

Aus dem Department für Nutztiere und
öffentliche Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin
der Veterinärmedizinischen Universität Wien
(Departmentssprecher: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Michael HESS)
Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie
und öffentliche Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin
Abteilung für Lebensmittelkrobiologie

**Mikrobiologische Qualität von verzehrfertigen Salaten vom
Verarbeitungsbetrieb bis zum Verbraucherlevel**

DIPLOMARBEIT

Zur Erlangung der Würde einer
MAGISTRA MEDICINAE VETERINARIAE
der Veterinärmedizinischen Universität

vorgelegt von

Irene Brunner

Wien, im April 2022

Betreuer/in

Dr. med. vet. Beatrix Stessl

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin der
Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und öffentliches
Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin, Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie

Begutachter/in

Dr.rer.nat. Tom Grunert

Department für Pathobiologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Mikrobiologie, Abteilung für funktionelle Mikrobiologie

ABKÜRZUNGEN

%	Prozent	HACCP	Hazard Analysis Critical Control Point
+	Plus	HBL	Hämolsin BL
°C	Grad Celsius	HCL	Chlorwasserstoff
µg	Mikrogramm	HF	Halbfraser inkl. Supplamente
µl	Mikroliter	HUS	hämolysisch urämisches Syndrom
Abs	Absatz	IFS	International Food Standard
AFF	Adhärenzfimbrien	ISO	International Organization for Standardization
AGES	Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	KBE	Kolonie bildende Einheit(en)
AICR	American Institute for Cancer Research	KBE/g	Kolonie bildende Einheiten pro Gramm
Aloa	Brilliance™ Listeria Agar	kg	Kilogramm
AMA	Agra Markt Austria	L	Lecithin
AMC	aerobe mesophile Gesamtkeimzahl	LAB	Milchsäurebakterien
API	Analytical Profile Index	Lis.	Listerien
APT	All Purpose Tween	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Art.	Artikel	LMSB	Lebensmittelsicherheitsbericht
B.	<i>Bacillus</i>	LMSVG	Lebensmittelsicherheits- und Verbraucherschutzgesetz
<i>B.</i> <i>cereus</i>	<i>Bacillus cereus sensu stricto</i>	M	Mannitol
s. s.			
B.c.	<i>Bacillus cereus</i>	MHD	Mindesthaltbarkeitsdatum
BCG	<i>Bacillus cereus</i> Gruppe	min	Minuten
BHI	Brain Heart Infusion	MKTTN	Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin Broth
BIOHAZ	Biological Hazards	ml	Milliliter
BPW	Gepuffertes Peptonwasser	MYP	Mannitol Eigelb Polymyxin
bzw.	beziehungsweise	N ₂	Stickstoff
CDC	Center for Disease Control and Prevention	NHE	nicht-hämolsierendes Enterotoxin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	O ₂	Sauerstoff
CFU	colony-forming unit	ÖGE	Österreichische Gesellschaft für Ernährung
d	Tag	PCPLC	Phosphatidylcholin-Phospholipase C
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung	PCR	Polymerase Chain Reaction
DGHM	Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie	pH	PH-Wert
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PIPLC	Phosphatidylinositol-Phospholipase C
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>	PS	<i>Pseudomonas</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	RASFF	Rapid Alert System for Food and Feed
e.g.	exempli gratia	RTE	Ready to eat
EAEC	enteroaggregative <i>Escherichia coli</i>	RT-PCR	Real-time polymerase chain reaction
EAST	Enterotoaggregative <i>Escherichia coli</i> heat-stable enterotoxin	RVS	Rappaport-Vassiliadis-Salmonella
EB	<i>Enterobacteriaceae</i>	S.	<i>Staphylococcus</i>
EHEC	enterohäorrhagische <i>Escherichia coli</i>	Sal.	Salmonellen
EIEC	enteroinvasiver <i>Escherichia coli</i>	sek	Sekunden
EntFM	Entertoxin FM	spp.	species pluralis

ABKÜRZUNGEN

EPEC	enteropathogener <i>Escherichia coli</i>	STEC	shigatoxin-bildende <i>E. coli</i>
etc	et cetera	Stx	Shigatoxin
ETEC	enterotoxischer <i>Escherichia coli</i>	TSA-Y	Trypton-Soja mit 6 % Hefe
EU	Europäische Union	tw	teilweise
F	Vollfraser	v.a.	vor allem
FAO	The Food and Agriculture Organization	VD	Verdünnungsstufe
FDA	US Food and Drug Administration	VF	Vollfraser inkl. Supplementen
FoodNet	FoodNet Active Surveillance Network	VO	Verordnung
frakt.	fraktionierter	VRBD	Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose
g	Gramm	WCRF	World Cancer Research Fund
GAP	<i>gute landwirtschaftliche Praktiken</i>	WHO	World Health Organisation
GI	<i>Genotyp</i>	XLD	Xylose-Lysin-Desoxycholat
GKZ	Gesamtkeimzahl	z.B.	Zum Beispiel
GHP	Gute Herstellungspraxis		
h	Stunde(n)		
H ₂ S	Schwefelwasserstoff		

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Dr. med. vet. Beatrix Stessl für die Betreuung meiner Diplomarbeit herzlich bedanken.

Danken möchte ich auch allen Personen, die mich tatkräftig im Labor unterstützt haben.

Weiters möchte ich mich bei meiner Familie für die Geduld und Unterstützung während des ganzen Studiums und des Schreibens dieser Diplomarbeit bedanken. Im Speziellen bei Christian Lutz und Birgid Reimer, die diese Arbeit Korrektur gelesen haben.

Für die Hilfestellungen bei der technischen Betreuung der Datenverarbeitung und bei fachlichen Fragen bzgl. Microsoft Word und Excel danke ich Dr. Leopold Sauermann.

Ohne die Hilfe dieser Personen wäre es mir nicht möglich gewesen, diese Diplomarbeit fertigzustellen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	8
1.1	Salate - ernährungsrelevanter Hintergrund.....	8
1.2	Ausbrüche assoziiert mit Fertigsalaten.....	10
1.3	Lebensmittelmikrobiologie	13
1.3.1	Lebensmittelverderb.....	13
1.3.2	Verderb von pflanzlichen Lebensmitteln.....	14
1.3.3	Mögliche Kontaminationsquellen und – wege bei der Herstellung von Blattsalaten.....	14
1.3.4	Mögliche Kontaminationsquellen und – wege von Mischsalaten.....	17
1.3.5	Mikroorganismen in Lebensmittel	17
1.4	Gesetzliche Grundlagen.....	28
1.5	Lebensmittelqualität und Sicherheit.....	29
1.5.1	Mikrobiologische Kriterien, Richt- und Warnwerte	31
1.5.2	Mikrobiologische Kriterien für Lebensmitteln	31
1.5.3	Lebensmittelsicherheitskriterien	31
1.5.4	Prozesshygienekriterien	322
1.5.5	Mikrobiologische Richt- und Warnwerte	32
1.6	Ziel der Studie	33
1.6.1	Hypothese.....	34
2	Material und Methodik	35
2.1	Geräte und Material.....	35
2.2	Untersuchungsmaterial	35
2.1	Rohstoffe, Fertigsalate und Dressing	35
2.2	Probenansatz und mikrobiologische Untersuchung	37
2.3	Isolierung von Mikroorganismen und Gewinnung von Reinkulturen.....	42
2.4	Kryokonservierung von Reinkulturen.....	43
2.5	Bestätigung von Reinkulturen.....	43
3	Resultate	45

3.1	Probencharakteristika und Hygieneindikatoren.....	45
3.2	Nachweis von lebensmittelpathogenen Keimen	49
3.3	Identifizierung von hoch abundanten Bakterienspezies	49
4	Diskussion	53
5	Literaturverzeichnis.....	58
6	Zusammenfassung	65
7	Extended Summary	67
8	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	68
9	Appendix	69

1 Einleitung

1.1 Salate - ernährungsrelevanter Hintergrund

Obst und Gemüse bilden mit ihren wertvollen Inhaltsstoffen und ihrem Gesundungspotenzial das Fundament einer gesunden und ausgewogenen Ernährung. Als Kost mit geringer Energiedichte, aber mit hohem Nährstoffgehalt, tragen sie als energieärmste Lebensmittel nicht nur zu einer gesunden Ernährungsweise bei, sondern können auch das Risiko von ernährungsbedingten Krankheiten senken. Als wichtige Lieferanten von Ballaststoffen und sekundären Pflanzenstoffen enthalten Obst und Gemüse auch zahlreiche Vitamine, Mineralstoffe und Spurenelemente und spielen mit ihrem, in der Regel niedrigen Fettgehalt und dem nicht Vorhandensein von Cholesterin eine wichtige und zentrale Rolle in der Ernährung (DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG e. V, 2011; RABAST, 2018; TANGO et al., 2018).

Die positive Wirkung von pflanzlichen Lebensmitteln in der Prävention verschiedener chronischer Erkrankungen hat eine Reihe von Organisationen, unter anderen die World Health Organisation (WHO) und die Food and Agriculture Organisation (FAO), zum Anlass genommen, den Verzehr von ausreichenden Mengen an Obst und Gemüse zu empfehlen (TANGO et al., 2014). Evidenzbasiert wird durch erhöhten Obst- und Gemüsekonsument das Erkrankungsrisiko von Hypertonie, koronaren Herzerkrankungen, Krebserkrankungen sowie Schlaganfall reduziert (STANGE, 2017; TANGO et al., 2018). Empfehlenswerte Lebensmittel hinsichtlich einer krebspräventiven Ernährung sind laut dem World Cancer Research Fund (WCRF) und dem American Institute for Cancer Research (AICR) Vollkornprodukte, Gemüse, Obst und Hülsenfrüchte. (<https://www.wcrf.org/sites/default/files/german.pdf>; eingesehen am 03.03.2022). Dieser pflanzenbetonte Ernährungsansatz spiegelt auch die Empfehlungen der Österreichischen Gesellschaft für Ernährung wider (<https://www.oege.at/index.php/bildung-information/empfehlungen>; eingesehen am 03.03.2022). Adipositas kann ebenfalls durch erhöhten Verzehr von Obst und Gemüse reduziert bzw. verhindert werden, wodurch in Folge auch indirekt die Inzidenz für Diabetes mellitus Typ 2 gesenkt werden kann.

Obst und Gemüse sollten bei einer bedarfsdeckenden und ausgewogenen Ernährung eine zentrale Rolle in der täglichen Speiseplanung einnehmen. In Österreich wird ein täglicher Bedarf von mindestens fünf Portionen Obst und Gemüse empfohlen (<https://www.gesundheit.gv.at/leben/ernaehrung/info/ernaehrungspyramide/gemuese-obst/ernaehrungspyramide-obst-gemuese>; eingesehen am 03.03.2022).

In welchem Maße diese Ernährungsempfehlung von der österreichischen Bevölkerung umgesetzt wird, kann im Rahmen verschiedener Datenerhebungen abgelesen werden.

Trendanalysen zum Lebensmittelverbrauch bzw. Verzehrerhebungen in Form von Ernährungsberichten werden unter anderen von der Statistik Austria, der Österreichischen Verbraucheranalyse, Agra Markt Austria (AMA) durchgeführt.

In Österreich wurden im Zeitraum 2018/2019 pro Kopf im Durchschnitt 113 Kilogramm Gemüse sowie rund 80kg Obst konsumiert. Dabei zeigt sich ein leichter Rückgang um 1,7 kg im Vergleich zum Vorjahr (<https://de.statista.com/statistik/daten/studie/287833/umfrage/pro-kopf-konsum-von-gemuese-in-oesterreich>; eingesehen am 03.03.2022).

Gemüse ist ein bevorzugtes Lebensmittel auf dem Teller der Österreicherinnen und Österreicher, was sich im Kaufverhalten widerspiegelt: im Jahr 2018/2019 wurden in Österreich insgesamt 1.000 Millionen Tonnen Gemüse konsumiert, ein steigender Trend im Vergleich zu den Vorjahren (<https://de.statista.com/statistik/daten/studie/287829/umfrage/konsum-von-gemuese-in-oesterreich/>; eingesehen am 03.03.2022). Das Angebot an Gemüsevariationen reicht von frisch, über tiefgekühlt und trocken bis hin zu Konserven, kann selbst zubereitet oder schon fix und fertig zum Genießen gekauft werden. Den Komfort von vorgefertigten Lebensmitteln nehmen immer mehr Konsumenten an (STRANIERI et al., 2017). Die Nachfrage nach Fertiggerichten stieg z. B. in ganz Europa zwischen 1998 und 2002 um 29% (JACKSON et al., 2016). Dieser Trend in Richtung Convenience Produkten lässt sich auch in Österreich verzeichnen (<https://www.oesterreich-isst-informiert.at/herstellung/convenience-food-das-steckt-dahinter/>; eingesehen am 03.03.2022).

„Ready- to- eat“ (RTE) Produkte erzielen in der heutigen Zeit immer mehr an Beliebtheit und gewinnen durch den gesellschaftlichen Wandel von früher üblichen Großfamilien hin zu heutigen Single- bzw. Zweipersonenhaushalten und durch die teilweise fehlenden Kochkenntnisse auch zunehmend an Bedeutung (ZIKEL, 2007). Diese Art von Lebensmitteln zeichnet sich als ein bequemes, praktisches Essen aus, dessen schnelle Zubereitung viel Zeit erspart (KLUTH, 2010). Bequemer Genuss von vorgeschnittenem und verzehrfertigem Obst und Gemüse, das zum Direktverzehr geeignet ist, ist zunehmend gefragt. Als sogenannte „Fresh Cut“ Produkte sind sie immer häufiger im Kühlregal diverser Lebensmittelgeschäfte vorzufinden (CALONICO et al., 2019). Im Bereich des Gemüsesektors lassen sich frische, verpackte Salate zu dieser Produktkategorie zählen (https://www.bfr.bund.de/cm/343/hohe_keimbelastung_in_sprossen_und_kuechenfertigen_salatmischungen.pdf, eingesehen am 03.03.2022). Mit einem Umsatzanteil von rund 90 % spielen geschnittene Salate in Deutschland in der Kategorie Convenience Gemüse- und Salatprodukte eine zentrale Rolle (<https://lebensmittelpraxis.de/warenkunden/15970-warenverkaufskunde-fresh-cut-salate.html>; eingesehen am 03.03.2022).

Verzehrfertige, vorgeschnittene Salate sind Produkte aus frisch geschnittenem Gemüse, das nur minimal verarbeitet ist, was so viel bedeutet, dass es nach der Ernte nur gewaschen, geschnitten, gemischt und verpackt wird (GULLINO et al., 2019; NOUSIAINEN et al., 2016; TOMASI et al., 2015). Somit wird dem Verbraucher die Möglichkeit geboten, seinem Bedürfnis nach Bequemlichkeit mit gesunder Kost, vollem Geschmack und Frische gerecht zu werden (GULLINO et al., 2019). Vorbereitete Salate gelten als die „gesunde“ Alternative zur aufwendigeren frischen Zubereitung und sind eine ideale Möglichkeit für den Direktverzehr im Büroalltag, unterwegs, aber auch für zu Hause: einfach Verpackung öffnen, Marinade drüber und fertig ist die Mahlzeit (<https://www.shz.de/tipps-trends/ernaehrung-gesundheit/teuer-und-mit-vorsicht-zu-geniessen-id280505.html>; eingesehen am 21.02.2021). Doch die Freude an der schnellen Küche birgt auch gesundheitliche Risiken. Da abgepackte Salate ausschließlich roh, meist ohne zuvor gesetzte keimreduzierende Maßnahmen wie Putzen, Waschen und Erhitzen verzehrt werden, ist eine gute mikrobiologische Qualität eine grundlegende Basis für einen gesundheitlich unbedenklichen Verzehr (MIR et al., 2018).

1.2 Ausbrüche assoziiert mit Fertigsalaten

„Ready to eat“- Salate zählen auf Grund ihres rohen Verzehrs und ohne jeweilige, vor dem Konsum gesetzte weitere Maßnahmen, wie z. B. Waschen, Erhitzen, ihrer primären hohen Keimbelastung und ihren aus geschnittenen Pflanzenteilen zusammengesetzten Bestandteilen zu den leicht verderblichen Lebensmitteln. Ein erhöhtes Risiko für den Menschen besteht darin, dass sie als mögliche Vektoren von pathogenen Mikroorganismen fungieren können (TANGO et al., 2014). Verzehr von mikrobiologischen kontaminierten Lebensmitteln kann zu Erkrankungen führen, die durch pathogene Bakterien, Viren oder im verminderten Ausmaß von Protozoen, Schimmel und Parasiten verursacht werden. Dabei können die Erreger selbst oder die durch sie gebildeten Toxine, eine Lebensmittelinfektion bzw. -vergiftung auslösen. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, pathogene *Escherichia coli* und *Bacillus cereus* verkörpern relevante humanpathogene Bakterien und wurden in Zusammenhang mit Fertigsalaten hinsichtlich lebensmittelbedingter Krankheitsausbrüche dokumentiert (ARIENZO et al., 2020; LOSIO et al., 2015; NOUSIAINEN et al., 2016; SANT'ANNA et al., 2020).

Die Überwachung von lebensmittelbedingten Erkrankungen erfolgt in den United States of Amerika (USA) durch das Center for Disease Control and Prevention (CDC). Dabei fungiert das FoodNet Active Surveillance Network (FoodNet) als aktives Überwachungssystem, wobei auf neun ausgewählte Krankheitserreger, die häufig über Lebensmittel übertragen werden, Bezug genommen wird (<https://www.cdc.gov/foodnet/index.html>; eingesehen am: 03.03.2022). Das Tool FoodNet Fast informiert unter anderen über lebensmittelbedingte Krankheitsausbrüche in bestimmten Überwachungsbereichen, die an das Foodborne

Diseases Active Surveillance Network gemeldet wurden (<https://www.cdc.gov/foodnet/foodnet-fast.html>; eingesehen am: 03.03.2022). Eingegangene Meldungen, die mit Salaten assoziiert wurden, sind in Tab. 1 ersichtlich.

Tabelle 1: CDC Meldungen in der Kategorie „fruits and vegetables“ im Zeitraum 2010-2020.

Jahr	Krankheitsbedingte Ausbrüche	Mikroorganismen	verbunden mit	Anzahl der Erkrankten	Anzahl der Toten
2010	<i>E. coli</i> Ausbruch	<i>E. coli</i> O145	Römersalat	26	
2011	<i>E. coli</i> Ausbruch	<i>E. coli</i> O157:H7	Römersalat	26	
2012	<i>E. coli</i> Ausbruch	<i>E. coli</i> O157:H7	Römersalat	58	
	Listeriose Ausbruch	<i>L. monocytogenes</i>	Ricotta Salat Käse	22	4
2013	<i>E. coli</i> Ausbruch	<i>E. coli</i> O157:H7	Fertigsalate	33	0
2015	<i>E. coli</i> Ausbruch	<i>E. coli</i> O157:H7	Hühner Salat	19	0
2017	<i>E. coli</i> Ausbruch	<i>E. coli</i> O157:H7	Blattgemüse	25	1
2018	<i>E. coli</i> Ausbruch	<i>E. coli</i> O157:H7	Römersalat	62	0
			Römersalat	210	5
2019	<i>E. coli</i> Ausbruch	<i>E. coli</i> O157:H7	Salat mit frisch gehackten Sonnenblumen	10	0
			Römersalat	167	0
2020	<i>E. coli</i> Ausbruch	<i>E. coli</i> O157:H7	Blattgemüse	40	0

In der europäischen Union (EU) nimmt das Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) eine zentrale Rolle für die Gewährleistung der Lebensmittelsicherheit ein. Im Sinne eines Schnellwarnsystems bildet es ein Informationsportal für Lebensmittelwarnungen. Das RASFF Portal ermöglicht über eine öffentlich zugängige interaktive Online Datenbank Zugriffe auf neueste Meldungen der EU- Länder bzgl. Lebensmittelrückrufe und Warnhinweisen, die die öffentliche Gesundheit betreffen. Auch Informationen zu den in der Vergangenheit erfassten Benachrichtigungen können abgerufen werden. Im Zeitraum von 2018-2020 sind über das Schnellwarnsystem RASFF dreizehn Meldungen, die in Tab. 2 aufgelistet sind, in Verbindung mit Salaten dokumentiert worden (<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/search>; eingesehen am: 03.03.2022).

Tabelle 2: RASFF Meldungen im Zusammenhang mit Salaten im Zeitrahmen 2018-2021.

LEBENSMITTELKATEGORIE	DATUM	MELDUNG IN	DETAILS
Früchte und Gemüse	05.06.2018	Deutschland	<i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium in Bio Mix Salat mit rotem und grünem Bataviasalat und Blattspinat aus Italien
	18.07.2018	Frankreich	Verbraucherrückruf von Salatgerichten aus Frankreich im Zusammenhang mit lebendmittelbedingten Krankheitsausbrüchen in mehreren Ländern
	13.08.2019	Spanien	Lebensmittelbedingter Krankheitsausbruch durch Noroviren (GI & GII /25g) in gefrorenem Algensalat aus China über Deutschland vertrieben
	22.08.2019	Norwegen	Lebensmittelbedingter Krankheitsausbruch durch Noroviren (GI & GII /25g) in gefrorenem Algensalat aus China über Deutschland vertrieben
	16.07.2020	Italien	Norovirus in Salat
	11.08.2020	Dänemark	<i>L. monocytogenes</i> frischer Salat
	18.01.2021	Italien	<i>Bacillus cereus</i> (250000 CFU/g) in Bio Salat aus Italien
	28.01.2021	Österreich	<i>Bacillus cereus</i> in Salat
Zubereitete Gerichte und Snacks	04.10.2019	Niederlande	<i>Salmonella</i> in Salat aus Niederlanden
	11.02.2020	Frankreich	Fertigsalat mit Räucherlachs
	03.04.2020	Frankreich	<i>L. monocytogenes</i> in Fertigsalat
	15.07.2020	Niederlande	<i>L. monocytogenes</i> in Matjessalat
	01.09.2020	Frankreich	<i>Salmonella</i> in gekühltem Salat mit Reis, Gemüse, Eiern und Thunfisch aus Frankreich

1.3 Lebensmittelmikrobiologie

Mikroorganismen, vor allem Bakterien, Pilze, Hefen und Viren kommen häufig in oder auf Lebensmitteln vor, wo sie sich als nützlich oder schädlich erweisen können. Die in der Ernährungstechnologie genutzten Mikroorganismen dienen zur Veredelung und Herstellung von fermentierten Lebensmitteln. Sie sind hilfreich, um Hilfs- und Zusatzstoffe zu produzieren und werden als Starterkulturen eingesetzt. Die schädliche Wirkung von Mikroorganismen führt zu einem Verderb oder verminderter Haltbarkeit von Lebensmitteln, oder hat Lebensmittelvergiftungen oder -infektionen beim Menschen zur Folge (KEWELOH, 2019; KRÄMER & PRANGE, 2016; Abbildung 1).

