

**Abschlussbericht für den
QS-Wissenschaftsfond Obst,
Gemüse und Kartoffeln**

Institut für Mikrobiologie und
Biotechnologie (Kiel)

Arbeitsbereich Lebensmittelinfektions-
und Verderbniserreger

**Humanpathogene
in der Lebens-
mittelkette Salat:**

Vorkommen, Eintragswege
und Möglichkeiten der
Kontrolle mittels
Bakteriophagen

J. Kabisch, G. Fiedler, C. Franz, C. Böhnlein

Inhaltsverzeichnis

1. Hintergrund, Problemstellung und Stand der Forschung	2
2. Ziele des Vorhabens	3
3. Durchführung und Ergebnisse.....	3
3.1 Probennahme auf Handelsebene.....	3
3.2 Probennahme im teilnehmenden Betrieb	6
3.2.1 Betriebsstruktur	6
3.2.2 Probenahme.....	7
3.2.3 Ergebnisse der Betriebsbeprobung	8
3.3 Mikrobiom-Analysen - 16S rRNA Gen Metagenomics	9
3.3.1 Grundlagen	9
3.3.2 Ergebnisse der Mikrobiota-Analysen	12
3.4 Minimierung der Keimbelastungen mittels Bakteriophagen	12
3.4.1 Grundlagen	12
3.4.2 Ergebnisse zur Minimierung der Keimbelastung mittels Bakteriophagen.....	13
4. Schlussbetrachtung aller erzielten Ergebnisse	14
5. Literaturverzeichnis	15

1. Hintergrund, Problemstellung und Stand der Forschung

Gemüse und Obst sind neben Getreideprodukten die mit Abstand wichtigsten Lebensmittel pflanzlichen Ursprungs in Deutschland. Bei Gemüse steht die Tomate mit einem jährlichen Pro-Kopf-Verzehr von 24,8 kg an erster Stelle (BMEL, 2016). Mit einem Pro-Kopf-Verzehr von ca. 4,8 kg / Jahr folgen Schnitt- und Kopfsalate gleich hinter Speisezwiebeln (22 kg) und Möhren (8,9 kg). In den letzten Jahren konnte bei vielen Gemüsesorten insbesondere bei den verzehrfertigen, wie Misch- und Schnittsalaten, eine Zunahme des Verbrauches beobachtet werden (BMEL, 2016). Dies ist zum einen auf eine gesundheitsbewusstere Lebensweise der Verbraucher, zum anderen auf eine verbesserte Lagerung und somit bessere und längere Verfügbarkeit der Produkte zurückzuführen (BMEL, 2016).

Pflanzliche Erzeugnisse können auf verschiedenen Stufen der Lebensmittelkette, vom Anbau über den Transport bis hin zum Privathaushalt mit Bakterien, Viren oder Parasiten in Kontakt kommen. Eine besondere Gefahr geht dabei von Salmonellen, Shigatoxin produzierenden *Escherichia coli* und *Listeria monocytogenes* aus. Alle drei genannten Infektionserreger sind in der Umwelt verbreitet und können dort sehr lange überleben (Avery et al., 2012; Duffy et al., 2014). Salmonellen und Shigatoxin bildende *E. coli* können z.B. durch direkten Kontakt mit Fäkalien/Gülle von infizierten Tieren auf die Anbauflächen gelangen (Gorski et al., 2011; Muniesa et al., 2006). Auch der Bodenbewohner *Listeria monocytogenes* wurde sehr häufig auf Pflanzenteilen nachgewiesen (Wijnands et al., 2014; Settanni et al., 2012). Die Krankheitserreger können auf der Oberfläche von Obst und Gemüse überleben (Wijnands et al., 2014) und durch Verletzung der natürlichen Kutikula, wie z.B. beim Aufschneiden oder weiterer Verarbeitung, von außen in das innere Pflanzengewebe gebracht werden. Daher setzt die Verarbeitung von pflanzlichen Lebensmitteln, die häufig roh verzehrt werden, stets eine sehr gute Hygiene voraus. Die Verarbeitung stellt neben der Primärerzeugung einen kritischen Prozessschritt dar, da die rohen und verzehrfertigen Lebensmittel nach der Verarbeitung in der Regel keiner keimabtötenden Behandlung unterzogen werden. Laut Survstat (RKI, 2014) waren Gemüse/ Gemüseprodukte im Jahr 2014 in 5% der Fälle an bakteriellen, lebensmittelbedingten Ausbrüchen beteiligt. Hier konnten vor allem Salmonellen als ursächlicher Erreger identifiziert werden. In den letzten Jahren gerieten Blattsalate und vorverpackte Schnittsalate international vermehrt in den Fokus von Ausbruchsgeschehen. So konnte ein EHEC-Ausbruch 2013 in Schweden auf grünen Salat zurückgeführt werden (Edelstein et al., 2014). Ein weiterer EHEC-Ausbruch in den USA im Jahr 2011, bei dem 58 Menschen erkrankten, ging ebenfalls auf den Konsum von kontaminiertem Blattsalat zurück (Slayton et al., 2013).

In dem QS-Workshop „Aufkommen von humanpathogenen Keimen bei frischem Obst und Gemüse“ wurden am 15.06.2015 Wissenslücken zu folgenden Themen definiert:

1. Mikrobiologische Belastungen während Ernte, Verarbeitung und Verpackung
2. Eintrag/Verteilung gegebenenfalls vorhandener pathogener Mikroorganismen entlang der Produktkette Gemüse
3. Probennahme/Nachweis von pathogenen Mikroorganismen insbesondere die Unterscheidung zwischen *Bacillus cereus*/ *Bacillus thuringiensis* und präsumptive *Bacillus cereus*
4. Möglichkeiten zur Reduzierung des Eintrages / Bekämpfungsmaßnahmen

Diese wurden zum größten Teil im Rahmen des vorliegenden Projektes bearbeitet.

2. Ziele des Vorhabens

Anhand der publizierten Daten wurde deutlich, dass das Produkt Misch-/Schnittsalat bisher vor allem auf den Ebenen der Produktion und des Handels untersucht wurde (Wood et al., 2015; Mazaheri et al., 2014; Aytac et al., 2010). Eine komplette Abbildung der Produktkette vom Feld bis in den Handel existierte für das Produkt Misch-/Schnittsalat bisher nicht. Eine vollständige Abbildung der Kette ist jedoch wichtig, um die Belastung und den Eintrag von pathogenen Bakterien besser abschätzen zu können und die Wissenslücken zu Eintragswegen von Pathogenen entlang der Produktionskette zu erkennen. Erkenntnisse hierüber sind sehr wertvoll, damit die verarbeitenden Betriebe ihre aufgestellten HACCP-Konzepte überprüfen und gegebenenfalls anpassen können. Des Weiteren war bisher nicht bekannt, ob durch die Verarbeitungsprozesse wie Schneiden und Waschen mikrobielle Gefahren ausreichend reduziert werden, oder ob durch diese Prozessschritte möglicherweise die Gefährdung durch Kreuzkontaminationen für den Verbraucher steigt. Das geförderte Forschungsvorhaben sollte daher Wissenslücken zur Pathogenbelastung und zum Gefährdungspotential des Lebensmittel „Misch/Schnittsalate“ adressieren.

