 10.1099/mic.0.000768.
- Kieffer, Nicolas; Poirel, Laurent; Mueller, Linda; Mancini, Stefano; Nordmann, Patrice (2020): *ISEcp1*-Mediated Transposition Leads to Fosfomycin and Broad-Spectrum Cephalosporin Resistance in *Klebsiella pneumoniae*. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 64 (5). DOI: 10.1128/AAC.00150-20.
- Kim, Hong-Seok; Chon, Jung-Whan; Kim, Young-Ji; Kim, Dong-Hyeon; Kim, Mu-sang; Seo, Kun-Ho (2015): Prevalence and characterization of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in ready-to-eat vegetables. In: *International journal of food microbiology* 207, S. 83–86. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.049.
- Kim, Jae-Jung; Koo, Sun Hoe (2018): Biological and Genetic Characteristics of Clinically Isolated *Enterobacter cloacae* with Multidrug Resistance. In: *Lab Med Online* 8 (3), S. 99. DOI: 10.3343/lmo.2018.8.3.99.
- Kimkes, Tom E. P.; Heinemann, Matthias (2020): How bacteria recognise and respond to surface contact. In: *FEMS microbiology reviews* 44 (1), S. 106–122. DOI: 10.1093/femsre/fuz029.
- Köck, R.; Cuny, C. (2020): Multiresistente Erreger bei Tier und Mensch. In: *Medizinische Klinik, Intensivmedizin und Notfallmedizin* 115 (3), S. 189–197. DOI: 10.1007/s00063-018-0487-x.
- Köck, R.; Daniels-Haardt, I.; Becker, K.; Mellmann, A.; Friedrich, A. W.; Mevius, D. et al. (2018): Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in wildlife, food-producing, and companion animals:

- a systematic review. In: *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 24 (12), S. 1241–1250. DOI: 10.1016/j.cmi.2018.04.004.
- Kokkinakis, Emmanuel; Boskou, Georgios; Fragkiadakis, Georgios A.; Kokkinaki, Aikaterini (2008): Changes in vegetable microbiological quality introduced by processing methods. In: *International Journal of Food Science & Technology* 43 (4), S. 603–609. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2006.01494.x.
- Kondratyeva, Kira; Salmon-Divon, Mali; Navon-Venezia, Shiri (2020): Meta-analysis of Pandemic *Escherichia coli* ST131 Plasmidome Proves Restricted Plasmid-clade Associations. In: *Scientific reports* 10 (1), S. 36. DOI: 10.1038/s41598-019-56763-7.
- Königer, Dagmar; Gastmeier, Petra; Kola, Axel; Schwab, Frank; Meyer, Elisabeth (2014): Vegetarians are not less colonized with extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing bacteria than meat eaters. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 69 (1), S. 281–282. DOI: 10.1093/jac/dkt335.
- Köper, Lydia M.; Bode, Christoph; Bender, Alice; Reimer, Inke; Heberer, Thomas; Wallmann, Jürgen (2020): Eight years of sales surveillance of antimicrobials for veterinary use in Germany-What are the perceptions? In: *PloS one* 15 (8), e0237459. DOI: 10.1371/journal.pone.0237459.
- Korir, Robert Cheruiyot; Parveen, Salina; Hashem, Fawzy; Bowers, John (2016): Microbiological quality of fresh produce obtained from retail stores on the Eastern Shore of Maryland, United States of America. In: *Food Microbiology* 56, S. 29–34. DOI: 10.1016/j.fm.2015.12.003.
- Koukkidis, Giannis; Haigh, Richard; Allcock, Natalie; Jordan, Suzanne; Freestone, Primrose (2017): Salad Leaf Juices Enhance *Salmonella* Growth, Colonization of Fresh Produce, and Virulence. In: *Applied and environmental microbiology* 83 (1). DOI: 10.1128/AEM.02416-16.
- Kozak, G. K.; MacDonald, D.; Landry, L.; Farber, J. M. (2013): Foodborne outbreaks in Canada linked to produce: 2001 through 2009. In: *Journal of food protection* 76 (1), S. 173–183. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-12-126.
- Lagkouvardos, Ilias; Fischer, Sandra; Kumar, Neeraj; Clavel, Thomas (2017): Rhea. A transparent and modular R pipeline for microbial profiling based on 16S rRNA gene amplicons. In: *PeerJ* 5, e2836. DOI: 10.7717/peerj.2836.
- Lagkouvardos, Ilias; Joseph, Divya; Kapfhammer, Martin; Girtli, Sabahattin; Horn, Matthias; Haller, Dirk; Clavel, Thomas (2016): IMNGS. A comprehensive open resource of processed 16S rRNA microbial profiles for ecology and diversity studies. In: *Scientific reports* 6, S. 33721. DOI: 10.1038/srep33721.
- Larsen, Mette V.; Cosentino, Salvatore; Rasmussen, Simon; Friis, Carsten; Hasman, Henrik; Marvig, Rasmus Lykke et al. (2012): Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. In: *Journal of clinical microbiology* 50 (4), S. 1355–1361. DOI: 10.1128/JCM.06094-11.
- Leong, Dara; NicAogáin, Kerrie; Luque-Sastre, Laura; McManamon, Oisín; Hunt, Karen; Alvarez-Ordóñez, Avelino et al. (2017): A 3-year multi-food study of the presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in 54 small food businesses in Ireland. In: *International journal of food microbiology* 249, S. 18–26. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.015.

- Li, Aiqing; Yang, Yong; Miao, Minhui; Chavda, Kalyan D.; Mediavilla, José R.; Xie, Xiaofang et al. (2016): Complete Sequences of mcr-1-Harboring Plasmids from Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase- and Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 60 (7), S. 4351–4354. DOI: 10.1128/AAC.00550-16.
- Li, Huiying; Li, Xiaomin; Lv, Runxia; Jiang, Xiaolong; Cao, Hengchun; Du, Yuhui et al. (2018a): Global regulatory function of the low oxygen-induced transcriptional regulator LoiA in *Salmonella* Typhimurium revealed by RNA sequencing. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 503 (3), S. 2022–2027. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.07.151.
- Li, Jun; Huang, Zi-Yan; Yu, Ting; Tao, Xiao-Yan; Hu, Yong-Mei; Wang, Hai-Chen; Zou, Ming-Xiang (2019): Isolation and characterization of a sequence type 25 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from the mid-south region of China. In: *BMC Microbiol* 19 (1), S. 219. DOI: 10.1186/s12866-019-1593-5.
- Li, Weiwei; Bai, Li; Fu, Ping; Han, Hailong; Liu, Jikai; Guo, Yunchang (2018b): The Epidemiology of *Listeria monocytogenes* in China. In: *Foodborne pathogens and disease* 15 (8), S. 459–466. DOI: 10.1089/fpd.2017.2409.
- Li, Xi; Sun, Long; Zhu, Yongze; Shen, Mengyuan; Tu, Yuexing (2018c): Draft genome sequence of *Escherichia coli* ST977: A clinical multidrug-resistant strain harbouring blaNDM-3 isolated from a bloodstream infection. In: *Journal of global antimicrobial resistance* 13, S. 121–122. DOI: 10.1016/j.jgar.2018.04.005.
- Li, Y.; Brackett, R. E.; Shewfelt, R. L.; Beuchat, L. R. (2001): Changes in appearance and natural microflora on iceberg lettuce treated in warm, chlorinated water and then stored at refrigeration temperature. In: *Food Microbiology* 18 (3), S. 299–308. DOI: 10.1006/fmic.2001.0401.
- Li, Zhen; Pérez-Osorio, Ailyn; Wang, Yu; Eckmann, Kaye; Glover, William A.; Allard, Marc W. et al. (2017): Whole genome sequencing analyses of *Listeria monocytogenes* that persisted in a milkshake machine for a year and caused illnesses in Washington State. In: *BMC Microbiol* 17 (1), S. 134. DOI: 10.1186/s12866-017-1043-1.
- Lindblom, Anna; Kk, Sriram; Müller, Vilhelm; Öz, Robin; Sandström, Hilda; Åhrén, Christina et al. (2019): Interspecies plasmid transfer appears rare in sequential infections with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae*. In: *Diagnostic microbiology and infectious disease* 93 (4), S. 380–385. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.10.014.
- Linke, Kristina; Ruckerl, Irene; Brugger, Katharina; Karpiskova, Renata; Walland, Julia; Muri-Klinger, Sonja et al. (2014): Reservoirs of *listeria* species in three environmental ecosystems. In: *Applied and environmental microbiology* 80 (18), S. 5583–5592. DOI: 10.1128/AEM.01018-14.
- Liu, Yang; Lai, Qiliang; Göker, Markus; Meier-Kolthoff, Jan P.; Wang, Meng; Sun, Yamin et al. (2015): Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. In: *Scientific reports* 5, S. 14082. DOI: 10.1038/srep14082.
- López-Gálvez, Francisco; Allende, Ana; Gil, Maria I. (2021): Recent progress on the management of the industrial washing of fresh produce with a focus on microbiological risks. In: *Current Opinion in Food Science* 38, S. 46–51. DOI: 10.1016/j.cofs.2020.10.026.
- Lübbert, Christoph; Straube, Laurentia; Stein, Claudia; Makarewicz, Oliwia; Schubert, Stefan; Mössner, Joachim et al. (2015): Colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in international travelers

- returning to Germany. In: *International journal of medical microbiology : IJMM* 305 (1), S. 148–156. DOI: 10.1016/j.ijmm.2014.12.001.
- Luchansky, John B.; Chen, Yuhuan; Porto-Fett, Anna C. S.; Pouillot, Régis; Shoyer, Bradley A.; Johnson-DeRycke, Rachel et al. (2017): Survey for *Listeria monocytogenes* in and on Ready-to-Eat Foods from Retail Establishments in the United States (2010 through 2013): Assessing Potential Changes of Pathogen Prevalence and Levels in a Decade. In: *Journal of food protection* 80 (6), S. 903–921. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-16-420.
- Lynch, Tarah; Chen, Liang; Peirano, Gisele; Gregson, Dan B.; Church, Deirdre L.; Conly, John et al. (2016): Molecular Evolution of a *Klebsiella pneumoniae* ST278 Isolate Harboring blaNDM-7 and Involved in Nosocomial Transmission. In: *The Journal of infectious diseases* 214 (5), S. 798–806. DOI: 10.1093/infdis/jiw240.
- Madec, J-Y; Haenni, M.; Nordmann, P.; Poirel, L. (2017): Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase/AmpC- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in animals: a threat for humans? In: *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 23 (11), S. 826–833. DOI: 10.1016/j.cmi.2017.01.013.
- Maffei, Daniele F.; Batalha, Erika Y.; Landgraf, Mariza; Schaffner, Donald W.; Franco, Bernadette D. G. M. (2016): Microbiology of organic and conventionally grown fresh produce. In: *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]* 47 Suppl 1, S. 99–105. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.10.006.
- Maiden, M. C.; Bygraves, J. A.; Feil, E.; Morelli, G.; Russell, J. E.; Urwin, R. et al. (1998): Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (6), S. 3140–3145. DOI: 10.1073/pnas.95.6.3140.
- Malberg Tetzschner, Anna Maria; Johnson, James R.; Johnston, Brian D.; Lund, Ole; Scheutz, Flemming (2020): In Silico Genotyping of *Escherichia coli* Isolates for Extraintestinal Virulence Genes by Use of Whole-Genome Sequencing Data. In: *Journal of clinical microbiology* 58 (10). DOI: 10.1128/JCM.01269-20.
- Mansour, Wejdene; Grami, Raoudha; Ben Haj Khalifa, Anis; Dahmen, Safia; Châtre, Pierre; Haenni, Marisa et al. (2015): Dissemination of multidrug-resistant blaCTX-M-15/IncFIIk plasmids in *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospital- and community-acquired human infections in Tunisia. In: *Diagnostic microbiology and infectious disease* 83 (3), S. 298–304. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.07.023.
- Matamoros, Sébastien; van Hattem, Jarne M.; Arcilla, Maris S.; Willemse, Niels; Melles, Damian C.; Penders, John et al. (2017): Global phylogenetic analysis of *Escherichia coli* and plasmids carrying the *mcr-1* gene indicates bacterial diversity but plasmid restriction. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 15364. DOI: 10.1038/s41598-017-15539-7.
- Meier-Kolthoff, Jan P.; Auch, Alexander F.; Klenk, Hans-Peter; Göker, Markus (2013): Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. In: *BMC bioinformatics* 14, S. 60. DOI: 10.1186/1471-2105-14-60.
- Meier-Kolthoff, Jan P.; Göker, Markus (2019): TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. In: *Nature communications* 10 (1), S. 2182. DOI: 10.1038/s41467-019-10210-3.

- Mellmann, Alexander; Harmsen, Dag; Cummings, Craig A.; Zentz, Emily B.; Leopold, Shana R.; Rico, Alain et al. (2011): Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. In: *PLoS one* 6 (7), e22751. DOI: 10.1371/journal.pone.0022751.
- Melton-Celsa, Angela R. (2014): Shiga Toxin (*Stx*) Classification, Structure, and Function. In: *Microbiology spectrum* 2 (4), EHEC-0024-2013. DOI: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013.
- Messens, W.; Bolton, D.; Frankel, G.; Liebana, E.; McLauchlin, J.; Morabito, S. et al. (2015): Defining pathogenic verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) from cases of human infection in the European Union, 2007-2010. In: *Epidemiology and infection* 143 (8), S. 1652–1661. DOI: 10.1017/S095026881400137X.
- Michino, H.; Araki, K.; Minami, S.; Takaya, S.; Sakai, N.; Miyazaki, M. et al. (1999): Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. In: *Am J Epidemiol* 150 (8), S. 787–796. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a010082.
- Mikhail, A. F. W.; Jenkins, C.; Dallman, T. J.; Inns, T.; Douglas, A.; Martín, A. I. C. et al. (2018): An outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 associated with contaminated salad leaves: epidemiological, genomic and food trace back investigations. In: *Epidemiology and infection* 146 (2), S. 187–196. DOI: 10.1017/S0950268817002874.
- Miko, Angelika; Pries, Karin; Haby, Sabine; Steege, Katja; Albrecht, Nadine; Krause, Gladys; Beutin, Lothar (2009): Assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from wildlife meat as potential pathogens for humans. In: *Applied and environmental microbiology* 75 (20), S. 6462–6470. DOI: 10.1128/AEM.00904-09.
- Moremi, N.; Claus, H.; Rutta, L.; Frosch, M.; Vogel, U.; Mshana, S. E. (2018): High carriage rate of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* among patients admitted for surgery in Tanzanian hospitals with a low rate of endogenous surgical site infections. In: *The Journal of hospital infection* 100 (1), S. 47–53. DOI: 10.1016/j.jhin.2018.05.017.
- Møretrø, Trond; Langsrud, Solveig (2017): Residential Bacteria on Surfaces in the Food Industry and Their Implications for Food Safety and Quality. In: *Comprehensive reviews in food science and food safety* 16 (5), S. 1022–1041. DOI: 10.1111/1541-4337.12283.
- Moura, Alexandra; Criscuolo, Alexis; Pouseele, Hannes; Maury, Mylène M.; Leclercq, Alexandre; Tarr, Cheryl et al. (2016): Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. In: *Nature microbiology* 2, S. 16185. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.185.
- MRI (2013): Nationale Verzehrsstudie II Lebensmittelverzehr und Nährstoffzufuhr auf Basis von 24h-Recalls. Unter Mitarbeit von Max Rubner-Institut. Online verfügbar unter [https://www.mri.bund.de/fileadmin/MRI/Institute/EV/Lebensmittelverzehr\\_N%C3%A4hrstoffzufuhr\\_24h-recalls-neu.pdf](https://www.mri.bund.de/fileadmin/MRI/Institute/EV/Lebensmittelverzehr_N%C3%A4hrstoffzufuhr_24h-recalls-neu.pdf), zuletzt geprüft am 12.06.2021.
- NACMCF (1999): Microbiological safety evaluations and recommendations on sprouted seeds. In: *International journal of food microbiology* 52 (3), S. 123–153. DOI: 10.1016/s0168-1605(99)00135-x.
- Nastou, Aikaterini; Rhoades, Jonathan; Smirniotis, Petros; Makri, Ioanna; Kontominas, Michael; Likotrafiti, Eleni (2012): Efficacy of household washing treatments for the control of