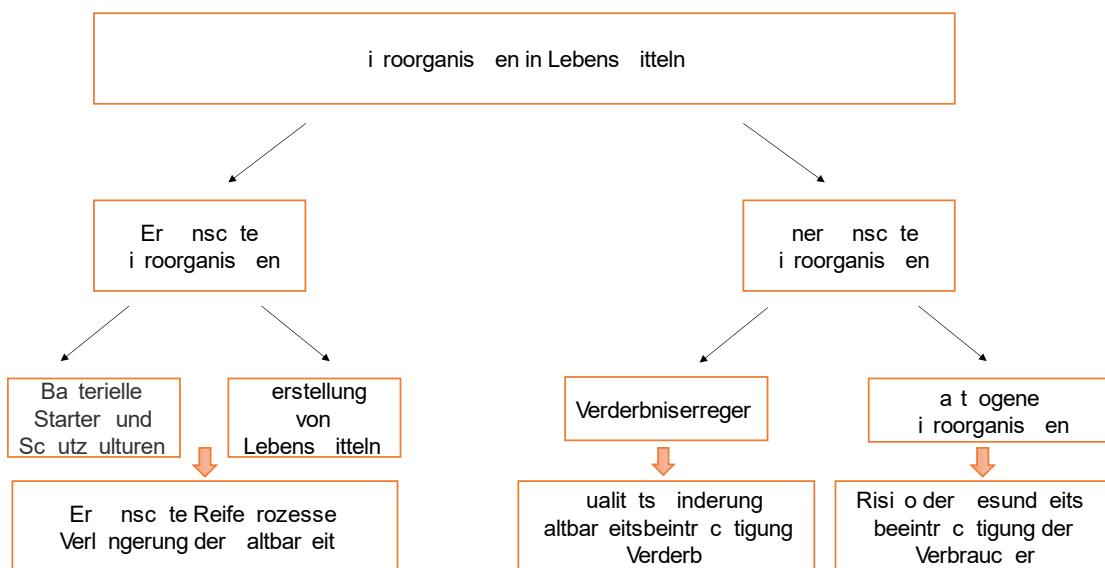


Abbildung 1: Bedeutung der Mikroorganismen im Lebensmittel.

1.3.1 Lebensmittelverderb

Unter dem Begriff Verderb versteht man alle durch Mikroorganismen hervorgerufenen stofflichen Veränderungen, die den Gebrauchswert eines Lebensmittels erheblich beeinträchtigen und vermindern (BLACKBURN, 2006).

Der Verfall eines Lebensmittels kann durch im Lebensmittel vorkommende Bakterien, Pilze und Enzyme bedingt sein. Dadurch kommt es zu Beeinträchtigungen in der Qualität, die sich in sensorischen Veränderungen zeigen. Veränderungen im Bereich des Geschmackes, der Konsistenz, des Geruches und des Aussehens sind in der Regel bei verdorbenen Lebensmitteln zu erkennen (Abbildung 2). In fast allen Lebensmitteln kommt es durch übermäßige Vermehrung und erhöhte Stoffwechselaktivitäten von unerwünschten Mikroorganismen irgendwann zum mikrobiellen Verderb. Des Weiteren sind physikalische

Vorgänge wie durch Licht, Austrocknung, Frieren, mechanische Beanspruchung, als auch chemische Prozesse, insbesondere enzymatisch bedingte, von Bedeutung für den Verderbnis Prozess bei Lebensmitteln (KEWELOH, 2019).

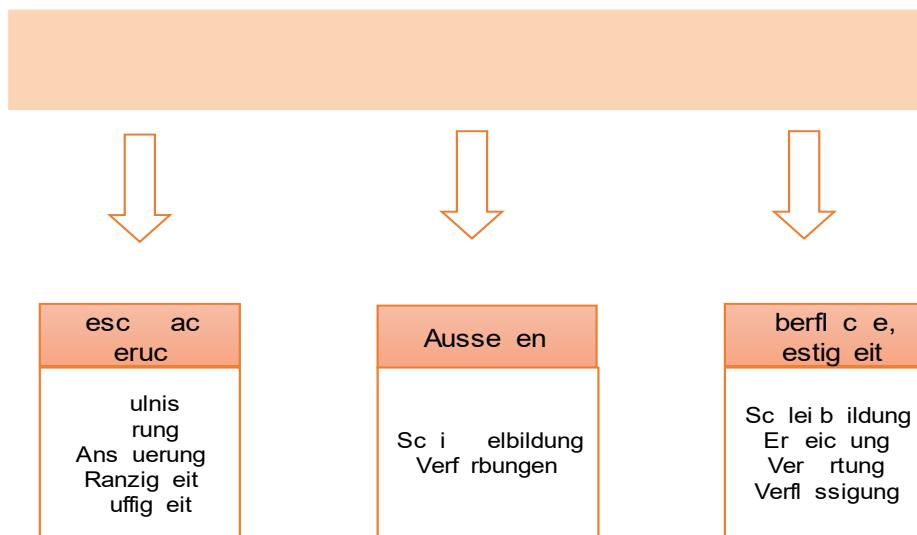


Abbildung 2: Arten des mikrobiellen Verderbs.

1.3.2 Verderb von pflanzlichen Lebensmitteln

Pflanzliche Lebensmittel verderben primär durch mikrobiologische Veränderungen. Durch den Kontakt mit Menschen bzw. Tieren, durch verunreinigte Gegenstände oder auch einfach über die Luft oder den Boden können Bakterien, Schimmelpilze oder Hefe auf die Pflanzen gelangen. Bei günstigen Bedingungen kommt es dort zur rasanten Vermehrung, wobei die Mikroorganismen einen Abbau von Lebensmittelinhaltstoffen und eine Ausscheidung von Stoffwechselprodukten bewirken. Diese Stoffwechselaktivitäten bedingen wiederum das Sauerwerden, das Faulen, das Gären oder das Verschimmeln des Produktes (DOYLE, 2009).

1.3.3 Mögliche Kontaminationsquellen und – wege bei der Herstellung von Blattsalaten

Pflanzliche Lebensmittel können während des ganzen Produktzyklus verunreinigt werden (MIR et al., 2018; TANGO et al., 2014). Die Kontamination kann auf unterschiedlichste Arten, von vor der Ernte bis nach der Ernte, erfolgen (MACHADO-MOREIRA et al., 2019). Die möglichen Kontaminationsquellen können menschlichen oder tierischen Ursprungs sein, aber auch die Umwelt (Erde, Wasser etc.) kann eine Quelle darstellen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Möglichkeiten der Kontamination/Übertragung von Mikroorganismen.

E t („p v t“)	N E t („p t v t“)
<ul style="list-style-type: none"> • Wetterbedingungen • Erdreich/Boden • Fäzes (Mensch und Tier) • Dünger (Gülle) • Schädlinge • Bewässerungswasser • Luft, Staubwasser • Bearbeitung durch den Menschen 	<ul style="list-style-type: none"> • Bearbeitung durch den Menschen • Fäzes • Luft, Staub • Transport • Schädlinge • verunreinigte Produktionsanlagen • Spül- bzw. Waschwasser • verunreinige Verpackung • Unterbrechung der Kühlkette • Kreuzkontamination • unsachgemäße/inadäquate Lagerungsbedingungen

Quelle: MIR et al., 2018, MACHADO-MOREIRA et al., 2019, SANT'ANNA et al., 2020.

1.3.3.1 Primäre Kontamination

Unter primärer Kontamination versteht man eine Verunreinigung des Lebensmittels vor seiner Gewinnung (CASTRO-ROSAS et al., 2012). Salate zeigen aufgrund ihrer Nähe zum Erdreich, durch die Kontaminationsmöglichkeit mit Dung, Abwasser, mikrobiell belastetes Bewässerungswasser und fäkaler Kontamination eine erhöhte Keimbelastung vor der Ernte (MRITUNJAY und KUMAR, 2017).

In 1 g Erdboden können bis zu 10^9 Kolonien bildende Einheiten (KBE) vorkommen (KRÄMER, 2011a), die auch auf der Oberfläche der Pflanzen zu finden sind (DASTOGEER et al., 2020). Somit sind Salate von Natur aus mit einer spezifischen, mikrobiellen Flora besiedelt, die nach Sorte, Jahreszeit und Anbaubedingungen variiieren kann. Diese primäre Keimbelastung kann bei Fertigsalaten, die als minimal verarbeitetes Gemüse roh verzehrt werden und aus lebendem atmendem Gewebe bestehen, in Bezug auf Qualität und Lebensmittelsicherheit problematisch werden. Die natürliche Barriere-Schicht der Pflanzen wird durch den Schneidevorgang zerstört, wobei das Eintreten der Mikroorganismen erleichtert wird. Der austretende Zellsaft kann noch dazu einen idealen Nährboden für Mikroorganismen bilden und deren Wachstum begünstigen (NOUSIAINEN et al., 2016, TANGO et al., 2014). Zusammen mit dem in der Verpackung herrschenden Luftdruck finden die Mikroorganismen ideale Wachstumsbedingungen vor (NOUSIAINEN et al., 2016).

Gramnegative Keime, u.a. auch lebensmittelpathogene Mikroorganismen [e.g. shigatoxin-bildende *E. coli* (STEC), *Salmonella*], können auch über die Poren der Pflanze in das innere Gewebe eindringen und sind damit schwer von der Oberfläche zu entfernen (WRIGHT et al., 2013). Aktuelle Mikrobiomstudien zeigten, dass *Pseudomonas* und *Enterobacteriaceae* in den Wurzelproben vorherrschend, während *Succinivibrio* und *Acinetobacter* die dominierenden Gattungen in den Blattproben waren (YANG et al., 2017). *L. monocytogenes* ist ein sehr guter

endophytischer Besiedler von Pflanzenwurzeln (KLJUJEV et al., 2018). *L. monocytogenes* und aerobe Sporenbildner kommen ubiquitär in der Umwelt vor, insbesondere in verrotteten Pflanzen, im Erdreich und in Tierkot (LOKERSE et al., 2016, TANGO et al., 2014). Zusätzlich können auch extreme Wetterereignisse, bedingt durch Überschwemmungen und Dürre, die Kontaminationsgefahr erhöhen (MACHADO-MOREIRA et al., 2019).

Die bereits vor der Ernte stattgefundene Kontamination erfolgt bei pflanzlichen Lebensmitteln häufig über kontaminiertes Bewässerungswasser oder durch den Gebrauch von tierischen Düngemitteln (FAOUR- KLINBEIL et al., 2016; MACHADO-MOREIRA et al., 2019; STEPHAN et al., 2015; TANGO et al., 2014). Das Wasser, das zu Bewässerung des Gemüses oder zu Herstellung von Pestizidmischungen verwendet wird, ist häufig von schlechter mikrobiologischer Qualität infolge von Grundwassernutzung, Regenwasser Rückgewinnungssysteme und Verwendung von wiederverwertetem Abwasser (MACHADO-MOREIRA et al., 2019). Der Einsatz von unangemessen behandelter Gülle als Dünger kann eine Übertragung von pathogenen Mikroorganismen begünstigen (FAOUR- KLINBEIL et al., 2016; GULLINO et al., 2019; MACHADO-MOREIRA et al., 2019, MIR et al., 2018; TANGO et al., 2014).

1.3.3.2 Sekundäre Kontamination

Bei der sekundären Kontamination gelangen Mikroorganismen erst während der Gewinnung, Verarbeitung, Lagerung oder während des Transportes in das Rohprodukt. Somit kann die Kontamination auf allen Stufen des Lebensmittelproduktionsprozesses stattfinden, jedoch großteils bedingt durch ungünstige Bedingungen in der „ost-areal“ und abhängig (IR et al., 2018). Die Verunreinigung kann durch den Menschen selbst erfolgen, und zwar durch die mangelhafte persönliche Hygiene der Feldarbeiter (MICELI & SETTANNI, 2019; STEPHAN et al., 2015). Auch verunreinigte Arbeitsgeräte, Erntemaschinen, Arbeitsflächen und Verpackungsmaterial, verschmutztes Prozess- oder Waschwasser und falsche Transport und Transportbedingungen beeinflussen die mikrobiologische Qualität negativ (CALONICO et al., 2019; FAOUR-KLINGBEIL et al., 2016; GIL et al., 2015; SANTOS et al., 2012).

Eine weitere Infektionsquelle kann von Tieren, insbesonders von Nagern und Insekten ausgehen, deren Kot oder Speichel als Vektoren bei der Übertragung von pathogenen Mikroorganismen fungieren können. Aus diesen Gründen ist es besonders wichtig, auf eine gute Herstellungspraxis (GHP) und gute landwirtschaftliche Praktiken (GAP) zu achten, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden (FAOUR-KLINGBEIL et al., 2016; SANTOS et al., 2012). Ein Zusammenhang zwischen der Verwendung von Waschwasser mit schlechter mikrobiologischer Qualität, inadäquater Transport- bzw. Lagerbedingungen und dem Risiko einer Kreuzkontamination wurde von einigen Autoren belegt (FAOUR-KLINGBEIL et al., 2016; SANT'ANNA et al., 2020).

In Blattsalat dominante Familien waren in einem longitudinalen Probenansatz (Feld, Ernte, Verarbeitung) *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Xanthomonadaceae* und *Moraxellaceae*. Als potentiell humanpathogene Keime wurden *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter* und *Morganella morganii* identifiziert (FRÖHLICH et al., 2018).

Neue Sequenziertechniken zeigen auch tatsächlich stoffwechselaktive bakterielle Gruppen, die in diversen Salatproben nachweisbar waren, wie z. B. *Aeromonas hydrophyla*, *Rahnella aquatilis*, apathogene Yersinien, und für hohe Gesamtkeimzahlen verantwortlich sind (10^6 Kolonien bildende Einheiten - KBE/g) (MIRA MIRALLES et al., 2019).

1.3.4 Mögliche Kontaminationsquellen und – wege von Mischsalaten

Mischsalate enthalten sowohl rohe (z. B. Blattgemüse, Paprika, Tomaten, Mais, Sprossen, Saaten, Nüsse und Samen) als auch prozessierte (z. B. Speck, Räucherlachs, Schinken, Hühnerbrust, Nudeln, Ei, Feta, Mayonnaise, Dressing etc.) Komponenten (SÖDERQVIST 2016, 2017). Bakterielle Verunreinigungen von Gemüse, Saaten, Nüssen und Samen können in jedem Schritt der Produktionskette auftreten, da kein reduzierender oder dekontaminierender Prozessschritt im Herstellungsprozess inkludiert ist (STEPHAN et al., 2015). Fleischzutaten werden in der Regel vor der Zubereitung hitzebehandelt, können aber durch den Schniede- und Schneideprozess („Slicen“) rekontaminiert werden. Wenn mehrere Zutaten miteinander vermischt werden, kann es zu Kreuzkontaminationen kommen. Die Zubereitung von Salaten mit gemischten Zutaten erfordert die Handhabung durch den Menschen, wo ein zusätzliches Risiko der bakteriellen Kontamination durch den Vektor Personal oder Umwelt (produktberührende Oberflächen) hinzukommt. Bei eiweißreichen Zutaten (z. B. gekochtem Fleisch, Käse) stellen Mischsalate ein hervorragendes Substrat für bakterielles Wachstum bis zum Ende der Haltbarkeit dar (SÖDERQVIST 2016, 2017).

1.3.5 Mikroorganismen in Lebensmittel

1.3.5.1 Hygieneindikatorkeime

In der Lebensmittelanalytik wird die mikrobielle Untersuchung auf Indikatorkeime eingesetzt, um die Prozesshygiene zu überwachen bzw. Kontaminationen und deren möglichen Ursprung zu ermitteln. *Escherichia coli* wird als Indikatorkeim für fäkale Verunreinigungen gesehen (CALONICO et al., 2019; NOUSIAINEN et al., 2016). Fäkal-Coliforme, wie *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter freundii* und *Enterobacter cloacae* spielen eine entscheidende Rolle beim Verderb von Blattsalaten und sind auch als potenziell pathogen einzustufen (SARANRAJ und REETHA, 2012).

Verderbnis-Erreger beeinträchtigen die Beschaffenheit (Geschmack, Geruch, Aussehen) und die Haltbarkeit von Lebensmitteln, sodass sie schlussendlich nicht mehr für den menschlichen Verzehr geeignet sind. Zu den häufig auf Salaten vorkommenden Verderbnis-Erregern zählen

neben Pseudomonaden, *Erwinia spp.* und *Xanthomonas spp.* (BARTSCH, 2018), Hefen und Schimmelpilze (https://verbraucherschutz.sachsen-anhalt.de/fileadmin/Bibliothek/Politik_und_Verwaltung/MS/LAV_Verbraucherschutz/lebensmittelsicherheit/publikationen/verderb_lebensmittel.pdf; eingesehen am 03.03.2022. Ein erhöhter quantitativer Nachweis von Hygieneindikatorkeimen in Produkten kann auf Hygienemängel während des Erntevorgangs und der Herstellung bzw. eine unsachgemäße Behandlung und Umgang Rohstoffen oder der Endprodukte hinweisen (ARIENZO et al., 2020; CALONICO et al., 2019; TANGO et al., 2014).

Die Bestimmung der **aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl** (aerobic mesophilic count - AMC) ist eine der am häufigsten angewandten Methoden zur Bestimmung der mikrobiologischen Qualität von Lebensmitteln (ISO 4333-2013). Die Aussagekraft der AMC ist abhängig von der Art des Lebensmittels und der technologischen Prozessierung, die zur Herstellung angewendet wurde. Am aussagekräftigsten ist die AMC bei verzehrfertigen Lebensmitteln, die erhitzt wurden und wo Komponenten prozessiert wurden, aber kein Erhitzungsverfahren angewendet wurde (Convenience-Stufe fünf) (<https://www.foodstandards.gov.au/code/microbiolimits/documents/Guidelines%20for%20Micro%20exam.pdf>; eingesehen am 03.03.2022). Die Convenience Stufe von Lebensmitteln wird anhand des Verarbeitungsgrad (1-5) festgelegt. Je mehr Be- oder Verarbeitungsschritte der Lebensmittelhersteller im Vorfeld übernimmt, umso höher ist die Fertigungsstufe und damit der Convenience-Grad eines Fertigproduktes (Grad 1: küchenfertige; Grad 2: garfertige; Grad 3: aufbereitungsfertige; Grad 4: regenerierfertige; Grad 5: verzehrfertige Lebensmittel).

Die Referenzmethode ISO 4333-2 (2013) zur Bestimmung der AMC mittels Spatelverfahrens ist besonders geeignet für die Bestimmung von psychrotrophen Keimen, aeroben Keimen, die einen großen Anteil der Gesamtflora ausmachen (*Pseudomonas*, *Bacillus*). Außerdem wird das Verfahren ISO 4333-2 bevorzugt, wenn eine Beurteilung der Koloniemorphologien und Differenzierung erforderlich ist. Wenn die Gesamtkeimzahl über das normale Maß hinaus überschritten wird, ist dies ein Hinweis auf eine mangelnde Hygiene im Verarbeitungsprozess, unsachgemäße Lagerung oder verunreinigte Ausgangsprodukte (ARIENZO et al., 2020; NOUSIAINEN et al., 2016). Die mikrobiologische Qualität von Blattgemüse ist wahrscheinlich ab einer Keimzahl von $7 \log \text{KBE/g}$ beeinträchtigt (TANGO et al., 2018). ARIENZO et al. (2020) setzt das Limit für AMC sogar bei $> 6 \log \text{KBE/g}$ als nicht akzeptabel fest. Die Richtwerte für Mischsalate, die von der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) empfohlen werden, geben einen Richtwert von 5×10^7 an (siehe Tabelle 5). Die Beurteilung der Gesamtkeimzahl muss aber immer im Zusammenhang mit der Lebensmittelkategorie und Herstellungstechnik gesehen werden (SHARIEF, 2015).

Die AMC wird bei frischem Gemüse und Obst nicht einheitlich betrachtet. Diese Produkte können entweder von Natur aus eine hohe AMC aufgrund der normalen vorhandenen mikrobiellen Flora oder als Ergebnis der Verarbeitung aufweisen. Das gilt auch für zusammengesetzte Lebensmittel, die Gemüse oder Salate enthalten (z.B. Sandwiches). Deshalb werden in diesem Fall bei einigen Standards keine Limits bestimmt (<https://www.foodstandards.gov.au/publications/Documents/Compendium%20of%20Microbiological%20Criteria/Compendium%20of%20Microbiological%20Criteria.pdf>; eingesehen am 03.03.2022).

In der Lebensmittelhygiene gelten *Enterobacteriaceae* als Hygieneindikatoren, die hinsichtlich Produktqualität und Herstellungsprozessen herangezogen werden (NOUSIAINEN et al., 2016). Bei starker Vermehrung kann es ein Indiz auf mangelnde Hygiene- und Reinigungspraktiken während des Prozesses sein (FAOUR-KLINGBEIL et al., 2016; NOUSIAINEN et al., 2016).

Enterobacteriaceae umfassen gramnegative, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien, die aufgrund ihrer Lipopolysaccharid-Membran im Kalilauge-Test positiv reagieren. Weitere wichtige biochemische Reaktionen sind positiver Oxidase-Test, die Reduktion von Nitrat zu Nitrit. Darüber hinaus sind sie in der Lage, Zucker, hauptsächlich Glukose, unter Bildung von Säure und Gas sowohl oxidativ als auch fermentativ abzubauen (SUERBAUM et al., 2012). Zu den *Enterobacteriaceae* gehören zahlreiche Vertreter, die einerseits zur physiologischen Darmflora anderseits auch zur fakultativ pathogenen Flora gerechnet werden können. Sie kommen überall in der Natur vor, sind in der Umwelt weit verbreitet. Sie wurden bereits in Boden, Wasser, Lebensmitteln, Pflanzen und Bäumen sowie in Menschen und Tieren nachgewiesen (BRENNER und FARMER, 2005; CALONICO et al., 2019). Als fakultativ pathogene Darmbakterien sind *Enterobacteriaceae* Bestandteile des normalen Darmmikrobioms und werden nur dann krankheitserregend, wenn sie aus dem Darm in andere Körperregionen gelangen. Zu dieser Gruppe gehören unter anderen *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Morganella* und *Serratia*, deren Krankheitsgeschehen mit Infektionen wie Septikämie, Respirationstrakts-, Harnwegs-, und Wundinfektionen und Meningitis einhergehen (JASSOY und SCHWARZKOPF, 2018). Vor allem als sogenannte opportunistisch pathogene Keime führen sie nur unter bestimmten Umständen, wie Immunschwäche, zu schwerer Erkrankung. Des Weiteren kann man noch die obligat pathogenen Enterobakterien unterscheiden: *Salmonellen*, *Shigellen*, *Yersinien*, *Campylobacter* und die Shigatoxin-bildende *E. coli*. Diese Gattungen gehören nicht zum natürlichen Habitat des Darms, sondern verursachen entweder eine Allgemeininfektion, indem sie aus dem Darm über die Blutbahn zu inneren Organen wandern, bzw. verharren einfach für eine gewisse Weile dort, was schlussendlich zu teilweise blutigen Enteritiden führen kann (HAHN et al., 1991).

Pseudomonaden sind gramnegative aerobe, nicht sporenbildende, gerade oder leicht gebogene Stäbchenbakterien, die durch polar angeordnete Geißeln aktiv beweglich sind. Pseudomonaden zählen zu den Oxidase und Katalase positiven Nonfermentern, die sowohl mesophil (25-35 °C) als auch psychrotroph, bei Kühltemperaturen vermehrungsfähig sind (BEVILACQUA et al., 2016).