Auch gab es bisher wenig erfolgreiche Methoden/Verfahren zur Minimierung der Keimbelastung für Misch/Schnittsalate. Gängige Verfahren beruhen auf Waschen z.T. mit Zusätzen wie Peressigsäure oder Zitronensäure oder UV-C Bestrahlung der Blattoberflächen bzw. des Waschwassers. Andere Methoden, wie z.B. Dekontamination mittels Bakteriophagen, sind kaum erforscht. Die Überprüfung von Bakteriophagen als „Bio-Control-Tool“, sollte in diesem Forschungsvorhaben erstmalig als Methode zur Reduzierung von pathogenen Bakterien im Waschwasser von Misch-/Schnittsalat evaluiert werden. Damit könnte möglicherweise den verarbeitenden Betrieben neben dem Waschen noch ein weiteres Werkzeug an die Hand gegeben werden, um eine Belastung von Schnitt-/Mischsalaten mit humanpathogenen Bakterien zu reduzieren. Dies wiederum könnte kostenintensive und rufschädigende Rückrufaktionen, sowie Krankheitsfälle durch die Übertragung von pathogenen Mikroorganismen, vermeiden.

3. Durchführung und Ergebnisse

3.1 Probennahme auf Handelsebene

Um einen Überblick über die Belastung von handelsüblichen Mischsalaten zu erhalten, wurde eine Marktanalyse innerhalb der Projektlaufzeit von 2016 bis 2017 durchgeführt und insgesamt 20 Mischsalate und 20 Monoprodukte einer Salatsorte unterschiedlicher Hersteller und Anbieter untersucht.

Die Mischsalate wurden im Handel in Plastikschaalen angeboten und einen Tag vor dem Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums untersucht. Die Zusammensetzung des Salates und der Probencode kann der Tabelle 1 entnommen werden. Für die mikrobiologischen Untersuchungen wurde ausschließlich das pflanzliche Material herangezogen. Die in den Salatschaalen getrennt enthaltenen Dips und tierischen Produkte (Käse, Ei und Fleisch) wurden nicht untersucht.

Tab. 1: Probencode, Salat-Zusammensetzung und Herkunft der untersuchten Mischsalate

Probencode	Salat-Zusammensetzung	Herkunft
HP-MS1	Baby Grünkohl (mind. 40%), Baby-Spinat und Karotten	Deutschland
HP-MS2	Endivie, Weißkohl, Möhren, Radicchio	Deutschland
HP-MS3	Frisee, Feldsalat, Radicchio	Deutschland
HP-MS4	Weißkohl, Rotkohl, Karotten	Deutschland
HP-MS5	Endivien, Weißkohl, Möhren, Radiccio	Deutschland
HP-MS6	Eichblatt grün, Eichblatt rot, Gartensalat grün, Lollo Rosso, Roma rot, Spinat	Deutschland
HP-MS7	Eisbergsalat, Weißkohl, Frisee, Radiccio, Karotten	Deutschland
HP-MS8	Endivie, Weißkraut, Karotte, Radiccio	Deutschland
HP-MS9	Frisee, Karotten, Tomaten, Lollo Rosso, Lollo Biondo, Mais, Kidneybohnen, Radicchio	Deutschland
HP-MS10	Salanova Kopfsalat, ganze rote u grüne Kopfsalatblätter	Deutschland
HP-MS11	Spinat-Mix	Deutschland
HP-MS12	Mesclun, Rucola, roter Mangold	Deutschland
HP-MS13	Endivie, Möhren, Lollo Bionda, Lollo Rosso, Radiccio	Deutschland
HP-MS14	Endivie, Frisee, Radiccio, Weißkohl, Möhren	Deutschland
HP-MS15	Frisee, Feldsalat, Radiccio	Deutschland
HP-MS16	Endivien, Frisee, Radiccio	Deutschland
HP-MS17	Eisberg, Endivien, Weißkraut, Radiccio, Karotte	Deutschland
HP-MS18	Endivien, Frisee, Radiccio	Deutschland
HP-MS19	Feldsalat, Frisee, Endivien, Radiccio, Karotten, Weißkohl, Mais	Deutschland
HP-MS20	Frisee, Karotten, Lollo Rossa, Mais	Dänemark

Parallel zu den Mischsalaten wurden 20 Monoprodukte beprobt. Die Herkunft und die Art der Proben sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Tab. 2: Probenocode, Salat-Art und Herkunft der untersuchten Monoprodukte

Probenocode	Salat-Art	Herkunft
HP-BS1/16	Deutsche Salatherzen	Deutschland
HP-BS2/16	Eisbergsalat	unbekannt
HP-BS3/16	Kopfsalat	Deutschland
HP-BS4/16	Kopfsalat	Holland
HP-BS5/16	Mini Romanasalat	Deutschland
HP-BS6/16	Feldsalat	Frankreich
HP-BS7/16	Rucola	Italien
HP-BS8/16	Baby Spinat	Spanien
HP-BS9/16	Eisbergsalat	Spanien
HP-BS10/16	Sala Rico (Kreuzung Eisberg- u. Römersalat)	Spanien
HP-BS11/16	Rucola	Italien
HP-BS12/16	Feldsalat	Frankreich
HP-BS13/16	Eisbergsalat	Spanien
HP-BS14/16	Rucola	Italien
HP-BS15/16	Rucola	Italien
HP-BS16/16	Feldsalat	Frankreich
HP-BS17/16	Eisbergsalat	Spanien
HP-BS18/16	Kopfsalat	Holland
HP-BS19/16	Rucola	Italien
HP-BS20/16	Eisbergsalat	Portugal