- Listeria monocytogenes* on salad vegetables. In: *International journal of food microbiology* 159 (3), S. 247–253. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.09.003.
- Navon-Venezia, Shiri; Kondratyeva, Kira; Carattoli, Alessandra (2017): *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. In: *FEMS microbiology reviews* 41 (3), S. 252–275. DOI: 10.1093/femsre/fux013.
- Nüesch-Inderbinnen, Magdalena; Cernela, Nicole; Althaus, Denise; Hächler, Herbert; Stephan, Roger (2015): *Salmonella enterica* Serovar Szentés, a Rare Serotype Causing a 9-Month Outbreak in 2013 and 2014 in Switzerland. In: *Foodborne pathogens and disease* 12 (11), S. 887–890. DOI: 10.1089/fpd.2015.1996.
- Ochman, H.; Selander, R. K. (1984): Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. In: *Journal of bacteriology* 157 (2), S. 690–693. DOI: 10.1128/jb.157.2.690-693.1984.
- Ogura, Yoshitoshi; Gotoh, Yasuhiro; Itoh, Takehiko; Sato, Mitsuhiko P.; Seto, Kazuko; Yoshino, Shyuji et al. (2017): Population structure of *Escherichia coli* O26 : H11 with recent and repeated *stx2* acquisition in multiple lineages. In: *Microbial genomics* 3 (11). DOI: 10.1099/mgen.0.000141.
- Olaimat, Amin N.; Holley, Richard A. (2012): Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. In: *Food Microbiology* 32 (1), S. 1–19. DOI: 10.1016/j.fm.2012.04.016.
- Oliveira, M.; Usall, J.; Viñas, I.; Anguera, M.; Gatiús, F.; Abadias, M. (2010): Microbiological quality of fresh lettuce from organic and conventional production. In: *Food Microbiology* 27 (5), S. 679–684. DOI: 10.1016/j.fm.2010.03.008.
- Ondov, Brian D.; Treangen, Todd J.; Melsted, Páll; Mallonee, Adam B.; Bergman, Nicholas H.; Koren, Sergey; Phillippy, Adam M. (2016): Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash. In: *Genome biology* 17 (1), S. 132. DOI: 10.1186/s13059-016-0997-x.
- Orsi, G. B.; García-Fernández, A.; Giordano, A.; Venditti, C.; Bencardino, A.; Gianfreda, R. et al. (2011): Risk factors and clinical significance of ertapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospitalised patients. In: *The Journal of hospital infection* 78 (1), S. 54–58. DOI: 10.1016/j.jhin.2011.01.014.
- Park, Jungsun; Shin, Eunkyung; Park, Ae Kyung; Kim, Soojin; Jeong, Hyun Ju; Kim, Jin Seok et al. (2020a): Co-infection With Chromosomally-Located blaCTX-M-14 and Plasmid-Encoding blaCTX-M-15 in Pathogenic *Escherichia coli* in the Republic of Korea. In: *Front. Microbiol.* 11, S. 545591. DOI: 10.3389/fmicb.2020.545591.
- Park, Kyung Min; Kim, Hyun Jung; Jeong, Mooncheol; Koo, Minseon (2020b): Enterotoxin Genes, Antibiotic Susceptibility, and Biofilm Formation of Low-Temperature-Tolerant *Bacillus cereus* Isolated from Green Leaf Lettuce in the Cold Chain. In: *Foods (Basel, Switzerland)* 9 (3). DOI: 10.3390/foods9030249.
- Paton, A. W.; Paton, J. C. (1998): Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. In: *Journal of clinical microbiology* 36 (2), S. 598–602.
- Patrick A.D. Grimont & François-Xavier Weill (2007): Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9th edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella.
- Pavlovic, Melanie; Huber, Ingrid; Skala, Henrike; Konrad, Regina; Schmidt, Herbert; Sing, Andreas; Busch, Ulrich (2010): Development of a multiplex real-time polymerase chain



- reaction for simultaneous detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* and enteropathogenic *Escherichia coli* strains. In: *Foodborne pathogens and disease* 7 (7), S. 801–808. DOI: 10.1089/fpd.2009.0457.
- Peirano, Gisele; Laupland, Kevin B.; Gregson, Daniel B.; Pitout, Johann D. D. (2011): Colonization of returning travelers with CTX-M-producing *Escherichia coli*. In: *Journal of travel medicine* 18 (5), S. 299–303. DOI: 10.1111/j.1708-8305.2011.00548.x.
- Pérez-Jaramillo, Juan E.; Carrión, Víctor J.; Hollander, Mattias de; Raaijmakers, Jos M. (2018): The wild side of plant microbiomes. In: *Microbiome* 6 (1), S. 143. DOI: 10.1186/s40168-018-0519-z.
- Pezzuto, Alessandra; Belluco, Simone; Losasso, Carmen; Patuzzi, Ilaria; Bordin, Paola; Piovesana, Alessia et al. (2016): Effectiveness of Washing Procedures in Reducing *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* on a Raw Leafy Green Vegetable (*Eruca vesicaria*). In: *Front. Microbiol.* 7, S. 1663. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01663.
- Pietsch, Michael; Eller, Christoph; Wendt, Constanze; Holfelder, Martin; Falgenhauer, Linda; Fruth, Angelika et al. (2017): Molecular characterisation of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates from hospital and ambulatory patients in Germany. In: *Veterinary microbiology* 200, S. 130–137. DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.11.028.
- Pightling, Arthur W.; Pettengill, James B.; Luo, Yan; Baugher, Joseph D.; Rand, Hugh; Strain, Errol (2018): Interpreting Whole-Genome Sequence Analyses of Foodborne Bacteria for Regulatory Applications and Outbreak Investigations. In: *Front. Microbiol.* 9, S. 1482. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01482.
- Pitout, Johann D. D.; Nordmann, Patrice; Laupland, Kevin B.; Poirel, Laurent (2005): Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 56 (1), S. 52–59. DOI: 10.1093/jac/dki166.
- Plaza-Rodríguez, Carolina; Alt, Katja; Grobbel, Mirjam; Hammerl, Jens Andre; Irrgang, Alexandra; Szabo, Istvan et al. (2020): Wildlife as Sentinels of Antimicrobial Resistance in Germany? In: *Frontiers in veterinary science* 7, S. 627821. DOI: 10.3389/fvets.2020.627821.
- Posada-Izquierdo, Guiomar D.; Pérez-Rodríguez, Fernando; López-Gálvez, Francisco; Allende, Ana; Selma, María V.; Gil, María I.; Zurera, Gonzalo (2013): Modelling growth of *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-cut lettuce submitted to commercial process conditions: chlorine washing and modified atmosphere packaging. In: *Food Microbiology* 33 (2), S. 131–138. DOI: 10.1016/j.fm.2012.08.010.
- Pouillot, Régis; Klontz, Karl C.; Chen, Yi; Burall, Laurel S.; Macarisin, Dumitru; Doyle, Matthew et al. (2016): Infectious Dose of *Listeria monocytogenes* in Outbreak Linked to Ice Cream, United States, 2015. In: *Emerging infectious diseases* 22 (12), S. 2113–2119. DOI: 10.3201/eid2212.160165.
- Praeger, Ulrike; Herppich, Werner B.; Hassenberg, Karin (2018): Aqueous chlorine dioxide treatment of horticultural produce: Effects on microbial safety and produce quality-A review. In: *Critical reviews in food science and nutrition* 58 (2), S. 318–333. DOI: 10.1080/10408398.2016.1169157.

- Pruden, Amy; Larsson, D. G. Joakim; Amézquita, Alejandro; Collignon, Peter; Brandt, Kristian K.; Graham, David W. et al. (2013): Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. In: *Environmental health perspectives* 121 (8), S. 878–885. DOI: 10.1289/ehp.1206446.
- Radoshevich, Lilliana; Cossart, Pascale (2018): *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. In: *Nat Rev Microbiol* 16 (1), S. 32–46. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.126.
- Rajkovic, Andreja; Jovanovic, Jelena; Monteiro, Silvia; Decler, Marlies; Andjelkovic, Mirjana; Foubert, Astrid et al. (2020): Detection of toxins involved in foodborne diseases caused by Gram-positive bacteria. In: *Comp Rev Food Sci Food Safety* 19 (4), S. 1605–1657. DOI: 10.1111/1541-4337.12571.
- Ramos, B.; Miller, F. A.; Brandão, T.R.S.; Teixeira, P.; Silva, C.L.M. (2013): Fresh fruits and vegetables—An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. In: *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 20, S. 1–15. DOI: 10.1016/j.ifset.2013.07.002.
- Raschle, Susanne; Stephan, Roger; Stevens, Marc J. A.; Cernela, Nicole; Zurfluh, Katrin; Muchaamba, Francis; Nüesch-Inderbinen, Magdalena (2021): Environmental dissemination of pathogenic *Listeria monocytogenes* in flowing surface waters in Switzerland. In: *Scientific reports* 11 (1), S. 9066. DOI: 10.1038/s41598-021-88514-y.
- Reuland, E. A.; Al Naiemi, N.; Raadsen, S. A.; Savelkoul, P. H. M.; Kluytmans, J. A. J. W.; Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E. (2014): Prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in raw vegetables. In: *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 33 (10), S. 1843–1846. DOI: 10.1007/s10096-014-2142-7.
- RKI (2021a): Infektionskrankheiten A-Z. Hg. v. Robert Koch-Institut (RKI). Online verfügbar unter [https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/InfAZ\\_marginal\\_node.html](https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/InfAZ_marginal_node.html), zuletzt geprüft am 30.06.2021.
- RKI (2021b): SurvStat@RKI 2.0. Hg. v. Robert Koch-Institut (RKI). Online verfügbar unter <https://survstat.rki.de>, zuletzt geprüft am 02.06.2021.
- Robert Koch-Institut (RKI) (2010): RKI-Ratgeber: Listeriose. Online verfügbar unter [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Listeriose.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Listeriose.html), zuletzt geprüft am 30.06.2021.
- Roer, Louise; Hendriksen, Rene S.; Leekitcharoenphon, Pimlapas; Lukjancenko, Oksana; Kaas, Rolf Sommer; Hasman, Henrik; Aarestrup, Frank M. (2016): Is the Evolution of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Linked to Restriction-Modification Systems? In: *mSystems* 1 (3). DOI: 10.1128/mSystems.00009-16.
- Roer, Louise; Overballe-Petersen, Søren; Hansen, Frank; Schønning, Kristian; Wang, Mikala; Røder, Bent L. et al. (2018): *Escherichia coli* Sequence Type 410 Is Causing New International High-Risk Clones. In: *mSphere* 3 (4). DOI: 10.1128/mSphere.00337-18.
- Rosberg, Anna Karin; Darlison, Julia; Mogren, Lars; Alsanius, Beatrix Waechter (2021): Commercial wash of leafy vegetables do not significantly decrease bacterial load but leads to shifts in bacterial species composition. In: *Food Microbiology* 94, S. 103667. DOI: 10.1016/j.fm.2020.103667.

- RStudio Team (2015): RStudio: Integrated Development Environment for R: RStudio, Inc. Online verfügbar unter <http://www.rstudio.com>.
- Sagoo, S. K.; Little, C. L.; Ward, L.; Gillespie, I. A.; Mitchell, R. T. (2003): Microbiological study of ready-to-eat salad vegetables from retail establishments uncovers a national outbreak of salmonellosis. In: *Journal of food protection* 66 (3), S. 403–409. DOI: 10.4315/0362-028x-66.3.403.
- Saltykova, Assia; Wuyts, Véronique; Mattheus, Wesley; Bertrand, Sophie; Roosens, Nancy H. C.; Marchal, Kathleen; Keersmaecker, Sigrid C. J. de (2018): Comparison of SNP-based subtyping workflows for bacterial isolates using WGS data, applied to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and serotype 1,4,5,12:i. In: *PloS one* 13 (2), e0192504. DOI: 10.1371/journal.pone.0192504.
- Samapundo, S.; Heyndrickx, M.; Khaferi, R.; Devlieghere, F. (2011): Incidence, diversity and toxin gene characteristics of *Bacillus cereus* group strains isolated from food products marketed in Belgium. In: *International journal of food microbiology* 150 (1), S. 34–41. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.013.
- Sands, Kirsty; Carvalho, Maria J.; Portal, Edward; Thomson, Kathryn; Dyer, Calie; Akpulu, Chinenye et al. (2021): Characterization of antimicrobial-resistant Gram-negative bacteria that cause neonatal sepsis in seven low- and middle-income countries. In: *Nature microbiology* 6 (4), S. 512–523. DOI: 10.1038/s41564-021-00870-7.
- Sannes, Mark R.; Belongia, Edward A.; Kieke, Burney; Smith, Kirk; Kieke, Amy; Vandermause, Mary et al. (2008): Predictors of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in the feces of vegetarians and newly hospitalized adults in Minnesota and Wisconsin. In: *The Journal of infectious diseases* 197 (3), S. 430–434. DOI: 10.1086/525530.
- Sant'Anna, Pedro B.; Melo Franco, Bernadette Dg de; Maffei, Daniele F. (2020): Microbiological safety of ready-to-eat minimally processed vegetables in Brazil: an overview. In: *Journal of the science of food and agriculture* 100 (13), S. 4664–4670. DOI: 10.1002/jsfa.10438.
- Schaufler, Katharina; Semmler, Torsten; Wieler, Lothar H.; Wöhrmann, Michael; Baddam, Ramani; Ahmed, Niyaz et al. (2016): Clonal spread and interspecies transmission of clinically relevant ESBL-producing *Escherichia coli* of ST410--another successful pandemic clone? In: *FEMS microbiology ecology* 92 (1). DOI: 10.1093/femsec/fiv155.
- Schierstaedt, Jasper; Grosch, Rita; Schikora, Adam (2019): Agricultural production systems can serve as reservoir for human pathogens. In: *FEMS microbiology letters* 366 (23). DOI: 10.1093/femsle/fnaa016.
- Schink, Anne-Kathrin; Kadlec, Kristina; Kaspar, Heike; Mankertz, Joachim; Schwarz, Stefan (2013): Analysis of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates collected in the GERM-Vet monitoring programme. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 68 (8), S. 1741–1749. DOI: 10.1093/jac/dkt123.
- Schlechter, Rudolf O.; Miebach, Moritz; Remus-Emsermann, Mitja N. P. (2019): Driving factors of epiphytic bacterial communities: A review. In: *Journal of advanced research* 19, S. 57–65. DOI: 10.1016/j.jare.2019.03.003.
- Schwaiger, Karin; Helmke, Katharina; Hölzel, Christina Susanne; Bauer, Johann (2011): Antibiotic resistance in bacteria isolated from vegetables with regards to the marketing stage

- (farm vs. supermarket). In: *International journal of food microbiology* 148 (3), S. 191–196. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.06.001.
- Shawa, Misheck; Furuta, Yoshikazu; Mulenga, Gillan; Mubanga, Maron; Mulenga, Evans; Zorigt, Tuvshinzaya et al. (2021): Novel chromosomal insertions of ISEcp1-blaCTX-M-15 and diverse antimicrobial resistance genes in Zambian clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Escherichia coli*. In: *Antimicrobial resistance and infection control* 10 (1), S. 79. DOI: 10.1186/s13756-021-00941-8.
- Siebers, Meike; Rohr, Thomas; Ventura, Marina; Schütz, Vadim; Thies, Stephan; Kovacic, Filip et al. (2018): Disruption of microbial community composition and identification of plant growth promoting microorganisms after exposure of soil to rapeseed-derived glucosinolates. In: *PloS one* 13 (7), e0200160. DOI: 10.1371/journal.pone.0200160.
- Siguié, P.; Perochon, J.; Lestrade, L.; Mahillon, J.; Chandler, M. (2006): ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. In: *Nucleic acids research* 34 (Database issue), D32-6. DOI: 10.1093/nar/gkj014.
- Siira, Lotta; Naseer, Umaer; Alfsnes, Kristian; Hermansen, Nils Olav; Lange, Heidi; Brandal, Lin T. (2019): Whole genome sequencing of *Salmonella* Chester reveals geographically distinct clusters, Norway, 2000 to 2016. In: *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 24 (4). DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.4.1800186.
- Siller, Paul; Daehre, Katrin; Rosen, Kerstin; Münch, Steffen; Bartel, Alexander; Funk, Roger et al. (2021): Low airborne tenacity and spread of ESBL-/AmpC-producing *Escherichia coli* from fertilized soil by wind erosion. In: *Environmental microbiology*. DOI: 10.1111/1462-2920.15437.
- Singh, Rasnik K.; Chang, Hsin-Wen; Di Yan; Lee, Kristina M.; Ucmak, Derya; Wong, Kirsten et al. (2017): Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. In: *Journal of translational medicine* 15 (1), S. 73. DOI: 10.1186/s12967-017-1175-y.
- Smet, Annemieke; van Nieuwerburgh, Filip; Vandekerckhove, Tom T. M.; an Martel; Deforce, Dieter; Butaye, Patrick; Haesebrouck, Freddy (2010): Complete nucleotide sequence of CTX-M-15-plasmids from clinical *Escherichia coli* isolates: insertional events of transposons and insertion sequences. In: *PloS one* 5 (6), e11202. DOI: 10.1371/journal.pone.0011202.
- Smith, A.; Moorhouse, E.; Monaghan, J.; Taylor, C.; Singleton, I. (2018): Sources and survival of *Listeria monocytogenes* on fresh, leafy produce. In: *Journal of applied microbiology* 125 (4), S. 930–942. DOI: 10.1111/jam.14025.
- Smith, Olivia M.; Snyder, William E.; Owen, Jeb P. (2020): Are we overestimating risk of enteric pathogen spillover from wild birds to humans? In: *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 95 (3), S. 652–679. DOI: 10.1111/brv.12581.
- Smyth, Cian; O'Flaherty, Aidan; Walsh, Fiona; Do, Thi Thuy (2020): Antibiotic resistant and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing faecal coliforms in wastewater treatment plant effluent. In: *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* 262, S. 114244. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.114244.
- Söderqvist, Karin; Ahmed Osman, Omneya; Wolff, Cecilia; Bertilsson, Stefan; Vågsholm, Ivar; Boqvist, Sofia (2017): Emerging microbiota during cold storage and temperature abuse of