Sie sind ubiquitär, also überall in der Umwelt verbreitet. Man findet sie im Boden, Wasser sowie in oder auf Pflanzen und Tieren. Einige Spezies können pathogen sein, andere hingegen für die Natur von großem ökologischem Interesse (MADIGAN et al., 2013). So sind sie im Boden und im Wasser für den weiteren Abbau vieler aus tierischem und pflanzlichem Material stammenden Verbindungen zuständig. Außerdem haben sie die Fähigkeit, xenobiotische Verbindungen, wie z. B. Pestizide und andere toxische Chemikalien, zu katabolisieren (MADIGAN et al., 2013). Im Gegenzug dazu hat eine ganze Reihe von Pseudomonaden krankheitserregendes Potential, und zwar für Mensch, Tier und Pflanze. Je nach Speziesart kommt es zur Ausbildung verschiedener Krankheitsbilder. So können pflanzenpathogene Stämme unter anderem Weichfäule (*P. marginalis*) bzw. tierpathogene Stämme unter anderem Rotz bei Pferden (*Burkholderia mallei*) verursachen (MADIGAN et al., 2013). Für den Menschen gilt *P. aeruginosa* als wichtiger Infektionserreger. Als sogenannter Krankenhauskeim führt er vor allem bei geschwächten Menschen zu Wundinfektion, Otitiden und Infektionen des Urogenital- bzw. Respirationsapparats. (<https://www.aerztliches-journal.de/medizin/infektiologie/infektion/auch-krankenhauskeime-haben-schwachstellen/7ca1daed7b3f8835e37d89c9b9a3fcce/>; eingesehen am 03.03.2022). Er ist somit ein bedeutender Erreger nosokomialer Infektionen. Pseudomonen können auch ein Problem in der Lebensmittelindustrie darstellen. Indem sich diese Bakterien gut an Oberflächen anhaften können, besiedeln sie gerne Wände, Fußböden, Gerätschaften und Innenseiten von Rohranlagen (RAPOSO et al., 2017). Aufgrund ihrer guten Resistenzfähigkeit und ihrer Neigung zur Bildung eines oft schwer zu beseitigendem Biofilms bilden sie eine gute Grundvoraussetzung für ein Wachstum anderer Mikroorganismen, unter anderem auch für *L. monocytogenes* (PUGA et al., 2018). Somit zeichnen sich Pseudomonaden als wichtige Indikatoren für Hygiene in der Produktion aus, die auf Mängel in der Reinigung und Desinfektion hinweisen (KRÄMER, 2011a).

Milchsäurebakterien (LAB) sind grampositive, unbewegliche Stäbchen oder Kokken. Sie werden zur Klasse der Bacilli gezählt, sind Katalase und Oxidase negativ. Als aerotolerante Anaerobier gewinnen sie ihre Energie nur aus dem Metabolismus von Zucker, den sie anschließend in einer Gärung verwerten. Das daraus anfallende Fermentationsprodukt ist Milchsäure. Anhand ihrer Gärungsprodukte wird zwischen homofermentativen und heterofermentativen Milchsäurebakterien unterschieden. Die Vertreter des homofermentativen Typs bilden im Zuge der Milchsäuregärung ausschließlich Milchsäure, wogegen die vom

heterofermentativen Typ auch andere Produkte, vor allem Ethanol, CO₂ und Essigsäure entstehen lassen. Der Katabolismus von Arginin und Glutamin trägt zur Säureresistenz von LAB bei (BISCHOFF, 2009; GAENZLE et al., 2015).

Milchsäurebakterien haben mit ihrer unterschiedlichsten Arten- und Stammvielfalt ein weitgefächertes Anwendungsgebiet. Seit jeher werden sie zum Haltbarmachen von diversen Lebensmitteln bzw. Herstellen von Gärfuttermitteln (Silage) verwendet. Durch die rasche Vergärung des Zuckers werden die Lebensmittel angesäuert, sodass das Wachstum von pathogenen Mikroorganismen wie Fäulnisbakterien und Pseudomonaden verhindert wird. In der Milchwirtschaft ist ihr Einsatzgebiet vor allem als Starterorganismen bei Fermentationsprozessen. Als natürlicher Bestandteil der Darm- und Vaginalflora werden auch einige ausgewählte Stämme der Milchsäurebakterien als Probiotika eingesetzt.

Neben dieser positiven Wirkung können Milchsäurebakterien jedoch auch zum Verderb eines Lebensmittels führen. Durch die, bei der Fermentation entstandene, Säure kommt es zur Senkung des pH-Wertes, was wiederum die Bildung von Schimmel und Hefe begünstigt (CHEN et al., 2019).

Milchsäurebakterien (LAB) gelten außerdem als Hauptproduzenten biogener Amine in fermentierten Lebensmitteln. Diese Verbindungen entstehen bei der Decarboxylierung von Aminosäuren durch mikrobielle Aktivitäten und können beim Menschen pseudoallergische Reaktionen hervorrufen, wobei die Symptome (Kopfschmerzen, Herzklopfen, Erbrechen, Durchfall) auch von der individuellen Empfindlichkeit abhängen (BARBIERI et al., 2019).

1.3.5.2 Lebensmittelpathogene Mikroorganismen

Der Verzehr von einem mit pathogenen Mikroorganismen kontaminiertem Lebensmittel kann ein gefährliches Gesundheitsrisiko für die Konsumentin/den Konsumenten darstellen. Die schädliche Wirkung der Mikroorganismen zeigt sich in einer Lebensmittelvergiftung oder Lebensmittelinfektion. Aus diesem Grund dürfen diese Pathogenen entweder gar nicht oder nur bis zu einem bestimmten Grenzwert im Lebensmittel vorhanden sein. Richt- bzw. Warnwerte relevanter pathogener Mikroorganismen sind in Tabelle 5 (Kapitel 1.5) dargestellt.

E. coli ist einer der wichtigsten Spezies der Gattung *Escherichia* und ist der Familie der *Enterobacteriaceae* zuzuordnen. *E. coli* sind gramnegative, fakultativ anaerobe, sporenlose, stäbchenförmige Kolibakterien, die durch eine peritrichen Begeißelung aktiv beweglich sind. Sie zeigen im Oxidase Test ein negatives Ergebnis, und sind in der Lage, Indol zu bilden. Die Energiegewinnung erfolgt über Fermentation von Kohlenhydraten, und zwar Glucose und Maltose, aber vor allem von Laktose (HOF und SCHLÜTER, 2019). Dieser Vorgang findet unter Bildung von Gas und Säure statt, was als biochemisches Nachweiskriterium für die

Identifizierung herangezogen wird (Nachweis mit Methylrot als pH- Indikator) (WÖSTEMEYER et al., 2019).

E. coli ist ein Bakterium, das physiologisch im Darm vorkommt. Es zählt zum Mikrobiom jedes Menschen und Säugetieres und stellt einen wichtigen Bestandteil der bakteriellen Darmflora da. Es gilt deshalb als Indikator für fäkale Verunreinigung im Wasser und im Lebensmittel. Als klassischer Fäkalindikator deutet der positive Nachweis immer auf eine Verunreinigung durch menschliche oder tierische Fäkalien in der Außenwelt hin. Dies ist ein Indikator für die Gefahr eines möglichen Auftretens anderer gefährlicher Krankheitserreger wie z. B. Salmonellen (CALONICO et al., 2019).

Neben diesen nicht enteropathogenen Kolibakterien können aber auch pathogene Stämme abgegrenzt werden, die extraintestinale oder intestinale Infektionen hervorrufen können (OETHINGER, 2004). Bakterielle Harnwegsinfekte, Sepsis, Meningitis, Pneumonie, Peritonitis und Wundinfektionen sind die Folge einer Infektion mit in diesem Fall fakultativ pathogen *E. coli*. Durch Verschleppung der Darmbakterien in eine andere Körperregion wie z.B. Harnblase oder Lunge kann es außerhalb des Darms, bei entsprechender Disposition des Wirtes, zum Auslösen der Erkrankung kommen (OETHINGER, 2004; HOF und SCHLÜTER, 2019). Intestinale Infektionen werden hingegen von *E. coli* Stämmen verursacht, die ihre pathogenen Eigenschaften hauptsächlich innerhalb des Darmtraktes entwickeln. Zu diesen enteropathogenen *E. coli* Stämmen, die über Schmierinfektionen oder über kontaminierte Lebensmittel (mit Fäkalien gedüngtes Gemüse oder Obst, Fertiggerichte) übertragen werden, zählt man unter anderen enteropathogene *E. coli* (EPEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enterotoxische *E. coli* (ETEC), enteroaggressive *E. coli* und enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) (KRÄMER, 2011b).

Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) werden meist mit persistierenden Durchfallerkrankungen, die vor allem jüngere Personen betreffen, in Verbindung gebracht. Dieses Krankheitsbild kommt durch Stimulation der Schleimproduktion infolge von Bindung der Adhärenzfimbrien (AFF) an den Mukosazellen und Bildung von hitzestabile Enterotoxinen (EAST) zu Stande (HOF und SCHLÜTER, 2019). EHEC Stämme sind in der Lage Shigatoxine zu bilden, die mitunter zu starken wässrigen Durchfällen, Bauchkrämpfen und Erbrechen führen kann. Shigatoxine sind gemeinsam mit weiteren Pathogenitätsfaktoren in der Lage auch schwerwiegender Krankheitsmanifestationen wie thrombotisch- thrombozytopenische Purpura (TTP), hämorrhagische Colitis oder das hämolytisch urämische Syndrom (HUS) auszulösen. Das dafür verantwortliche Serovar ist vor allem O157:H7. Daneben kommen aber auch die Serovargruppen O26, O103, O111, O145, O146, O121, O128, O91, O104 und O113 häufig als humanpathogene Erreger vor. Es gibt zwei Typen von Shigatoxinen, nämlich Stx1a bis Stx1c und Stx2a bis Stx2i

(https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_EHEC.html; eingesehen am 03.03.2022). Im Fall des Sprossen-assoziierten Ausbruchs 2011 war der Ausbruchstamm mit einer ungewöhnlichen Kombination von Virulenzmerkmalen, die sowohl für EHEC charakteristisch sind - ein chromosomal integrierter Stx-kodierender Bakteriophage und enteroaggregative *Escherichia coli*-pAA-Plasmid-kodierte aggregative Adhärenzfimbrien, ausgestattet (KAMPMEIER et al., 2018).

Die natürlichen Erregerreservoir sind Wiederkäuer (Rinder, Schafe Ziegen) und Wildtiere (Rehe und Hirsche), bei denen sie typische Darmbewohner sind und damit auch im Kot vorkommen können, jedoch ohne eine Erkrankung der Tiere selbst hervorzurufen (HEREDIA und GARCIA, 2018; SOARE et al., 2021). Vor allem in roh oder unzureichend erhitzten oder nicht gegarten Produkten vom Rind, wie Faschiertem, Salami, Mettwurst sowie in nicht pasteurisierter Rohmilch und Rochmilchprodukten, wie Rohmilchkäse werden EHEC häufig nachgewiesen. Eine weitere Rolle in der EHEC Übertragung in die Nahrungskette spielen kontaminiertes Wasser oder durch mit Rindergülle gedüngte Äcker (KIM et al., 2020). Unter die am häufigsten mit *E. coli* assoziierten Gemüsesorten fallen Sprossen und Blattgemüse. Dabei stellten sich als mögliche Kontaminationsquellen vor allem das verwendete Saatgut (Sprossen) bzw. verunreinigtes Wasser (Blattgemüse) heraus (LUNA-GUEVARA et al., 2019). Weitere Infektionsquellen stellen Tierkontakte (Streichelzoo) mit unzureichender Handhygiene mit anschließendem Nahrungsverzehr, sowie Mensch-zu-Mensch Infektionen dar. Dieses von Mensch zu Mensch übertragende Risiko wird auf Grund der sehr niedrigen Infektionsdosis von unter 100 KBE EHEC begünstigt (https://www.bfr.bund.de/de/a-z_index/ehec__enterohaemorrhagische_escherichia_coli-5233.html; eingesehen am 03.03.2022).

Als sogenannte meldepflichtige Infektionen wurden im Jahr 2019 in Österreich 286 STEC Fälle von speziellen Labors bestätigt. Die Inzidenz betrug 3,23 bei 100 000 Einwohnern, wobei 16 Personen einen schweren Krankheitsverlauf mit Symptomen von HUS zeigten (<https://www.ages.at/themen/krankheitserreger/escherichia-coli-inklusive-verotoxin-bildende-e-coli-vtec/>; eingesehen am 03.03.2022).

Mitglieder der ***Bacillus cereus* Gruppe** (*B. anthracis*, *B. cereus* sensu stricto (s.s.), *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. cytotoxicus*, und *B. toyonensis* sind bewegliche, grampositive, fakultativ anaerobe, Stäbchenbakterien, dessen Wachstumsoptimum zw. + 28 °C und + 40 °C liegt. Präsumtive *B. cereus* sind in der Lage, thermoresistente Endosporen zu bilden, wodurch eine erhöhte Tenazität und die Möglichkeit zur Persistenz in der Umwelt besteht. Diese Sporen sind Dauerformen des Keims und ermöglichen ihm, trotz ungünstiger Umweltbedingungen (Hitze, Trockenheit) jahrelang überleben zu können, indem die Sporen bei günstigeren

Lebensbedingungen einfach wieder zu auszukeimen beginnen. Mit diesem Vermögen, resistent gegen jegliche Umwelteinflüssen zu sein, wird die ubiquitäre Ausbreitung im Erdboden, auf Pflanzen und im Wasser aber auch in Lebensmitteln begünstigt (EFSA BIOHAZ PANEL, 2016; MESSELHÄÜSER und EHLING-SCHULZ, 2018).

Mitglieder der *B. cereus* Gruppe sind in der Lage, Toxine zu produzieren, die zu lebensmittelbedingten Erkrankungen führen können. Zum Ausbruch dieser Erkrankungen kommt es meist erst dann, wenn es durch mangelhafte und unsachgemäße Lagerungen oder Verarbeitung zur starken Vermehrung der Bakterien kommt. Die auf Grund der hohen Keimbela stung übermäßig vorhandenen Endotoxine können im Lebensmittel selbst oder erst im menschlichen Darm gebildet werden. Anhand dieser Tatsache kann zwischen Lebensmittelinfektionen, gekennzeichnet durch Durchfall, oder Lebensmittelintoxikationen, einhergehend mit Erbrechen, unterschieden werden (HOF und SCHLÜTER, 2019).

Bei dem emetischen Typ handelt es sich um eine Erkrankung, bei der nur die bakteriellen Toxine, nämlich Cereulide über das kontaminierte Lebensmittel aufgenommen werden. Erbrechen zusammen mit Übelkeit tritt meist kurz nach Aufnahme der Toxine (Intoxikation) auf, wobei die Symptome nach wenigen Tagen selbstlimitierend sind. Sehr selten können schwerwiegende Krankheitsfälle infolge einer Cereulid Vergiftung auch Leberschäden und Irnöde e nac sic zie en (S I TA et al., 2010). Intoxi a tionen durc das „E etic Toxin“ treten überwiegend nach dem Verzehr von stärkehaltigen, gekochten Lebensmitteln wie Reis oder Nudeln auf (DIETRICH et al., 2021; https://www.bfr.bund.de/de/bacillus_cereus-54344.html; eingesehen am 03.03.2022).

Die zweite durch *B. cereus* hervorgerufene Er r an un g ist das sogenannte „Durc fal I Syndro “ (KRÄ ER, 2011b). Das durc das „Diarrhöe Toxin“ ausgelöste Kran e itsbild i rd durch das Bakterium selbst ausgelöst. Hierbei werden die vegetativen Zellen und /oder Sporen des *B. cereus* über die Nahrung aufgenommen. Nach Auskeimen der Sporen im Dünndarm kommt es dort zur Herstellung des Toxins. Die aufgenommenen vegetativen Zellen sowie bereits im Lebensmittel gebildete Enterotoxine werden hingegen größtenteils während der Passage im Magen und Darm inaktiviert. Als Folge der im Darm stattfindenden Giftbildung kommt es zu Diarrhö und Bauchkrämpfen. Diese Symptomkomplexe treten ca. 16 Stunden nach Nahrungsaufnahme ein (DODD et al., 2017; https://www.bfr.bund.de/de/bacillus_cereus-54344.html; eingesehen am 03.03.2022).

Zusätzlich zur Befähigung der Endotoxinbildung kann *B. cereus* auch Proteasen und viele andere extrazelluläre Enzyme produzieren, die den Verderb von Lebensmitteln bedingen können (HOF und SCHLÜTER, 2019).

Ab einer Kei belastung von 10^5 KBE/g kann, infolge der Fähigkeit von *B. cereus* Toxine zu bilden, innerhalb von kürzester Zeit Diarrhö beim Verbraucher auftreten. Bei Cereulid-Bildner reicht sogar ein geringerer Gehalt von *B. cereus* im Lebensmittel aus (10^3 KBE/g) um eine Erkrankung auszulösen (<https://www.bfr.bund.de/cm/343/bacillus-cereus-bakterien-in-lebensmitteln-koennen-magen-darm-erkrankungen-verursachen.pdf>; eingesehen am 03.03.2022).

Bakterien der Gattung ***Listeria*** sind grampositive, sporenlose, Katalase positive gerade Kurzstäbchen. Sie sind mittels peritricher Geißeln ab einer Temperatur von 20°C beweglich und sind als fakultative anaerob wachsende Keime fast überall zu finden. Sie kommen ubiquitär in der Umwelt vor, insbesondere im Boden und somit auch auf Pflanzen, in Abwässern und auch in der Landwirtschaft. Vor allem in tierischen Futtermitteln, dabei speziell in verdorbener Silage, wurden Listerien häufig isoliert. Durch standardisierte Silier-Vorgänge mit Silier-Hilfen wurde die Prävalenz in Silagen minimiert (QUEIROZ et al., 2018). Auch im Kot von gesunden und erkrankten Tieren bzw. im Stuhl von gesunden Menschen sind Keime dieser Spezies zu finden (NYILA, 2018; RYSER und MARTH, 2007).

Listerien sind anspruchslose, widerstandsfähige Bakterien, die nur geringe Ansprüche an ihre Nährstoffe stellen. Listerien können sich bei recht hohen und bei extremen niedrigen Temperaturen vermehren. Ihr Temperaturbereich umfasst dabei eine große Spannweite, reicht von $-0,4^{\circ}\text{C}$ bis $+45^{\circ}\text{C}$ und macht es dem Keim möglich, auch bei Kühlschranktemperaturen zu wachsen. Auch die Tatsache, dass sie bei reduziertem Sauerstoffangebot vom aeroben in den anaeroben Stoffwechsel übergehen können, befähigt sie auch in vakuumverpackten und gekühlten Lebensmitteln zu überleben und sich zu vermehren (<https://lmva.de/wp-content/uploads/2012/10/Listerieninfo.pdf>; eingesehen am 03.03.2022).

Laut derzeitigen Erkenntnissen lassen sich 23 Spezies der Gattung *Listeria* zuordnen, von denen jedoch nur *L. monocytogenes* humanpathogen ist (<https://lpsn.dsmz.de/genus/listeria>; eingesehen am 03.03.2022). *L. monocytogenes* lässt sich in 13 Serovare unterteilen, wobei die Serovare 1/2a, 1/2b und 4b hauptsächlich mit Erkrankungen des Menschen assoziiert sind (GRESSNER und ARNDT, 2019).

Die Infektion mit dem pathogenen Erreger *L. monocytogenes* erfolgt meist nach dem Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln, wobei Nahrungsmittel tierischen Ursprungs eine der bedeutendsten Infektionsquellen darstellen. Vor allem in Rohprodukten, wie Milch und Käse aus Rohmilch, aber auch in rohem und ungenügend erhitztem Fleisch, Geflügel und Fischerzeugnissen (häufig Räucherfisch) finden sich Keime wieder. Auch in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft, besonders bei vorgeschnittenen Salaten, können Listerien nicht selten vorkommen (STEPHAN et al., 2015). Listerien können über das Düngen mit tierischen Abwässern in Gemüse und Obst gelangen. Nicht zu vernachlässigen ist auch eine sekundäre

Kontamination durch nachträgliche Einschleppung des Keims im Zuge von Hygienefehlern und Biofilmen (BIERBACH und GEORGI, 2011; HOF und SCHLÜTER, 2019; MAZAHERI et al., 2021).

Die durch *L. monocytogenes* ausgelöste Listeriose tritt in verschiedenen Verlaufsformen auf. Das Krankheitsbild äußert sich mit grippeähnlichen Beschwerden, wie Fieber, Kopfschmerzen und Muskelschmerzen, beziehungsweise mit gastrointestinalen Beschwerden, wie Durchfall und Erbrechen

(file:///C:/Users/irene/AppData/Local/Temp/Listeriose_Information%20f%C3%BCr%20medizinisches%20Fachpersonal.pdf; eingesehen am 03.03.2022). Auch bei Immunsuppressiven manifestiert sich die Erkrankung mit Symptomen eines grippalen Infektes, kann aber schwerwiegende Verläufe bis hin zu Septikämien und Meningoenzephalitiden hervorrufen (BUCHANAN, et al., 2017). Invasiv gefährlich ist diese Infektion bei Schwangeren, die infolge der intrauterinen Übertragung auch auf den Fötus übergehen kann. Als Folge kann es zu Fehl- und Frühgeburten sowie zu neonatalen Erkrankungen des Neugeborenen kommen (CRAIG et al., 2019).

Salmonellen sind gramnegative, fakultativ anaerobe, Oxidase-negative Stäbchenbakterien. Mit Hilfe von Begeißelungen sind sie meist beweglich und können keine Sporen bilden. Sie werden der Familie der *Enterobacteriaceae* zugerechnet, in der sie als obligat pathogen gelten. Innerhalb der Gattung *Salmonella* werden zwei *Salmonella* Arten unterschieden: *Salmonella bongori* und *Salmonella enterica*. Innerhalb dieser erfolgt wieder eine Unterteilung in Subspezies, welche wiederum mehr als 2500 Serovare umfassen. So wird die Spezies *S. enterica* in 6 Subspezies eingeteilt, die anhand von unterschiedlichen Antigenmustern, nämlich Oberflächen-(O)-, Kapsel-(K)- und Geißel-(H)-Antigenen, in Serovare unterteilt werden. Diese Antigenformel O-H- K schafft die Grundlage des serologischen Typisierungsschemas nach dem White-Kauffmann-Le Minor-Schema

(<https://www.cdc.gov/salmonella/reportspubs/salmonella-atlas/serotyping-importance.html>; eingesehen am 03.03.2022; <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-5-salmonella>; eingesehen am 03.03.2022; SELBITZ et al., 2015).

Salmonellen sind Bakterien, die sehr widerstandsfähig sind und sich rasch verschiedenen Milieubedingungen anpassen können. Sie sind unempfindlich gegenüber Einfrieren und können monate- bis jahrelang je nach Temperatur- und Umweltbedingungen außerhalb des menschlichen und tierischen Körpers überleben (<https://www.vis.bayern.de/ernaehrung/lebensmittelsicherheit/hygiene/salmonellen.htm>; eingesehen am 03.03.2022). Bei tiefen Temperaturen im Minusbereich können sie sogar sehr lange infektionsfähig bleiben

(https://www.bfr.bund.de/de/presseinformation/2021/18/mehr_salmonellen_infektionen_in_europa_hygienericeln_helfen_gefluegel_sicher_zuzubereiten-271764.html; eingesehen am 03.03.2022). Nur auf Hitze reagiert das hitzelabile Bakterium empfindlich (https://www.lgl.bayern.de/lebensmittel/hygiene/bakterien/salmonellen/salmonellen_hintergrund.htm; eingesehen am 03.03.2022).