Bei den 20 Mischsalatproben, die aus dem Einzelhandel erworben wurde zeigte sich, dass die meisten Proben (90 %) die bei der DGHM angegeben Richtwerte für die aerobe mesophile Keimzahl von 5×10^7 KbE/g einhielten. Bei 2 Proben (10 %) wurden die Werte vor dem Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums überschritten. Hinsichtlich Schimmelpilze überschritten ebenfalls 2 Proben den Richtwert von 1×10^3 KbE/g, aber nicht den Warnwert von 1×10^4 KbE/g. Parallel zu den Schimmelpilzen wurden auch Hefen analysiert. Hier zeigte, sich dass die Konzentration der Hefen in 11 Proben (55 %) über dem Richtwert von 1×10^5 KbE/g lagen. Da es jedoch für Hefen und die aerobe mesophile Keimzahl keinen Warnwert gibt, wären die Proben verkehrsfähig gewesen. Pathogene Mikroorganismen (Listerien, Salmonellen, STEC) konnten in den Handelsproben nicht nachgewiesen werden. Vergleichbare Ergebnisse wurden für die Monoprodukte erzielt. Vergleicht man diese Ergebnisse mit Daten aus der Überwachung (LAVES, CVUA), so bilden die Ergebnisse gut die Realität im Einzelhandel ab. Ein Nachweis von pathogenen Mikroorganismen ist hier sehr selten und korreliert sehr gut mit Daten von Handelsstudien aus Deutschland und Niederlande, in denen Proben mit Salmonellen nur mit 0,02 % - 1,3 %, *Listeria monocytogenes* 1,1 % - 6,5 % und STEC/EHEC 0,0 % - 0,6 % belastet waren.

3.2 Probennahme im teilnehmenden Betrieb

Parallel zur Status quo Untersuchung auf Handelsebene wurde ein Gemüseverarbeitender Betrieb entlang der Verarbeitungskette in die Untersuchungen mit einbezogen und beprobt. Der Betrieb soll nachfolgend kurz vorgestellt werden.

3.2.1 Betriebsstruktur

Der im Projekt beteiligte Betrieb befindet sich im süddeutschen Raum und kann auf mehr als 100 Jahre Erfahrung in der Landwirtschaft zurückblicken. Die Produkte werden entweder auf eigenen Anbauflächen in Deutschland und Europa angebaut oder von weiteren Erzeugern in Europa zugekauft. Das Unternehmen hat eine Produktionsfläche von ca. 9000 qm und verarbeitet täglich bis zu 120 Tonnen Rohwaren. Zu Spitzenzeiten beschäftigt die Firma in allen Teilen bis zu 900 Mitarbeiter.

Der Betrieb gliedert sich in 5 große Bereiche (siehe Abb. 1.). Zunächst wird die Rohware am Wareneingang (I) in Empfang genommen und qualitativ überprüft. Anschließend wird die Ware im Kühllager (II) bis zur Verarbeitung gelagert. Von dort gelangen die Rohmaterialien in den Vorputzbereich (III) und danach in den davon räumlich getrennten Weißbereich (IV). Der Weißbereich ist dadurch charakterisiert, dass die Ware hier von allen äußeren Verschmutzungen befreit wird und auch die Mitarbeiter aus den „unreinen“ Bereichen (Lager und Vorputz) keinen Zutritt haben. Weiterhin findet hier der Zuschnitt für den Gastrobereich (unterteilt nach Produkten – z.B. Möhren, Tomaten, Paprika etc.) als auch für die Schnitt- und Mischsalaten räumlich getrennt statt. Dem Weißbereich schließt sich am Ende der Verarbeitung die Verpackung und Kommissionierung an (V).

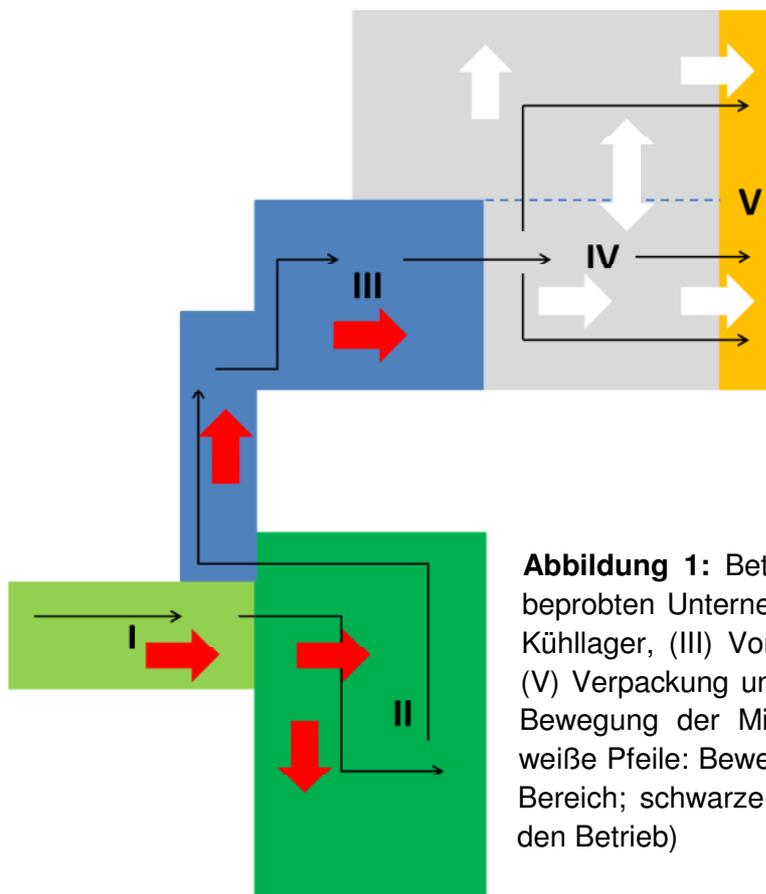


Abbildung 1: Betriebsstruktur- und Grundriss des beprobten Unternehmens mit (I) Wareneingang, (II) Kühllager, (III) Vorputzbereich, (IV) Weißraum und (V) Verpackung und Kommissionierung (rote Pfeile: Bewegung der Mitarbeiter im „Unreinen“ Bereich; weiße Pfeile: Bewegung der Mitarbeiter im „Weißen“ Bereich; schwarze Pfeile: Weg der Rohware durch den Betrieb)

3.2.2 Probenahme

Die Probenahmen im Betrieb fanden an vier unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb eines Jahres am 10.05.2016, 07.07.2016, 14.02.17 und 17.05.2017 statt. In den fünf Bereichen wurden neben den Produktproben auch Abklatschproben von Oberflächen, Tupfer-, Luft- und Wasserproben genommen. Eine genaue Aufstellung der Anzahl der Proben (n=734), sowie der Probenahmeorte ist der Tabelle 3 zu entnehmen. Aufgrund der örtlichen Gegebenheiten wurden der Wareneingang und das Kühllager zu einem Bereich zusammengefasst, da die Produktproben am Wareneingang typischerweise nur wenige Minuten verweilen.