- ready-to-eat salad. In: *Infection ecology & epidemiology* 7 (1), S. 1328963. DOI: 10.1080/20008686.2017.1328963.
- Stasiewicz, Matthew J.; Oliver, Haley F.; Wiedmann, Martin; Bakker, Henk C. den (2015): Whole-Genome Sequencing Allows for Improved Identification of Persistent *Listeria monocytogenes* in Food-Associated Environments. In: *Applied and environmental microbiology* 81 (17), S. 6024–6037. DOI: 10.1128/AEM.01049-15.
- Statista: Gemüsekonsum in Deutschland | Statista. Online verfügbar unter <https://de.statista.com/statistik/studie/id/42820/dokument/gemuesekonsum-in-deutschland/>, zuletzt geprüft am 24.07.2021.
- Statista: Lieferländer von Gemüseimporten nach Importmenge nach Deutschland 2019 | Statista. Online verfügbar unter <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/1139358/umfrage/der-import-von-gemuese-nach-deutschland-laender/>, zuletzt geprüft am 24.07.2021.
- Statista: Produktion von Obst und Gemüse in Europa 2019 | Statista. Online verfügbar unter <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/669449/umfrage/produktion-von-obst-und-gemuese-europa/>, zuletzt geprüft am 24.07.2021.
- Statista: Umsatzanteil von Fresh Cut-Gemüse und -Salaten nach Ländern in Europa 2017 | Statista. Online verfügbar unter <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/961923/umfrage/umsatzanteil-von-fresh-cut-gemuese-und-salaten-nach-laendern-in-europa/>, zuletzt geprüft am 24.07.2021.
- Statistisches Bundesamt (2020): Fachserie 3.1.3 - Land- und Forstwirtschaft, Fischerei - Gemüseerhebung 2019-. Online verfügbar unter [https://www.destatis.de/DE/Service/Bibliothek/\\_publikationen-fachserienliste-3.html](https://www.destatis.de/DE/Service/Bibliothek/_publikationen-fachserienliste-3.html), zuletzt geprüft am 24.07.2021.
- Stenfors Arnesen, Lotte P.; Fagerlund, Annette; Granum, Per Einar (2008): From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. In: *FEMS microbiology reviews* 32 (4), S. 579–606. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x.
- Stephan, Roger; Althaus, Denise; Kiefer, Sabine; Lehner, Angelika; Hatz, Christoph; Schmutz, Claudia et al. (2015): Foodborne transmission of *Listeria monocytogenes* via ready-to-eat salad: A nationwide outbreak in Switzerland, 2013–2014. In: *Food Control* 57, S. 14–17. DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.03.034.
- Szczzech, Magdalena; Kowalska, Beata; Smolińska, Urszula; Maciorowski, Robert; Oskiera, Michał; Michalska, Anna (2018): Microbial quality of organic and conventional vegetables from Polish farms. In: *International journal of food microbiology* 286, S. 155–161. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.018.
- Tango, Charles Nkufi; Wei, Shuai; Khan, Imran; Hussain, Mohammad Shakhawat; Kounkeu, Paul-François Ngnitcho; Park, Joong-Hyun et al. (2018): Microbiological Quality and Safety of Fresh Fruits and Vegetables at Retail Levels in Korea. In: *Journal of food science* 83 (2), S. 386–392. DOI: 10.1111/1750-3841.13992.
- Tarlak, Fatih; Johannessen, Gro; Bascón Villegas, Isabel; Bolívar, Araceli; Posada-Izquierdo, Guiomar Denisse; Pérez-Rodríguez, Fernando (2020): Modelling of the Behaviour of *Salmonella*

- enterica* serovar Reading on Commercial Fresh-Cut Iceberg Lettuce Stored at Different Temperatures. In: *Foods (Basel, Switzerland)* 9 (7). DOI: 10.3390/foods9070946.
- Tenover, F. C.; Arbeit, R. D.; Goering, R. V.; Mickelsen, P. A.; Murray, B. E.; Persing, D. H.; Swaminathan, B. (1995): Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. In: *Journal of clinical microbiology* 33 (9), S. 2233–2239. DOI: 10.1128/jcm.33.9.2233-2239.1995.
- Tomasik, Przemysław; Tomasik, Piotr (2020): Probiotics, Non-Dairy Prebiotics and Postbiotics in Nutrition. In: *Applied Sciences* 10 (4), S. 1470. DOI: 10.3390/app10041470.
- Tournas, V. H. (2005): Spoilage of vegetable crops by bacteria and fungi and related health hazards. In: *Critical reviews in microbiology* 31 (1), S. 33–44. DOI: 10.1080/10408410590886024.
- Treu, Hanna; Nordborg, Maria; Cederberg, Christel; Heuer, Thorsten; Claupein, Erika; Hoffmann, Heide; Berndes, Göran (2017): Carbon footprints and land use of conventional and organic diets in Germany. In: *Journal of Cleaner Production* 161, S. 127–142. DOI: 10.1016/j.jclepro.2017.05.041.
- Trivedi, Pankaj; Leach, Jan E.; Tringe, Susannah G.; Sa, Tongmin; Singh, Brajesh K. (2020): Plant-microbiome interactions: from community assembly to plant health. In: *Nature reviews. Microbiology* 18 (11), S. 607–621. DOI: 10.1038/s41579-020-0412-1.
- Tuohy, Kieran M.; Fava, Francesca; Viola, Roberto (2014): 'The way to a man's heart is through his gut microbiota'--dietary pro- and prebiotics for the management of cardiovascular risk. In: *The Proceedings of the Nutrition Society* 73 (2), S. 172–185. DOI: 10.1017/S0029665113003911.
- Uhlig, Elisabeth; Olsson, Crister; He, Jiayi; Stark, Therese; Sadowska, Zuzanna; Molin, Göran et al. (2017): Effects of household washing on bacterial load and removal of *Escherichia coli* from lettuce and "ready-to-eat" salads. In: *Food science & nutrition* 5 (6), S. 1215–1220. DOI: 10.1002/fsn3.514.
- Ulloa, Soledad; Arata, Loredana; Alarcón, Pedro; Araya, Pamela; Hormazábal, Juan Carlos; Fernández, Jorge (2019): Caracterización genética de cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas durante los años 2007-2014 en Chile. In: *Revista chilena de infectología : organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectología* 36 (5), S. 585–590. DOI: 10.4067/S0716-10182019000500585.
- Valentin, Lars; Sharp, Hannah; Hille, Katja; Seibt, Uwe; Fischer, Jennie; Pfeifer, Yvonne et al. (2014): Subgrouping of ESBL-producing *Escherichia coli* from animal and human sources: an approach to quantify the distribution of ESBL types between different reservoirs. In: *International journal of medical microbiology : IJMM* 304 (7), S. 805–816. DOI: 10.1016/j.ijmm.2014.07.015.
- Valenza, Giuseppe; Nickel, Silke; Pfeifer, Yvonne; Eller, Christoph; Krupa, Elzbieta; Lehner-Reindl, Verena; Höller, Christiane (2014): Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* as intestinal colonizers in the German community. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 58 (2), S. 1228–1230. DOI: 10.1128/AAC.01993-13.
- van Hoek, Angela H. A. M.; Veenman, Christiaan; van Overbeek, Wendy M.; Lynch, Gretta; Roda Husman, Ana Maria de; Blaak, Hetty (2015): Prevalence and characterization of ESBL- and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* on retail vegetables. In: *International journal of food microbiology* 204, S. 1–8. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.014.

- Vandenkoornhuysse, Philippe; Quaiser, Achim; Duhamel, Marie; Le Van, Amandine; Dufresne, Alexis (2015): The importance of the microbiome of the plant holobiont. In: *The New phytologist* 206 (4), S. 1196–1206. DOI: 10.1111/nph.13312.
- Vasoo, Shawn; Barreto, Jason N.; Tosh, Pritish K. (2015): Emerging issues in gram-negative bacterial resistance: an update for the practicing clinician. In: *Mayo Clinic proceedings* 90 (3), S. 395–403. DOI: 10.1016/j.mayocp.2014.12.002.
- Velásquez, Juan C.; Hidalgo, Alejandro A.; Villagra, Nicolás; Santiviago, Carlos A.; Mora, Guido C.; Fuentes, Juan A. (2016): SPI-9 of *Salmonella enterica* serovar Typhi is constituted by an operon positively regulated by RpoS and contributes to adherence to epithelial cells in culture. In: *Microbiology* 162 (8), S. 1367–1378. DOI: 10.1099/mic.0.000319.
- Versalovic, J.; Koeuth, T.; Lupski, J. R. (1991): Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. In: *Nucleic acids research* 19 (24), S. 6823–6831. DOI: 10.1093/nar/19.24.6823.
- Weber, Herbert (Hg.) (2013): Mikrobiologie der Lebensmittel -Grundlagen-. 9., vollst. überarb. Aufl., korrigierter Nachdr. Hamburg: Behr (Mikrobiologie der Lebensmittel).
- Weiner-Lastinger, Lindsey M.; Abner, Sheila; Edwards, Jonathan R.; Kallen, Alexander J.; Karlsson, Maria; Magill, Shelley S. et al. (2020): Antimicrobial-resistant pathogens associated with adult healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015-2017. In: *Infection control and hospital epidemiology* 41 (1), S. 1–18. DOI: 10.1017/ice.2019.296.
- Weller, Daniel; Wiedmann, Martin; Strawn, Laura K. (2015): Spatial and Temporal Factors Associated with an Increased Prevalence of *Listeria monocytogenes* in Spinach Fields in New York State. In: *Applied and environmental microbiology* 81 (17), S. 6059–6069. DOI: 10.1128/AEM.01286-15.
- WHO (2017): WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. World Health Organization. Online verfügbar unter <https://apps.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/index.html>, zuletzt aktualisiert am 07.08.2021, zuletzt geprüft am 07.08.2021.
- Wijnands, Lucas M.; Delfgou-van Asch, Ellen H. M.; Beerepoot-Mensink, Marieke E.; van der Meij-Florijn, Alice; Fitz-James, Ife; van Leusden, Frans M.; Pielaat, Annemarie (2014): Prevalence and concentration of bacterial pathogens in raw produce and minimally processed packaged salads produced in and for the Netherlands. In: *Journal of food protection* 77 (3), S. 388–394. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-13-135.
- Wu, Guanghui; Day, Michaela J.; Mafura, Muriel T.; Nunez-Garcia, Javier; Fenner, Jackie J.; Sharma, Meenaxi et al. (2013): Comparative analysis of ESBL-positive *Escherichia coli* isolates from animals and humans from the UK, The Netherlands and Germany. In: *PloS one* 8 (9), e75392. DOI: 10.1371/journal.pone.0075392.
- Wulfkuehler, Sabine; Kurfiss, Lisa; Kammerer, Dietmar R.; Weiss, Agnes; Schmidt, Herbert; Carle, Reinhold (2013): Impact of different washing procedures on quality of fresh-cut iceberg lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata* L.) and endive (*Cichorium endivia* L.). In: *Eur Food Res Technol* 236 (2), S. 229–241. DOI: 10.1007/s00217-012-1878-5.

- Yaici, Lydia; Haenni, Marisa; Métayer, Véronique; Saras, Estelle; Mesbah Zekar, Ferialle; Ayad, Meriem et al. (2017): Spread of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in the community through ready-to-eat sandwiches in Algeria. In: *International journal of food microbiology* 245, S. 66–72. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.011.
- Yoon, Eun-Jeong; Gwon, Bareum; Liu, Changseung; Kim, Dokyun; Won, Dongju; Park, Sung Gyun et al. (2020): Beneficial Chromosomal Integration of the Genes for CTX-M Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase in *Klebsiella pneumoniae* for Stable Propagation. In: *mSystems* 5 (5). DOI: 10.1128/mSystems.00459-20.
- Zhang, Guodong; Chen, Yi; Hu, Lijun; Melka, David; Wang, Hua; Laasri, Anna et al. (2018): Survey of Foodborne Pathogens, Aerobic Plate Counts, Total Coliform Counts, and *Escherichia coli* Counts in Leafy Greens, Sprouts, and Melons Marketed in the United States. In: *Journal of food protection* 81 (3), S. 400–411. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-17-253.
- Zhang, Guodong; Lampel, Keith A. (2010): Comparison of chromogenic Biolog Rainbow agar *Shigella/Aeromonas* with xylose lysine desoxycholate agar for isolation and detection of *Shigella* spp. from foods. In: *Journal of food protection* 73 (8), S. 1458–1465. DOI: 10.4315/0362-028x-73.8.1458.
- Zhang, Jing; Zhou, Kai; Zheng, Beiwen; Zhao, Lina; Shen, Ping; Ji, Jinru et al. (2016): High Prevalence of ESBL-Producing *Klebsiella pneumoniae* Causing Community-Onset Infections in China. In: *Front. Microbiol.* 7, S. 1830. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01830.
- Zhang, Pei; Wang, Juan; Wang, Xinglong; Bai, Xue; Ma, Jiangang; Dang, Ruyi et al. (2019): Characterization of Five *Escherichia coli* Isolates Co-expressing ESBL and MCR-1 Resistance Mechanisms From Different Origins in China. In: *Front. Microbiol.* 10, S. 1994. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01994.
- Zhou, Kai; Zhou, Yanzi; Zhang, Chuqiu; Song, Jingjie; Cao, Xiaoli; Yu, Xiao et al. (2020a): Dissemination of a 'rare' extended-spectrum  $\beta$ -lactamase gene blaSFO-1 mediated by epidemic clones of carbapenemase-producing *Enterobacter hormaechei* in China. In: *International journal of antimicrobial agents* 56 (3), S. 106079. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106079.
- Zhou, Zhemin; Alikhan, Nabil-Fareed; Mohamed, Khaled; Fan, Yulei; Achtman, Mark (2020b): The EnteroBase user's guide, with case studies on *Salmonella* transmissions, *Yersinia pestis* phylogeny, and *Escherichia* core genomic diversity. In: *Genome research* 30 (1), S. 138–152. DOI: 10.1101/gr.251678.119.
- Zhu, Qi; Gooneratne, Ravi; Hussain, Malik Altaf (2017): *Listeria monocytogenes* in Fresh Produce: Outbreaks, Prevalence and Contamination Levels. In: *Foods (Basel, Switzerland)* 6 (3). DOI: 10.3390/foods6030021.
- Zurfluh, Katrin; Glier, Melinda; Hächler, Herbert; Stephan, Roger (2015a): Replicon typing of plasmids carrying blaCTX-M-15 among *Enterobacteriaceae* isolated at the environment, livestock and human interface. In: *The Science of the total environment* 521-522, S. 75–78. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.03.079.
- Zurfluh, Katrin; Hächler, Herbert; Nüesch-Inderbini, Magdalena; Stephan, Roger (2013): Characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Isolates from rivers and lakes in Switzerland. In: *Applied and environmental microbiology* 79 (9), S. 3021–3026. DOI: 10.1128/AEM.00054-13.



Zurfluh, Katrin; Nüesch-Inderbini, Magdalena; Morach, Marina; Zihler Berner, Annina; Hächler, Herbert; Stephan, Roger (2015b): Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolated from vegetables imported from the Dominican Republic, India, Thailand, and Vietnam. In: *Applied and environmental microbiology* 81 (9), S. 3115–3120. DOI: 10.1128/AEM.00258-15.