Salmonellen kommen weltweit sowohl in Tieren und Menschen als auch in Habitaten außerhalb von Organismen vor. Sie sind von großer humanmedizinischer Bedeutung als eine der wichtigsten bakteriellen lebensmittelbedingten Durchfallerkrankungen. Anhand des Krankheitsbildes, das sich einerseits in Form von Durchfall und anderseits auch systemisch manifestieren kann, werden zwei Arten unterschieden.

Auslöser der primär darmassoziierten Infektion können alle *S. Enterica* Serovare sein. Zurzeit sind von den, in sechs Subspezies unterteilten *S. Enterica* circa 1500 Serovare beschrieben. Als klassische Lebensmittelinfektion erfolgt die Ansteckung über die orale Aufnahme von mit Salmonellen besiedelten tierischen Nahrungsmitteln, da voran Geflügel, Eier und Eiproducte, Fleisch und Fleischprodukte, Milcherzeugnisse und Speiseeis (ANTUNES et al., 2016). Dabei wird *S. enteritidis* v.a. über nicht ausreichend erhitzte Eier und die daraus hergestellten Speisen (z.B.: Tiramisu, Cremes, Eis, Mayonnaise) übertragen, *S. typhimurium* hingegen eher über rohes Fleisch oder unzureichend erhitzte Fleischerzeugnisse (https://www.krankenhaushygiene.at/fileadmin/media/ikm/FRL_PDF/08_Infektioes_bakterielle_Durchfallerreger_05.2018.pdf; eingesehen am 03.03.2022); BHUNIA, 2018). Nicht außer Acht zu lassen sind aber auch pflanzliche Produkte, darunter Gemüse und Gewürze, die über Verunreinigungen durch Abwässer oder durch Kot von Nagern und Vögeln mit Salmonellen belastet sein können (SCHIKORA et al., 2008; GOUDEAU et al., 2013; PICHHARDT, 2013). Des Weiteren kann auch eine sogenannte Kreuzkontamination eine wichtige Rolle im Infektionsweg spielen. Dabei kommt es zur Verschleppung des Erregers von primär nicht mit Salmonellen kontaminierten Lebensmitteln.

Eine Erkrankung, die häufig mit akut einsetzendem Durchfall, Kopf- und Bauchschmerzen, Unwohlsein, Erbrechen und manchmal mit leichtem Fieber einhergeht, kommt in der Regel nur dann zustande, wenn eine Erregeranzahl von $> 10^5$ Keimen vorliegt. Diese hohe Keimzahl ergibt sich nur, wenn nach falscher Lagerung oder Handhabung von Lebensmittel sich die Bakterien stark vermehren können. Befinden sich jedoch Salmonellen in stark fetthaltigen Produkten (z. B. Käse, Schokolade und Salami) oder in Gewürzen, dann ist in diesem Fall auch schon eine Erkrankung bei Keimen $< 10^2$ (Infektionsdosis) möglich (https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Salmonellose.html; eingesehen am 03.03.2022). Auch bei immunschwachen Personen, wie z. B. Säuglingen, Kleinkindern und alten Menschen besteht eine erhöhte Krankheitsdisposition bei geringer

Infektionsdosis. Salmonellen gehören zu den durch Lebensmittel übertragbaren Zoonose-Erregern und sind meldepflichtig. Im Jahr 2019 wurden in Österreich insgesamt 1.865 Fälle von Salmonellen gemeldet (<https://www.ages.at/themen/krankheitserreger/salmonellen/>; eingesehen am 03.03.2022).

1.4 Gesetzliche Grundlagen

Um einen unbedenklichen Verzehr von Lebensmitteln für den Konsumenten sicherzustellen, wurden, eine Vielzahl von Gesetzen, Verordnungen und Richtlinien erlassen, die alle das Ziel haben, die Gesundheit der Verbraucherinnen und Verbraucher zu schützen und sie vor Täuschungen zu bewahren

(<https://www.oesterreich-isst-informiert.at/lebensmittel/lebensmittel-zaehlen-zu-den-strangst-geregelten-produkten/>; eingesehen am 03.03.2022).

Rechtsnormen zur Lebensmittelhygiene betreffen alle Stufen der Produktion, der Verarbeitung, des Vertriebs und des Inverkehrbringens von Lebensmitteln für den menschlichen Verzehr. Die Verantwortung für die Sicherheit der produzierten Lebensmittel obliegt der/dem Lebensmittelunternehmerin/ Lebensmittelunternehmer (https://ec.europa.eu/food/safety/biosafety/food_hygiene/legislation_en; eingesehen am 03.03.2022).

In der EU- Basisverordnung VO (EG) 178/2002 werden die allgemeinen Grundsätze des Lebens- und Futtermittelgesetzes festgehalten, deren Inhalt aus grundsätzlichen Regelungen und Konzepten zur Lebensmittelsicherheit besteht. Um das wie in der Basisverordnung er nsc te „o e Sc u tzniveau f r die esund e it des ensc e n und die Verbrauc e rinteressen bei Lebens it teln“ [Art 1 Abs. 1 V (E) Nr. 178/2002] sicherzustellen, urde das sogenannte“ E - ygiene a e t“ erlassen. Dieses setzt sic aus drei Lebensmittelverordnungen zusammen, in der die VO (EG) 852/2004 allgemeine Hygienevorschriften, die VO (EG) 853/2004 spezifische Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischer Herkunft und die VO (EG) 854/2002 spezifische Vorschriften für die amtliche Überwachung von tierischen Lebensmitteln, enthält.

Die EU-Kontroll-Verordnung VO (EG) 2017/625 entspricht einer Kontrollverordnung, die die Durchführung von amtlichen Kontrollen und anderen offiziellen Tätigkeiten verbindlich für alle EU- Mitgliedstaaten festlegt, mit dem Ziel, die Anwendung des Lebens- und Futtermittelgesetzes zu gewährleisten und die Vorschriften über Tiergesundheit und Tierschutz, Pflanzengesundheit und Pflanzenschutzmittel sicherzustellen.

it der Verordnung V (E) 2073/2005 „ b er i r obiologische Kriterien für Lebensmittel“ werden für bestimmte Lebensmittel definierte Kriterien fixiert, die besagen, welche

Mikroorganismen wie z. B. Listerien und Salmonellen nicht nachweisbar sein dürfen. Lebensmittelsicherheitskriterien sind Kriterien, die die Sicherheit des Lebensmittels während der gesamten Haltbarkeit gewährleisten sollen. Bei Nichteinhaltung der Anforderungen gilt das Produkt als nicht sicher und darf nicht in den Verkehr gebracht werden bzw. muss gegebenenfalls vom Markt zurückgeholt werden. Demgegenüber stehen Prozesshygienekriterien für eine akzeptable Funktionsweise des Herstellungsprozesses im Hinblick auf Hygiene.

Im Lebensmittelsicherheits- und Verbraucherschutzgesetz (LMSVG) ist verankert, dass jährlich ein Lebensmittelsicherheitsbericht (LMSB) vorzulegen ist (https://www.verbrauchergesundheit.gv.at/lebensmittel/lebensmittelkontrolle/LMSB_2019_Version_2020_05_28_final.pdf?7vj8dc; eingesehen am 03.03.2022). Dieser Bericht fokussiert auf der Ergebnisdarstellung des Vollzugs der amtlichen Lebensmittelkontrolle gemäß § 31 Abs. 1 LMSVG.

In Österreich werden diese amtlichen Kontrollen durch Lebensmitteluntersuchungsanstalten und Lebensmittelkontrollstellen durchgeführt. Die Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (AGES) nimmt dabei eine zentrale Stellung ein. Ihr Aufgabenbereich reicht dabei von Überwachung der Einhaltung, Lebensmitteluntersuchung, Begutachtungen bis hin zu Risikobewertung, Risikokommunikation und Information (<https://www.ages.at/themen/lebensmittelsicherheit/>; eingesehen am 03.03.2022). In Österreich bildet die AGES diese zentrale Stelle, auf EU- Ebene werden die wichtigen Informationen über die RASFF, das Europäische Schnellwarnsystem für Lebens- und Futtermittel, veröffentlicht. Somit ist ein lückenloser Informationsaustausch zw. allen beteiligten Ländern gegeben und ein größtmöglicher Schutz dem Verbraucher gegenüber gewährleistet (<https://www.baes.gv.at/kontrolle/futtermittel/rasff/>; eingesehen am 03.03.2022).

1.5 Lebensmittelqualität und Sicherheit

Lebensmittel sind Bestandteile des täglichen Lebens und müssen zum Schutz des Verbrauchers hohen Qualitäts- und Sicherheitsstandards entsprechen. Damit ein Lebensmittel sicher ist, müssen durchgehend Qualitätssicherungen und Lebensmittelkontrollen vom Rohstoff bis zum fertigen Produkt stattfinden. Zahlreiche europäische und nationale gesetzliche Vorgaben decken den Bereich der Lebensmittelsicherheit ab (<https://www.oesterreich-isst-informiert.at/herstellung/lueckenlose-qualitaetssicherung-fuer-ihren-genuss/>; eingesehen am 03.03.2022).

Neben diesen strengen gesetzlichen Anforderungen stehen dem Unternehmer noch ergänzende Zertifizierungssysteme, wie z.B. die International Organisation für

Standardisierung (ISO) bzw. lebensmittelspezifische Qualitätssicherheitssysteme wie z. B. die International Food Standard (IFS) zur Verfügung, deren Anwendung grundsätzlich freiwillig und rechtlich unverbindlich ist (MATISSEK et al., 2018). Die umfangreichen Maßnahmen und strikten Vorschriften sind somit eine wichtige Grundlage für die Lebensmittelsicherheit (<https://www.oesterreich-isst-informiert.at/herstellung/strikte-hygienestandards-fuer-unbeschwertenen-genuss/>; eingesehen am 03.03.2022).

Die Verantwortung für die Sicherheit des Lebensmittels, die gesundheitliche Unbedenklichkeit der in Verkehr gebrachten Produkte liegt, primär in der Hand der Lebensmittelunternehmer. Im Rahmen von guter Hygienepraxis und Eigenkontrollen, die auf den Grundsätzen des HACCP Systems aufbauen, tragen sie zur Lebensmittelsicherheit bei. Im Rahmen der Eigenkontrolle und der Stichprobenkontrollen des Handels stehen unabhängige externe akkreditierte Untersuchungslabore zur Verfügung.

Im Zuge der amtlichen Kontrolle werden Proben herangezogen, die anschließend unter anderem auf Schadstoffe, Krankheitserreger, die Einhaltung gesetzlich festgelegter Höchstmengen untersucht bzw. auf korrekte Etikettierung kontrolliert werden. Ebenso wird dabei überprüft, ob im Betrieb ein geeignetes „Hazard Analysis and Critical Control Points“ (HACCP) Konzept vorliegt und eine Rückverfolgbarkeit der Lebensmittel auf jeder Stufe der Lebensmittelkette gegeben ist. Die lückenlose Rückverfolgbarkeit soll sicherstellen, dass nicht sichere Lebensmittel, von denen eine Gefährdung der Gesundheit ausgeht, so rasch wie möglich durch Produktrückrufe aus dem Verkehr gezogen werden (<https://www.oesterreich-isst-informiert.at/lebensmittel/wer-kontrolliert-eigentlich-unsere-lebensmittel/>; eingesehen am 03.03.2022).

Ein weiterer unerlässlicher Grundpfeiler der Lebensmittelsicherheit ist ein gutes Hygienekonzept. Für eine guten Hygienepraxis muss auf die Umsetzung der notwendigen hygienischen Maßnahmen und deren Kontrolle größtmöglichen Wert gelegt werden. Die Lebensmittelhygiene sollte allgegenwärtig sein, muss von dem Erzeugnis der Rohstoffe für das Lebensmittel bis zu seinem Inverkehrbringen und der Abgabe an den Endverbraucher („from farm to fork“) reichen und sollte in allen Bereichen des Betriebes, und zwar im Produktionsprozess, beim Personal, aber auch im Betrieb selbst, Anwendung finden. Zu guter Letzt ist noch die Verpackung als ein entscheidender Faktor für die Lebensmittelsicherheit anzusehen. Sie hat den Zweck, Schutz zu bieten sowie gute Transport- und Lagerungsmöglichkeiten zu gewährleisten. Außerdem fungiert sie als wichtiger Informationsträger (Kennzeichnungspflicht) für den Verbraucher/die Verbraucherin (<https://www.lebensmittelverband.de/de/lebensmittel/verpackung/>, <https://www.oesterreich-isst-informiert.at/lebensmittel/so-sind-lebensmittelverpackungen-rechtlich-geregelt/>; eingesehen am 03.03.2022).

1.5.1 Mikrobiologische Kriterien, Richt- und Warnwerte

Da Lebensmittel, sowohl aus pflanzlicher und tierischer Herkunft, ein mikrobiologisches Risiko darstellen können, wurden im Interesse der Lebensmittelsicherheit und der öffentlichen Gesundheit rechtsverbindliche mikrobiologische Kriterien sowie Richt- und Grenzwerte definiert. Ziel ist es, Lebensmittelunternehmer und Behörden einen objektiven Anhaltspunkt zur Beurteilung der erforderlichen mikrobiologischen Beschaffenheit von Lebensmitteln zu geben (<https://www.dghm-richt-warnwerte.de/de/einleitung>; eingesehen am 03.03.2022).

1.5.2 Mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel

In der Europäischen Union wurden von der europäischen Kommission für bestimmte Lebensmittel im Hinblick auf deren hygienisch-mikrobiologische Beschaffenheit rechtsverbindliche Anforderungen festgelegt. In der gültigen Verordnung (EG) Nr.2073/2005 sind mikrobiologische Kriterien für gewisse Mikroorganismen sowie Durchgangsbestiungen veranwortet, „die von den Lebensmittelunternehmen bei der Durchführung allgemeiner und spezifischer Hygienemaßnahmen gemäß Artikel 4 der Verordnung (EG) Nr. 852/2004 einzufüllten sind“ [Abs 1 V (EG) Nr. 2073/2007]. Diese Kriterien, welche sich durch Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein von Mikroorganismen bzw. deren in der Probe vorkommenden Anzahl sowie an der durch Mikroorganismen produzierter Menge an Toxinen oder Metaboliten charakterisieren, werden in Bezug auf Akzeptabilität eines Produktes oder einer Lebensmittelpartie herangezogen. Dadurch wird die Unbedenklichkeit von Lebensmitteln vom Erzeuger bzw. Hersteller gewährleistet (Abs 21 VO (EG) NR. 2073/2005).

1.5.3 Lebensmittelsicherheitskriterien

Lebensmittelsicherheitskriterien sollen die Sicherheit des Lebensmittels während der gesamten Haltbarkeitsdauer auf den Stufen des Vertriebs, der Lagerung und der Verwendung gewähren.

Fertigsalate, deren Hauptbestandteil geschnittenes Gemüse beinhaltet, werden der Kategorie „verzerrte fertige Lebensmittel mit einer Haltbarkeit unter 5 Tagen“ zugeordnet. D. h. der Grenzwert von 100 KBE *L. monocytogenes* darf während der Haltbarkeit in 25 g Probenvolumen nicht überschritten werden [VO (EG) Nr. 2073/2005]. Beim Vorhandensein von Salmonellen bezieht sich die Verordnung auf Bestimmungen, die in der Lebensmittelkategorie „Vorzerleinerte Obst und Gemüse (verzerrt fertig)“ veranwortet sind. In jedem Fall dürfen Salmonellen in 25g nicht nachweisbar sein [VO (EG) Nr. 2073/2005].

1.5.4 Prozesshygienekriterien

Das Prozesshygienekriterium ist ein maßgebliches Kriterium in Hinblick auf Hygiene, das die akzeptable Funktionsweise des Herstellungsbetriebes bestimmt. Es nimmt Bezug auf nicht im Handel befindliche Erzeugnisse (Art 2 lit d VO (EG) Nr. 2073/2005). Durch dieses werden Richtwerte für die Kontamination definiert, bei deren Überschreitung Korrekturmaßnahmen einzuleiten sind. Dies ist nötig, um konform mit dem Lebensmittelrecht zu gehen. Hinsichtlich Fertigsalaten zählt *E. coli* zu den prozesshygienerelevanten Mikroorganismen. Sie unterliegen den in Tabelle 4 ersichtlichen Bestimmungen.

Tabelle 4: Prozesshygienekriterien in puncto *E. coli* f r „vorzerleinertes bst und e se (verze rfertig“ [An ang II Ka 2 V (E) Nr. 2073/2005].

Probenahmen plan ¹		Grenz werte		Analytische Referenz- methode	Stufe, für die das Kriterium gilt	Maßnahmen im Falle un- befriedigender Ergebnisse
n	c	m	M			
5	2	100 KBE/g	1000 KBE/g	ISO 16649-1 oder 2	Während der Herstellung	Verbesserungen in der Herstellunghygiene und bei der Auswahl der Rohstoffe

¹ n= Anzahl der Probeeinheiten der Stichprobe; c= Anzahl der Probeeinheiten, deren Werte zw. m und M liegen; m = unterer Grenzwert; M = oberer Grenzwert.

Die Testergebnisse reflektieren die mikrobiologischen Bedingungen des entsprechenden Herstellungsprozesses; Die Interpretation der Untersuchungsergebnisse kann wie folgt bewertet werden:

- befriedigend, sofern alle ge esenen Werte \leq sind
- akzeptabel, sofern maximal zwei der fünf gemessenen Werte zwischen m und M liegen und die br igen ge esenen Werte \leq sind
- unbefriedigend, sofern ein oder mehrere gemessene Werte $> M$ sind oder mehr als 2 gemessene Werte zwischen m und M liegen

1.5.5 Mikrobiologische Richt- und Warnwerte

Ein großer Teil von Lebensmitteln unterliegt keinen verbindlichen Bestimmungen, sodass es sowohl für die amtliche Lebensmittelüberwachung als auch für Hersteller und Handel an Bezugspunkten für die Beurteilung mikrobiologischer Befunde fehlt. Ein wichtiger Beitrag diese mikrobiologische Lücke zu füllen, leistet die Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), eine wissenschaftliche Arbeitsgruppe, die ergänzend zu der geltenden nationalen und europäischen Gesetzgebung laufend Empfehlungen für ausgewählte

Lebensmittel herausgibt. Die Erstellung/Festsetzung von rechtlich nicht bindenden Richt- und Warnwerten sollen Wirtschaft, Behörde und Endverbraucher eine Grundlage zur Bewertung des mikrobiologischen hygienischen Status von Lebensmitteln geben. Richtwerte fungieren als Orientierungsgröße, „die Produkte sind mikrobiologisch sicher“ (https://www.dghm.org/wp-content/uploads/2018/10/Entw%C3%BCrfe_03.18_Ver%C3%BCff._NEU.pdf, eingesehen am 03.03.2022).

Eine Richtwerteüberschreitung wird nicht empfohlen; wird der Keimgehalt dennoch überschritten, besteht aber trotzdem keine akute Gesundheitsgefährdung. Das Überschreiten der Richtwerte verdeutlicht nur die im Herstellungsprozess vorherrschenden Schwachstellen. Bleibt hingegen der Keimgehalt der Proben unter dem festgesetzten Richtwert, so gelten sie als verkehrsfähig. Ganz im Gegensatz dazu kann das Überschreiten der Warnwerte eine Gesundheitsgefährdung für Endverbraucher hervorrufen und einen Hinweis auf Verletzung der guten Hygiene – und Herstellungspraxis geben. Der Warenwert bezieht sich auf die Menge der in einem Produkt vorhandenen pathogenen Mikroorganismen, bei deren Überschreitung das Produkt als gesundheitsgefährdend einzustufen ist. Die nachfolgende Tab. 5 verdeutlicht die Richt- und Warnwerte für Mischsalate hinsichtlich ihrer relevanten Mikroorganismen.

Tabelle 5: Richt- und Warnwerte Mischsalate roh, frisch, verzehrfertig.

Mikroorganismen	Richtwerteüberschreitung (KBE/g)	Warnwerteüberschreitung (KBE/g)
Gesamtkeimzahl aerob	$5,0 \times 10^7$	-
<i>E. coli</i>	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$
Hefen	$1,0 \times 10^5$	-
Schimmelpilze	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^4$
<i>Salmonella</i> spp.	-	Nicht nachweisbar in 25g
<i>L. monocytogenes</i>	-	$1,0 \times 10^2$
<i>B. cereus</i> , präsumptiv	$5,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$

Quelle: LADR Der Laborverbund Dr. Kramer & Kollegen GbR, Geesthacht, Deutschland; <https://www.ladr-lebensmittel.de/richt-warnwerte/salat>; gesehen am 07.01.2020

1.6 Ziel der Studie

Ziel dieser Arbeit war es, die mikrobiologische Belastung von Rohstoffkomponenten und verzehrfertigen Salaten zu untersuchen. Das Probematerial bestand dabei aus 87

Fertigsalaten und Rohstoffen, die vom Industriepartner zur Verfügung gestellt wurden. Das Warenangebot inkludierte verschiedene Blattsalate (Rucola, Mischsalate, Vogerlsalat), versetzt mit verschiedenen Fleisch- und Käsesorten und den dazu angebotenen Dressings.

Die longitudinale Analyse der Proben erfolgte auf Grundlage von Kultur basierten und molekularbiologischen Nachweisverfahren, wobei die diagnostische Bestimmung der zu untersuchenden Mikroorganismen, darunter Hygieneindikatorkeime, pathogene Erreger und Verderbs-Organismen, gemäß der ISO Normen durchgeführt wurde.

Anhand der gestellten Hypothesen sollte gezeigt werden, inwieweit Fertigsalate den mikrobiologischen Richt- und Grenzwerten für verzehrfertige Salate, siehe Tabelle 5, entsprechen bzw. inwieweit die mikrobiologische Rohstoffanalyse in Verbindung mit potentiell Eintrag von Verderbs-Erregern gebracht werden kann.

1.6.1 Hypothese

Hypothese I: die mikrobiologischen Richt- und Warnwerte für verzehrfertige Salate werden nicht überschritten.

Hypothese II: die mikrobiologische Rohstoffanalyse gibt Auskunft über potentiellen Eintrag von Verderbs-Erregern.

2 Material und Methodik

2.1 Geräte und Material

Die für die nachfolgende Studie verwendeten Geräte und Materialien, mit den zugehörigen Herstellern, sind der Appendix Tab. 1 zu entnehmen.

2.2 Untersuchungsmaterial

Im Rahmen dieser Studie wurden 87 verzehrfertige Fertigsalate inklusive Dressings und den dazugehörigen Rohstoffen mikrobiologisch und molekularbiologisch untersucht. Ein besonderes Augenmerk richtete sich auf die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl (AMC), *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, Milchsäurebakterien, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* und präsumptive *B. cereus*, die mittels PCR Methoden bestätigt wurden.

Die Proben wurden von einem österreichischen Lebensmittelunternehmen zur Verfügung gestellt. Die essfertigen, verpackten Fertigsalate wurden aus dem täglichen Herstellungskontingent entnommen. Die zu untersuchenden Rohstoffe waren teilweise originalverpackt, teilweise repräsentative Stichproben, die während des Produktionshergangs gezogen wurden. Die täglich frische Zubereitung der fast ausschließlich aus österreichischen bzw. regionalen Betrieben stammenden Zutaten erfolgt unter strengsten Hygiene- und Sicherheitsmaßnahmen. Abpackung und Auslieferung erfolgt zeitnah nach Herstellung.

Die Anlieferung der zu untersuchenden Proben fand unmittelbar nach Herstellung der Salate unter Einhaltung der Kühlkette (Styroporbox, 4 °C) an das Labor der Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien statt. Sofort nach Einlangen der Proben an der Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie begann die Untersuchung der Salate, Dressings und Rohstoffe.