Tab. 3: Ort, Art und Anzahl der Probennahmen im Betrieb

Ort	Probenart	Anzahl [n]	Gegenstände
Wareneingang + Kühllager	Luft	4	Raumluft
	Tupfer	70	Hubwagen, Regale, Holzpaletten, Waage, Rampe, LKW-Wand, Abflussrinne, Fußböden, Transportkisten, Regale, Lagerwand
	Abklatsch	122	Holzpaletten, Treppenaufgang, Waage, Rampe, LKW-Boden, Abflussrinne, Fußböden, Transportkisten
Vorputz	Luft	4	Raumluft
	Tupfer	75	Hubwagen, Holzpaletten, Messerschleifmaschine, Transportbänder, Handschuhe der Mitarbeiter, Schneidwerkzeuge der Mitarbeiter, Schneidebretter, Abflussrinne, Fußböden, Transportkisten, Abfallfließband, Schneidbretter, Transportwagen, Treppenaufgang,
	Abklatsch	129	Waschbecken für Mitarbeiter, Abflussrinne, Fußböden, Transportkisten, Transportbänder, Abfallbänder, Schneidemaschinen
Weißraum	Luft	6	Raumluft Gastrobereich, Raumluft Waschstraße
	Tupfer	94	Waagen, Salatschleuder, Transportbänder, Handschuhe der Mitarbeiter, Schneidwerkzeuge der Mitarbeiter, Schürzen der Mitarbeiter, Schneidebretter, Abflussrinne, Fußböden, Transportkörbe, Metallwannen zur Lagerung von Gemüse, Gully, Schneidemaschine, Mehrkopfabfüller, Computerarbeitsplätze
	Abklatsch	184	Waagen, Edelstahl-Regale, Handschuhe der Mitarbeiter, Schürzen der Mitarbeiter, Schneidebretter, Abflussrinne, Fußböden, Transportkörbe, Metallwannen zur Lagerung von Gemüse, Hubwagen, Schneidemaschine, Mehrkopfabfüller
	Wasser	46	Abwasser Salatschleuder, Abwasser Weißkohlschleuder, Salatwaschbecken Linie 1-4, Eiswasser (manuelle Waschstraße), Trinkwasseranschluss, Wasseranschlüsse zum Spülen und Reinigen der Fußböden

3.2.3 Ergebnisse der Betriebsbeprobung

Die Betriebsbeprobung fand jeweils zweimal in den Jahren 2016 und 2017 statt. Insgesamt wurden 14 Luft-, 239 Tupper-, 46 Wasser- und 435 Abklatschproben analysiert. Dabei wurden äußerst selten pathogene Mikroorganismen nachgewiesen. Ein positiver Nachweis gelang dabei nur nach einem mehrstufigen Anreicherungsverfahren. Dies lässt auf eine sehr niedrige Zahl an pathogenen Bakterien schließen. Pathogene Mikroorganismen wie z.B. *Listeria monocytogenes* sind typische Umweltkeime und werden durch die Rohwaren in den Betrieb eingetragen. Salmonellen und Shigatoxin bildende *E. coli* können z.B. ebenfalls über die Rohwaren in den Verarbeitungsprozess gelangen. Ein völliger Ausschluss dieser Bakterien ist unrealistisch und dem entsprechend sollten die Hygienemaßnahmen im Betrieb darauf ausgerichtet sein, solche Bakterien an eine Vermehrung zu hindern und möglichst durch Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen deutlich zu reduzieren. Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen konnten pathogene Mikroorganismen nur vereinzelt nachgewiesen werden. So wurde *Listeria monocytogenes* in zwei Produktproben (Serovar IVb und IIb) und in vier Tupperproben (Serovar IVb und IIb) detektiert. Des Weiteren wurde in einer Produktprobe ein Shigatoxin produzierender *E. coli* (O146:[H28]) und jeweils in einer Produkt- und Wasserprobe ein enteropathogener *E. coli* (EPEC) O63:H6 und O96:H7 nachgewiesen. Diese sehr niedrigen Nachweisraten korrelieren sehr gut mit den Daten aus Handelsstudien aus Deutschland und Niederlande in denen Proben mit Salmonellen 0,02 % - 1,3 %, *Listeria monocytogenes* 1,1 % - 6,5 % und STEC/VTEC 0,0 % - 0,6 % belastet waren.

Die entlang der Verarbeitungskette untersuchten Proben von Kopfsalaten, Blattsalaten, Schnitt-/Pflücksalaten, Endivie und Zichorie waren alle von guter mikrobiologischer Qualität. Es zeigte sich, dass die Keimzahlen (aerobe mesophile Keimzahl, *Enterobacteriaceae*, Hefen und Schimmelpilze) im Schnitt vor allem nach dem Vorputzbereich sanken. Dies ist auf das Entfernen der äußeren Blätter und auf das Abstreifen von offensichtlichen Verschmutzungen zurückzuführen. Da Produkte, die im Freiland wachsen, durch äußere Einflüsse wie Spritzwasser, Faeces von Vögel und anderen Tieren (Hasen, Rehe, Wildschweine, Waschbären etc.), Staub und anderen Verschmutzungen nicht verschont bleiben, gelangen die auf den Salatköpfen zurückbleibenden Bakterien, Hefen und Schimmelpilze in den Betrieb und müssen dann entfernt werden. Auch Produkte aus Gewächshäusern können, bevor sie in den verarbeitenden Betrieb kommen, verschmutzt werden. Denkbar wären hier verunreinigte Sprinkleranlagen, verunreinigte Transportkisten usw. Daher ist das Entfernen der äußeren Blätter ein sehr wichtiger Schritt für ein hygienisch gutes Produkt.

Bei der Untersuchung der Raumluft fiel vor allem der hohe Anteil an Pseudomonaden im Vorputz- und Weißraumbereich auf. Dies lässt sich jedoch aufgrund der verarbeiteten Produkte mit einer hohen mikrobiellen Besiedlung durch Pseudomonaden und der verwendeten Verfahren (Waschen des Salates mittels turbulenter Strömung) erklären. Dadurch können Pseudomonaden in Folge von Aerosolbildung in die Raumluft gelangen und durch den Betrieb strömen. Daher wird empfohlen, die Luftführung im Betrieb zu überdenken und die entsprechenden Filter regelmäßig zu kontrollieren und gegebenenfalls zu tauschen. Weiterhin fiel durch die Beprobung mittels Abklatschplatten