## 7. Anhang

Tabelle A 1

### Geräte.

Gerät	Model/Typ	Hersteller
Autoklav	Laboklav 55-195	SHP steriltechnik AG, Detzel Schloss/ Satuelle
Brutschrank	Heraeus instruments function line 30 °C	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Brutschrank	BD 56	Binder GmbH, Tuttlingen
Dispenser für Antibiotika- Testblättchen	ST6090/ST8090	Oxoid Ltd., Hampshire, UK
Eismaschine	AF 100 AS	Scotsman®, Milano - Italien
Fluorometer	Qubit 3.0	Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA
Fotodokumentation	VWR® Imager CHEMI Premium	VWR, Darmstadt
Gelelektrophorese Kammer	Mini-Sub® Cell GT Cell Sub-Cell® GT Cell	BioRad, Hercules, USA
Glasflasche	50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml	Schott AG, Mainz
Heizschüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Integra Biosciences Tecnomat	Abfüllautomat für Petrischalen	IBS Integra, Wallisellen, Schweiz
Lichtmikroskop	Axioskop 40	Carl Zeiss AG, Jena
Messzylinder	100 ml, 1000 ml	diverse Hersteller
Mikrowelle	Privileg 8019	QUELLE GmbH, Salzburg, Österreich
Netzteil	EPS 301	Amersham, Bioscience, USA
Netzteil	PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad, Hercules, USA
PCR Cycler	peqSTAR Thermocycler 2x48 Gradient	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
PCR- Werkbank	Captair bio DFS	Erlab, Salisbury Großbritannien
pH-Meter	Delta 340	Mettler-Toledo, Gießen
Photometer	Nano Color 250D	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Pinzetten	verschiedene Größen	diverse Hersteller

Gerät	Model/Typ	Hersteller
Pipette	Eppendorf Reference 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette	Eppendorf Multipette® plus	Eppendorf, Hamburg
Pipette	Multipette Xstream®	Eppendorf, Hamburg
Pipette	Eppendorf Xplorer®	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipetus- akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Proben Homogenisator	Stomacher® 400 Circulator	Seward Ltd., Worthing, UK
Reagenzgläser	15 ml	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
real time Cyclus	CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad, Hercules, USA
Reinstwasseranlage	Arium® pro UV	Sartorius AG, Göttingen
Scheren	verschiedene Größen	diverse Hersteller
Sequenziergerät	MiSeq®	Illimina Inc., San Diego, CA, USA
Sicherheitswerkbank	B-[MaxPro] <sup>2</sup> -130	Berner International GmbH, Elmshorn
Spektrometer	Nanodrop 2000c	Peqlab GmbH, VWR, Darmstadt
Ultrasonicator	Covaris M220	Covaris Inc., Woburn, Massachusetts, USA
Vortexer	Vortex genie 2	VWR, Darmstadt
Waage	1204 MP	Sartorius AG, Göttingen
Zellmühle	Precellys 24& Cryolys® Kühlmodul	Bertin Instruments, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich
Zentrifuge	Eppendorf 5415D, 5430 R, 5425	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge	Avanti J-26S XPI mit Rotoren JA 25.50 und JA-10	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

Tabelle A 2

*Verbrauchsmaterialien, Enzyme und Kits.*

Material/Kit	Model/Typ	Hersteller
0,2 ml PCR Reaktionsgefäß	PCR Tubes (0,2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
1,5 ml Reaktionsgefäß	SafeSeal Reagiergefäß, 1,5 ml, PP	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
10 µl Filter-Pipettenspitze	10 µl, 100 µl, 1000 µl	Nerbe plus, Winsen/Luhe

Material/Kit	Model/Typ	Hersteller
10 µl Pipettenspitze	10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
15 ml Schraubröhre	Schraubröhre, 15 ml, PP	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
2,0 ml Reaktionsgefäß	SafeSeal Reagiergefäß, 2,0 ml, PP	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
50 ml Schraubröhre	Schraubröhre, 50 ml, PP	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
96 well Abdeckfolie	Microseal® 'C' PCR Plate Sealing Film	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
96 well PCR Platte	Hard-Shell® 96-Well PCR Plates, low profile	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Agglutinationsreagenz	Anti-Salmonella I Reagenz (omnivalent)	Sifin diagnostics GmbH, Berlin
Agglutinationsreagenz	Anti-Salmonella II Reagenz (omnivalent)	Sifin diagnostics GmbH, Berlin
Agglutinationsreagenz	Anti-Shigella I Reagenz (omnivalent)	Sifin diagnostics GmbH, Berlin
Agglutinationsreagenz	Anti-Shigella II Reagenz (omnivalent)	Sifin diagnostics GmbH, Berlin
Anaerobag	AnaeroGen™ 2.5 l-Beutel	Oxoid Ltd, Basingstoke, UK
Anaerobenbox	Mitsubishi™ AnaeroPack 7.0L	Oxoid Ltd, Basingstoke, UK
Antibiotika-Testblättchen	5x 50 Plättchen je Kartusche. Entsprechend den CLSI-, DIN-, BSAC- und EUCAST- Richtlinien	Oxoid Ltd., Basingstoke, UK
Deckgläser	24 x 24 mm	Marienfeld GmbH, Lauda- Königshofen
DNA Marker	Gene Ruler™ 1 Kb Plus DNA Ladder, Gene Ruler DNA Ladder Mix low range	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen
Drigalski Spatel	Plattierungsspatel	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Handschuhe	Kolibri Premium	IGEFA Handelsgesellschaft GmbH, Ahrensfelde
Immersionsöl	Immersionsöl Kst.-Flasche	Merck KGaA, Darmstadt
Impföse	1 µl, 10 µl	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Katalase	Katalasetest ID-ASE	BioMérieux SA, Nürtingen
Kryokonservierung	ROTI®Store-Cryoröhrchen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Material/Kit	Model/Typ	Hersteller
Ladepuffer	DNA Gel Loading Dye (6x)	Thermo Fisher Scientific GmbH, USA
Objektträger	76 x 26 mm	Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen
Oxidase	Bactident® Oxidase	Merck KGaA, Darmstadt
Parafilm	Parafilm „M“	Pechiney Plastic Packaging, Chicago
Petrischalen	94 x 16 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Polymerase	DreamTaq (Green) PCR Master Mix 2x	Thermo Fisher Scientific GmbH, USA
Polymerase	iQ Multiplex Powermix	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Polymerase	KAPA Biosystems© HiFi HotStart	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Primer/Sonden	Oligo desalted, Probe HPLC	EurofinsGenomics, MWG-Biotech, Ebersberg
Primer/Sonden	Oligo desalted, Probe HPLC	Metabion, Planegg
Serologische Pipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Sterilfilter (0,2 µm)	Filtropur S 0.2	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Stomacherbeutel	Blender Bags, steril	VWR International GmbH, Darmstadt
Ultrasonication tubes	microTUBE-50 AFA Fiber Screw-Cap	Covaris Inc., Woburn, Massachusetts, USA

Kits	Model/Typ	Hersteller
AmpC und ESBL Detektion	MASTDISCS ID AmpC und ESBL Detection Discs	MAST GmbH, Reinfeld, DE
DNA-Isolierung (Mikrobiom)	ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit	Zymo Research, Freiburg
DNA-Isolierung (Reinkultur)	Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit	Zymo Research, Freiburg
DNA-Isolierung (Reinkultur)	Genomic Micro AX Bacteria+	A&A Biotechnology, Gdynia, Polen
Genomsequenzierung	Nextera Index Kit (24/96 Indexe)	Illumina, München
Genomsequenzierung	Nextera XT Library kit	Illumina, München

Material/Kit	Model/Typ	Hersteller
Genomsequenzierung	TruSeq DNA Index Kit (24/96 Indexe)	Illumina, München
Genomsequenzierung	TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit	Illumina, München
Genomsequenzierung	Reagent Kit v2	Illumina, München
Genomsequenzierung	Reagent Kit v3	Illumina, München
Genomsequenzierung	MinION MK1B	Oxford Nanopore, Oxford, Großbritannien
Genomsequenzierung	MinION barcoding SQK- LSK109	Oxford Nanopore, Oxford, Großbritannien
Fluorometer Reagenzien	Qubit dsDNA HS Assay Kit, Qubit dsDNA BR Assay Kit	Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA

Tabelle A 3

*Chemikalien.*

Chemikalie	Hersteller
Agarose	AppliChem GmbH, Darmstadt
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
EDTA-Dinatriumsalz	AppliChem GmbH, Darmstadt
Essigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol; ≥99,8 %, p.a.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glycerin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Isopropanol; mol. biology grade	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Milchsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Pepton aus Casein, tryptisch verdaut	VWR International GmbH, Darmstadt
Salzsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris-Acetat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tris-HCL	Merck KGaA, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Merck KGaA, Darmstadt

Tabelle A 4

*Lösungen und Puffer.*

Lösungen	Komponente	Menge
6x Ladepuffer	Glycerin	33 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,07 % (w/v)
Ethidiumbromidlösung	Ethidiumbromid	0,5 mg/l
NaCl Verdünnungslösung	Natriumchlorid	8,5 g/l
NaCl-Peptonlösung	Natriumchlorid	8,5 g/l
Verdünnungslösung	Pepton	1,0 g/l
Puffer		
1x TAE (pH 8,4)	Tris-Acetat	40 mM
	EDTA-Dinatriumsalz	1 mM
1x TBE (pH 8,3)	Tris-Acetat	89 mM
	Borsäure	89 mM
	EDTA-Dinatriumsalz	2 mM

Tabelle A 5 Teststatistiken der Proben auf Herstellerebene und auf Handelsebene.

Untersucht wurden die zentralen Tendenzen der mikrobiologischen Zellzahlen zwischen den verschiedenen Verarbeitungsstufen, zwischen den Produktgruppen und zwischen konventioneller vs. ökologischer Herstellung. Zusätzlich wurden für die Proben auf Herstellerebene der Effekteinfluss (Verarbeitungsstufe und Produktgruppe) durch Modellierung untersucht.

*Analyse der Verarbeitungsstufen (Herstellerebene):**Einfaktorielle Analyse der Gesamtkeimzahl nach Probenort:***Mittelwerte und Std.-Abweichungen**

Stufe	Anzahl	Mittelwert	Std.-Abw.	Std.-Fehler Mittelwert	95% KI unten	95% KI oben
Feld	28	6,8069023	1,0469416	0,1978534	6,4009407	7,2128638
Lager	63	6,5422357	0,9734117	0,1226384	6,2970852	6,7873863
Vorputzbereich	53	6,1582791	1,2326198	0,1693134	5,818527	6,4980312
Reinbereich	60	6,0625725	0,8990655	0,1160689	5,8303193	6,2948257
Endprodukt	36	6,4737082	0,5164969	0,0860828	6,2989508	6,6484656

**Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert- Mittelwert0)/Std.0
Feld	28	4193,00	3374,00	149,750	2,371
Lager	63	8914,50	7591,50	141,500	2,795
Vorputzbereich	53	6320,50	6386,50	119,255	-0,147
Reinbereich	60	5350,50	7230,00	89,175	-4,035
Endprodukt	36	4141,50	4338,00	115,042	-0,510

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
23,1943	4	0,0001*

**Nichtparametrische Vergleiche für jedes Paar mittels Wilcoxon-Methode**

q*	Alpha
1,95996	0,05

Kategorie	- Kategorie	Mittlere Score-Differenz	p-Wert	KI unten	KI oben	Differenzdiagramm
Endprodukt	Reinbereich	14,7333	0,0121*	0,057992	0,585027	
Lager	Feld	-2,3214	0,6986	-0,340902	0,196295	
Endprodukt	Vorputzbereich	-2,4722	0,6577	-0,338819	0,315753	
Vorputzbereich	Feld	-8,2965	0,1311	-0,720159	0,051153	
Vorputzbereich	Lager	-10,2312	0,1025	-0,450328	0,037324	
Reinbereich	Vorputzbereich	-11,6376	0,0595	-0,627088	0,009545	
Endprodukt	Feld	-11,6508	0,0130*	-0,576253	-0,066947	
Endprodukt	Lager	-12,6806	0,0345*	-0,477121	-0,020522	
Reinbereich	Feld	-22,8643	<,0001*	-0,968966	-0,363178	
Reinbereich	Lager	-25,4460	<,0001*	-0,792875	-0,301030	

**Einfaktorielle Analyse der Enterobakterien nach Probenort:**

**Mittelwerte und Std.-Abweichungen**

Stufe	Anzahl	Mittelwert	Std.-Abw.	Std.-Fehler Mittelwert	95% KI unten	95% KI oben
Feld	28	3,6792207	1,2491949	0,2360756	3,1948335	4,1636079
Lager	63	3,652462	1,3581791	0,1711145	3,310409	3,994515
Vorputzbereich	53	3,0759987	1,3285202	0,1824863	2,7098132	3,4421843
Reinbereich	60	3,085593	1,3067058	0,168695	2,7480351	3,4231509
Endprodukt	36	2,9855636	1,2118884	0,2019814	2,5755195	3,3956076

**Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Feld	28	3912,50	3374,00	139,732	1,587
Lager	63	8864,50	7591,50	140,706	2,738
Vorputzbereich	53	5728,50	6386,50	108,085	-1,501
Reinbereich	60	6652,00	7230,00	110,867	-1,263
Endprodukt	36	3762,50	4338,00	104,514	-1,525

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
12,6980	4	0,0128*

**Nichtparametrische Vergleiche für jedes Paar mittels Wilcoxon-Methode**

q*	Alpha
1,95996	0,05

Kategorie	- Kategorie	Mittlere Score-Differenz	p-Wert	KI unten	KI oben	Differenzdiagramm
Lager	Feld	1,4187	0,8117	-0,49009	0,5942347	



Kategorie	- Kategorie	Mittlere Score-Differenz	p-Wert	KI unten	KI oben	Differenzdiagramm
Reinbereich	Vorputzbereich	0,9950	0,8681	-0,21632	0,3590219	
Endprodukt	Vorputzbereich	-1,5860	0,7699	-0,52827	0,3010300	
Endprodukt	Reinbereich	-1,8000	0,7528	-0,60206	0,2373609	
Endprodukt	Feld	-10,1587	0,0285*	-1,44716	0,0000000	
Reinbereich	Feld	-10,7119	0,0625	-1,41497	0,0000000	
Vorputzbereich	Feld	-10,9437	0,0429*	-1,41497	0,0000000	
Reinbereich	Lager	-14,3825	0,0228*	-1,17609	0,0000000	
Endprodukt	Lager	-14,7976	0,0124*	-1,37566	0,0000000	
Vorputzbereich	Lager	-16,0677	0,0091*	-1,21085	0,0000000	

**Einfaktorielle Analyse von Hefen nach Probenort:**

**Mittelwerte und Std.-Abweichungen**

Stufe	Anzahl	Mittelwert	Std.-Abw.	Std.-Fehler Mittelwert	95% KI unten	95% KI oben
Feld	27	4,5175984	0,7974963	0,1534782	4,2021194	4,8330774
Lager	63	4,3920782	1,1254583	0,1417944	4,1086352	4,6755212
Vorputzbereich	53	4,0445673	1,1790035	0,1619486	3,7195937	4,369541
Reinbereich	60	4,295482	0,9717851	0,1254569	4,0444432	4,5465207
Endprodukt	36	4,583256	0,6770801	0,1128467	4,354165	4,8123469

**Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Feld	27	3430,00	3240,00	127,037	0,562
Lager	63	7967,50	7560,00	126,468	0,867
Vorputzbereich	53	5570,50	6360,00	105,104	-1,783
Reinbereich	60	6900,50	7200,00	115,008	-0,647
Endprodukt	36	4811,50	4320,00	133,653	1,289

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi²	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi²
5,0420	4	0,2830

**Nichtparametrische Vergleiche für jedes Paar mittels Wilcoxon-Methode**

q*	Alpha
1,95996	0,05

Kategorie	- Kategorie	Mittlere Score-Differenz	p-Wert	KI unten	KI oben	Differenzdiagramm
Endprodukt	Vorputzbereich	10,3320	0,0629	0,000000	0,8195439	
Endprodukt	Reinbereich	7,9111	0,1736	0,000000	0,5682017	
Reinbereich	Vorputzbereich	5,4546	0,3756	-0,148742	0,5314789	
Endprodukt	Lager	2,8373	0,6339	-0,255273	0,3467875	
Endprodukt	Feld	1,6204	0,7275	-0,301030	0,3565473	
Lager	Feld	0,8730	0,8843	-0,318289	0,2676062	
Reinbereich	Feld	-4,9407	0,3976	-0,550031	0,1804561	
Reinbereich	Lager	-5,9222	0,3547	-0,481486	0,0969100	
Vorputzbereich	Feld	-7,7987	0,1555	-0,881135	0,1135093	
Vorputzbereich	Lager	-9,4843	0,1293	-0,716943	0,0362122	

**Einfaktorielle Analyse von Schimmelpilzen nach Probenort:  
Mittelwerte und Std.-Abweichungen**

Stufe	Anzahl	Mittelwert	Std.-Abw.	Std.-Fehler Mittelwert	95% KI unten	95% KI oben
Feld	28	3,5382567	0,8602883	0,1625792	3,2046717	3,8718417
Lager	62	2,9646818	0,8222453	0,1044253	2,7558706	3,173493
Vorputzbereich	53	2,6505821	0,9852473	0,1353341	2,3790143	2,9221499
Reinbereich	60	2,5029265	1,0795698	0,1393719	2,2240441	2,781809
Endprodukt	36	2,6255509	1,2250899	0,2041816	2,2110401	3,0400617

**Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert- Mittelwert0)/Std.0
Feld	28	4716,50	3360,00	168,446	4,067
Lager	62	8518,00	7440,00	137,387	2,371
Vorputzbereich	53	5985,50	6360,00	112,934	-0,868
Reinbereich	60	5804,50	7200,00	96,742	-3,103
Endprodukt	36	3655,50	4320,00	101,542	-1,791

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
29,3113	4	<,0001*

**Nichtparametrische Vergleiche für jedes Paar mittels Wilcoxon-Methode**

q*	Alpha
1,95996	0,05

Kategorie	- Kategorie	Mittlere Score- Differenz	p-Wert	KI unten	KI oben	Differenzdiagramm
Endprodukt	Reinbereich	2,2000	0,6829	0,00000	0,000000	
Endprodukt	Vorputzbereich	-4,0815	0,4353	-0,33099	0,000000	
Reinbereich	Vorputzbereich	-7,0892	0,2170	-0,33724	0,000000	
Vorputzbereich	Lager	-11,6365	0,0566	-0,60206	0,000000	
Lager	Feld	-12,7535	0,0315*	-1,00000	-0,013788	
Endprodukt	Lager	-15,2576	0,0089*	-1,01703	0,000000	
Endprodukt	Feld	-17,6508	0,0001*	-1,53148	-0,425969	
Vorputzbereich	Feld	-17,9575	0,0009*	-1,50515	-0,301030	
Reinbereich	Lager	-21,0876	0,0007*	-1,07918	-0,017033	
Reinbereich	Feld	-26,2690	<,0001*	-1,53148	-0,726999	

**Analyse der Produktgruppen (Herstellerebene):**

**Einfaktorielle Analyse der Gesamtkeimzahl nach Produkt Code Probenort=Feld**

**Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score- Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Gartensalate	16	198,000	208,000	12,3750	-0,538
Zichorie	9	127,000	117,000	14,1111	0,538