2.1 Rohstoffe, Fertigsalate und Dressing

Die Probenpalette der Fertigsalate umfasste jeweils 10 unterschiedliche Produkte, die in Tabelle 6 ersichtlich sind. Die Auslieferung erfolgte in Plastikgefäßen mit wiederverschließbaren, fest schließenden Deckeln, in Originalverpackung. Die Chargennummer, das Herstellerdatum und das Mindesthaltbarkeitsdatum (MHD) waren abhängig vom Lieferzeitpunkt bzw. Herstellerzeitpunkt und somit bei jedem neuen Probenansatz unterschiedlich.

Tabelle 6: Auflistung der analysierten Fertigsalatsorten und Inhaltsstoffe laut Herstellerangaben auf dem Etikett.

Probe	Zutaten
Caesar Salat 295 g	Blattsalate, gebratene Hühnerbrust, Eier, Speckwürfel, Kräutercroutons, Hartkäse (Gluten, Milch, Ei, Fisch, Senf)
Thunfischsalat, Mais, Ei 350 g	Blattsalat-Mix, Thunfisch, Mais, Karotten-Julienne, Ei, Fisch (Milch, Senf, Laktose)
Crispy Chicken Salat 400 g	Blattsalat-Mix, gebackene Hühnerbruststücke in Sesampanade, Tomaten, Karotten-Julienne, gelber Paprika, Radieschen (Gluten, Ei, Milch, Senf, Sesam, Laktose)
Bunter Wurstsalat 400 g	Extrawurst, Emmentaler, Essiggurkerl, roter Paprika, Zwiebel, Blattsalat-Mix (Milch)
Lachsstücke, Blattsalat 290 g	Blattsalat-Mix, gebratene atlantische Lachsfiletstücke, Gurken, Radieschen, Kresse (Fisch)
Mediterraner Pastasalat 390 g	Penne, Pesto Rosso, Tomaten, Rucola, Parmesan-Chip (Gluten, Milch, Ei)
Thai-BBQ-Chicken Salat 350 g	Blattsalat- Mix, Pulled Chicken, Gurken, Cocktailltomaten, Zwiebel, Kresse, Cashewkerne (Schalenfrüchte)
Sommersalat, Grillkäse 300 g	Blattsalat-Mix, gebratener Grillkäse, gelber Paprika, Radieschen, Cocktailltomaten (Ei, Milch, Laktose, Senf)
Tomaten-Mozzarellasalat 370 g	Eisberg-, Zuckerhut-, und Friséosalat, Tomaten, Mozzarella- Bällchen, Pesto Genovese (Milch, Ei, Senf, Laktose, Sulfit)
Falafelsalat 440g	Falafel auf Humus, Blattsalat-Mix, Tomaten, Gurken (Gluten, Milch, Ei, Senf, Sesam, Laktose)

Im Rahmen der Studie wurden auch Salat Dressings, siehe Tabelle 7, zur Testung bereitgestellt. Diese Proben wurden von der Herstellerfirma in original verschweißten kleinen Plastikgefäßen, separiert von den Fertigsalaten, mitgeliefert. Herstellerdatum, Chargennummer und MHD orientierten sich wieder an dem jeweiligen Herstellerdatum.

Tabelle 7: Auflistung der analysierten Salat Dressings.

Probe
Caesar Dressing
Knoblauch Dressing
Wiener Marinade
Thai Dressing
Jogurt Kräuter Dressing
Balsamico Dressing

Zusätzlich wurden noch 20 unterschiedliche Rohstoffe, die für die Herstellung der Fertigsalate verwendet wurden, beprobt. Herstellerdatum, Chargennummer und MHD waren unterschiedlich, angepasst an das Produktionsdatum der Salate. Die für die Untersuchung zur Verfügung gestellten Rohstoffe sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Auflistung der analysierten Rohware.

Probe
Karotten Julienne 3mm frisch 1.000g
Zwiebeln Julienne 5mm 1.000g
Jungzwiebeln frisch 1.000g
Gurkerln Julienne 5mm 8kg
Tomaten ganz 1.000g
Cocktailtomaten halbiert 1.000g
Grüner Salatmix 1kg 1.000g
Rucola grob geschnitten 1.000g
Vogerlsalat
Paprika gelb ganz 500g
Paprika rot ganz 500g (geschnitten)
Radieschen ganz geputzt 1.000g
Mangold rot mini 1.000g
S+R Extrawurst in Streifen 1.000g
Emmentaler geschnitten (in Streifen)
Pulled Chicken gebraten GW UF 1.000g
Pesto Rosso für V-Nr UF 1.000g (inkl. TK Tomaten)
Penne gekocht UF 1.000g
Wurstsalat- Mischung UF 1.000g
Knoblauchpulver

2.2 Probenansatz und mikrobiologische Untersuchung

Die Probeaufbereitung begann sofort nach Einlangen der vom Hersteller zur Verfügung gestellten gekühlten Waren. Arbeitsflächen und Instrumente wurden nach jedem Arbeitsschritt gereinigt und desinfiziert, Handschuhe nach jeder Probe gewechselt. Zur Entnahme der diversen Anreichungsmedien wurden ebenfalls sterilen Hilfsmittel (Messkolben, Pipetten, etc.) verwendet (Appendix Tabelle 1).

Ein Hauptaugenmerk der mikrobiologischen Untersuchung der Rohstoffe und Fertigsalate lag auf der Bestimmung von der aerobe mesophile Gesamtkeimzahl (AMC), *Enterobacteriaceae* (EB), *Pseudomonadaceae* (PS), Milchsäurebakterien (LAB) und pathogenen Organismen wie *E. coli*, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* und präsumptiven *B. cereus*. Die mikrobiologische Untersuchung der Dressings beschränkte sich auf die Bestimmung der AMC. Eine grobe Übersicht über grundlegende Informationen der mikrobiologischen Analyse kann Tabelle 9 entnommen werden.

Von jeder Probe wurde je 25 g Probematerial in einen sterilen Stomacherbeutel eingewogen, mit 225ml gepuffertes Peptonwasser (BPW) bzw. Halbfraser (HF) übergossen und für 3 min

in einem Stomacher Labor- Homogenisator geknetet (1:10 Verhältnis von der Untersuchungsmenge zum selektiven Anreicherungsmedium). Durch die Verarbeitung mittels Stomacher wurde eine gute Homogenisierung der Proben erreicht, um eine bestmögliche Keimverteilung im Lebensmittel zu erzielen. Die mit HF versetzte 1:10 Verdünnung wurde bei einer Temperatur von 30 °C für 24h inkubiert. Die Weiterverarbeitung erfolgte nach der Bebrütung am nächsten Tag und entspricht somit dem qualitativen Nachweis von *L. monocytogenes* und *Listeria spp.* nach ISO 11290-1 (2017) - Horizontales Verfahren zum Nachweis und zur Auszählung von *Listeria monocytogenes* und *Listeria spp.* – Teil 1: Nachweismethode.

Die mit BPW angereicherte Suspension wurde, um die entsprechenden Verdünnungen herzustellen weiterverwendet. Dafür wurde jeweils nach nochmaliger Durchmischung der Initialsuspension eine 1:10 Verdünnungsreihe in steriler Ringerlösung bis Verdünnung 10⁻⁶ hergestellt (Abbildung 3). Für die Primärverdünnung (VD1) wurden jeweils 3 x 333µl auf drei Agarplatten aufgetragen. Zur Herstellung der zweiten Verdünnungsstufe wurden die entsprechenden Agarplatten mit 100µl beimpft. Anschließend wurden die Inokula (333µl x 3, 100µl) mit einer zu einem Spatel gebogenen Pasteurpipette ausgespatelt. Nach den durchgeführten Arbeitsschritten wurde das BPW zur Erst-Anreicherung für *Salmonella spp.* gemäß ISO 6579 (2017) und bei einer Temperatur von 37°C für 18h inkubiert.

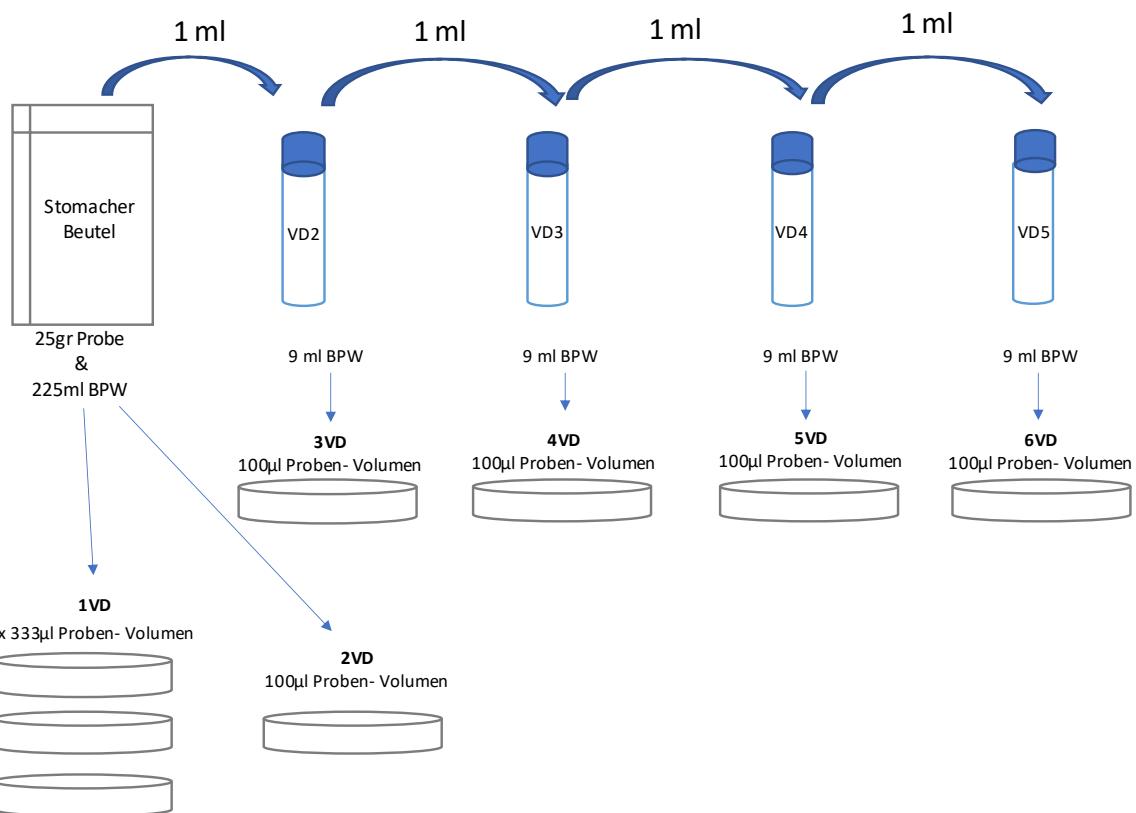


Abbildung 3: Verdünnungsreihe für Rohstoffe, Salate und Dressings.

Abkürzungen: BPW, Buffered Peptonwater; VD, Verdünnung

Tabelle 9: Übersicht zur mikrobiologischen Analyse.

Nachweis von	Nähr- medium	Verdünnungsstufe	Inkubation	ISO
AMC	TSAY	VD 3-5 Salate, Rohstoffe, VD 1-6 Dressing	3 Tage, 30°C	4833-2:2013
EB inkl. <i>E. coli</i> , PS	VRBD	VD 1-4	1-2 Tage, 30 °C	21528-2:2017
LAB	APT	VD 3-5	1-2 Tage, 30°C	
<i>B. cereus</i>	MYP	VD 1-4	1-2 Tage, 30 °C	7932:2004
Listeria	ALOA	HF und VF Anreicherung	2 Tage, 37 °C	11290-1:2017
Salmonella	XLD	MKKTN und RVS Anreicherung	2 Tage, 37 °C	6579-1:2017

Abkürzungen: AMC, aerobe mesophile Gesamtkeimzahl; EB, *Enterobacteriaceae*; *E. coli*, *Escherichia coli*; PS, *Pseudomonas*; LAB, Milchsäurebakterien; *B. cereus*, *Bacillus cereus*; TSAY, Trypton-Soya mit 6% Hefe; VRBD, Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose; APT, All Purpose Tween; MYP, Mannitol Eigelb Polymyxin; ALOA, Brilliance™ *Listeria* Agar; XLD, Xylose-Lysin-Desoxycholat; VD, Verdünnung; HF, Halbfräser inkl. Supplementen; VF, Vollfräser inkl. Supplementen; MKKTN, Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin Broth; RVS, Rappaport-Vassiliadis-Salmonella.

Nach Überimpfen der jeweiligen Verdünnungen auf die entsprechenden Selektivmedien wurden die Nährmedien in einem Brutschrank, entsprechend der Kultivierungseigenschaften der zu untersuchenden Mikroorganismen, inkubiert (Tabelle 9). Zu beachten war eine mikroaerophile Bebrütung des APT Nährmediums, um ein besseres Wachstumsmilieu für Milchsäurebakterien zu erzielen. Dafür wurden die APT Platten mit einem besonderen

Gasgemisch (10% CO₂, 3% O₂, 87% N₂) versetzt, um eine geringere Sauerstoffkonzentration als wie in normaler Luft (~ 20% Sauerstoff) vorhanden, zu erlangen.

Die quantitative Berechnung der Keimzahl erfolgte gemäß der Formel (<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-3-aerobic-plate-count>;eingesehen am 03.03.2022):

$$N = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0.1 \times n_2) \times (d)]}$$

N = Anzahl der koloniebildenden Einheiten pro Gramm Probe (KBE/g); C = Summe aller Kolonien der Keimzählplatten von zwei aufeinander folgenden Verdünnungen; n₁ = Anzahl der Keimzählplatten der niedrigeren Verdünnung; n₂ = Anzahl der Keimzählplatten der höheren Verdünnung; d = Verdünnungsfaktor der niedrigeren Verdünnung.

, wobei Platten von Verdünnungen mit Koloniewachstum <10 und >300 nicht in der Berechnung berücksichtigt wurden.

Das Verfahren zum Nachweis von *Listeria monocytogenes* und *Listeria spp.* erfolgte anhand der ISO Norm 11290-1:2017- Horizontales Verfahren zum Nachweis und zur Auszählung von *Listeria monocytogenes* und *Listeria spp.* – Teil 1: Nachweismethode, einer Referenzmethode zum qualitativen Nachweis gemäß der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 Anhang I.

Der Nachweis von Listerien wurde anhand mehrerer Arbeitsschritte durchgeführt. Zu Beginn der Analyse erfolgte eine Voranreicherung der homogenisierten Probe (25g) in einer Halb-Fraser (HF) Bouillon (225ml). Nach entsprechender Inkubation (30 °C für 24 Stunden) kam es erstens zur Herstellung einer weiteren Anreicherung und zweitens zum Ausstrich auf ein Selektivmedium. Zur Herstellung der Selektivanreicherung wurden 100 µl der HF-Anreicherung in eine Vollfraser (F) Bouillon überimpft, anschließend gut gevortext und bei 37°C für 48 Stunden nochmals inkubiert. Für den Ausstrich der HF- Anreicherungen wurden 10µl auf eine ALOA- Platte aufgebracht und nachfolgend ein fraktioniertem 3- Ösen- Ausstrich vorgenommen. Nach weiterer Inkubation von 48 Stunden bei 37°C wurden die HF- ALOA Platten ausgewertet. Als letzter Arbeitsvorgang wurden nochmals 10µl der bereits inkubierten Selektivanreicherung entnommen, mittels fraktionierten 3- Ösen- Ausstrichs auf ein ALOA- Nährmedium ausgestrichen und bei 37°C für 48 Stunden inkubiert. Hierauf erfolgte wieder die Verifizierung. Die Abb.4 zeigt eine graphische Darstellung der einzelnen Schritte.

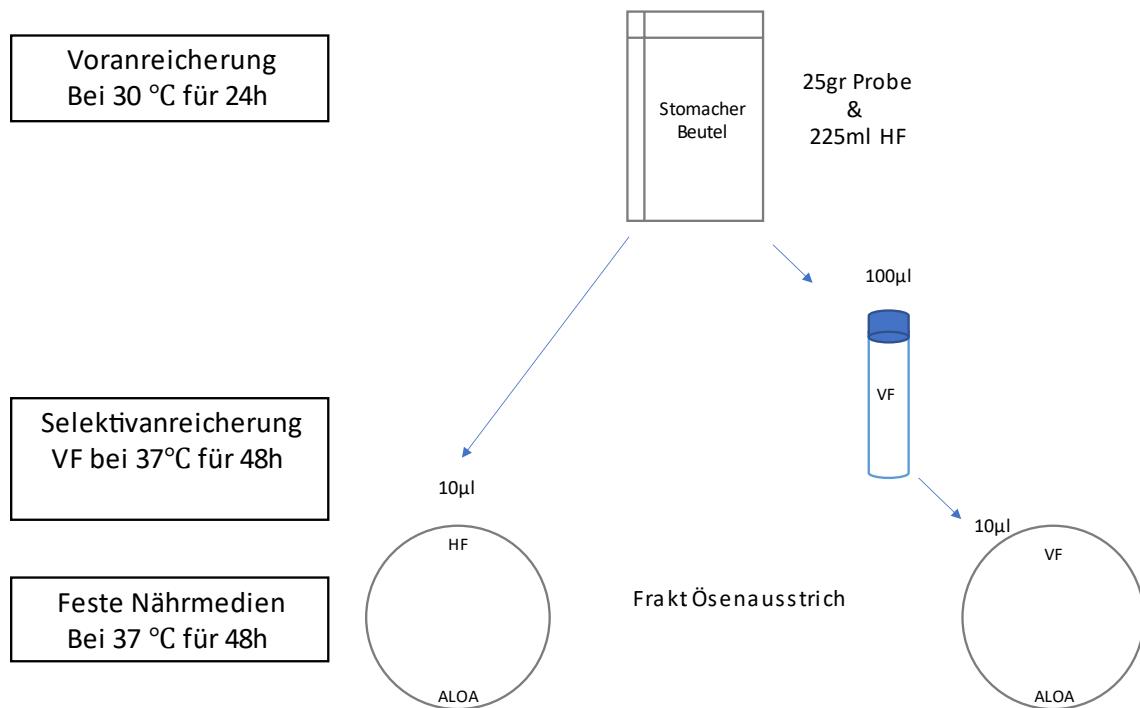


Abbildung 4: Anreicherungsschema *Listeria* gemäß ISO 11290-1.

Abkürzungen: HF, Halbfraser inkl. Supplementen; VF, Vollfraser inkl. Supplementen; frakt, fraktionierter; ALOA, Brilliance™ *Listeria* Agar

Der Nachweis von Salmonellen aus Lebensmitteln entspricht dem horizontalen Verfahren der ISO 6579-1:2017 - Horizontales Verfahren zum Nachweis, zur Zählung und zur Serotypisierung von Salmonellen – Teil 1: Nachweis von *Salmonella* spp. Dabei wurden die, aus einer Voranreicherung entstandenen Selektivanreicherungen, nach entsprechender Inkubation, auf selektive Nährmedien mittels fraktioniertem 3- Ösen- Ausstrichs ausgestrichen. Für die unselektive Voranreicherung der Salmonellen wurden 25g der, gut mit dem Stomacher homogenisierten, Probe mit 225ml gepuffertem Peptonwasser vermengt und für 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Daraufhin erfolgte eine 2. Anreicherungsstufe in zwei selektiven Flüssigmedien. Hierfür wurden von der Voranreicherung jeweils 1 ml Muller-Kauffmann Tetrathionat-Novobiocin (MKTN) bzw. 100 µl Rappaport-Vassiliadis-Salmonella (RVS) in die jeweilige Anreicherungsbouillon überimpft. Nach entsprechender Inkubationsdauer und – zeit wurden von beiden Röhrchen jeweils 10 µl auf ein Xylose-Lysin-Desoxycholat Nährmedium (XLD) mit Hilfe eines fraktionierten 3- Ösen- Ausstriches aufgebracht. Die einzelnen Arbeitsvorgänge sind in Abb. 5 dargestellt.

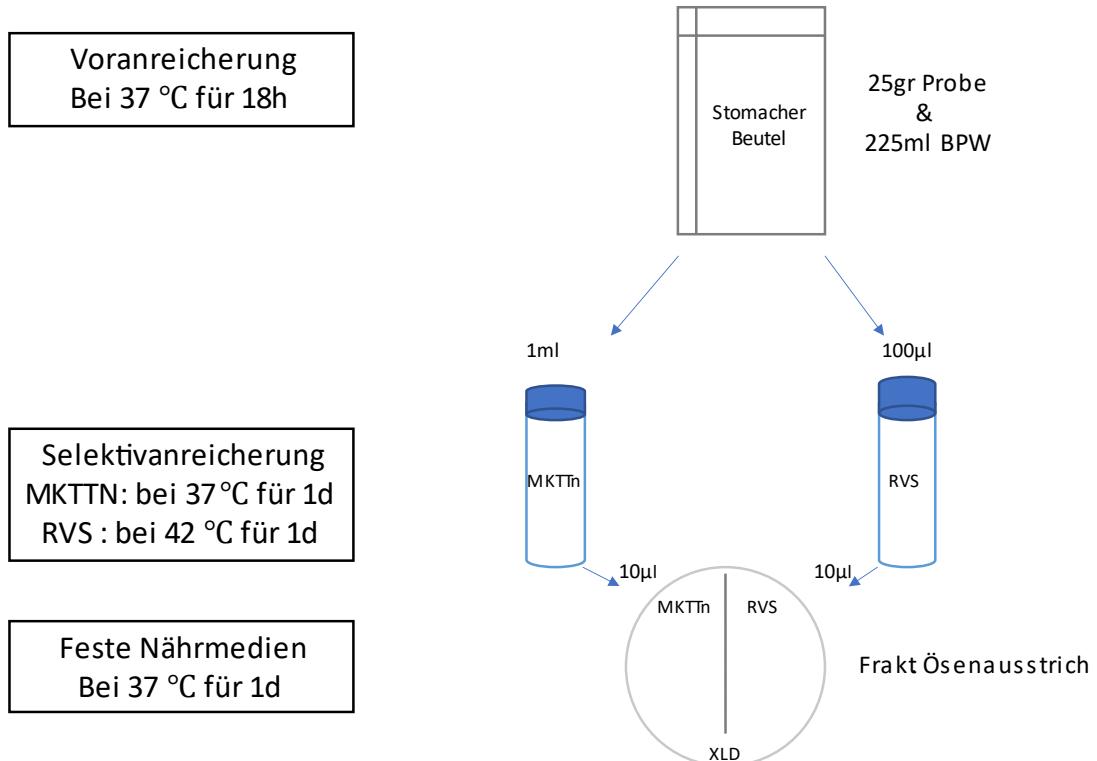


Abbildung 5: Verfahrensschema Salmonellen.