die hohe mikrobielle Belastung der Oberflächen im Betrieb auf. Diese ist zum einen insbesondere im Lager und im Vorputzbereich auf die Verschmutzung durch Erde von den Produkten, als auch auf Produktreste am Boden zurückzuführen. Im Weißraumbereich war eine optische Verschmutzung durch Erdreste nicht festzustellen. Die konsequente Trennung der unreinen und reinen Bereiche stellte sich als sehr gut dar. Allerdings waren auch hier die Abklatschplatten sehr stark bewachsen. Dies ist vermutlich auf das feuchte Milieu im Weißraum zurückzuführen. In dieser feuchten Umgebung finden Mikroorganismen in Kombination mit Exsudaten aus geschnittenem Gemüse, welche als Nährstoffquelle dienen, gute Vermehrungsbedingungen. Daher ist hier eine sehr gute Reinigung und effektive Desinfektion unter Berücksichtigung eines Wechsels der Reinigungs- und Desinfektionsmittel nach Schichtende zu empfehlen. Bei den Analysen der Wasserproben zeigte sich, dass nur sehr selten pathogene Mikroorganismen nachgewiesen werden konnten. Dies korreliert auch sehr gut mit den geringen Nachweisen von pathogenen Mikroorganismen aus den Produktproben im Betrieb. Weiterhin wurde überprüft, inwiefern sich die Keimzahlen in den Waschbecken über eine längere Zeit verändern. Hier konnte beobachtet werden, dass die Becken, insbesondere wenn mehrere Salatsorten gewaschen werden (Pariser-Linie), eine sehr stabile Mikrobiota aufweisen. Bei der Beprobung der Endivien-Linie, bei der über einen längeren Zeitraum nur ein Produkt verarbeitet wurde, zeigten sich deutlich größere Schwankungen der Keimzahl. Ob dies eine Momentaufnahme war oder tatsächlich den Bedingungen entspricht, sollte in weiteren Untersuchungen statistisch abgesichert werden. Da die Erfassung der kultivierbaren Mikroorganismen aufgrund der verwendeten Nährböden immer stark limitiert ist, wurden in weiteren Versuchen kulturunabhängige Verfahren herangezogen, um bessere Aussagen zur Zusammensetzung der Mikrobiota zu erhalten.

3.3 Mikrobiom-Analysen - 16S rRNA Gen Metagenomics

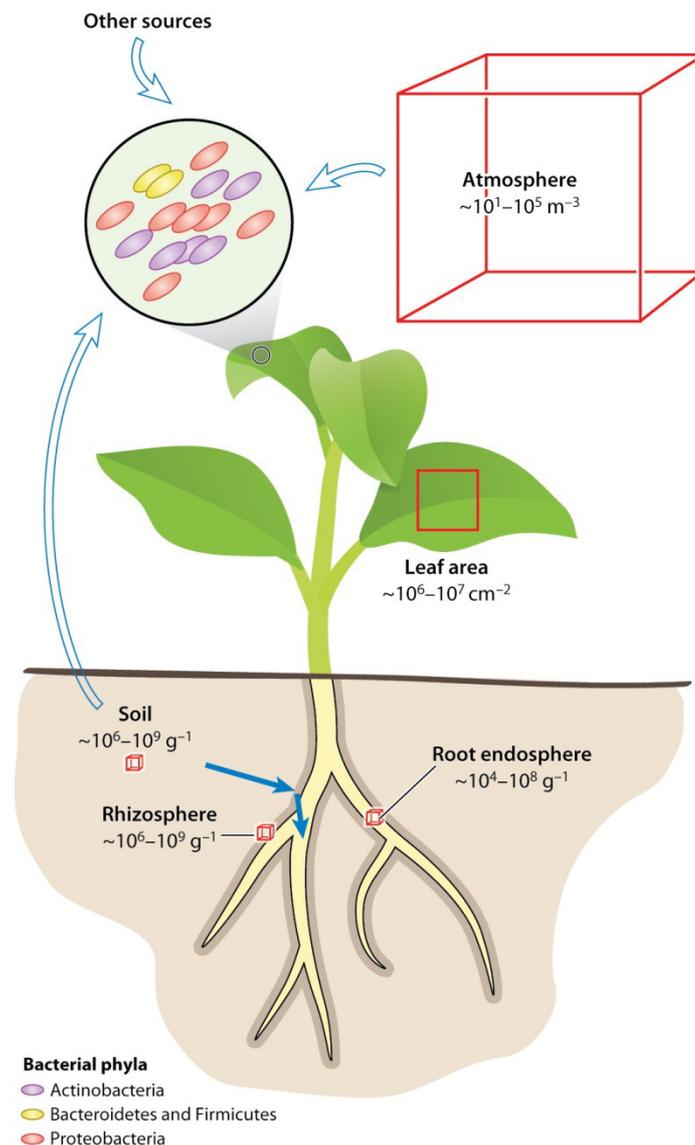
3.3.1 Grundlagen

Traditionell werden bakterielle Gemeinschaften über kulturelle Verfahren (kulturabhängige Verfahren) im Labor angezüchtet und identifiziert. Dabei dienen die Zusammensetzung des Nährbodens und die simulierten Umweltbedingungen (Temperatur, Luftzusammensetzung) einer nicht selektiven oder selektiven Anzucht von Mikroorganismen. So werden beispielsweise auf dem nicht selektiven „Plate Count Agar“ alle aeroben, mesophilen Mikroorganismen angezogen und zur Berechnung der Gesamtkeimzahl verwendet. Andererseits wird für den spezifischen Nachweis des pathogenen Bakteriums *Listeria monocytogenes* ein selektiver Agar nach Ottaviani & Agosti verwendet (ALOA) der grundsätzlich nur das Wachstum von *Listeria* erlaubt und pathogene Vertreter von apathogenen Listerien durch Eintrübung des Mediums unterscheidbar macht. Dabei wird aber bei nicht selektiven Nährböden allgemein angenommen, dass bis zu 99 % der Mikroorganismen nicht kultivierbar sind, da die benötigten Umweltbedingungen im Labor nicht simuliert werden können (Hugenholtz, 2002). Zusätzlich besitzen viele Bakterien, unter erhöhtem Umweltstress, spezielle Überlebensstrategien. Sie können durch physiologische Anpassung eine lebende, aber nicht kultivierbare Form (viable but non-culturable (VBNC)) annehmen und längere Zeit in diesem Zustand überdauern (Oliver, 2010). Dadurch ist es auf

dem traditionellen, kulturabhängigen Analyseweg nahezu unmöglich, die Artengemeinschaft der Bakterien umfassend zu bestimmen.

Erst durch die Etablierung von Next-Generation Sequencing (NGS) wurde eine realitätsnahe Analyse von komplexen bakteriellen Gemeinschaften ermöglicht. Dafür wird im ersten Schritt die gesamte DNA aus den Proben extrahiert, die vorhandenen 16S-rRNA Gensequenzen zur Bestimmung der vorkommenden Bakterienarten amplifiziert, um diese im Anschluss zu sequenzieren und für die Biodiversitätsuntersuchungen auszuwerten. Diese kulturunabhängigen Analysen sind jedoch mit relativ hohen Kosten und zeitaufwändiger Auswertung verbunden.