**2-Stichproben-Test, Normal-Approximation**

S	Z	Wahrsch. >  Z
127	0,53804	0,5906

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
0,3208	1	0,5712

*Einfaktorielle Analyse der Enterobakterien nach Produkt Code Probenort=Feld***Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Gartensalate	16	209,500	208,000	13,0938	0,057
Zichorie	9	115,500	117,000	12,8333	-0,057

**2-Stichproben-Test, Normal-Approximation**

S	Z	Wahrsch. >  Z
115,5	-0,05668	0,9548

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
0,0072	1	0,9322

*Einfaktorielle Analyse von Hefen nach Produkt Code Probenort=Feld***Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Gartensalate	16	201,000	200,000	12,5625	0,031
Zichorie	8	99,000	100,000	12,3750	-0,031

**2-Stichproben-Test, Normal-Approximation**

S	Z	Wahrsch. >  Z
99	-0,03063	0,9756

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
0,0038	1	0,9511

*Einfaktorielle Analyse von Schimmelpilzen nach Produkt Code Probenort=Feld***Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Gartensalate	16	210,000	208,000	13,1250	0,085
Zichorie	9	115,000	117,000	12,7778	-0,085

**2-Stichproben-Test, Normal-Approximation**

S	Z	Wahrsch. >  Z
115	-0,08502	0,9322

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
0,0129	1	0,9097

*Einfaktorielle Analyse der Gesamtkeimzahl nach Produkt Code Probenort=Lager***Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Gartensalate	23	466,500	506,000	20,2826	-0,951
Zichorie	20	479,500	440,000	23,9750	0,951

**2-Stichproben-Test, Normal-Approximation**

S	Z	Wahrsch. >  Z
479,5	0,95077	0,3417

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
0,9273	1	0,3356

*Einfaktorielle Analyse der Enterobakterien nach Produkt Code Probenort=Lager***Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Gartensalate	23	457,500	506,000	19,8913	-1,171
Zichorie	20	488,500	440,000	24,4250	1,171

**2-Stichproben-Test, Normal-Approximation**

S	Z	Wahrsch. >  Z
488,5	1,17058	0,2418

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
1,3989	1	0,2369

*Einfaktorielle Analyse von Hefen nach Produkt Code Probenort=Lager***Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Gartensalate	23	482,500	506,000	20,9783	-0,561
Zichorie	20	463,500	440,000	23,1750	0,561

**2-Stichproben-Test, Normal-Approximation**

S	Z	Wahrsch. >  Z
463,5	0,56058	0,5751

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
0,3281	1	0,5668

*Einfaktorielle Analyse von Schimmelpilzen nach Produkt Code Probenort=Lager***Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score- Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Gartensalate	23	517,500	494,500	22,5000	0,572
Zichorie	19	385,500	408,500	20,2895	-0,572

**2-Stichproben-Test, Normal-Approximation**

S	Z	Wahrsch. >  Z
385,5	-0,57151	0,5677

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
0,3413	1	0,5591

*Einfaktorielle Analyse der Gesamtkeimzahl nach Produkt Code Probenort=Vorputzbereich***Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score- Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Gartensalate	23	384,500	483,000	16,7174	-2,575
Zichorie	18	476,500	378,000	26,4722	2,575

**2-Stichproben-Test, Normal-Approximation**

S	Z	Wahrsch. >  Z
476,5	2,57528	0,0100*

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
6,6999	1	0,0096*

*Einfaktorielle Analyse der Enterobakterien nach Produkt Code Probenort=Vorputzbereich***Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score- Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Gartensalate	23	463,500	483,000	20,1522	-0,512
Zichorie	18	397,500	378,000	22,0833	0,512

**2-Stichproben-Test, Normal-Approximation**

S	Z	Wahrsch. >  Z
397,5	0,51182	0,6088

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
0,2759	1	0,5994

*Einfaktorielle Analyse von Hefen nach Produkt Code Probenort=Vorputzbereich***Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score- Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Gartensalate	23	402,500	483,000	17,5000	-2,106
Zichorie	18	458,500	378,000	25,4722	2,106

**2-Stichproben-Test, Normal-Approximation**

S	Z	Wahrsch. >  Z
458,5	2,10567	0,0352*

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
4,4894	1	0,0341*

*Einfaktorielle Analyse von Schimmelpilzen nach Produkt Code Probenort=Vorputzbereich***Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score- Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Gartensalate	23	536,500	483,000	23,3261	1,446
Zichorie	18	324,500	378,000	18,0278	-1,446

**2-Stichproben-Test, Normal-Approximation**

S	Z	Wahrsch. >  Z
324,5	-1,44563	0,1483

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
2,1295	1	0,1445

*Einfaktorielle Analyse der Gesamtkeimzahl nach Produkt Code Probenort=Reinbereich/Endprodukt***Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score- Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Gartensalate	15	375,500	555,000	25,0333	-2,444
Zichorie	7	174,000	259,000	24,8571	-1,583
Salatmix	51	2151,50	1887,00	42,1863	3,174

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
10,1154	2	0,0064*

**Nichtparametrische Vergleiche für jedes Paar mittels Wilcoxon-Methode**

q*	Alpha
1,95996	0,05

Kategorie	- Kategorie	Mittlere Score-Differenz	p-Wert	KI unten	KI oben	Differenzdiagramm
Salatmix	Zichorie	15,19048	0,0256*	0,032185	0,656042	
Salatmix	Gartensalate	14,66667	0,0093*	0,113943	1,019305	
Zichorie	Gartensalate	1,78095	0,5488	-0,346787	0,903090	

**Einfaktorielle Analyse der Enterobakterien nach Produkt Code Probenort=Reinbereich/Endprodukt Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Gartensalate	15	473,500	555,000	31,5667	-1,126
Zichorie	7	342,000	259,000	48,8571	1,574
Salatmix	51	1885,50	1887,00	36,9706	-0,012

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
3,2888	2	0,1931

**Einfaktorielle Analyse von Hefen nach Produkt Code Probenort=Reinbereich/Endprodukt Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Gartensalate	15	368,000	555,000	24,5333	-2,560
Zichorie	7	251,500	259,000	35,9286	-0,132
Salatmix	51	2081,50	1887,00	40,8137	2,345

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
6,9190	2	0,0314*

**Nichtparametrische Vergleiche für jedes Paar mittels Wilcoxon-Methode**

q*	Alpha
1,95996	0,05

Kategorie	- Kategorie	Mittlere Score-Differenz	p-Wert	KI unten	KI oben	Differenzdiagramm
Salatmix	Gartensalate	14,58039	0,0092*	0,148742	1,468521	
Salatmix	Zichorie	3,98039	0,5552	-0,470172	0,602060	
Zichorie	Gartensalate	3,56190	0,2303	-0,327359	1,881901	

*Einfaktorielle Analyse von Schimmelpilze nach Produkt Code Probenort=Reinbereich/Endprodukt*  
**Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Gartensalate	15	552,000	555,000	36,8000	-0,037
Zichorie	7	219,000	259,000	31,2857	-0,794
Salatmix	51	1930,00	1887,00	37,8431	0,548

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

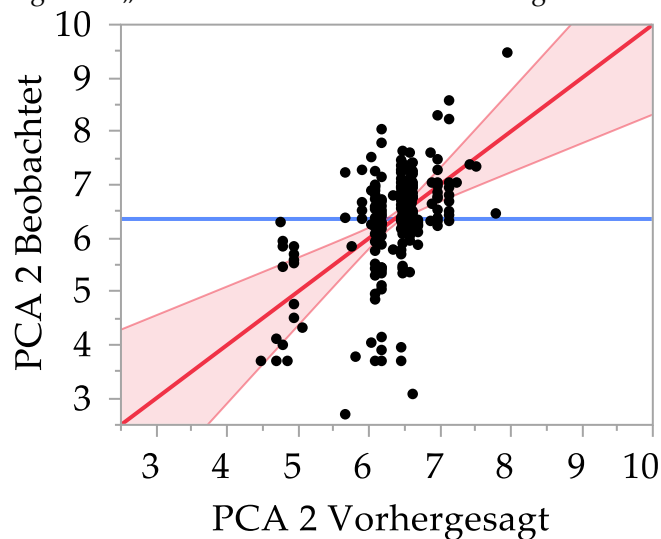
Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
0,6780	2	0,7125



## Effektanalysen der Verarbeitungsstufen und Produktgruppen:

Zielgröße **Gesamtkeimzahl**

Diagramm „Beobachtete Werte über Vorhersage“



RMSE=0,8414  $r^2 = 0,34$  P-Wert= $<,0001$

### Effektzusammenfassung

Quelle	Log-Wertigkeit	P-Wert
Produkt Code	11,983	0,00000
Probenort	1,347	0,04495

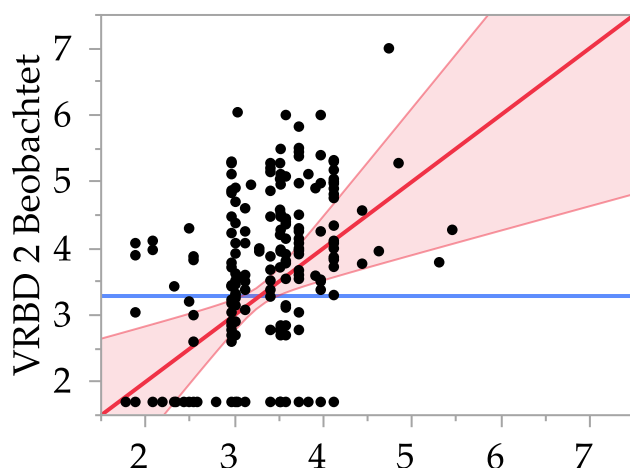
### Skalierte Schätzer

Nominale Faktoren auf alle Stufen erweitert

Term	Skalierter Schätzer	Std.-Fehler	t-Wert	Wahrsch. >  t
Achsenabschnitt	6,137377	0,101581	60,42	<,0001*
Probenort[Feld]	0,3343146	0,152909	2,19	0,0298*
Probenort[Lager]	0,1719309	0,118913	1,45	0,1496
Probenort[Vorputzbereich]	-0,195875	0,125011	-1,57	0,1186
Probenort[Reinbereich]	-0,104654	0,108472	-0,96	0,3357
Probenort[Endprodukt]	-0,205717	0,209444	-0,98	0,3271
Produkt Code[Feldsalat]	0,9244535	0,456798	2,02	0,0442*
Produkt Code[Gartensalate]	0,1423286	0,1364	1,04	0,2979
Produkt Code[Gurke]	-1,250256	0,273825	-4,57	<,0001*
Produkt Code[Kohl]	-0,279057	0,290619	-0,96	0,3380
Produkt Code[Möhren]	-1,093277	0,292143	-3,74	0,0002*
Produkt Code[Rucola]	0,5757148	0,333141	1,73	0,0853
Produkt Code[Spinat]	1,4767321	0,394736	3,74	0,0002*
Produkt Code[Tomate]	-1,558595	0,45261	-3,44	0,0007*
Produkt Code[Zichorie]	0,6554473	0,149455	4,39	<,0001*
Produkt Code[Salatmix]	0,5400674	0,215931	2,50	0,0131*
Produkt Code[Diverse]	-0,133558	0,214057	-0,62	0,5333

Zielgröße **Enterobakterien**

Diagramm „Beobachtete Werte über Vorhersage“



VRBD 2 Vorhergesagt  
 RMSE=1,2157 r2 =0,21 P-  
 Wert=<,0001

**Effektzusammenfassung**

Quelle	Log- Wertigkeit	P-Wert
Produkt Code	5,221	0,00001
Probenort	2,177	0,00666

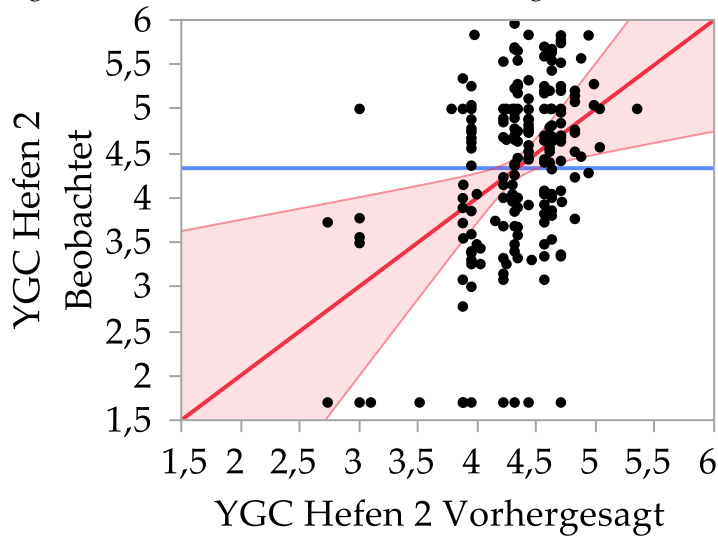
**Skalierte Schätzer**

Nominale Faktoren auf alle Stufen erweitert

Term	Skalierter Schätzer	Std.-Fehler	t-Wert	Wahrsch. >  t
Achsenabschnitt	3,2158076	0,146758	21,91	<,0001*
Probenort[Feld]	0,3775764	0,220913	1,71	0,0888
Probenort[Lager]	0,5248492	0,171798	3,06	0,0025*
Probenort[Vorputzbereich]	-0,188875	0,180609	-1,05	0,2968
Probenort[Reinbereich]	-0,08021	0,156714	-0,51	0,6093
Probenort[Endprodukt]	-0,633341	0,302591	-2,09	0,0375*
Produkt Code[Feldsalat]	0,8862247	0,659954	1,34	0,1807
Produkt Code[Gartensalate]	-0,013899	0,197063	-0,07	0,9438
Produkt Code[Gurke]	-0,94611	0,395605	-2,39	0,0176*
Produkt Code[Kohl]	-0,703954	0,419869	-1,68	0,0950
Produkt Code[Möhren]	-0,595328	0,422071	-1,41	0,1598
Produkt Code[Rucola]	0,6981278	0,481302	1,45	0,1483
Produkt Code[Spinat]	1,7133319	0,570291	3,00	0,0030*
Produkt Code[Tomate]	-0,553223	0,653904	-0,85	0,3984
Produkt Code[Zichorie]	0,3791862	0,215923	1,76	0,0804
Produkt Code[Salatmix]	0,385742	0,311964	1,24	0,2176
Produkt Code[Diverse]	-1,250098	0,309256	-4,04	<,0001*

Zielgröße **Hefen**

Diagramm „Beobachtete Werte über Vorhersage“



RMSE=0,9613 r2 =0,16 P-  
Wert=0,0002

Effektzusammenfassung

Quelle	Log- Wertigkeit	P-Wert
Produkt Code	3,544	0,00029
Probenort	0,670	0,21390

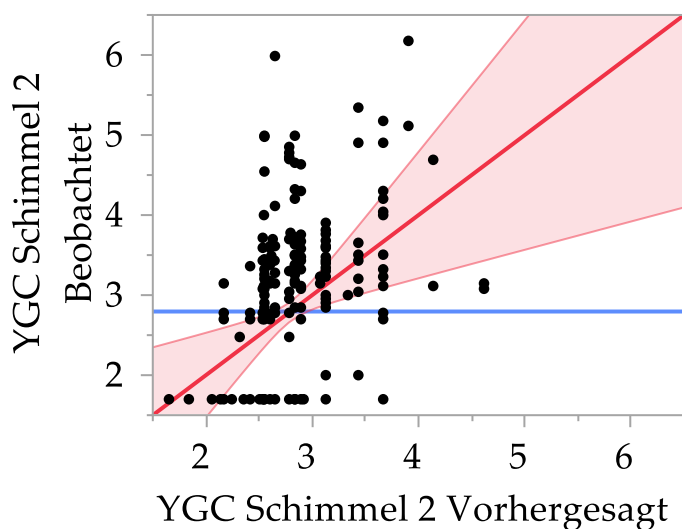
Skalierte Schätzer

Nominale Faktoren auf alle Stufen erweitert

Term	Skalierter Schätzer	Std.-Fehler	t-Wert	Wahrsch. >  t
Achsenabschnitt	4,3366533	0,116229	37,31	<,0001*
Probenort[Feld]	0,2180946	0,177006	1,23	0,2192
Probenort[Lager]	0,0998432	0,136081	0,73	0,4639
Probenort[Vorputzbereich]	-0,264896	0,143055	-1,85	0,0654
Probenort[Reinbereich]	0,0049812	0,124073	0,04	0,9680
Probenort[Endprodukt]	-0,058023	0,239356	-0,24	0,8087
Produkt Code[Feldsalat]	0,9133781	0,521862	1,75	0,0814
Produkt Code[Gartensalate]	-0,121609	0,155958	-0,78	0,4364
Produkt Code[Gurke]	-1,335697	0,312826	-4,27	<,0001*
Produkt Code[Kohl]	-0,190019	0,332015	-0,57	0,5677
Produkt Code[Möhren]	-0,045016	0,333754	-0,13	0,8928
Produkt Code[Rucola]	0,5983513	0,38059	1,57	0,1173
Produkt Code[Spinat]	-0,095589	0,45103	-0,21	0,8324
Produkt Code[Tomate]	0,278159	0,517076	0,54	0,5911
Produkt Code[Zichorie]	0,2694838	0,171276	1,57	0,1170
Produkt Code[Salatmix]	0,287348	0,246686	1,16	0,2453
Produkt Code[Diverse]	-0,558791	0,244566	-2,28	0,0233*