Abkürzungen: BPW, Buffered Peptonwater; MKTTN, Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin Broth; RVS, Rappaport-Vassiliadis-Salmonella; XLD, Xylose-Lysin-Desoxycholat; frakt, fraktionierter

2.3 Isolierung von Mikroorganismen und Gewinnung von Reinkulturen

Nach Identifizierung von möglichen Verdachtskolonien erfolgte eine Subkultivierung der Mikroorganismen mit dem Ziel, eine Reinkultur zu gewinnen, um diese daraufhin bestätigen zu können. Zu diesem Zwecke wurde eine verdächtige, wenn möglich gut von anderen Kolonien abgegrenzte Einzelkolonie gepickt und im Zuge des fraktionierten 3- Ösen-Ausstrichs auf einem Selektivnährmedium soweit verdünnt, dass es durch Dichtereduktion zu einer Einzelkolonieisolierung kam. Nach erfolgreicher Vereinzelung erfolgte eine neuerliche Überimpfung und Ausplattierung der Zielkolonie auf Trypto Casein Soya Agar (TSAY) (Inkubation bei 30 °C für 48h) zum Zwecke der Vermehrung dieses einen Mikroorganismenstammes. Somit entstand eine homogene Kultur, deren genetisches Material ident war.

2.4 Kryokonservierung von Reinkulturen

Nach Vorliegen der jeweiligen Reinkulturen wurde eine große Menge an Material mittels steriler blauer Öse abgenommen und in ein Kühlmedium übergeführt. Nach vollständiger Auflösung des Materials in einer Mischung aus 1 ml Brain Heart Infusion (BHI) und 1 ml 60% Glycerol wurde diese sofort bei -80 °C eingefroren (Abbildung 6).

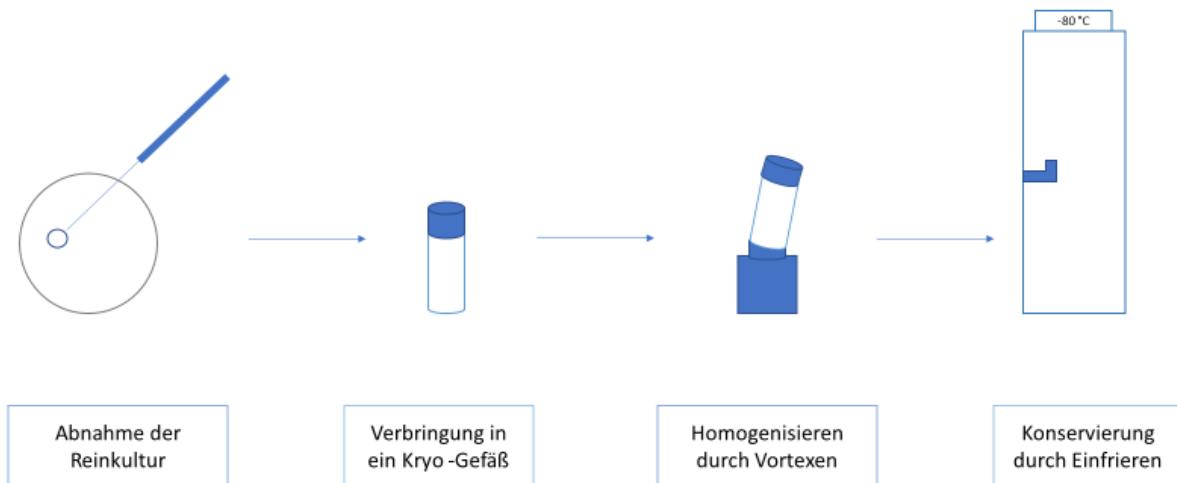


Abbildung 6: Kryokonservierung von verdächtigen Isolaten zur näheren Speziesbestätigung.

2.5 Bestätigung von Reinkulturen

Die genaue Identifizierung der einzelnen Mikroorganismen erfolgte einerseits über ein biochemisches Schnellbestimmungssystem und andererseits über eine molekularbiologische Methode.

Bei verdächtigen pathogen erscheinenden Mikroorganismen kam das Schnelltestsysteem Analytical Profile Index (API) zur Anwendung. Damit sollten medizinisch relevante Mikroorganismen, die ein Gesundheitsrisiko für den Menschen darstellen könnten, rasch erkannt werden. Für den Nachweis von Listerien wurde der Api *Listeria*, für den Nachweis *Enterobacteriaceae* der Api rapid ID32 E bzw. der Api 20E verwendet.

Das miniaturisierte und standardisierte Identifikationssystem beruht auf biochemischen Reaktionen, wobei die Verwertbarkeit von Kohlenhydraten, die Bildung spezifischer Stoffwechselprodukte und die Aktivität von bestimmten Enzymen der jeweiligen Mikroorganismen bestimmt wird. Diese Vorgänge werden anschließend durch Indikatorssysteme, in diesem Fall durch Farbumschläge, sichtbar gemacht. Die stattgefundenen Farbreaktionen zeigen sich entweder spontan während der Inkubation oder

nach Zugabe von Reagenzien. Hierbei entsteht ein buntes Bild, das sich aus den verschiedenen Farbreaktionen einzelner Indikatoren ergibt. Die Auswertung dieses auch als sogenannte „Bunte Rei e“, bezeic n eten Testsyste s erfolgt ittels eines Kodierungssystems, wobei die Farbumschläge ein numerisches Profil ergeben, das anschließend mit einer Datenbank verglichen wird.

Molekularbiologische Methoden sind zuverlässige Diagnosewerkzeuge und ermöglichen eine sichere Identifikation von Mikroorganismen auf DNA- Ebene. Die Fähigkeit der Feintypisierung und Feindifferenzierung von Mikroorganismen ist wichtig, um Lebensmittelinfektions- und -intoxikationserreger rasch und korrekt zu erkennen.

Die hier angewendete molekularbiologische Methode beruht auf einer Target spezifischen PCR- Analyse, womit repräsentative Isolate von *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli* und *B. cereus* bestätigt wurden. Außerdem erfolgte eine Speziesbestimmung mittels partieller 16S rRNA-Sequenzierung. Diese Daten wurden dankenswerter Weise von Dr. Beatrix Stessl zur Verfügung gestellt.

3 Resultate

3.1 Probencharakteristika und Hygieneindikatoren

Bei dieser Studie wurden insgesamt 87 Proben analysiert, wobei sich der Probenumfang aus 3 Produktgruppen, Endprodukt, Rohstoff und Dressing, zusammensetzt. Davon, wie in Abbildung 7 ersichtlich, fallen 52,27% auf das Produkt (N= 46), 28,41% auf den Rohstoff (N=25) und 19,32% (N= 17) auf das Dressing. Details der Untersuchungsansätze sind in Appendix Tabelle 10 dargestellt.

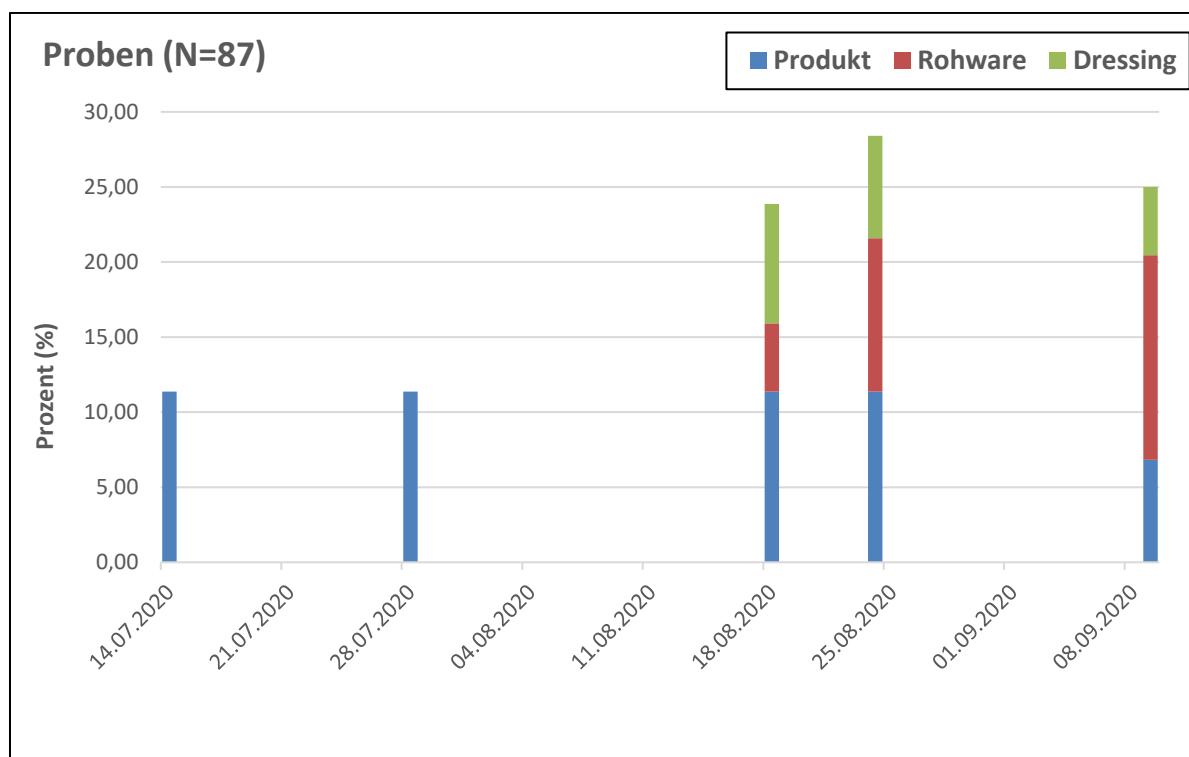


Abbildung 7: Probenumfang (insgesamt n= 87) bestehend aus Endprodukt /Salat (blau), Rohware (rot) und Dressing (grün).

Die quantitativen Ergebnisse der AMC, LAB, EB und BCG in den Fertigsalaten (n=46) sind in Abbildung 8 zusammengefasst.

In der Gruppe der AMC wiesen die Salate eine mikrobielle Belastung zwischen 5,9 log KBE/g und 7,4 log KBE/g auf, wobei der Mediterrane Pasta Salat den niedrigsten und der Blattsalat mit Lachsstücken den höchsten Wert zeigte. Bei den Milchsäurebakterien lagen die Werte zwischen 4,9 log KBE/g und 6,9 log KBE/g. Die höchsten Koloniezahlen (> 6,4 log KBE/g) waren dabei in Salaten mit Fleischbeimengungen zu finden (Wurstsalat, Thai BBQ – Chicken Salat und Thunfischsalat). In der Familie der *Enterobacteriaceae* bzw. präsumtiver *Bacillus cereus* (BCG, *Bacillus cereus* Gruppe) überwog die „Non-Target“ gegenüber der „Target“ Fraktion. Die Non-Target Gruppe auf dem entsprechenden Agar umfasst Bakterien, die auf den Selektivagarmedien ein nicht typisches Koloniebild zeigen. Im Fall der *Enterobacteriaceae*

sind diese Non-Target Kolonien Laktose-negativ, mit blasser Koloniefarbe, teilweise schleimig und konfluierend, was auf Pseudomonaden hinweist. Beim BCG Nachweis ist bei der Non-Target Flora ein β -D Glukosidase und Mannitol negatives Ergebnis dominierend (blaue Koloniefarbe, gelber Nährbodenhintergrund). In jedem Fall fehlt das typische rhizoide Wachstum, das typisch für BCG ist. Eine generelle erhöhte Grundbelastung in der BCG in den vorhandenen Salaten war zu erkennen (1,6 log KBE/g bis 6,4 log KBE/g).

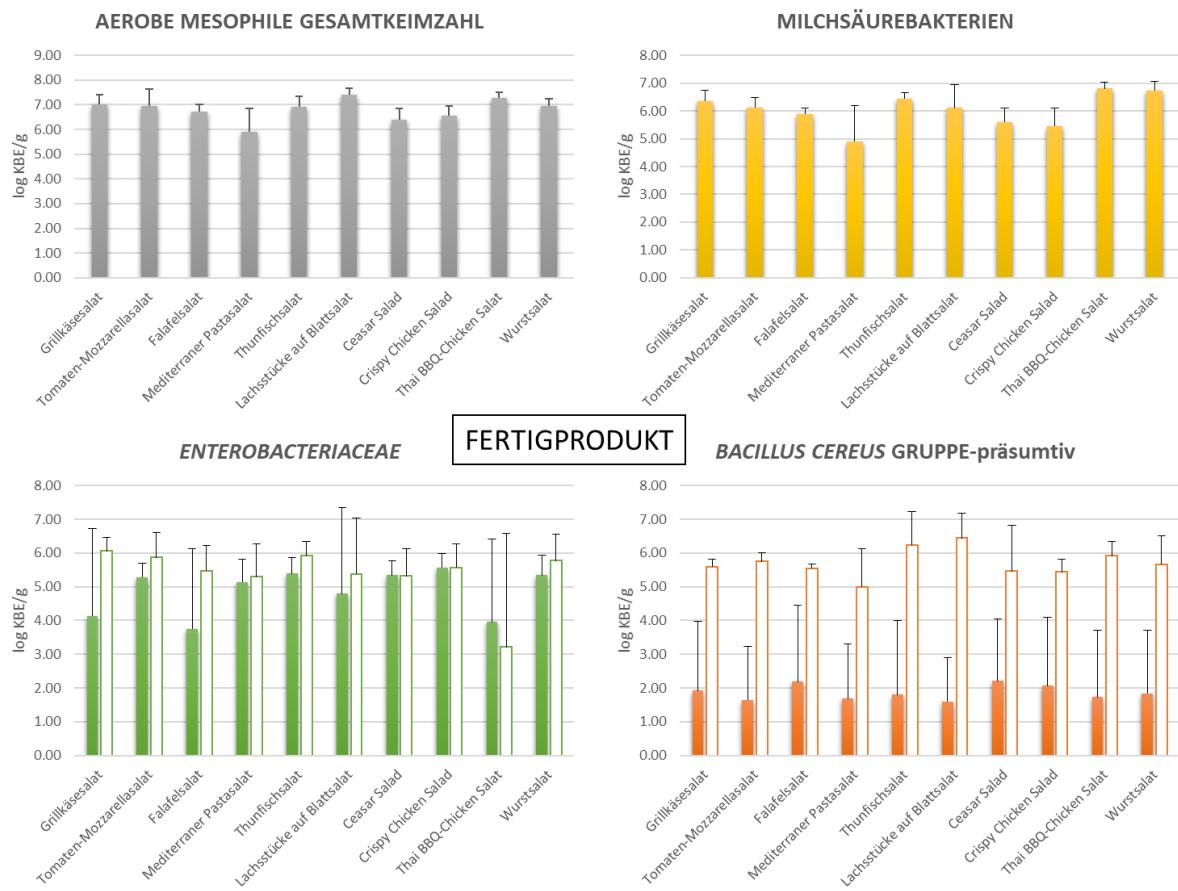


Abbildung 8: Mikrobiologische Qualität von Fertigsalaten.

Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung der analysierten Mikroorganismengruppen, deren Keimzahlen als Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) je Gramm (g) Salatprobe angegeben sind. Legende: Aerobe Mesophile Gesamtkeimzahl (grau), Milchsäurebakterien (gelb), *Enterobacteriaceae* (grün = Target, weiß/grün = Non-Target), *B. cereus* Gruppe- präsumtiv (orange = Target, weiß/orange = Non-Target).

Der Probenumfang der Rohstoffe konnte grob in vier Kategorien gegliedert werden: Salate, Gemüse, Fleisch bzw. Käseprodukte und Andere (Pesto, Penne, Knoblauchpulver). Die detaillierte Auflistung der analysierten Rohstoffproben ist in Tabelle 8 aufgelistet bzw. in Abbildung 9 ersichtlich. Die höchste AMC wurde bei Zwiebeln und Emmentaler nachgewiesen: Zwiebeln (7,5 log KBE/g), gefolgt von Blattsalaten (6,7 log KBE/g - 7,4 log KBE/g) und Emmentaler (7,3 log KBE/g). Gurkerl-Julienne und Penne gekocht wiesen die geringste aerobe mesophile Gesamtkeimzahl (AMC 0,3 log KBE/g) auf. Bei den Milchsäurebakterien (LAB) lagen die Keimzahlen zwischen 0,6 log KBE/g und 7,5 log KBE/g. Hierbei lagen die

Zwiebel und der Emmentaler im Bereich $> 7,0 \log \text{KBE/g}$. Bei Paprika gelb, Gurkerl Julienne, Knoblauchpulver und Penne gekocht war die LAB Zahl unter der Nachweisgrenze ($< 1,00 \log \text{KBE/g}$). Wie in Abbildung 9 ersichtlich war die Gruppe der *Enterobacteriaceae* sowohl in der Target als auch in der Non-Target Gruppe im Rohstoffsortiment besonders stark vertreten. In der Non-Target Fraktion lag mit Ausnahme von Gurkerl Julienne, Emmentaler und Penne gekocht (alle EB $< 1,00 \log \text{KBE/g}$) die EB Keimzahl zw. $2,2 \log \text{KBE/g}$ und $6,4 \log \text{KBE/g}$. Betrachtet man die Target Fraktion zeigt nur das Gurkerl Julienne eine niedrige Keimzahl von $< 1,00 \log \text{KBE/g}$. Die restlichen Rohstoffe variierten zw. $1,5 \log \text{KBE/g}$ und $6,4 \log \text{KBE/g}$. Die mikrobiologische Analyse der präsumtiven *B. cereus* (BCG) zeigte, dass besonders die grünen Blattsalate in toto, Paprika rot ganz und das Knoblauchpulver in der Target Gruppe erhöhte BCG Gehalte im Vergleich mit den anderen Rohstoffen ($< 1,00 \log \text{KBE/g}$) aufwiesen. In der Non-Target Gruppe konnten nur der Vogerlsalat, das Gurkerl Julienne, Emmentaler und Penne gekocht Wert von $> 1,00 \log \text{KBE/g}$ aufweisen. Die übrigen Rohstoffe in dieser Fraktion zeigten einen Keimgehalt von $2,8 \log \text{KBE/g}$ bis $6,5 \log \text{KBE/g}$.

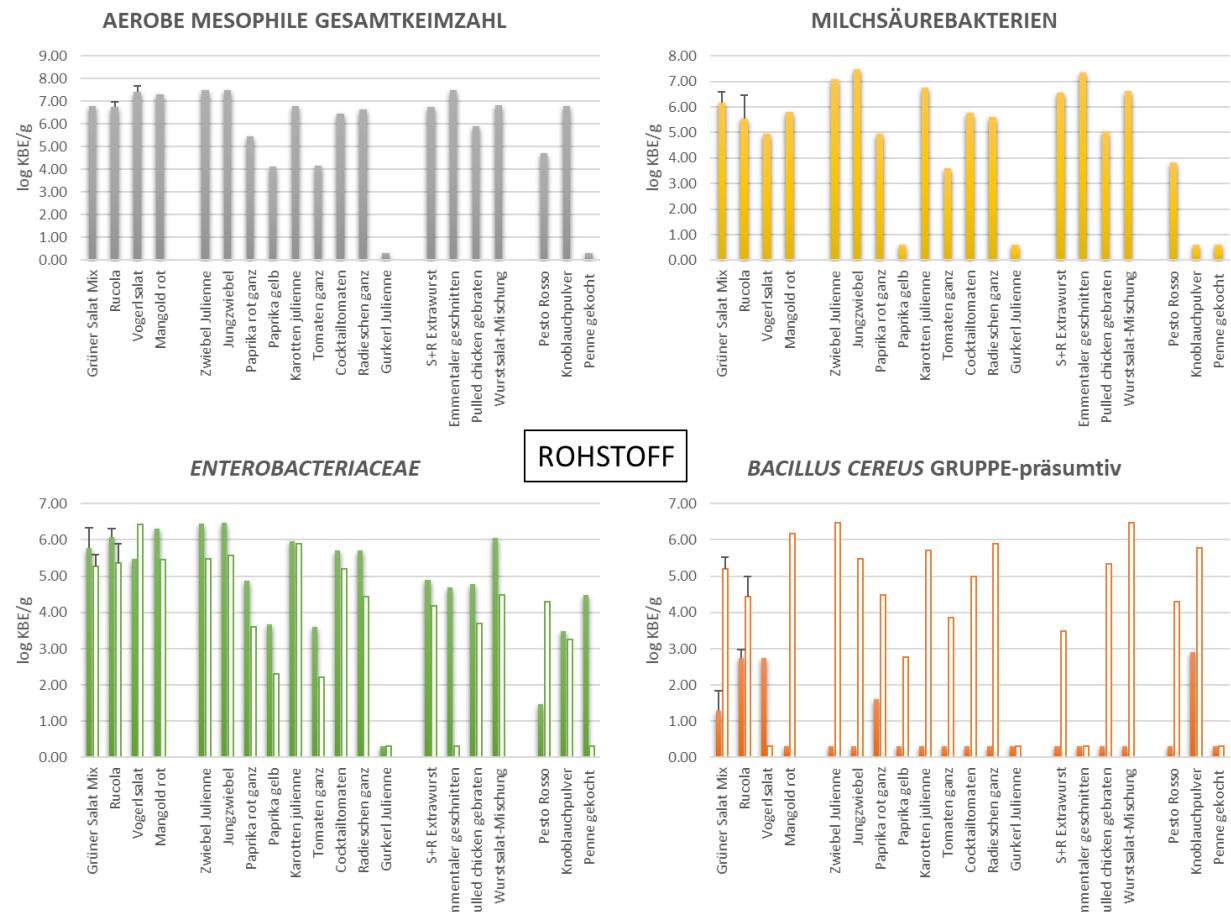


Abbildung 9: Mikrobiologische Qualität von Rohstoffen.

Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung der analysierten Mikroorganismengruppen, deren Keimzahlen als Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) je Gramm (g) Salatprobe angegeben sind. Legende: Aerobe Mesophile Gesamtkeimzahl (grau), Milchsäurebakterien (gelb), *Enterobacteriaceae* (grün = Target, weiß/grün = Non-Target), *B. cereus* Gruppe- präsumtiv (orange = Target, weiß/orange = Non-Target).

In Abbildung 10 ist die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl (AMC) der Salatdressings dargestellt. Die AMC aller Dressings lag zwischen 0,3 und 4,45 log KBG/g.

Dabei war die Marinade Essig und Öl nahezu keimfrei, und Knoblauchdressing, Jogurt Kräuter Dressing und Thai Dressing wiesen die höchsten AMC Werte auf (2,57 log KBG/g - 4,45 log KGB/g). Im Knoblauchdressing war das Koloniebild sehr einheitlich. Der Leitkeim deutete auf einen Vertreter der Gruppe der aeroben Sporenbildner hin (schleimig, rauhe, bergartige sich ausdehnende Koloniemorphologie). Diese Ergebnisse decken sich mit den Resultaten der mikrobiologischen Analyse der Rohware Knoblauchpulver. Im Jogurt Kräuter Dressing waren Schimmelkolonien mit schwarzem Pigment die dominierende Flora.

Bei den anderen Dressing- Arten (Thai Dressing, Cesar Dressing und Balsamico Dressing) wurde kein spezieller Leitkeim vorgefunden. Es lag ein heterogene Mischflora vor, eine Mischung von aeroben Sporenbildnern (rauh, unregelmäßiger Rand, ausladendes Wachstum 3-5 mm Durchmesser) und Kokken (0,5 -1 mm Durchmesser, rund, glatt, glänzend, opak, gelb oder cremefarbenes Pigment).