Für pflanzliche Produkte wurde seit Einführung der NGS-Methoden nur eine überschaubare Anzahl von Studien veröffentlicht. So haben Leff und Fierer (2013) verschiedene Produkte (Sprossen, Spinat, Blattsalat, Tomaten, Pfeffer, Erdbeeren, Äpfel, Pfirsich, Trauben und Pilze) mittels Pyrosequenzierung untersucht und grundlegende Daten zu pflanzlichen Lebensmitteln erhoben. Dabei wurden primär produktabhängige Unterschiede in den bakteriellen Gemeinschaften ermittelt. Auffällig waren vor allem die hohen Anteile an *Enterobacteriales* Sequenzen bei Sprossen, Spinat, Blattsalat, Tomaten, Pfeffer, Erdbeeren. Da diese Ordnung eine Vielzahl von pathogenen Vertretern wie *Salmonella* und enterohämorrhagische *Escherichia coli* beinhaltet, besitzen *Enterobacteriaceae* eine besondere Bedeutung bei der Sequenzauswertung (Berg et al., 2014). Jedoch ist auch die grundlegende Zusammensetzung auf der Phyllosphäre (Oberflächen der Blattbereiche) von Interesse, um die natürliche Besiedlung und deren Interaktion mit der Pflanze abzuschätzen. Abhängig vom untersuchten Produkt, Herkunft und Untersuchungsmethode unterscheiden sich die abundantesten Vertreter der Phyla *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* und *Proteobacteria*, wobei Proteobakterien grundsätzlich den größten Anteil bilden. Aus der Literatur wurden positive Wachstumseffekte auf die Pflanze durch *Alphaproteobacteria* (*Sphingomonadaceae* und *Rhizobiaceae*), *Betaproteobacteria* (*Oxalobacteraceae*, *Comamonadaceae*), *Gammaproteobacteria* (*Pseudomonadaceae*) nachgewiesen. Auch bei *Actinobacteria* (*Actinomycetales*) und *Bacteroidetes* (*Flavobacteriaceae*) sind symbiotische Interaktionen bekannt (Berg et al., 2014, Bulgarelli et al., 2013, Müller et al., 2016). Meist wurden die bakteriellen Interaktionen an der Rhizosphäre (Wurzelbereich) untersucht, wobei diese stark von der Mikrobiota des Bodens abhängig sind. Und wiederum die bakterielle Mikrobiota der Phyllosphäre (Blätter) in direkter Abhängigkeit von Rhizosphäre und Boden steht (vgl. Abb. 2), sodass diese Bakterien allgemein als wichtige Indikatoren für eine gesunde Pflanze anzusehen sind.



 Bulgarelli D, et al. 2013.
Annu. Rev. Plant Biol. 64:807–38

Abbildung 2: Anteil und Verteilung der Mikrobiota an der Rhizosphäre, im Boden und an der Pflanze nach (Bulgarelli et al., 2013)

Kontaminationen der Produkte können auf allen Ebenen, vom Feld bis hin zur Verpackung auftreten und wurden unter anderem von Jung et al. (2014) zusammengefasst. Dabei spielt das Waschwasser eine entscheidende Rolle als potentieller Eintrags- und Verteilungsweg von pathogenen Mikroorganismen (Jensen et al., 2015). Kulturunabhängige Untersuchungen zu mikrobiellen Gemeinschaften in Waschwasser und verzehrfertigen, geschnittenen Salaten sind zum momentanen Zeitpunkt nicht bekannt. Daher wurde der Fokus der 16S rRNA Gen-Metagenomics auf das Waschwasser in der Waschstraße gelegt.

Außerdem wurden Romana-Salat, Endivie und Lollo Bionda jeweils vom Feld, Kühllager, Vorputzbereich und als geschnittenes und gewaschenes Endprodukt untersucht. Diese Produkte wurden auch während der Probennahme in der Waschstraße verarbeitet.

Zusätzlich wurde das Schleuderwasser der Waschstraße und das Wasser der Weißkohlschleuder beprobt. Dadurch wurde die natürlich vorkommende Biodiversität (unabhängig der Kultivierbarkeit) durch Sequenzierung nahezu aller in den Produktproben und der Wasserproben vorkommender Bakterien-16S-rRNA Gensequenzen bestimmt.

3.3.2 Ergebnisse der Mikrobiota-Analysen

Anhand der Mikrobiom-Analysen zeigte sich eine produktspezifische Mikrobiota. Diese war für die untersuchten Produkte kennzeichnend. Des Weiteren konnte bei der Mikrobiota-Analyse entlang der Verarbeitungskette vom Feld zum Endprodukt eine Veränderung der Zusammensetzung festgestellt werden. Während die Zusammensetzung auf dem Feld sehr heterogen war, konnte im Endprodukt bei Romana-Salat, Endivie und Lollo Bionda eine deutlich homogenere Zusammensetzung der Familien/Gattungen, insbesondere bei den *Enterobacteriaceae*, verzeichnet werden.

Die Mikrobiota des pflanzlichen Rohstoffes nimmt somit nur einen sehr begrenzten Einfluss auf die Mikrobiota des geschnittenen und gewaschenen Salat. Die abundantesten Gattungen im Endprodukt sind somit abhängig von der Mikrobiota des Waschwassers und zeigen deutliche Unterschiede zur ursprünglichen produktspezifischen Mikrobiota. Im Gegensatz dazu hängt die Zusammensetzung der Enterobakterien deutlich von der produktspezifischen Mikrobiota ab und bleibt über die verschiedenen Produktionsschritte bis zum Endprodukt erhalten. Somit könnte postuliert werden, dass eine Übertragung von pathogenen Enterobakterien in hohen Konzentrationen zwischen den Produkten durch das Waschwasser demnach weniger wahrscheinlich ist, als eine unzureichende Verringerung von vorhandenen, produktspezifischen Pathogenen durch den Waschprozess. Eine grundlegende Schlussfolgerung ist jedoch durch die Untersuchung nur eines Betriebs nur limitiert möglich. Hinsichtlich der Verderbsproblematik bei frischen, rohen und geschnittenen Salat konnte festgestellt werden, dass vermutlich Bakterien der Familie der *Pseudomonadaceae* beteiligt sind. Diese zeigten unter den gekühlten Bedingungen die größte Zunahme vom Vorputz zum Endprodukt. Dieses Ergebnis korreliert auch sehr gut mit den durchgeführten Begleituntersuchungen im Betrieb. So konnten in der Raumluft vor allem Pseudomonaden nachgewiesen werden. Des Weiteren waren Bakterien dieser Gattung auch in hohen Konzentrationen in den zuvor schon untersuchten Handelsproben enthalten.