Zielgröße **Schimmelpilze**

Diagramm „Beobachtete Werte über Vorhersage“



RMSE=0,9558  $r^2=0,21$  P-  
Wert= $<,0001$

## Effektzusammenfassung

Quelle	Log- Wertigkeit	P-Wert
Probenort	3,325	0,00047
Produkt Code	3,000	0,00100

## Skalierte Schätzer

Nominale Faktoren auf alle Stufen erweitert

Term	Skalierter Schätzer	Std.-Fehler	t-Wert	Wahrsch. >  t
Achsenabschnitt	2,7552871	0,115385	23,88	$<,0001^*$
Probenort[Feld]	0,7281006	0,17374	4,19	$<,0001^*$
Probenort[Lager]	0,1879652	0,135595	1,39	0,1671
Probenort[Vorputzbereich]	-0,10285	0,142084	-0,72	0,4699
Probenort[Reinbereich]	-0,290023	0,123224	-2,35	$0,0195^*$
Probenort[Endprodukt]	-0,523193	0,237907	-2,20	$0,0289^*$
Produkt Code[Feldsalat]	-0,024012	0,518873	-0,05	0,9631
Produkt Code[Gartensalate]	0,1842473	0,154941	1,19	0,2356
Produkt Code[Gurke]	-0,297491	0,311036	-0,96	0,3399
Produkt Code[Kohl]	-0,106739	0,330139	-0,32	0,7468
Produkt Code[Möhren]	-0,813087	0,33185	-2,45	$0,0150^*$
Produkt Code[Rucola]	1,6730436	0,378427	4,42	$<,0001^*$
Produkt Code[Spinat]	-0,147525	0,448377	-0,33	0,7424
Produkt Code[Tomate]	-0,328159	0,514126	-0,64	0,5239
Produkt Code[Zichorie]	-0,049596	0,170496	-0,29	0,7714
Produkt Code[Salatmix]	0,3181864	0,245275	1,30	0,1959
Produkt Code[Diverse]	-0,408868	0,243223	-1,68	0,0941

## Unterschiede zwischen Produktgruppen auf Handelsebene:

Einfaktorielle Analyse der Gesamtkeimzahl nach Produktgruppe

### Mittelwerte und Std.-Abweichungen

Stufe	Anzahl	Mittelwert	Std.-Abw.	Std.-Fehler Mittelwert	95% KI unten	95% KI oben
Frische Kräuter	40	6,712414	1,2131744	0,1918197	6,3244221	7,100406
Frischpilze	41	6,9598423	1,7401111	0,2717597	6,4105955	7,5090892
Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	40	7,5001867	0,9933566	0,1570635	7,1824959	7,8178776
Möhren	81	7,2161367	0,6898137	0,076646	7,0636064	7,3686671
Salatgurken	40	6,1471162	0,9608853	0,1519293	5,8398102	6,4544223
Sprossen	39	8,5675737	0,6561101	0,1050617	8,3548874	8,78026
Mischsalate	40	7,4690297	0,8022788	0,1268514	7,2124485	7,7256109

### Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.d.0
Frische Kräuter	40	4884,00	6440,00	122,100	-2,832
Frischpilze	41	6301,00	6601,00	153,683	-0,540
Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	40	7230,50	6440,00	180,763	1,439
Möhren	81	12589,5	13041,0	155,426	-0,624
Salatgurken	40	2986,00	6440,00	74,650	-6,289
Sprossen	39	10513,0	6279,00	269,564	7,793
Mischsalate	40	7177,00	6440,00	179,425	1,341

### Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
98,9645	6	<,0001*

### Nichtparametrische Vergleiche für jedes Paar mittels Wilcoxon-Methode

q*	Alpha
1,95996	0,05

Kategorie	- Kategorie	Mittlere Score-Differenz z	p-Wert	KI unten	KI oben	Differenzdiagramm
Sprossen	Möhren	51,0541	<,0001*	1,11090	1,63071	
Sprossen	Salatgurken	38,0567	<,0001*	2,03218	2,78915	
Sprossen	Frische Kräuter	32,1571	<,0001*	1,40170	2,27755	
Mischsalate	Salatgurken	28,7000	<,0001*	0,87276	1,73731	
Sprossen	Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	24,2064	<,0001*	0,71120	1,50790	
Sprossen	Frischpilze	23,8399	<,0001*	0,81094	2,01047	
Möhren	Frische Kräuter	16,2640	0,0164*	0,07918	0,88606	
Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	Frische Kräuter	15,0500	0,0038*	0,27470	1,28255	
Mischsalate	Frische Kräuter	14,9500	0,0040*	0,24778	1,24778	
Mischsalate	Möhren	11,7826	0,0821	-0,03951	0,53148	
Frischpilze	Frische Kräuter	6,1985	0,2357	-0,31426	1,07918	
Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	Frischpilze	5,8774	0,2609	-0,28255	1,05912	
Mischsalate	Frischpilze	5,4823	0,2943	-0,31017	0,96829	
Möhren	Frischpilze	0,5327	0,9373	-0,48953	0,56331	

Kategorie	- Kategorie	Mittlere Score-Differenz z	p-Wert	KI unten	KI oben	Differenzdiagramm
Mischsalate	Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	-0,8750	0,8663	-0,43012	0,39794	
Möhren	Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	-10,6435	0,1163	-0,59292	0,06070	
Salatgurken	Frische Kräuter	-12,1000	0,0199*	-1,04139	-0,06215	
Salatgurken	Frischpilze	-14,6442	0,0051*	-1,61182	-0,33882	
Salatgurken	Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	-27,2000	<,0001*	-1,79074	-0,88461	
Mischsalate	Sprossen	-27,6500	<,0001*	-1,46489	-0,76264	
Salatgurken	Möhren	-38,9515	<,0001*	-1,36318	-0,72428	

Einfaktorielle Analyse von *Enterobakterien* nach Produktgruppe

Mittelwerte und Std.-Abweichungen

Stufe	Anzahl	Mittelwert	Std.-Abw.	Std.-Fehler Mittelwert	95% KI unten	95% KI oben
Frische Kräuter	40	4,6929499	1,2075569	0,1909315	4,3067545	5,0791453
Frischpilze	41	5,0240748	1,5662598	0,2446087	4,5297022	5,5184474
Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	40	5,271684	1,4128014	0,2233835	4,8198482	5,7235198
Möhren	81	5,4817135	0,7727826	0,0858647	5,3108372	5,6525897
Salatgurken	40	3,9999014	1,1416887	0,1805168	3,6347716	4,3650312
Sprossen	39	7,0197471	0,9260358	0,1482844	6,719561	7,3199331
Mischsalate	40	5,1911464	1,0077114	0,1593332	4,8688647	5,5134281

Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.d.0
Frische Kräuter	40	4928,50	6440,00	123,213	-2,752
Frischpilze	41	5635,50	6601,00	137,451	-1,739
Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	40	6517,50	6440,00	162,938	0,140
Möhren	81	14555,5	13041,0	179,698	2,097
Salatgurken	40	3106,00	6440,00	77,650	-6,072
Sprossen	39	10727,5	6279,00	275,064	8,191
Mischsalate	40	6210,50	6440,00	155,263	-0,417

Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
103,9701	6	<,0001*

Nichtparametrische Vergleiche für jedes Paar mittels Wilcoxon-Methode

q*	Alpha
1,95996	0,05

Kategorie	- Kategorie	Mittlere Score-Differenz z	p-Wert	KI unten	KI oben	Differenzdiagramm
Sprossen	Möhren	48,5850	<,0001*	1,21455	1,81954	
Sprossen	Salatgurken	37,6263	<,0001*	2,58402	3,51851	
Sprossen	Frische Kräuter	35,1196	<,0001*	1,82391	2,69897	

Kategorie	- Kategorie	Mittlere Score-Differenz z	p-Wert	KI unten	KI oben	Differenzdiagramm
Sprossen	Frischpilze	28,3177	<,0001*	1,54407	2,81954	
Möhren	Frische Kräuter	27,4304	<,0001*	0,33724	1,07572	
Sprossen	Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	26,2574	<,0001*	1,22185	2,35428	
Mischsalate	Salatgurken	22,4000	<,0001*	0,71917	1,81766	
Möhren	Frischpilze	15,7964	0,0192*	0,05552	1,19382	
Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	Frische Kräuter	9,1000	0,0798	-0,07058	1,16481	
Mischsalate	Frische Kräuter	8,8250	0,0894	-0,06070	0,93225	
Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	Frischpilze	7,1369	0,1690	-0,35471	1,17609	
Möhren	Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	6,5542	0,3330	-0,25527	0,69897	
Mischsalate	Frischpilze	6,0997	0,2398	-0,33619	0,97313	
Frischpilze	Frische Kräuter	1,3088	0,8009	-0,69897	0,73676	
Mischsalate	Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	-2,0750	0,6896	-0,64782	0,52288	
Mischsalate	Möhren	-10,8489	0,1091	-0,61979	0,08940	
Salatgurken	Frischpilze	-13,4835	0,0093*	-1,34242	-0,39794	
Salatgurken	Frische Kräuter	-15,1750	0,0034*	-1,34679	-0,22185	
Salatgurken	Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	-20,1250	0,0001*	-1,95424	-0,74674	
Mischsalate	Sprossen	-32,6888	<,0001*	-2,25527	-1,39076	
Salatgurken	Möhren	-43,3583	<,0001*	-1,92082	-1,14468	

### Einfaktorielle Analyse von präsumtiven *Bacillus cereus* nach Produktgruppe

#### Mittelwerte und Std.-Abweichungen

Stufe	Anzahl	Mittelwert	Std.-Abw.	Std.-Fehler Mittelwert	95% KI unten	95% KI oben
Frische Kräuter	40	1,6326183	0,9583914	0,151535	1,3261099	1,9391268
Frischpilze	40	0,8432676	0,3996815	0,0631952	0,7154433	0,971092
Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	39	1,5347737	0,6706467	0,1073894	1,3173752	1,7521722
Möhren	81	1,4898489	0,9652856	0,107254	1,2764067	1,7032911
Salatgurken	40	0,9293467	0,5875889	0,092906	0,7414266	1,1172667
Sprossen	39	1,5100694	1,0492343	0,1680119	1,169947	1,8501918
Mischsalate	40	1,1760743	0,5776963	0,0913418	0,991318	1,3608305

#### Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.d.0
Frische Kräuter	40	7721,00	6400,00	193,025	2,683
Frischpilze	40	4391,50	6400,00	109,788	-4,080
Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	39	7521,00	6240,00	192,846	2,630
Möhren	81	13929,5	12960,0	171,969	1,498
Salatgurken	40	4654,50	6400,00	116,363	-3,546
Sprossen	39	6662,00	6240,00	170,821	0,866
Mischsalate	40	6160,50	6400,00	154,013	-0,486

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
40,4906	6	<,0001*

**Nichtparametrische Vergleiche für jedes Paar mittels Wilcoxon-Methode**

q*	Alpha
1,95996	0,05

Kategorie	- Kategorie	Mittlere Score-Differenz z	p-Wert	KI unten	KI oben	Differenzdiagramm
Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	Frischpilze	22,3833	<,0001*	0,425969	0,998970	
Möhren	Frischpilze	21,2497	0,0002*	0,000000	0,823909	
Sprossen	Frischpilze	13,4452	0,0010*	0,000000	0,601030	
Mischsalate	Frischpilze	13,3250	0,0015*	0,000000	0,601030	
Sprossen	Salatgurken	12,1032	0,0035*	0,000000	0,601030	
Mischsalate	Salatgurken	11,2750	0,0082*	0,000000	0,601030	
Salatgurken	Frischpilze	1,2750	0,6819	0,000000	0,000000	
Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	Frische Kräuter	1,0635	0,8340	-0,301030	0,367977	
Sprossen	Möhren	0,1899	0,9754	0,000000	0,000000	
Sprossen	Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	-3,3846	0,4908	-0,777121	0,000000	
Mischsalate	Sprossen	-3,9500	0,4033	-0,505150	0,000000	
Möhren	Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	-4,2545	0,5064	-0,601030	0,000000	
Sprossen	Frische Kräuter	-5,0894	0,3020	-0,601030	0,000000	
Möhren	Frische Kräuter	-7,0210	0,2719	-0,601030	0,000000	
Mischsalate	Möhren	-7,2451	0,2427	-0,330993	0,000000	
Mischsalate	Frische Kräuter	-10,7250	0,0313*	-0,602060	0,000000	
Mischsalate	Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	-12,3564	0,0128*	-0,777121	0,000000	
Salatgurken	Möhren	-19,1023	0,0009*	-0,601030	0,000000	
Salatgurken	Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	-19,9019	<,0001*	-0,998970	0,000000	
Salatgurken	Frische Kräuter	-20,0000	<,0001*	-0,902060	0,000000	
Frischpilze	Frische Kräuter	-21,8500	<,0001*	-0,902060	-0,045757	

*Einfaktorielle Analyse von Hefen nach Produktgruppe*

**Mittelwerte und Std.-Abweichungen**

Stufe	Anzahl	Mittelwert	Std.-Abw.	Std.-Fehler Mittelwert	95% KI unten	95% KI oben
Frische Kräuter	40	5,4830334	1,0216487	0,1615368	5,1562943	5,8097725
Frischpilze	41	4,0648281	1,6893644	0,2638344	3,5315989	4,5980573
Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	40	6,0766913	0,9705845	0,1534629	5,7662833	6,3870993
Möhren	81	4,5008725	0,5905873	0,0656208	4,3702829	4,631462
Salatgurken	40	4,3597333	0,9632471	0,1523027	4,051672	4,6677947



Stufe	Anzahl	Mittelwert	Std.-Abw.	Std.-Fehler Mittelwert	95% KI unten	95% KI oben
Sprossen	39	4,4269556	1,9783164	0,3167841	3,7856596	5,0682516

**Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.d.0
Frische Kräuter	40	7517,50	5640,00	187,938	3,945
Frischpilze	41	4096,00	5781,00	99,902	-3,504
Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	40	8904,00	5640,00	222,600	6,859
Möhren	81	10066,5	11421,0	124,278	-2,195
Salatgurken	40	4503,00	5640,00	112,575	-2,388
Sprossen	39	4534,00	5499,00	116,256	-2,049

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi²	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi²
76,1486	5	<,0001*

**Nichtparametrische Vergleiche für jedes Paar mittels Wilcoxon-Methode**

q*	Alpha
1,95996	0,05

Kategorie	- Kategorie	Mittlere Score-Differenz z	p-Wert	KI unten	KI oben	Differenzdiagramm
Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	Frischpilze	25,9793	<,0001*	1,53511	2,79588	
Möhren	Frischpilze	16,6597	0,0139*	0,19629	1,11810	
Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	Frische Kräuter	13,2750	0,0106*	0,14175	1,03253	
Salatgurken	Frischpilze	10,1003	0,0524	0,00000	1,04576	
Sprossen	Frischpilze	3,2520	0,5312	-0,47129	1,14613	
Sprossen	Salatgurken	-3,7981	0,4600	-0,82391	0,63347	
Sprossen	Möhren	-8,4330	0,2134	-0,95424	0,24900	
Salatgurken	Möhren	-10,6995	0,1138	-0,43933	0,07918	
Sprossen	Frische Kräuter	-15,6228	0,0025*	-2,01379	-0,53202	
Frischpilze	Frische Kräuter	-21,4107	<,0001*	-2,23657	-0,93554	
Sprossen	Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	-21,4212	<,0001*	-2,58087	-1,10721	
Salatgurken	Frische Kräuter	-23,6000	<,0001*	-1,50515	-0,69897	
Salatgurken	Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	-32,8750	<,0001*	-2,00000	-1,32222	
Möhren	Frische Kräuter	-34,6381	<,0001*	-1,26451	-0,60206	
Möhren	Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	-51,8918	<,0001*	-1,81034	-1,20066	

Einfaktorielle Analyse von *Schimmelpilzen* nach Produktgruppe

Mittelwerte und Std.-Abweichungen

Stufe	Anzahl	Mittelwert	Std.-Abw.	Std.-Fehler Mittelwert	95% KI unten	95% KI oben
Frische Kräuter	40	4,6456336	0,9162644	0,1448741	4,352598	4,9386691
Frischpilze	41	2,9358415	1,1774397	0,1838852	2,5641956	3,3074873
Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	40	3,9052951	1,367686	0,2162501	3,4678879	4,3427023
Möhren	81	3,038477	0,8220055	0,0913339	2,8567167	3,2202374
Salatgurken	40	3,9175522	0,9942933	0,1572116	3,5995617	4,2355426
Sprossen	39	2,9083092	1,0710004	0,1714973	2,5611311	3,2554874

Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.d.0
Frische Kräuter	40	8834,50	5640,00	220,863	6,739
Frischpilze	41	4124,00	5781,00	100,585	-3,460
Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	40	6621,50	5640,00	165,538	2,070
Möhren	81	8981,00	11421,0	110,877	-3,971
Salatgurken	40	7107,50	5640,00	177,688	3,095
Sprossen	39	3952,50	5499,00	101,346	-3,297

Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
81,6883	5	<,0001*

Nichtparametrische Vergleiche für jedes Paar mittels Wilcoxon-Methode

q*	Alpha
1,95996	0,05

Kategorie	- Kategorie	Mittlere Score-Differenz z	p-Wert	KI unten	KI oben	Differenzdiagramm
Salatgurken	Möhren	33,5364	<,0001*	0,69897	1,25964	
Salatgurken	Frischpilze	20,6204	<,0001*	0,56864	1,65321	
Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	Frischpilze	18,7683	0,0003*	0,30103	1,47712	
Möhren	Frischpilze	8,3574	0,2156	-0,14613	0,60103	
Salatgurken	Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	3,2250	0,5243	-0,20412	0,60206	
Sprossen	Frischpilze	0,5503	0,9147	-0,47712	0,47712	
Sprossen	Möhren	-6,7996	0,3135	-0,60103	0,17609	
Salatgurken	Frische Kräuter	-16,2500	0,0014*	-1,00000	-0,07918	
Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	Frische Kräuter	-16,8000	0,0011*	-1,17609	-0,28330	
Sprossen	Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	-18,0535	0,0004*	-1,52288	-0,30000	
Sprossen	Salatgurken	-20,8135	<,0001*	-1,69897	-0,47712	
Möhren	Kopf-, Blatt- und Pflücksalate	-24,0880	0,0004*	-1,14133	-0,36318	
Frischpilze	Frische Kräuter	-30,5479	<,0001*	-2,30000	-1,30103	
Sprossen	Frische Kräuter	-30,8657	<,0001*	-2,30000	-1,30000	
Möhren	Frische Kräuter	-48,6614	<,0001*	-2,00000	-1,24778	

**Statistik konventioneller Anbau vs. ökologischer Anbau auf Handelsebene:**

Einfaktorielle Analyse der Gesamtkeimzahlen nach Anbauform Produktgruppe=FrISCHE KRÄUTER

**Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Konventioneller Anbau	28	534,000	574,000	19,0714	-1,166
Ökologischer Anbau	12	286,000	246,000	23,8333	1,166

**2-Stichproben-Test, Normal-Approximation**

S	Z	Wahrsch. >  Z
286	1,16613	0,2436

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
1,3945	1	0,2376

Einfaktorielle Analyse der Enterobakterien nach Anbauform Produktgruppe=FrISCHE KRÄUTER

**Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Konventioneller Anbau	28	608,000	574,000	21,7143	0,989
Ökologischer Anbau	12	212,000	246,000	17,6667	-0,989

**2-Stichproben-Test, Normal-Approximation**

S	Z	Wahrsch. >  Z
212	-0,98905	0,3226

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
1,0076	1	0,3155

Einfaktorielle Analyse von präsumptiven *Bacillus cereus* nach Anbauform Produktgruppe=FrISCHE KRÄUTER

**Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Konventioneller Anbau	28	613,500	574,000	21,9107	1,174
Ökologischer Anbau	12	206,500	246,000	17,2083	-1,174

**2-Stichproben-Test, Normal-Approximation**

S	Z	Wahrsch. >  Z
206,5	-1,17424	0,2403

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
1,4144	1	0,2343

Einfaktorielle Analyse von *Hefen* nach Anbauform Produktgruppe=*FrISCHE KRÄUTER***Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Konventioneller Anbau	28	599,500	574,000	21,4107	0,738
Ökologischer Anbau	12	220,500	246,000	18,3750	-0,738

**2-Stichproben-Test, Normal-Approximation**

S	Z	Wahrsch. >  Z
220,5	-0,73834	0,4603

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
0,5672	1	0,4514

Einfaktorielle Analyse von *Schimmelpilzen* nach Anbauform Produktgruppe=*FrISCHE KRÄUTER***Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Konventioneller Anbau	28	548,500	574,000	19,5893	-0,744
Ökologischer Anbau	12	271,500	246,000	22,6250	0,744

**2-Stichproben-Test, Normal-Approximation**

S	Z	Wahrsch. >  Z
271,5	0,74448	0,4566

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
0,5766	1	0,4476

Einfaktorielle Analyse der *Gesamtkeimzahl* nach Anbauform Produktgruppe=*FrISCHE PILZE***Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Konventioneller Anbau	28	667,000	588,000	23,8214	2,201
Ökologischer Anbau	13	194,000	273,000	14,9231	-2,201

**2-Stichproben-Test, Normal-Approximation**

S	Z	Wahrsch. >  Z
194	-2,20132	0,0277*

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
4,9077	1	0,0267*

Einfaktorielle Analyse der *Enterobakterien* nach Anbauform Produktgruppe=*Frischpilze*

## Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Konventioneller Anbau	28	625,000	588,000	22,3214	1,088
Ökologischer Anbau	13	236,000	273,000	18,1538	-1,088

## 2-Stichproben-Test, Normal-Approximation

S	Z	Wahrsch. >  Z
236	-1,08760	0,2768

## Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
1,2155	1	0,2702

Einfaktorielle Analyse von präsumptiven *Bacillus cereus* nach Anbauform Produktgruppe=*Frischpilze*

## Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Konventioneller Anbau	27	567,500	553,500	21,0185	0,678
Ökologischer Anbau	13	252,500	266,500	19,4231	-0,678

## 2-Stichproben-Test, Normal-Approximation

S	Z	Wahrsch. >  Z
252,5	-0,67850	0,4975

## Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
0,4951	1	0,4817

Einfaktorielle Analyse von *Hefen* nach Anbauform Produktgruppe=*Frischpilze*

## Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Konventioneller Anbau	28	575,500	588,000	20,5536	-0,337
Ökologischer Anbau	13	285,500	273,000	21,9615	0,337

## 2-Stichproben-Test, Normal-Approximation

S	Z	Wahrsch. >  Z
285,5	0,33654	0,7365

## Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
0,1229	1	0,7259

Einfaktorielle Analyse von *Schimmelpilzen* nach Anbauform Produktgruppe=*Frischpilze***Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Konventioneller Anbau	28	547,000	588,000	19,5357	-1,147
Ökologischer Anbau	13	314,000	273,000	24,1538	1,147

**2-Stichproben-Test, Normal-Approximation**

S	Z	Wahrsch. >  Z
314	1,14718	0,2513

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
1,3487	1	0,2455

Einfaktorielle Analyse der *Gesamtkeimzahl* nach Anbauform Produktgruppe=*Kopf-, Blatt- und Pflücksalate***Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Konventioneller Anbau	30	548,000	615,000	18,2667	-2,078
Ökologischer Anbau	10	272,000	205,000	27,2000	2,078

**2-Stichproben-Test, Normal-Approximation**

S	Z	Wahrsch. >  Z
272	2,07750	0,0378*

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
4,3812	1	0,0363*

Einfaktorielle Analyse der *Enterobakterien* nach Anbauform Produktgruppe=*Kopf-, Blatt- und Pflücksalate***Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Konventioneller Anbau	30	566,000	615,000	18,8667	-1,515
Ökologischer Anbau	10	254,000	205,000	25,4000	1,515

**2-Stichproben-Test, Normal-Approximation**

S	Z	Wahrsch. >  Z
254	1,51510	0,1297

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
2,3431	1	0,1258

*Einfaktorielle Analyse von präsumptiven Bacillus cereus nach Anbauform Produktgruppe=Kopf-, Blatt- und Pflücksalate*

**Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Konventioneller Anbau	29	549,000	580,000	18,9310	-0,998
Ökologischer Anbau	10	231,000	200,000	23,1000	0,998

**2-Stichproben-Test, Normal-Approximation**

S	Z	Wahrsch. >  Z
231	0,99815	0,3182

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
1,0292	1	0,3103

*Einfaktorielle Analyse von Hefen nach Anbauform Produktgruppe=Kopf-, Blatt- und Pflücksalate*

**Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Konventioneller Anbau	30	581,500	615,000	19,3833	-1,031
Ökologischer Anbau	10	238,500	205,000	23,8500	1,031

**2-Stichproben-Test, Normal-Approximation**

S	Z	Wahrsch. >  Z
238,5	1,03084	0,3026

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
1,0951	1	0,2953

*Einfaktorielle Analyse von Schimmelpilzen nach Anbauform Produktgruppe=Kopf-, Blatt- und Pflücksalate*

**Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Konventioneller Anbau	30	581,000	615,000	19,3667	-1,061
Ökologischer Anbau	10	239,000	205,000	23,9000	1,061

**2-Stichproben-Test, Normal-Approximation**

S	Z	Wahrsch. >  Z
239	1,06130	0,2886

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
1,1602	1	0,2814

## Einfaktorielle Analyse der Gesamtkeimzahlen nach Anbauform Produktgruppe=Möhren

## Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Konventioneller Anbau	56	2263,00	2296,00	40,4107	-0,332
Ökologischer Anbau	25	1058,00	1025,00	42,3200	0,332

## 2-Stichproben-Test, Normal-Approximation

S	Z	Wahrsch. >  Z
1.058	0,33243	0,7396

## Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
0,1139	1	0,7357

## Einfaktorielle Analyse der Enterobakterien nach Anbauform Produktgruppe=Möhren

## Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Konventioneller Anbau	56	2275,00	2296,00	40,6250	-0,210
Ökologischer Anbau	25	1046,00	1025,00	41,8400	0,210

## 2-Stichproben-Test, Normal-Approximation

S	Z	Wahrsch. >  Z
1.046	0,21036	0,8334

## Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
0,0464	1	0,8294

Einfaktorielle Analyse von präsumptiven *Bacillus cereus* nach Anbauform Produktgruppe=Möhren

## Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Konventioneller Anbau	56	2300,00	2296,00	41,0714	0,039
Ökologischer Anbau	25	1021,00	1025,00	40,8400	-0,039

## 2-Stichproben-Test, Normal-Approximation

S	Z	Wahrsch. >  Z
1.021	-0,03933	0,9686

## Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
0,0020	1	0,9642



Einfaktorielle Analyse von *Hefen* nach Anbauform Produktgruppe=*Möhren***Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Konventioneller Anbau	56	2250,50	2296,00	40,1875	-0,460
Ökologischer Anbau	25	1070,50	1025,00	42,8200	0,460

**2-Stichproben-Test, Normal-Approximation**

S	Z	Wahrsch. >  Z
1.070,5	0,46031	0,6453

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
0,2166	1	0,6416

Einfaktorielle Analyse von *Schimmelpilzen* nach Anbauform Produktgruppe=*Möhren***Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Konventioneller Anbau	56	2129,00	2296,00	38,0179	-1,708
Ökologischer Anbau	25	1192,00	1025,00	47,6800	1,708

**2-Stichproben-Test, Normal-Approximation**

S	Z	Wahrsch. >  Z
1.192	1,70833	0,0876

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
2,9359	1	0,0866

Einfaktorielle Analyse der *Gesamtkeimzahlen* nach Anbauform Produktgruppe=*Salatgurken***Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Konventioneller Anbau	25	529,500	512,500	21,1800	0,461
Ökologischer Anbau	15	290,500	307,500	19,3667	-0,461

**2-Stichproben-Test, Normal-Approximation**

S	Z	Wahrsch. >  Z
290,5	-0,46112	0,6447

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
0,2257	1	0,6347

Einfaktorielle Analyse der *Enterobakterien* nach Anbauform Produktgruppe=Salatgurken

## Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Konventioneller Anbau	25	485,500	512,500	19,4200	-0,746
Ökologischer Anbau	15	334,500	307,500	22,3000	0,746

## 2-Stichproben-Test, Normal-Approximation

S	Z	Wahrsch. >  Z
334,5	0,74638	0,4554

## Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
0,5783	1	0,4470

Einfaktorielle Analyse von präsumptiven *Bacillus cereus* nach Anbauform Produktgruppe=Salatgurken

## Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Konventioneller Anbau	25	477,500	512,500	19,1000	-1,551
Ökologischer Anbau	15	342,500	307,500	22,8333	1,551

## 2-Stichproben-Test, Normal-Approximation

S	Z	Wahrsch. >  Z
342,5	1,55130	0,1208

## Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
2,4768	1	0,1155

Einfaktorielle Analyse von *Hefen* nach Anbauform Produktgruppe=Salatgurken

## Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Konventioneller Anbau	25	432,000	512,500	17,2800	-2,311
Ökologischer Anbau	15	388,000	307,500	25,8667	2,311

## 2-Stichproben-Test, Normal-Approximation

S	Z	Wahrsch. >  Z
388	2,31114	0,0208*

## Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
5,4083	1	0,0200*

Einfaktorielle Analyse von *Schimmelpilzen* nach Anbauform Produktgruppe=*Salatgurken*

## Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Konventioneller Anbau	25	481,000	512,500	19,2400	-0,909
Ökologischer Anbau	15	339,000	307,500	22,6000	0,909

## 2-Stichproben-Test, Normal-Approximation

S	Z	Wahrsch. >  Z
339	0,90945	0,3631

## Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
0,8540	1	0,3554

Einfaktorielle Analyse der *Gesamtkeimzahl* nach Anbauform Produktgruppe=*Sprossen*

## Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Konventioneller Anbau	27	564,000	540,000	20,8889	0,715
Ökologischer Anbau	12	216,000	240,000	18,0000	-0,715

## 2-Stichproben-Test, Normal-Approximation

S	Z	Wahrsch. >  Z
216	-0,71515	0,4745

## Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
0,5334	1	0,4652

Einfaktorielle Analyse der *Enterobakterien* nach Anbauform Produktgruppe=*Sprossen*

## Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Konventioneller Anbau	27	563,000	540,000	20,8519	0,685
Ökologischer Anbau	12	217,000	240,000	18,0833	-0,685

## 2-Stichproben-Test, Normal-Approximation

S	Z	Wahrsch. >  Z
217	-0,68493	0,4934

## Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
0,4902	1	0,4838

Einfaktorielle Analyse von präsumptiven **Bacillus cereus** nach Anbauform Produktgruppe=**Sprossen**

**Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Konventioneller Anbau	27	538,500	540,000	19,9444	-0,034
Ökologischer Anbau	12	241,500	240,000	20,1250	0,034

**2-Stichproben-Test, Normal-Approximation**

S	Z	Wahrsch. >  Z
241,5	0,03359	0,9732

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
0,0025	1	0,9598

Einfaktorielle Analyse von **Hefen** nach Anbauform Produktgruppe=**Sprossen**

**Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Konventioneller Anbau	27	555,000	540,000	20,5556	0,442
Ökologischer Anbau	12	225,000	240,000	18,7500	-0,442

**2-Stichproben-Test, Normal-Approximation**

S	Z	Wahrsch. >  Z
225	-0,44171	0,6587

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
0,2088	1	0,6477

Einfaktorielle Analyse von **Schimmelpilzen** nach Anbauform Produktgruppe=**Sprossen**

**Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests (Rangsummen)**

Kategorie	Häufigkeiten	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert	(Mittelwert-Mittelwert0)/Std.0
Konventioneller Anbau	27	560,000	540,000	20,7407	0,602
Ökologischer Anbau	12	220,000	240,000	18,3333	-0,602

**2-Stichproben-Test, Normal-Approximation**

S	Z	Wahrsch. >  Z
220	-0,60171	0,5474

**Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi <sup>2</sup>
0,3809	1	0,5371

Tabelle A 6

*Für die Mikrobiota-Analysen verwendete Proben, Ort bzw. Zeitpunkte der Probennahme und jeweils generierte 16S-rDNA Sequenzen (reads).*

Probe	Ort/Zeit	Anzahl Sequenzen
Romana Salat	Feld	170.910
	Kühllager	98.519
	Vorputz	244.134
	Endprodukt	89.071
Endivie	Feld	135.583
	Kühllager	162.273
	Vorputz	151.591
	Endprodukt	171.838
Lollo Bionda	Feld	281.246
	Kühllager	147.153
	Vorputz	251.935
	Endprodukt	253.054
Waschwasser	4:10 Uhr	304.112
	4:30 Uhr	429.178
	4:50 Uhr	266.985
	5:10 Uhr	420.724
	5:30 Uhr	269.504
	5:50 Uhr	300.666
	6:20 Uhr	410.371
	6:50 Uhr	355986
	7:20 Uhr	461.039
	7:52 Uhr	290.795
	8:22 Uhr	308.772
	8:52 Uhr	340.260
	9:30 Uhr	320.976
	9:50 Uhr	209.810
10:20 Uhr	459.999	
10:50 Uhr	390.406	
11:20 Uhr	283.834	
11:50 Uhr	458.633	

Tabelle A 7

Übersicht der verwendeten *Salmonella* Szentes Isolate.