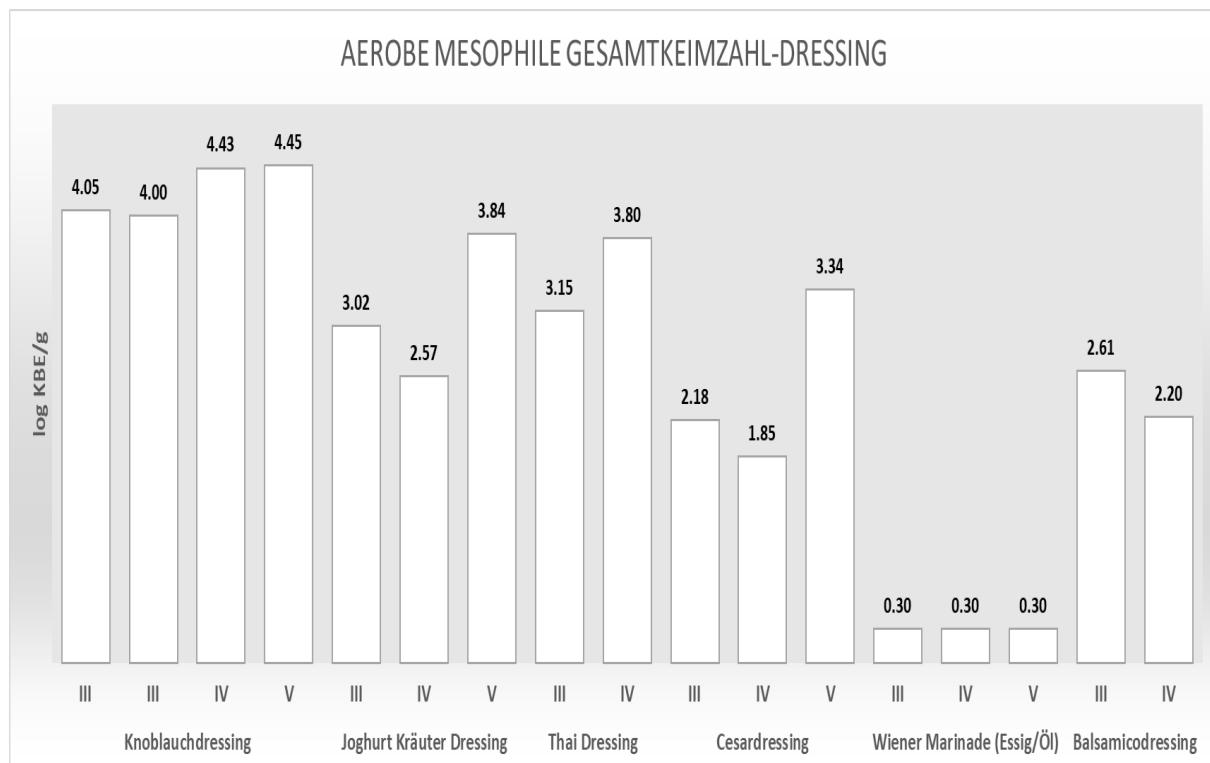


Abbildung 10: Mikrobiologische Qualität von Dressings.

Dargestellt ist der Mittelwert der analysierten Mikroorganismengruppe (AMC), dessen Keimzahl als Koloniebildenden Einheiten (KBE) je Gramm (g) Dressing angegeben ist. Legende: III-V: dritter bis fünfter Beprobungsevent.

3.2 Nachweis von lebensmittelpathogenen Keimen

Salmonella spp. wurde in keiner Probe gemäß der ISO 6579 nachgewiesen. Eine atypische Kolonie wurde bei einer Probe Thai BBQ-Chicken auf Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD) Agar detektiert. Die Bestätigung mit API® RAPID 20E (Biomerieux) ergab *Citrobacter freundii*. Apathogene Listerien (*L. seeligeri*/*L. welshimeri*) wurden im Caesar Salat und mediterranen Pastasalat nachgewiesen (ISO 11290-1). *L. monocytogenes* PCR Serogruppe 1/2a, 3a war nachweisbar im Rohstoff Extrawurst in Streifen und im Produkt bunter Wurstsalat (LECLERCQ et al., 2011).

3.3 Identifizierung von hoch abundanten Bakterienspezies

Eine weitere Differenzierung der Isolate auf Probenebene wurde innerhalb der *Enterobacteriaceae* vorgenommen. Dabei wurden die Genera präsent in Rohstoff und Fertigsalaten in Bezug auf Präsenz oder Absenz verglichen. Im Rohstoff (n=28 Proben) und im Endprodukt (n=60 Proben) waren verschiedene Vertreter von *Enterobacteriaceae* vorhanden. Im Rohstoff war die bakterielle Diversität geringer als im Fertigsalat, da 10 und 13 verschiedene Gattungen der Familie der Enterobakterien nachweisbar waren. Unter Andere (other EB) wurden Vertreter der Enterobakterien zusammengefasst, die nur einmal in einer Probe nachgewiesen wurden (Abbildung 11).

Die Gattung *Kluyvera* war besonders häufig im Rohstoff präsent (grüner Salatmix n=2 Proben, Rucola n=2, Mangold n=1 Tomaten ganz n=1 und Pulled Chicken n=1). *Kluyvera* war dementsprechend auch im Fertigprodukt anzutreffen, was auf einen Eintrag über den Rohstoff spricht (Grillkäsesalat n=1, Falafel Salat n=1, Thunfischsalat n=1, Lachsstücke auf Blattsalat n=3). Die Gattung *Serratia* war nur in drei Proben im Rohstoff vorhanden (grüner Salatmix, Rucola und Cocktailltomaten), war aber hoch abundant im Endprodukt (n=16 Proben), was auch auf ein vermehrtes Vorhandensein während der Produktion hinweist. Die Gattung *Erwinia* wurde in drei Rohstoffproben nachgewiesen (grüner Salatmix, Rucola und Pulled Chicken) und war im Endprodukt auch in Mischsalaten mit Produkten tierischer Herkunft vertreten (n=6 Proben). *Rahnella* war auf Rohstoffebene in grünem Salatmix, Paprika gelb und Tomate nachweisbar und zeigt auch eine Zunahme der Nachweisbarkeit im Endprodukt (n=6 Proben).

Im Rohstoff waren außerdem *Lelliottia*, *Pantoea*, *Cedecea*, *Leclercia* und *Hafnia* anzutreffen. Ausschließlich aus Endprodukten wurden *Citrobacter* (Grillkäsesalat n=1, mediterraner Pastasalat n=3), *Enterobacter* (Tomate-Mozarella Salat n=1, Crispy Chicken Salat n=1, bunter Wurstsalat n=1), *Raoultella* (Tomate-Mozarella Salat n=1, Thunfischsalat n=1) und andere *Enterobacteriaceae* isoliert (Abbildung 11).

Auf Rohstoffebene war die größte Bakterien Diversität im Grünen Salatmix, Rucola (*Serratia*, *Kluyvera*, *Erwinia*, *Rahnella*, *Lelliotta*, *Cedecea*, *Hafnia*) und Pulled Chicken (*Kluyvera*, *Erwinia*, *Cedecea* zu beobachten. Im fertig zusammengestellten Produkt war die größte bakterielle Diversität im Thunfischsalat und Crispy Chicken Salat vorhanden. Neue Genera die im Endprodukt hinzukamen waren *Raoultella* (Thunfischsalat) und *Enterobacter*, *Pantoea* und andere Enterobakterien Gattungen die nur einmal isoliert wurden (Crispy Chicken Salat).

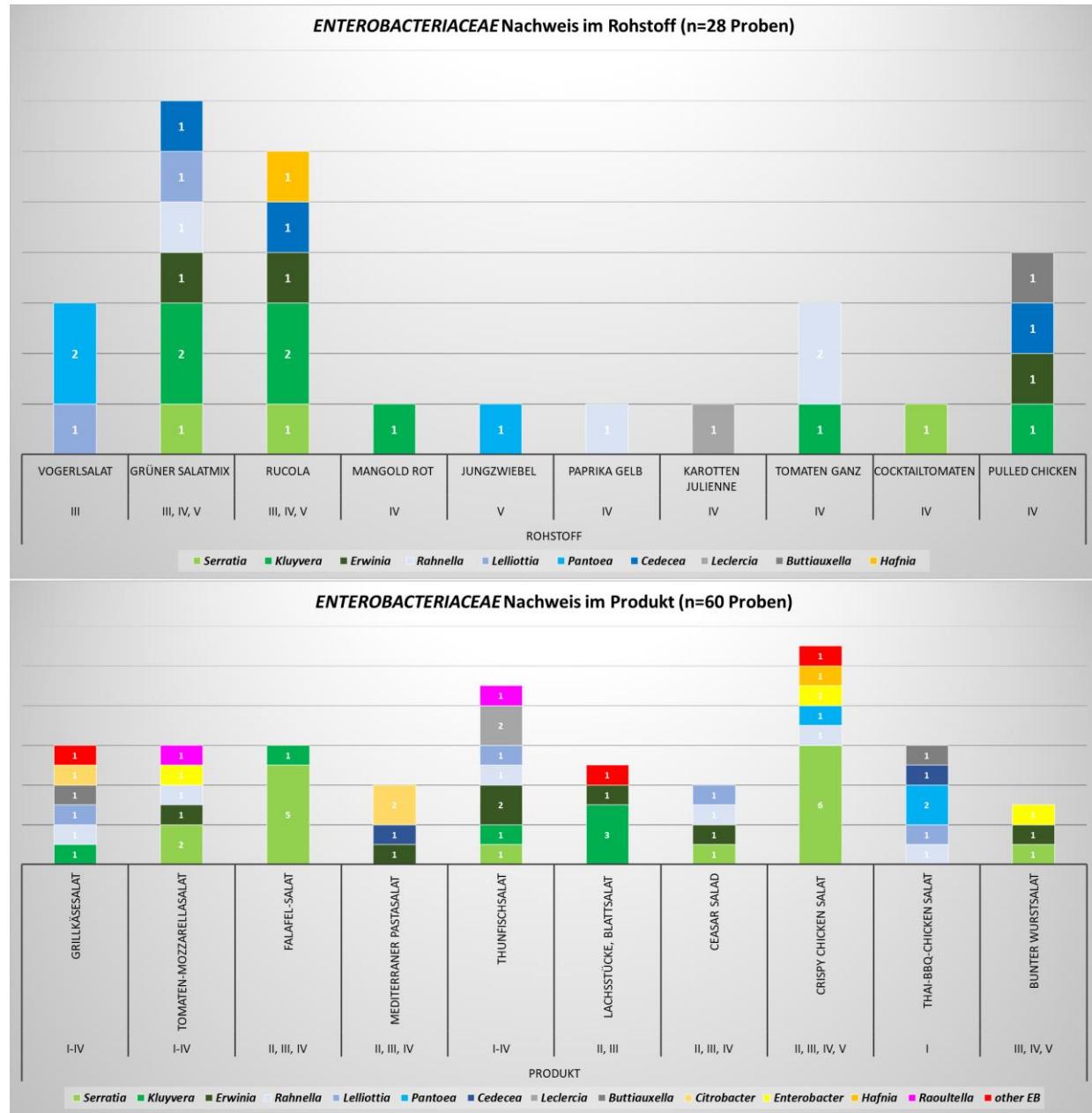


Abbildung 11: Enterobakterien Präsenz im Rohstoff und Produkt.

Legende: I-V: erster bis fünfter Beprobungsevent.

Die Abbildung 12 zeigt das unterschiedliche Spektrum von *Pseudomonadaceae* und *Aeromonas* im Rohstoff und im Produkt. In 15 Rohstoffproben bzw. in 35 Produktproben

wurden 7 bzw. 15 unterschiedliche Arten isoliert. Bei Rohstoff (n=7) als auch Produktproben (n=12) war *P. azotoformans* prädominant. Des Weiteren wurden *P. poae* und *Aeromonas* in jeweils vier Rohstoffproben nachgewiesen. Die restlichen isolierten Spezies waren in den jeweiligen Rohstoffproben nur einmalig vorzufinden. Die größte Bakteriendiversität wies Mangold auf (n=3 Genera).

Bezüglich der Produkte war, so wie bei den Rohstoffen, *P. poae* als zweithäufigste Bakterienart zu finden (in 9 Proben positiv), gefolgt von *P. marginalis* (in 7 Proben positiv) und *P. synxantha* (in 4 Proben positiv). *P. marginalis* war neu in Fertigprodukten und könnte auch im Verarbeitungsprozess eingetragen worden sein.

Diese Beobachtung trifft auch auf folgende Spezies zu: *P. putida*, *P. punonensis*, *P. brassicacearum* subsp. *neoaurantiaca*, *P. protegenes*, *P. koreensis* und *P. brenneri* zu. *Aeromonas* wurde in den entsprechenden Fertigprodukten nur mehr in Thunfischsalat nachgewiesen (Abbildung 12).

Die anschließende weitere Isolat-Bestimmung mit 16 Sequenzierungen ergab ein mehrheitliches Vorhandensein der *Bacillus subtilis* Gruppe (e.g. *B. atrophaeus*=*B. nakamurai*, *B. subtilis*, *B. velezensis*, *B. licheniformis*, *B. mojavensis*, *B. halotolerans*, *B. tequilensis*) in Knoblauchdressing (n=4), dem Rohstoff Knoblauchpulver (n=1) dafür und Vogerlsalat (n=1 Probe)

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=653685>; eingesehen am 03.03.2022). Die *Bacillus cereus* Gruppe war in mehreren Rohstoffen überrepräsentiert (n=8 Proben, Vogerlsalat, Rucola, grüner Salatmix, Radieschen und Paprika rot). Da die *B. cereus* Gruppe schon sehr präsent in den Hauptrohstoffquellen der Fertigsalate war, wurde sie auch in allen Arten der Fertigsalate angetroffen (n=26 Proben).

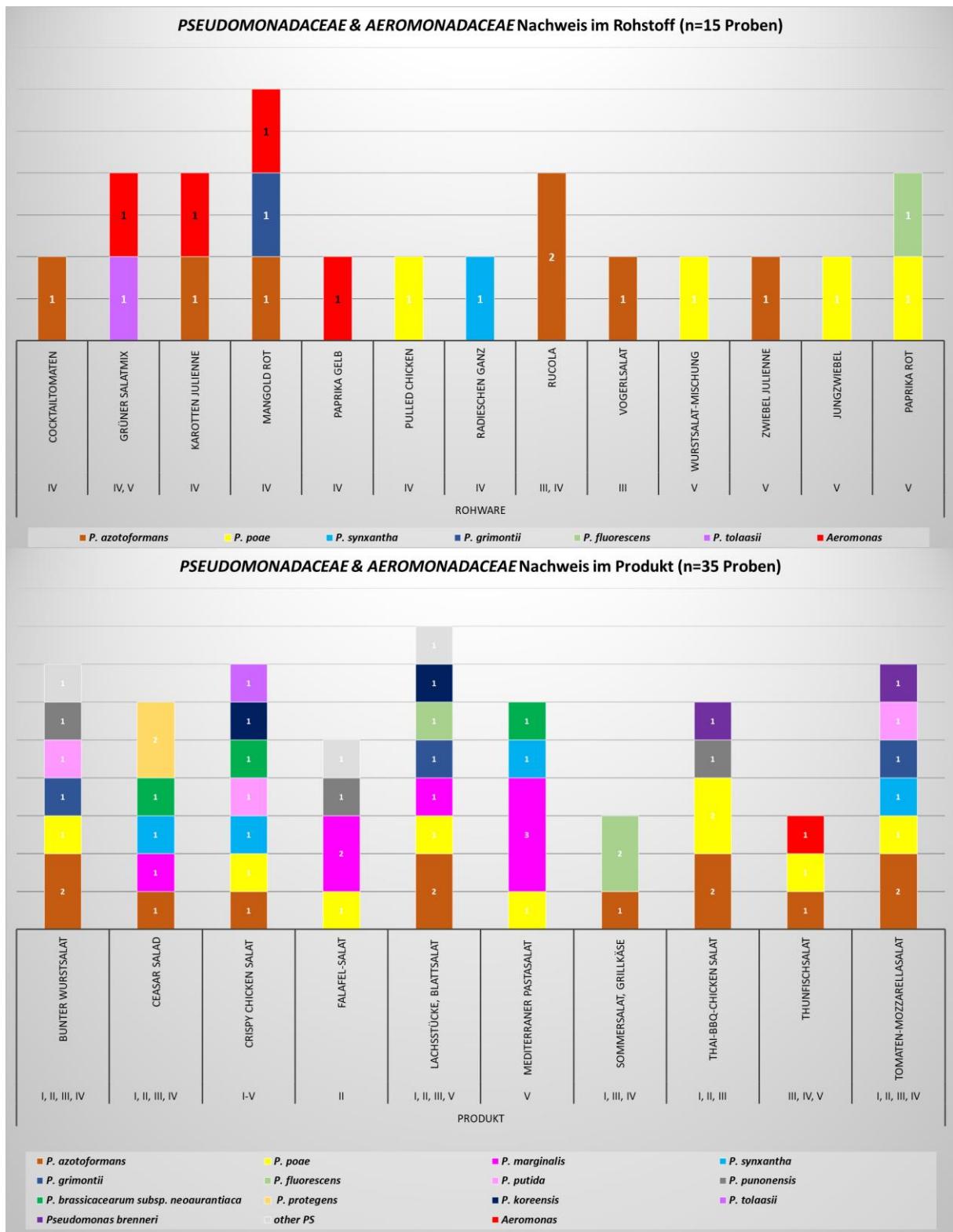


Abbildung 12: Pseudomonaden und Aeromonaden Präsenz im Rohstoff und Produkt.

Legende: I-V: erster bis fünfter Beprobungsevent.

4 Diskussion

Auf Grund der Veränderungen der Lebensumstände und dem Wandel des Lebensstils nehmen Convenience Produkte im Handel zu (BARSKA, 2018). Das Angebot an Lebensmitteln, die einerseits schnell zubereitet werden können und einer gesunden Ernährung entsprechen ist zunehmend (MASSAGLIA et al., 2019; SIDDIQUI & RAHMAN, 2014).

„Fresh Cut“ Salate zählen zu den minimal verarbeiteten Lebensmitteln und besitzen als biologisch leicht verderbliche Produkte ein mikrobiologisches Belastungspotenzial (<https://www.verbraucherzentrale.nrw/wissen/lebensmittel/auswaehlen-zubereiten-aufbewahren/keimgefahr-auch-vorgeschnittene-salate-immer-waschen-38808>; eingesehen am 03.03.2022). Da es sich bei Fertigsalaten um ein minimal prozessiertes Produkt handelt, die weder wärmebehandelt noch chemisch konserviert werden, ist eine gute Rohstoffqualität und -Herstellungshygiene entscheidend über die Endproduktqualität und -sicherheit (LEPECKA et al., 2022; YOUSUF et al., 2020).

Das Ziel dieser Studie bestand darin, die mikrobiologische Beschaffenheit von Fertigsalaten zu ermitteln und deren mikrobiologische Qualität in Hinsicht auf relevante Hygieneindikatorkeime und das Vorhandensein von pathogenen Bakterien (Salmonellen und *Listeria monocytogenes*) zu untersuchen.

Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass zwar alle Salate mikrobiologisch „nicht zu beanstanden“ bis „a zetabel“ waren und so fit als verkehrsfähig galten, jedoch dennoch mit einer erhöhten Gesamtkeimzahl versehen waren (<https://www.ladr-lebensmittel.de/richt-warnwerte/salat>; eingesehen am 14.03.2022). Besonders Salate mit Fleischbestandteilen wiesen eine erhöhte Gesamtkeimzahl auf (>6,4 log KBE/g; Abbildung 8). Die niedrigste AMC war bei mediterranem Pastasalat (5,9 log KBE/g) und die höchste bei Salat mit Lachs (7,4 log KBE) zu beobachten.

Beim *Enterobacteriaceae* Nachweis waren eher Non-Target Organismen (Pseudomonaden) überwiegend, *E. coli* war nicht nachweisbar. Die *Enterobacteriaceae* Target-Werte waren im Falafelsalat am niedrigsten (3,76 log KBE/g) und im Crispy Chicken Salat am höchsten (5,57 log KBE/g).

Hefen und Schimmel waren im Produkt nicht nachweisbar. Staphylokokken wurden ebenso nicht nachgewiesen und auch in den 16-S Sequenzierdaten nicht anzutreffen. Der Wert präsumtive *B. cereus* lag für die Fertigsalate unter dem DGHM-Warnwert 5x 10³ KBE/g (Abbildung 8; Durchschnitt: 1,87 log KBE/g).

Die Produkte enthielten keine Salmonellen, und *L. monocytogenes* war nur in einem Salat (Wurstsalat) unter 100 KBE/g enthalten. Dabei handelte es sich um Serogruppe 1/2a, 3a die

auch im Rohstoff Extrawurst nachweisbar war, also eindeutig durch den Rohstoff eingetragen wurde. Die niedrige Prävalenz an Zoonoseerregern deckt sich mit Studien von BRANDAO et al. (2014) und CALONICO et al. (2019). Apathogene Listerien (*L. seeligeri*/*L. welshimeri*) wurden im Caesar Salat und mediterranen Pastasalat nachgewiesen. Dieser Nachweis dient dem Hersteller als Hygieneindikator, und durch Überprüfung des Rohstoffs und der Prozesshygiene bzw. Umfeldhygiene können Kontaminationen mit pathogenen Listerien vermieden werden (KASZONI-RÜCKERL et al., 2020).

Die PCR *L. monocytogenes* Serogruppenbestimmung ergab 1/2a, 3a, wobei der Serotyp 1/2a häufig mit menschlichen Listeriosen Ausbrüchen in Verbindung gebracht werden konnte (EBAKOTA et al., 2018; SHENG et al., 2018). Listerien konnten neben einer Vielzahl von tierischen Lebensmitteln wie „I eisc und I eisc e rzeugnisse“, „i sc und i sc e rzeugnisse“ sowie „ilc und ilc e rzeugnisse“ auch in er öfters von flanzlichen Lebensmitteln isoliert werden (EFSA BIOHAZ PANEL, 2018; GÓMEZ et al., 2015). Dem Verzehr von kontaminierten RTE-Produkten kommt dabei eine immer größere Bedeutung zu (EBAKOTA et al., 2018; EFSA BIOHAZ PANEL, 2018). In minimal verarbeiteten, roh verzehrten Lebensmitteln kann keine vollständige mikrobielle Abtötung gewährleistet werden und daher stellen diese Produkte zunehmend ein potenzielles Vehikel für *L. monocytogenes* dar (TOWNSEND et al., 2021). Als ubiquitär vorkommende Bakterien sind Listerien in der Umwelt weit verbreitet. *L. monocytogenes* kommt natürlich vor und kann im Boden bei günstigen Bedingungen monatelang überleben und sich sogar vermehren (DOWE et al., 1997). Bei der Übertragung auf das Pflanzenmaterial spielen Boden und Wasser eine wichtige Rolle (LINKE et al., 2014). Da das Erdreich schon eine Grundbelastung mit diesem pathogenen Mikroorganismen aufweisen kann, kann diese Allgegenwart in natürlicher Umgebung eine wichtige Quelle für Kontamination von Rohstoffen darstellen (NIGHTINGALE et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die Kreuzkontamination von Primärprodukten auf landwirtschaftlicher Ebene einer großen Bedeutung für das Vorhandensein der Mikroorganismen im Endprodukt zukommt (EFSA BIOHAZ PANEL, 2018). Ein Zusammenhang mit erhöhtem Kontaminationsrisiko und gesteigertem Vorhandensein von *L. monocytogenes* in der Verarbeitungsumgebung mit zunehmender Konzentration von *L. monocytogenes* im Rohmaterial konnte nachgewiesen werden (EFSA BIOHAZ PANEL, 2018). Durch seine Fähigkeit, Oberflächen zu besiedeln und Biofilme zu bilden hat der Erreger auch eine hohe Tenazität in Produktionsumgebungen (EBAKOTA et al. 2018, GÓMEZ et al., 2015). Auf Grund der große Widerstandsfähigkeit gegen Austrocknung, Kälte, Säure, Hitze und Anpassungsfähigkeit an Desinfektionsmittel stellt dieser Mikroorganismus sehr oft ein Problem in lebensmittelverarbeiteten Betrieben dar (TOWNSEND et al., 2021, AREVALOS- SANCHEZ et al., 2012). Das Überleben auf Utensilien wie Geräten, Schneidebrettern und Abflüssen infolge von Biofilmbildung konnte von vielen Studien als potenzielle Pathoquelle der Kreuzkontamination dargelegt werden (BLACKMAN et

al., 1996; DI BONAVENTURA et al., 2008). Die Kombination der guten Anpassungsfähigkeit an umgebenden Bedingungen und seiner hohen Persistenz in natürlicher Umgebung machen *L. monocytogenes* in jeder Phase der Lieferkette von Produktion bis hin zum Endverbraucher zum Problem (TOWNSEND et al., 2021). Auf dieses Wissen basierend ist die Sicherstellung von Guter Herstellungspraxis und Guter Hygienepraxis eine wichtige Grundlage für die Minimierung der Gefahrenquellen in pflanzlichen Lebensmitteln (TOWNSEND et al., 2021).