3.4 Minimierung der Keimbelastungen mittels Bakteriophagen

3.4.1 Grundlagen

Eine Kreuz-/Kontamination von Salat ist grundsätzlich auf allen Ebenen der Produktion möglich, jedoch ist eine Verteilung von pathogenen Mikroorganismen durch den Waschschrift besonders wahrscheinlich und dann auch effektiv (Olaimat und Holley, 2012, Jensen et al., 2015). Trotz Verbesserungen in der Wasseraufbereitung (Filtration,

Wasserwechsel etc.) würde ein Eintrag pathogener Mikroorganismen in der Waschstraße nur langsam ausgedünnt werden und einige hundert Kilogramm pflanzlicher Frischeprodukte könnten kontaminiert werden (Jung et al., 2014). Eine Vielzahl technischer, rechtlicher und ökonomischer Gründe verhindert eine schnelle, effektive Reduktion von Bakterien im Waschwasser (Holvoet et al., 2012). Auch ist fraglich, ob eine starke Reduktion der oberflächlichen Bakterien auf geschnittenen Salat den gewünschten, risikominimierenden Effekt hat. Da apathogene wie pathogene Bakterien einen deutlichen Wachstumsvorteil bei fehlender Konkurrenz besitzen und unter günstigen Umweltbedingungen alle verfügbaren Nährstoffe zur Verfügung hätten.

Ein neuer technologischer Ansatz ist die zielgerichtete Reduktion von pathogenen Mikroorganismen durch Bakteriophagen. Dabei nutzt man das enge Wirtsspektrum von Bakteriophagen, um gezielt Listerien, Salmonellen oder krankmachende Varianten von *Escherichia coli* abzutöten. Von der potentiellen Wirksamkeit zeugen die Zulassungen der kommerziellen Mittel „ListShield“ und „Listex P100“ auf dem US-Markt.

3.4.2 Ergebnisse zur Minimierung der Keimbelastung mittels Bakteriophagen

In den Untersuchungen zeigte sich, dass die Reduktion der Salmonellen vor allem auf das Waschen zurückzuführen ist (ca. 86 %). Weitere 10 % der Salmonellen wurden durch die Applikation des Phagen reduziert. Somit war im ausgewählten Versuchsaufbau die Applikation des Phagen als biologisches Agens im Waschwasser nur zu einem geringen Maß erfolgreich, da zum einen relativ große Mengen an Phagen eingesetzt werden mussten, was technologisch schwierig ist und zum anderen zeigte sich in den Status quo Erhebungen, dass nur ein sehr geringer Anteil der Rohware mit pathogenen Bakterien belastet ist. Somit stellt sich die Frage der Wirtschaftlichkeit für diese Applikation mit dem gewählten Versuchsaufbau in Hinblick auf ihren Nutzen.

Aus der Literatur sind höhere Reduktionsraten bekannt, wobei die verwendeten Methoden nur schwer vergleichbar sind (Sharma, 2013). Als Ursachen kommen einige Faktoren in Betracht. Die niedrigen Temperaturen können einen negativen Einfluss auf die Phagenadsorption an die Bakterienoberfläche gehabt haben. Weiterhin wäre eine zu geringe lytische Aktivität des Phagens unter diesen Bedingungen möglich. Die Kinetik der bakteriellen Lyse durch den Phagen SZ sollte daher in weiteren Untersuchungen näher charakterisiert werden, um die geringe Reduktion besser einordnen zu können. Für zukünftige Anwendungen/Überprüfungen wird daher eine weitere Methode zur Reduktion von pathogenen Mikroorganismen durch Phagen empfohlen. Das Versprühen der Phagen als Aerosolnebel wäre eine gute Alternative zum Tauchbad. Bei dieser Methode wird im Vergleich eine verhältnismäßig hohe Konzentration von Phagen verteilt. Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens ist, dass die benötigte Phagenanzahl bedeutend geringer ist als beim Tauchbad. Somit erscheint aus ökonomischen Gründen diese weitere Methode empfehlenswert und sollte wissenschaftlich in Hinblick auf eine Anwendung im Salatproduzierenden Betrieb überprüft werden.

4. Schlussbetrachtung aller erzielten Ergebnisse

Fast man alle Untersuchungen zusammen, so kann festgestellt werden, dass der Eintrag von pathogenen Mikroorganismen in das Produkt Schnitt-/Mischsalat sehr selten stattfindet. Dies kann sowohl über die Rohware als aber auch durch Produktionsprozesse im Betrieb (z.B. kontaminierte Transportbänder, Waschwasser) erfolgen. Ein Ausschluss des Eintrages von Pathogenen in die Verarbeitungskette kann somit nicht ausgeschlossen werden und daher bedarf es einer konsequenten und durchdachten Reinigung und Desinfektion, um den Druck auf die pathogenen Bakterien aufrecht zu erhalten und eine Besiedlung des Betriebes in Form von Biofilmen zu verhindern.

Die untersuchten Proben auf Handelsebene wiesen zum Untersuchungszeitpunkt (1 Tag vor MHD) eine gute mikrobiologische Qualität auf. Anhand der Mikrobiom-Analysen zeigte sich eine produktspezifische Mikrobiota. Diese war für die jeweiligen untersuchten Produkte gekennzeichnet. Des Weiteren konnte bei der Mikrobiota-Analyse entlang der Verarbeitungskette vom Feld zum Endprodukt eine Veränderung der Zusammensetzung der Mikrobiota festgestellt werden. Zusammenfassend lässt sich hier feststellen, dass die Mikrobiota des pflanzlichen Rohstoffes nur einen sehr begrenzten Einfluss auf die Mikrobiota des geschnittenen und gewaschenen Salat hat. Hier zeigte sich, dass die Mikrobiota-Zusammensetzung des Waschwassers eine viel größere Bedeutung für die Besiedlung des Endproduktes hatte. Hierin liegt aber auch eine Chance, da die Bakterien, die über den Waschprozess eingetragen werden, somit als eine Art „protektive Mikrobiota“ auf dem Produkt wirken und mögliche fakultative pathogene oder pathogene Mikroorganismen aufgrund der Konkurrenzsituation am Wachstum hindern könnten.

In den Arbeiten im Betrieb und bei der Analyse der Endprodukte zeigte sich, dass vor allem Pseudomonaden ein Problem darstellen. Pseudomonaden können sich zumeist auch unter Kühltemperaturen vermehren und so unter Umständen zu einem vorzeitigen Verderb des Schnitt-/Mischsalates führen. Diese Problematik sollte in Zukunft näher untersucht werden.