<i>Salmonella</i> Szentes Stamm	Datum	Land	Ursprung-	Sequenzier- ungstechnik	Sequence Read Archive (SRA) accession	Übermittelt durch
1504MS06S A	2015	Kiel, Deutsch- land	Lebens-mittel (Mischsalat)	Illumina MiSeq, 2019	-	Max Rubner- Institut (MRI), Germany
FMA0171	2011- 08-11	Bulgarien	Lebensmittel (Sonnenblume kerne)	Illumina MiSeq, 2014	SRR1346306	FDA
MS170183	2017	Irland	Human	Illumina HiSeq 2500, 2017	ERS1855865	University Hospital Galway, Ireland
56995	-	Groß- britannien	Human	Illumina HiSeq 2500, 2015	SRR3048756	PHE
63873	2014- 10	Groß- britannien	Human	Illumina HiSeq 2500, 2015	SRS904907	PHE
70656	2014- 11	Groß- britannien	Human	Illumina HiSeq 2500, 2015	SRS900701	PHE
FL_FLDAC S-43692	2005- 04-01	USA	Lebensmittel (Paprika)	Illumina MiSeq, 2013	SRR1015723	FDA
FDA000091 99	2015- 04-14	Bulgarien	Lebensmittel (Sonnen- blumenkerne)	Illumina MiSeq, 2015	SRR2086588	FDA
FDA000092 00	2015- 04-14	Bulgarien	Lebensmittel (Sonnen- blumenkerne)	Illumina MiSeq, 2015	SRR2086572	FDA
FDA000134 13	2018- 07-24	Deutsch- land	Umwelt	Illumina MiSeq, 2018	SRR7718994	FDA
FDA000134 12	2018- 07-24	Deutsch- land	Umwelt	Illumina MiSeq, 2018	SRR7718993	FDA
453249	2017- 12	Groß- britannien	Human	Illumina HiSeq, 2019	SRS4323524	PHE
274292	2016- 07	Groß- britannien	Human	Illumina HiSeq, 2019	SRS4443890	PHE

FDA= FDA Center for Food Safety and Applied Nutrition, USA

PHE= Public Health England (PHE), United Kingdom

Tabelle A 8

*SNP Matrix der Listeria monocytogenes Isolate und den nächsten Verwandten aus öffentlichen Datenbanken.*

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)
(1) 104	0	93	505 4	112	499 9	489 8	111	490 2	374 96	376 94	376 90	498 2	87	374 89	493 0
(2) 1506MS22LM	93	0	504 6	25	501 0	490 6	110	491 2	375 05	376 98	376 94	499 3	46	374 98	494 0
(3) 1509MS40LM	505 4	504 6	0	504 7	456 3	424 0	506 2	424 4	374 40	376 13	376 11	455 0	505 6	374 33	427 0
(4) 16_00028	112	25	504 7	0	502 9	492 1	103	492 5	375 20	377 03	376 99	501 2	65	375 13	495 1
(5) 1609P18LM	499 9	501 0	456 3	502 9	0	455 6	502 8	456 0	375 29	377 06	377 04	25	500 4	375 22	459 2
(6) 1702PP11LM	489 8	490 6	424 0	492 1	455 6	0	492 0	8	374 44	376 09	376 07	453 9	490 6	374 37	104
(7) 1702PP12LM	111	110	506 2	103	502 8	492 0	0	492 4	375 15	377 04	377 00	501 1	118	375 08	495 2
(8) 1702PP18LM	490 2	491 2	424 4	492 5	456 0	8	492 4	0	374 46	376 09	376 07	454 3	491 0	374 39	102
(9) 1705PP02LM	374 96	375 05	374 40	375 20	375 29	374 44	375 15	374 46	0	117 33	117 35	375 14	374 89	29	374 51
(10) 1705PP03LM	376 94	376 98	376 13	377 03	377 06	376 09	377 04	376 09	117 33	0	37	376 95	376 85	117 28	376 15
(11) sam_B989AF5 F	376 90	376 94	376 11	376 99	377 04	376 07	377 00	376 07	117 35	37	0	376 93	376 81	117 30	376 13
(12) FDA00005603	498 2	499 3	455 0	501 2	25	453 9	501 1	454 3	375 14	376 95	376 93	0	498 7	375 07	457 5
(13) FDA00006218	87	46	505 6	65	500 4	490 6	118	491 0	374 89	376 85	376 81	498 7	0	374 82	493 8
(14) sam_2A310D6 8	374 89	374 98	374 33	375 13	375 22	374 37	375 08	374 39	29	117 28	117 30	375 07	374 82	0	374 44
(15) SENASICA_Li _U16	493 0	494 0	427 0	495 1	459 2	104	495 2	102	374 51	376 15	376 13	457 5	493 8	374 44	0
min: 0 max: 37706															

Tabelle A 9

*Identifizierte Replikonsequenzen.*

Replikonsequenz	N	Absoluter Anteil (n=43 Plasmidsequenzen)	Replikon- Gruppe	N	Relativer Anteil (n=22 Isolate)
Col440I	1	2,33 %	Col	2	9 %
Col(BS512)	1	2,33 %			
FIA(pBK30683)	2	4,65 %	IncFI	17	77 %

Replikonsequenz	N	Absoluter Anteil (n=43 Plasmidsequenzen)	Replikon- Gruppe	N	Relativer Anteil (n=22 Isolate)
IncFIA(HI1)	2	4,65 %			
IncFIB(AP001918)	3	6,98 %			
IncFIB(K)	8	18,60 %			
IncFIB(pECLA)	1	2,33 %			
IncFIB(pHCM2)	1	2,33 %			
IncFII	1	2,33 %			
IncFII(K)	7	16,28 %	IncFII	10	45 %
IncFII(pCoo)	1	2,33 %			
IncFII(pECLA)	1	2,33 %			
IncB/O/K/Z	1	2,33 %	IncB/O/K/Z	1	4,5 %
IncHI2	2	4,65 %	IncH	4	18 %
IncHI2A	2	4,65 %			
IncI1	2	4,65 %	IncI1	2	9 %
IncN	3	6,98 %	IncN	3	13,6 %
IncR	3	6,98 %	IncR	3	13,6 %
IncY	1	2,33 %	IncY	1	4,5 %
Alle	43	100 %		43	(2,15 Replikon- Sequenzen pro Isolat)

Tabelle A 10

*Gruppierte Replikonsequenzen.*

Replikonsequenz Zusammenfassung	<i>Enterobacter</i>		<i>Escherichia</i>		<i>Klebsiella</i>	
	N	%	N	%	N	%
Col	0	0 %	2	14 %	0	0 %
IncB/O/K/Z	0	0 %	1	7 %	0	0 %
IncFI	2	40 %	4	29 %	11	46 %
IncFII	1	20 %	2	14 %	7	29 %
IncHI	2	40 %	0	0 %	2	8 %
IncI1	0	0 %	2	14 %	0	0 %
IncN	0	0 %	2	14 %	1	4 %
IncR	0	0 %	0	0 %	3	13 %
IncY	0	0 %	1	7 %	0	0 %



Tabelle A 11

*Repliksequenzen nach Gattung.*

Repliksequenz	<i>Enterobacter</i>		<i>Escherichia</i>		<i>Klebsiella</i>	
	N	%	N	%	N	%
Col440I	0	0 %	1	7 %	0	0 %
Col(BS512)	0	0 %	1	7 %	0	0 %
FIA(pBK30683)	0	0 %	0	0 %	2	8 %
IncB/O/K/Z	0	0 %	1	7 %	0	0 %
IncFIA(HI1)	0	0 %	0	0 %	2	8 %
IncFIB(AP001918)	0	0 %	3	21 %	0	0 %
IncFIB(K)	0	0 %	1	7 %	7	29 %
IncFIB(pECLA)	1	20 %	0	0 %	0	0 %
IncFIB(pHCM2)	1	20 %	0	0 %	0	0 %
IncFII	0	0 %	1	7 %	0	0 %
IncFII(K)	0	0 %	0	0 %	7	29 %
IncFII(pCoo)	0	0 %	1	7 %	0	0 %
IncFII(pECLA)	1	20 %	0	0 %	0	0 %
IncHI2	1	20 %	0	0 %	1	4 %
IncHI2A	1	20 %	0	0 %	1	4 %
IncI1	0	0 %	2	14 %	0	0 %
IncN	0	0 %	2	14 %	1	4 %
IncR	0	0 %	0	0 %	3	13 %
IncY	0	0 %	1	7 %	0	0 %

Tabelle A 12

*Vergleich der Gesamtkeimzahlen des Waschwassers und der gewaschenen Produkte in Verarbeitungsbetrieben mit Literaturangaben.*

Probenpunkt	Produkt	Mittelwert Gesamtkeimzahl log KbE/g bzw. ml	Literatur
Waschwasser	Salatmix	5,7-6	diese Studie
Waschwasser	Endivie	5,3	(Wulfkuehler et al. 2013)
Waschwasser	Eissalat	3,7	(Wulfkuehler et al. 2013)
Waschwasser	Endivie	5,3	(Hägele et al. 2016)
Waschwasser	Eissalat	4,2	(Hägele et al. 2016)

Probenpunkt	Produkt	Mittelwert Gesamtkeimzahl log KbE/g bzw. ml	Literatur
Gewaschen	Gartensalate	5,9	diese Studie
Gewaschen	Zichorien	6,2	diese Studie
Gewaschen	Salatmix	6,6	diese Studie
Gewaschen	Endivie	5,7	(Wulfkuehler et al. 2013)
Gewaschen	Eissalat	4,5	(Wulfkuehler et al. 2013)
Gewaschen	Endivie	6,5	(Hägele et al. 2016)
Gewaschen	Eissalat	5,5	(Hägele et al. 2016)
Gewaschen	Spinat	5,6-5,9	(Rosberg et al. 2021)
Gewaschen	Rucola	4,2-6,1	(Rosberg et al. 2021)

## Eidesstattliche Erklärungen

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig, abgesehen von der Beratung durch den Betreuer und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die Arbeit wurde unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft verfasst. Sie wurde in der vorgelegten oder einer ähnlichen Fassung keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt, wurde nicht veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass mir bisher kein akademischer Grad entzogen wurde.

Kiel, den 30.08.2021

---

Gregor Fiedler

Teile der während dieser Doktorarbeit erzielten Ergebnisse wurden in den folgenden Artikeln und Beiträgen mit Zustimmung des Betreuers veröffentlicht:

Veröffentlichungen (peer-review):

Fiedler G, Kabisch J, Böhnlein C, Huch M, Becker B, Cho GS, Franz CMAP. Presence of human pathogens in produce from retail markets in northern Germany. Foodborne Pathog Dis. 2017 Sep;14(9):502-509. doi: 10.1089/fpd.2016.2258. Epub 2017 Jun 8.

Fiedler G, Brinks E, Böhnlein C, Cho GS, Koberg S, Kabisch J, Franz CMAP. Draft genome sequence of the intimin-positive enteropathogenic *Escherichia albertii* strain MBT-EA1, isolated from lettuce. Genome Announc. 2018 Apr 12;6(15): e00255-18. doi: 10.1128/genomeA.00255-18.

Fiedler G, Schneider C, Igbinosa EO, Kabisch J, Brinks E, Becker B, Stoll DA, Cho GS, Huch M, Franz CMAP. Antibiotics resistance and toxin profiles of *Bacillus cereus*-group isolates from fresh vegetables from German retail markets. BMC Microbiol. 2019 Nov 9;19(1):250. doi: 10.1186/s12866-019-1632-2.

Fiedler G, Kabisch J, Brinks E, Sprotte S, Boehnlein C, Franz CMAP. Complete genome sequence of a Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 Strain (sequence type 21) and two draft genome sequences of *Listeria monocytogenes* strains (clonal complex 1 [CC1] and CC59) isolated from fresh produce in Germany. *Microbiol Resour Announc*. 2020 Dec 3;9(49):e00973-20. doi: 10.1128/MRA.00973-20.

Zeitschriftenartikel und Abschlussberichte (Nicht peer review):

Fiedler G, Kabisch J, Franz CMAP: *Vorkommen und Charakterisierung von humanpathogenen Bakterien in pflanzlichen Erzeugnissen aus Norddeutschland*. 2017. *Journal für Kulturpflanzen*. Vol. 69 (2017), H. 5S. 180-181.

Kabisch J, Fiedler G, Böhnlein C, et al.: *Humanpathogene in der Lebensmittelkette Salat - Ergebnisse einer Betriebsbeobachtung*. 2017. *Journal für Kulturpflanzen*, Vol. 69 (2017), H. 5S. 181.

Kabisch J, Fiedler G, Franz CMAP, Böhnlein C: *Humanpathogene in der Lebensmittelkette Salat: Vorkommen, Eintragswege und Möglichkeiten der Kontrolle mittels Bakteriophagen*; Abschlussbericht für den QS-Wissenschaftsfond Obst, Gemüse und Kartoffeln, 2018; [https://www.q-s.de/services/files/qs-wissenschaftsfonds/Kurzfassung\\_%20Abschlussbericht\\_%20QS\\_%20FINAL.pdf](https://www.q-s.de/services/files/qs-wissenschaftsfonds/Kurzfassung_%20Abschlussbericht_%20QS_%20FINAL.pdf).

Fiedler G, Kabisch J, Franz CMAP, Becker B, Huch M, Kulling S, Stoll D. *Humanpathogene in der pflanzlichen Erzeugung*. Abschlussbericht Oktober 2018; [https://www.mri.bund.de/de/presse/pressemitteilungen/presse-einzelansicht/?tx\\_news\\_pi1%5Bnews%5D=298&cHash=368609b0e6095bd6278ba3b144ddc99d](https://www.mri.bund.de/de/presse/pressemitteilungen/presse-einzelansicht/?tx_news_pi1%5Bnews%5D=298&cHash=368609b0e6095bd6278ba3b144ddc99d).

Poster:

Fiedler G, Böhnlein C, Brinks E, et al.: *A survey of the microbiota associated with ready-to-eat mixed salads from field to retail*. 2018. 26th International ICFMH Conference - FoodMicro 2018, 3-6 September 2018, Berlin.

Vorträge:

Fiedler G, Kabisch J, Böhnlein C, et al.: *Mikrobiologische Qualität von Frischgemüse in Norddeutschland*. 2016. 16. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie der VAAM und DGHM –Stuttgart.

Fiedler G: *Abgepackte Frischsalate: Wie sieht es unter dem Deckel aus?* 2017. Wissenschaftsspaziergänge 2017, Kieler Hochschulen und Forschungszentren stellen sich vor, Kiel.

Fiedler G, Kabisch J, Böhnlein C, Franz CMAP: *Characteristics of ESBL-producing enterobacteria isolated from sprouts*. 2018. 3rd International Workshop on interactions between crop plants and human pathogens, Berlin.

Franz C, Kabisch J, Böhnlein C, Cho GS, Brink E, Fiedler G: *Human pathogens and antibiotic-resistant enterobacteria in fresh produce*. 2018. 3rd International Workshop on interactions between crop plants and human pathogens, Berlin.

Franz C, Kabisch J, Böhnlein C, Cho GS, Brink E, Fiedler G: *Microbiota at different stages of industrial processing of ready-to-eat salad*. 2018. 3rd International Workshop on Interactions between crop plants and human pathogens, Berlin.

Fiedler G, Brinks E, Kabisch J, et al.: *Charakterisierung von ESBL- und AmpC-bildenden Enterobakterien aus frischen, pflanzlichen Produkten*. 2019. 18. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie der VAAM und DGHM; Kiel, Germany; 2019.

Kabisch J, Fiedler G, Brinks E, et al: *Humanpathogene in der Lebensmittelkette Salat - Ergebnisse einer Betriebsbeobachtung* -. 2019. 18. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie der VAAM und DGHM; Kiel, Germany; 2019.

# Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Betreuer Prof. Dr. Charles M.A.P. Franz für sein Vertrauen bei der Überlassung dieses Themas danken. Ohne deine Unterstützung, Ermutigung, Ratschläge und Expertise wäre diese Arbeit nicht entstanden. Die mir anvertrauten Aufgaben und Freiheiten haben maßgeblich zu meiner beruflichen und persönlichen Entwicklung beigetragen.

Auch Frau Prof. Dr. Tal Dagan danke ich herzlich für ihre Unterstützung und die Begutachtung dieser Arbeit.

Ebenso gilt mein aufrichtiger Dank all den Menschen, die mich in der Promotionszeit und bis dahin unterstützt und begleitet haben. Mein besonderer Dank gilt hier der Arbeitsgruppe Pathogene, vor allem Jan, Christina und Philipp für ihre Beständigkeit bei fachlicher und persönlicher Unterstützung und für euer Vertrauen. Außerdem danke ich für die großartige Unterstützung im Labor, vor allem Petra, Katja, Lena, Frauke, Imke, Adrian und Jana ohne deren Hilfe und Zuverlässigkeit wir manche Materialschlacht verloren hätten. Ein besonderer Dank gilt Erik, Natalia, Gesa, Sabrina und Frank für die schöne Zeit, das gemeinsame Voranschreiten und den gesunden humorvollen Ausgleich durch manche Albernheit. Ebenso danke ich den Kolleginnen und Kollegen am Max Rubner-Institut für ihr faires, konstruktives, ehrliches und freundliches Miteinander.

Es gibt viele Menschen, denen ebenfalls mein aufrichtiger Dank dafür gebührt, dass sie mich bis zu dieser Danksagung begleitet haben.

Hier zu nennen sind mindestens Lu, Corny, Kalle, Stophl, Cindy, Antje, Kilian, Jule, Fanz, Felix, Gerrit, Jan und Henny. Tomas und Enrico danke ich gehörig für eure Freundschaft und euer Mentorat. Meinen Brüdern Markus und Cornelius und Familien danke ich herzlich für eure direkte und indirekte Unterstützung in all den Jahren.

Meinen Eltern und Großeltern, die mich immer in jeder erdenklichen Weise unterstützt haben, möchte ich dafür nachdrücklich danken.

Abschließend möchte ich mich besonders bei meiner Frau Sophia und meinem Sohn bedanken, die mir während des Schreibens Rückhalt, Sinn und jegliche Unterstützung gegeben haben. Für eure Entbehrungen bedanke ich mich zutiefst.