Im Rahmen der Untersuchungen wurde auch überprüft inwiefern pathogene Mikroorganismen durch den Einsatz von Bakteriophagen abgetötet werden können. In den Untersuchungen zeigte sich, dass durch die Applikation des eingesetzten Phagen, die Salmonellen nur um 10 % reduziert wurden. Somit ist im ausgewählten Versuchsaufbau die Applikation des Phagen als biologisches Agens im Waschwasser nicht zielführend, da zum einen relativ große Mengen an Phagen eingesetzt werden müssen, was technologisch schwierig ist und zum anderen zeigte sich in den Status quo Erhebungen, dass nur ein sehr geringer Anteil der Rohware mit pathogenen Bakterien belastet ist. Somit stellt sich die Frage der Wirtschaftlichkeit für diese Applikation in Hinblick auf ihren Nutzen. Für zukünftige Anwendungen/Überprüfungen wird daher eine weitere Methode zur Reduktion von unerwünschten Mikroorganismen durch Phagen empfohlen. Das Versprühen der Phagen als Aerosolnebel wäre eine gute Alternative zum Tauchbad. Bei dieser Methode wird im Vergleich eine verhältnismäßig hohe Konzentration von Phagen verteilt. Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens ist, dass die benötigte Phagenanzahl bedeutend geringer ist als beim Tauchbad. Somit erscheint aus ökonomischen Gründen diese weitere Methode empfehlenswert und sollte wissenschaftlich in Hinblick auf eine Anwendung im Salatproduzierenden Betrieb überprüft werden. Insbesondere würde sich diese Methode für Mikroorganismen anbieten, welche am mikrobiellen Verderb beteiligt sind (z.B. Pseudomonaden). Hier bedarf es aber weiterer Forschung, gerade in Hinblick auf die Zusammensetzung eines Phagencocktails mit einem breiten Wirkungsspektrum gegen möglichst viele Pseudomonaden.

5. Literaturverzeichnis

Avery, L.M.; Booth, P.; Campbell, C.; Tompkins, D.; Hough, R.L. (2012). Prevalence and survival of potential pathogens in source-segregated green waste compost; *Science of the total environment*, 431, pp: 128-138

Aytac, S.A.; Ben, U.; Cengiz, C.; Taban, B.M. (2010). Evaluation of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* contamination on leafy green vegetables; *Journal of Food Agriculture and Environment*, 8 (2), pp: 275-279

Berg, G.; Erlacher, A.; Smalla, K.; Krause, R. (2014). Vegetable microbiomes: is there a connection among opportunistic infections, human health and our 'gut feeling?'; *Microbial Biotechnology*, 7 (6), pp: 487-495

BMEL (2016). https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Broschueren/Landwirtschaft-verstehen.pdf?__blob=publicationFile

Bulgarelli, D.; Schlaeppli, K.; Spaepen, S.; van Themaat, E.V.L.; Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants; *Annual Review of Plant Biology*, 64, pp: 807-838

Duffy, G.; Burgess, C.M.; Bolton, D.J., (2014). A review of factors that affect transmission and survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in the European farm to fork beef chain; *Meat Science*, 97 (3), pp: 375-383

Edelstein, M.; Sundborger, C.; Hergens, M.-P.; Ivarsson, S.; Dryselius, R.; Insulander, M.; Jernberg, C.; Hutin, Y.; Wallensten, A. (2014). Barriers to Trace-back in a Salad-associated EHEC Outbreak, Sweden, June 2013; *Plos current outbreaks*, PMC4055603

Gorski, L.; Parker, C.T.; Liang, A.; Cooley, M.B.; Jay-Russell, M.T.; Gordus, A.G.; Atwill, E.R.; Mandrell, R.E. (2011). Prevalence, Distribution, and Diversity of *Salmonella enterica* in a Major Produce Region of California; *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (8), pp: 2734-2748

Hugenholtz, P. (2002). Exploring prokaryotic diversity in the genomic era; *Genome biology* 3 (2), REVIEWS0003.

Leff, J.W.; Fierer, N. (2013). Bacterial Communities Associated with the Surfaces of Fresh Fruits and Vegetables; *Plos One*, 8 (3), e59310

Jensen, D.A.; Friedrich, L.M.; Harris, L.J.; Danyluk, M.D.; Schaffner, D.W., (2015). Cross contamination of *Escherichia coli* O157:H7 between lettuce and wash water during home-scale washing; *Food Microbiology*, 46, pp: 428-433

Jung, Y.J.; Jang, H.; Matthews, K.R. (2014). Effect of the food production chain from farm practices to vegetable processing on outbreak incidence; *Microbial Biotechnology*, 7 (6), pp: 517-527

Mazaheri, S.; Ahrabi, S.S.; Aslani, M.M. (2014). Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* isolated from lettuce samples in Tehran, Iran; *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7 (11), e12346

Mueller, G.; Horstmeyer, L.; Ronneburg, T.; van Kleunen, M.; Dawson, W. (2016). Alien and native plant establishment in grassland communities is more strongly affected by disturbance than above- and below-ground enemies; *Journal of Ecology*, 104 (5), pp: 1233-1242

Muniesa, M.; Jofre, J.; Garcia-Aljaro, C.; Blanch, A.R. (2006). Occurrence of *Escherichia coli* O157: H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the environment; *Environmental Science and Technology*, 40 (23), pp: 7141-7149

Oliver, J.D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria; *Fems Microbiology Reviews*, 34 (4), pp: 415-425

Settanni, L.; Miceli, A.; Francesca, N.; Moschetti, G. (2012). Investigation of the hygienic safety of aromatic plants cultivated in soil contaminated with *Listeria monocytogenes*; *Food Control*, 26 (2), pp: 213-219

Slayton, R.B.; Turabelidze, G.; Bennett, S.D.; Schwensohn, C.A.; Yaffee, A.Q.; Khan, F.; Butler, C.; Trees, E.; Ayers, T.L.; Davis, M.L. (2013). Outbreak of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) O157:H7 Associated with Romaine Lettuce Consumption, 2011; *Plos One*, 8 (2), pp: e55300

RKI (2014). <https://survstat.rki.de/>

Wijnands, L.M.; Delfgou-van Asch, E.H.M.; Beerepoot-Mensink, M.E.; van der Meij-Florijn, A.; Fitz-James, I.; van Leusden, F.M.; Pielaat, A. (2014). Prevalence and concentration of bacterial pathogens in raw produce and minimally processed packaged salads produced in and for The Netherlands; *Journal of Food Protection*, 77 (3), pp: 388-394

Wood, J.L.; Chen, J.C.; Friesen, E.; Delaquis, P.; Allen, K.J. (2015). Microbiological Survey of Locally Grown Lettuce Sold at Farmers' Markets in Vancouver, British Columbia, *Journal of Food Protection*, 78 (1), pp: 203-208

**Wir danken dem QS-Wissenschaftsfonds Obst, Gemüse und Kartoffeln
für die finanzielle Unterstützung des Projektes.**