Da in den getesteten Fertigsalaten keine mikrobiologische Richt- und Warnwertüberschreitungen laut DGH zu verzeichnen waren, wurde die Hypothese 1: „die mikrobiologischen Richt- und Warnwerte für verzehrfertige Salate werden nicht überschritten“ verifiziert.

Die AMC im Rohstoff waren bei Zwiebel am höchsten (7,5 log KBE/g, gefolgt von Emmentaler (7,3 log KBE/g) und bei den Blattsalaten zwischen 6,7-7,4 log KBE/g. Die Milchsäurebakterienwerte (LAB) waren bei Zwiebel und Emmentaler am höchsten (Abbildung 9). *Enterobacteriaceae* Werte bei Zwiebel und Blattsalaten höher (im Schnitt 5,0 log KBE/g; hier >6 log KBE/g). Präsumtive *Bacillus cereus* waren im Rucola, Vogersalat und Grünen Salatmix nachweisbar (maximal 4,7 KBE/g).

Die erhöhten Werte innerhalb der Gesamtkeimzahl und *Enterobacteriaceae* (EB) war im gewissen Grad zu erwarten, da diese Art von Mikroorganismen stark an pflanzliche Rohstoffe assoziiert sind. Diese Gram-negativen Bakterien gehören zur natürlichen Mikroflora der Pflanze und nehmen als Pflanzenmikrobiom eine bedeutende Rolle für ihr Wachstum und ihre Gesundheit ein (BERENDSEN et al., 2012). Enterobakterien der Gattung *Erwinia*, *Serratia* und *Pantoea* gehören zu den typischen Bakterien, die an der Blattoberfläche (Phyllosphäre) zu finden sind. In Salaten können bis zu 30% der in oberirdischen Pflanzenteilen assoziierten Bakterien ihnen zugeordnet werden (FORNEFELD et al., 2015). Diese Tatsache wird auch durch die quantitativen erhobenen Werte der EB innerhalb der Salatgruppe (> 6 log KBE/g) verdeutlicht. In unserer Studie waren *Hafnia*, *Lelliotta*, *Cedacea* und *Leclercia* im Rohstoff als auch Endprodukt präsent (Abbildung 11). *Pantoea* war besonders vorkommend im Rohstoff Vogersalat und Jungzwiebel und auch in den entsprechenden Salaten Crispy Chicken und Thai BBQ Salat nachzuweisen. Dieselbe Beobachtung war auch auf *Serattia*, *Erwinia*, *Kluyvera* und *Rahnella* zutreffend wobei eine Nachweiszunahme im Endprodukt zu verzeichnen war (Abbildung 11).

Die qualitative Bestimmung von Salmonellen gemäß der ISO 6579 detektierte eine fragwürdige Kolonie, die sich anhand genauerer Analyse mittels API® RAPID 20E als *Citrobacter freundii* herausstellte. *Citrobacter* spp. wird nicht dem natürlichen Mikrobiom der Pflanze zugeordnet, sondern ist häufig im Darm von Menschen und Tier (zur normalen Darmflora gehörig) zu finden (ADEGUN et al., 2019). Als ubiquitär vorkommendes

Bakterium liegt es nahe, dass die Kontamination infolge von unzureichende Hygienemaßnahmen resultierte. Indirekte Übertragung von fäkalen Bakterien von Tieren während der Aufzucht spielen genauso eine große Rolle wie eine direkte Übertragung von menschlicher Seite: Kreuzkontamination entlang der ganzen Produktionskette von Ernte über Produktion bis hin zu Verpackung der Produkte durch unhygienische Bedingungen beim Umgang mit den Lebensmitteln (MESBAH et al., 2017). Als opportunistischer Erreger kann *Citrobacter freundii* den menschlichen gastrointestinal Trakt besiedeln und bei immunsupprimierten Personen zu Erkrankungen führen (PLETZ et al., 2018).

Neben *Citrobacter* (Grillkäse Salat, Pastasalat) waren auch *Enterobacter* (Tomate-Mozarella, Crispy Chicken Salat) und *Raoultella* (Tomate-Mozarella und Thunfischsalat) erst im Endprodukt nachweisbar was auf eine notwendige Verbesserung der Verarbeitungshygiene und Transport und Lagertemperatur hinweist (Abbildung 11; CALONICO et al., 2019).

Die größte *Enterobacteriaceae* Bakteriendiversität war im Rohstoff bei grünen Blattsalaten und Pulled Chicken und im Endprodukt bei Thunfischsalat und Crispy Chicken anzutreffen. Bei den *Enterobacteriaceae* Isolaten sollte in eiterer *o lge besti t erden ob „extended-spectrum β-lacta ase“ (ESBL) produzenten unter *Kluyvera*, *Serratia* oder *Enterobacter* enthalten sind (NÜESCH-INDERBINEN et al., 2015).*

Bei den Pseudomonaden nahm die Bakteriendiversität im Endprodukt zu (7 Bakterienarten im Lachs und Crispy-Chicken Salat, 6 im Tomate-Mozarella Salat und Wurstsalat; Abbildung 12). Mangold als Rohstoff wies die höchste *Pseudomonas/Aeromonas* Diversität auf. *Pseudomonas azotoformans* und *P. poae* waren die am häufigsten, sowohl im Rohstoff als auch Endprodukt, nachgewiesenen Pseudomonas Arten. *Aeromonas* war in pflanzlichen Rohstoffen (Salat, Karotten, Mangold, Paprika) und im Endprodukt Thunfischsalat nachweisbar (Abbildung 12). *Pseudomonas* und *Aeromonas* gehören zu den psychrotrophen Mikroorganismen und können sich auch bei 4 °C vermehren, deshalb sind diese Hygieneindikatoren und potentiell pathogenen Mikroorganismen und ihre quantitativen Werte sehr bedeutend für die Rohstoffqualitätsbeurteilung (UMUTONI et al., 2020).

Die Salatdressings wurden extra untersucht und was sofort auffiel, war die hohe Schimmelpräsenz im Joghurt-Kräuter Dressing und *B. subtilis* Gruppe Präsenz schon im Rohstoff Knoblauchpulver und dann auch im Knoblauchdressing. *Bacillus subtilis* ein grampositives, bewegliches Stäbchenbakterium, das ubiquitär in der Umwelt vorkommt und insbesondere im Darm und Boden zu finden ist (CURTIS, 2018). Als Bodenmikroorganismus kann er oft in Pflanzen bzw. Pflanzenmaterial isoliert werden. Schimmelpilze und potentiell auch Mykotoxine sind neben präsumtiven *B. cereus* und anderen Sporenbildnern häufig in Kräutern und Gewürzen sowie Tee anzutreffen (FOGELE et al., 2018; MINAEVA et al., 2019).

Mit diesen Ergebnissen der hoch abundanten Bakterienarten lässt sich auch die Hypothese 2 „die *ir* obiologisc *e* Ro stof fanalyse gibt Aus u nft b er o tentiellen Eintrag von Verderbs-

Erregern“ verifizieren. Dem Hersteller ist im Rahmen der Lebensmittelqualitäts- und -sicherheitsbeurteilung ein Rohstoff und Waschwassermanagement zu empfehlen. Außerdem ist die Kühlung der Fertigsalate in der Kühlvitrine im Handel und während des Transportes dringend zu überwachen, um eine Vermehrung von psychrotrophen Keimen zu vermeiden.

5 Literaturverzeichnis

- Adegun, B. R., Oluduro, A. O., & Aregbesola, O. A. (2019). Isolation and molecular characterization of *Citrobacter* species in fruits and vegetables sold for consumption in ILE-IFE, Nigeria. *Scientific African*, 6, e00173.
- Arevalos-Sánchez, M., Regalado, C., Martin, S. E., Domínguez-Domínguez, J., & García-Almendárez, B. E. (2012). Effect of neutral electrolyzed water and nisin on *Listeria monocytogenes* biofilms, and on listeriolysin O activity. *Food Control*, 24(1-2), 116-122.
- Arienzo, A., Murgia, L., Fraudentali, I., Gallo, V., Angelini, R., & Antonini, G. (2020). Microbiological quality of ready-to-eat leafy green salads during shelf-life and home-refrigeration. *Foods*, 9(10), 1421.
- Antunes, P., Mourão, J., Campos, J., & Peixe, L. (2016). Salmonellosis: the role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(2), 110-121.
- Barbieri, F., Montanari, C., Gardini, F., & Tabanelli, G. (2019). Biogenic amine production by lactic acid bacteria: A review. *Foods*, 8(1), 17.
- Barska, A. (2018). Millennial consumers in the convenience food market. *Management*, 22(1).
- Bartsch L. (2018). Analyse des hygienerelevanten Verbraucherverhaltens im Rahmen der Zubereitung gegrillter Speisen [Masterarbeit]. Fakultät Life Sciences der Hochschule Rhein-Waal Kleve.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M., & Bakker, P. A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17(8), 478-486.
- Bevilacqua, A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (Eds.). (2016). *The Microbiological Quality of Food: Foodborne Spoilers*. Woodhead Publishing.
- Bhunia, A. K. (2018). *Salmonella enterica*. In *Foodborne Microbial Pathogens* (pp. 271-287). Springer, New York, NY.
- Bierbach, E. und Gerogi, P. (2011). *Infektionskrankheiten von Aids bis Zytomegalie: Infektionskrankheiten von A-Z für Heilpraktiker*, dritte Auflage, Elsevier GmbH, München, Deutschland
- Bischoff, S. C. (2009): Taxonomie und Funktion von Probiotika, Präbiotika und Synbiotika. In: Kneifel, W., Domig, K.J. (Hrsg): *Probiotika, Präbiotika und Synbiotika*, George Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland
- Blackman, I. C., & Frank, J. F. (1996). Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. *Journal of food protection*, 59(8), 827-831.
- Brandão, M. L., Almeida, D. O., Bispo, F. C., Bricio, S. M., Marin, V. A., & Miagostovich, M. P. (2014). Assessment of microbiological contamination of fresh, minimally processed, and ready-to-eat lettuces (*Lactuca sativa*), Rio de Janeiro State, Brazil. *Journal of Food Science*, 79(5), M961-M966.
- Brenner, D.J., Farmer III, J.J. (2005): Family I. *Enterobacteriaceae*. In: Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (Hrsg.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria*, zweite Auflage. Springer-Verlag, New York USA
- Buchanan, R. L., Gorris, L. G., Hayman, M. M., Jackson, T. C., & Whiting, R. C. (2017). A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, 75, 1-13.
- Calonico, C., Delfino, V., Pesavento, G., Mundo, M., & Nostro, A. L. (2019). Microbiological Quality of - Ready-to-eat Salads from Processing Plant to the Consumers. *Journal of Food and Nutrition Research*, 7, 427-434.

- Castro-Rosas, J., Cerna-Cortés, J. F., Méndez-Reyes, E., Lopez-Hernandez, D., Gómez-Aldapa, C. A., & Estrada-Garcia, T. (2012). Presence of faecal coliforms, *Escherichia coli* and diarrheagenic *E. coli* pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops are irrigated with untreated sewage water. International Journal of Food Microbiology, 156(2), 176-180.
- Chen, W. (Ed.). (2019). Lactic Acid Bacteria: Bioengineering and Industrial Applications. Springer.
- Craig, A. M., Dotters-Katz, S., Kuller, J. A., & Thompson, J. L. (2019). Listeriosis in pregnancy: a review. Obstetrical & Gynecological Survey, 74(6), 362-368.
- Curtis, A. (2018). *Bacillus subtilis*. Morphology, Functions and Role in Disease Management, Nova Science Publishers Inc, New York, Vereinigte Staaten
- Dastogeer, K. M., Tumpa, F. H., Sultana, A., Akter, M. A., & Chakraborty, A. (2020). Plant microbiome—an account of the factors that shape community composition and diversity. Current Plant Biology, 100161.
- De W Blackburn, C. (Ed.). (2006). Food spoilage microorganisms. Woodhead Publishing.
- Di Bonaventura, .., iccolo ini, R., aludi, D., D'orio, V., Vergara, A., Conter, .., & Ianieri, A. (2008). Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. Journal of Applied Microbiology, 104(6), 1552-1561.
- Dietrich, R., Jessberger, N., Ehling-Schulz, M., Märtilbauer, E., & Granum, P. E. (2021). The food poisoning toxins of *Bacillus cereus*. Toxins, 13(2), 98.
- Dodd, C. E., Aldsworth, T. G., & Stein, R. A. (Eds.). (2017). Foodborne diseases. Academic Press
- Dowe, M. J., Jackson, E. D., Mori, J. G., & Bell, C. R. (1997). *Listeria monocytogenes* survival in soil and incidence in agricultural soils. Journal of Food Protection, 60(10), 1201-1207.
- Doyle, M. P. (2009). Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages. Springer Science & Business Media, Luxemburg, Luxemburg.
- Ebakota, D. O., Abiodun, O. A., & Nosa, O. O. (2018). Prevalence of antibiotics resistant *Listeria monocytogenes* strains in Nigerian ready-to-eat foods. Food Safety, 6(3), 118-125.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2016). Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. EFSA Journal, 14(7), e04524.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Ricci, A., Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., ... & Lindqvist, R. (2018). *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. EFSA Journal, 16(1), e05134.
- Faour-Klingbeil, D., Murtada, M., Kuri, V., & Todd, E. C. (2016). Understanding the routes of contamination of ready-to-eat vegetables in the Middle East. Food Control, 62, 125-133.
- ogelete, B., ranta, R., Valciņa, .., & Bērziņš, A. (2018). Occurrence and diversity of *Bacillus cereus* and moulds in spices and herbs. Food Control, 83, 69-74.
- Fornefeld, E., Schikora, A., Berg, G., Grosch, R., Erlacher, A., Kühne, T., & Smalla, K. (2015). Humanpathogene Bakterien auf Pflanzen. J Kulturpflanzen, 67, 297-309.
- Fröhling, A., Rademacher, A., Rumpold, B., Klocke, M., & Schlüter, O. (2018). Screening of microbial communities associated with endive lettuce during postharvest processing on industrial scale. Heliyon, 4(7), e00671.
- Gaenzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. Current Opinion in Food Science, 2, 106-117.

Gil, M. I., Selma, M. V., Suslow, T., Jacxsens, L., Uyttendaele, M., & Allende, A. (2015). Pre-and postharvest preventive measures and intervention strategies to control microbial food safety hazards of fresh leafy vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(4), 453-468.

Gómez, D., Iguácel, L. P., Rota, M., Carramiñana, J. J., Ariño, A., & Yangüela, J. (2015). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat products and meat processing plants in Spain. *Foods*, 4(3), 271-282.

Goudeau, D. M., Parker, C. T., Zhou, Y., Sela, S., Kroupitski, Y., & Brandl, M. T. (2013). The *Salmonella* transcriptome in lettuce and cilantro soft rot reveals a niche overlap with the animal host intestine. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(1), 250-262.

Gressner, A.M., Arndt, T. (2019). *Listeria monocytogenes*. In: Stöcker, W. (Hrsg): Lexikon der medizinischen Laboratoriumsdiagnostik, 3 Auflage, Springer Verlag GmbH, Heidelberg, Deutschland

Gullino, M. L., Gilardi, G., & Garibaldi, A. (2019). Ready-to-eat salad crops: a plant at origin's own. *Plant Disease*, 103(9), 2153-2170.

Hahn, H., Falke, D., Klein, P. (1991) In: Hahn H. Enterobakterien: Allgemeines und fakultativ pathogene Arten: Medizinische Mikrobiologie, Springer Verlag GmbH, Heidelberg, Deutschland.

Heredia, N., & García, S. (2018). Animals as sources of food-borne pathogens: A review. *Animal Nutrition*, 4(3), 250-255.

Hof, H., Schlüter, D. (2019). Spezielle Bakteriologie. In: Hof, H., Schlüter D. (Hrsg): Medizinische Mikrobiologie, siebte Auflage, George Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland.

Jackson, P., & Viehoff, V. (2016). Reframing convenience food. *Appetite*, 98, 1-11

Jassoy, C., Schwarzkopf, A. (2018). Bakteriologie. In: Schwarzkopf, A. (Hrsg): Hygiene, Infektiologie, Mikrobiologie, dritte Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland

Kampmeier, S., Berger, M., Mellmann, A., Karch, H., & Berger, P. (2018). The 2011 German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104: H4 outbreak—The danger is still out there. *Escherichia coli*, a versatile pathogen, 117-148.

Kaszoni-Rückerl, I., Mustedanagic, A., Muri-Klinger, S., Brugger, K., Wagner, K. H., Wagner, M., & Stessl, B. (2020). Predominance of distinct *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* in recurrent contamination events at dairy processing facilities. *Microorganisms*, 8(2), 234.

Keweloh, H (2019). Mikroorganismen in Lebensmitteln, Theorie und Praxis der Lebensmittel-hygiene siebte Auflage, Fachbuchverlag Pfanneberg GmbH & Co. KG, Haan, Deutschland

Kim, J. S., Lee, M. S., & Kim, J. H. (2020). Recent updates on outbreaks of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and its potential reservoirs. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 273.

Kljujev, I., Raicevic, V., Jovicic-Petrovic, J., Vujovic, B., Mirkovic, M., & Rothbauer, M. (2018). *Listeria monocytogenes*—Danger for health safety vegetable production. *Microbial pathogenesis*, 120, 23-31.

Kluth, J.P. (2010). Bewertung von Convenience Food unter Einbeziehung der sensorischen Wahrnehmung – dargestellt in einer Unterrichtseinheit eines Wahlpflichtkurses WPK R10, GRIN Verlag, München, Deutschland.

Krämer, J. (2011a). Lebensmittel-Mikrobiologie, sechste Auflage, Verlag Eugen Ulmer KG, Stuttgart, Deutschland.

Krämer, J. (2011b). Lebensmittelvergiftungen: Lebensmittel-Mikrobiologie, sechste Auflage, Verlag Eugen Ulmer KG, Stuttgart, Deutschland.

Krämer, J., & Prange, A. (2016). Lebensmittel-Mikrobiologie (Vol. 1421), siebte Auflage, UTB, Stuttgart, Deutschland

- Leclercq, A., Chenal-Francisque, V., Dieye, H., Cantinelli, T., Drali, R., Brisse, S., & Lecuit, M. (2011). Characterization of the novel *Listeria monocytogenes* PCR serogrouping profile IVb-v1. International journal of food microbiology, 147(1), 74-77.
- Linke, K., Rückerl, I., Brugger, K., Karpiskova, R., Walland, J., Muri-Klinger, S., ... & Stessl, B. (2014). Reservoirs of *Listeria* species in three environmental ecosystems. Applied and Environmental Microbiology, 80(18), 5583-5592.
- Lokerse, R. F. A., Maslowska-Corker, K. A., Van de Wardt, L. C., & Wijtzes, T. (2016). Growth capacity of *Listeria monocytogenes* in ingredients of ready-to-eat salads. Food Control, 60, 338-345.
- Losio, M. N., Pavoni, E., Bilei, S., Bertasi, B., Bove, D., Capuano, F., ... & De Medici, D. (2015). Microbiological survey of raw and ready-to-eat leafy green vegetables marketed in Italy. International Journal of Food Microbiology, 210, 88-91.
- Luna-Guevara, J. J., Arenas-Hernandez, M. M., Martínez de la Peña, C., Silva, J. L., & Luna-Guevara, M. L. (2019). The role of pathogenic *E. coli* in fresh vegetables: Behavior, contamination factors, and preventive measures. International Journal of Microbiology, 2019.
- Machado-Moreira, B., Richards, K., Brennan, F., Abram, F., & Burgess, C. M. (2019). Microbial contamination of fresh produce: what, where, and how? Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety, 18(6), 1727-1750.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A., Clark, D.P. (2013). Brock Mikrobiologie, dritte Auflage, Pearson Deutschland GmbH, Hallbergmoos, Deutschland, 717-720.
- Massaglia, S., Merlino, V. M., Borrà, D., Bargetto, A., Sottile, F., & Peano, C. (2019). Consumer attitudes and preference exploration towards fresh-cut salads using best-worst scaling and latent class analysis. Foods, 8(11), 568.
- Matissek, R., Fischer, M., & Steiner, G. (2018). Lebensmittelanalytik, sechste Auflage, Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.
- Mazaheri, T., Cervantes-Huamán, B. R., Bermúdez-Capdevila, M., Ripolles-Avila, C., & Rodríguez-Jerez, J. J. (2021). *Listeria monocytogenes* Biofilms in the Food Industry: Is the Current Hygiene Program Sufficient to Combat the Persistence of the Pathogen? Microorganisms, 9(1), 181.
- Mesbah Zekar, F., Granier, S. A., Marault, M., Yaici, L., Gassilloud, B., Manceau, C., ... & Millemann, Y. (2017). From farms to markets: Gram-negative bacteria resistant to third-generation cephalosporins in fruits and vegetables in a region of North Africa. Frontiers in Microbiology, 8, 1569.
- Messelhäußer, U., & Ehling-Schulz, M. (2018). *Bacillus cereus*—a multifaceted opportunistic pathogen. Current Clinical Microbiology Reports, 5(2), 120-125.
- Miceli, A., & Settanni, L. (2019). Influence of agronomic practices and pre-harvest conditions on the attachment and development of *Listeria monocytogenes* in vegetables. Annals of Microbiology, 69(3), 185-199.
- Minaeva, L. P., Aleshkina, A. I., Markova, Y. M., Polyanina, A. S., Pichugina, T. V., Bykova, I. B., ... & Sheveleva, S. A. (2019). Studying the contamination of tea and herbal infusions with mold fungi as potential mykotoxin producers: the first step to risk assessment (message 1). Health Risk Analysis, (1), 93-102.
- Mir, S. A., Shah, M. A., Mir, M. M., Dar, B. N., Greiner, R., & Roohinejad, S. (2018). Microbiological contamination of ready-to-eat vegetable salads in developing countries and potential solutions in the supply chain to control microbial pathogens. Food Control, 85, 235-244.
- Mira Miralles, M., Maestre-Carballa, L., Lluesma-Gomez, M., & Martinez-Garcia, M. (2019). High-throughput 16S rRNA sequencing to assess potentially active bacteria and foodborne pathogens: A case example in ready-to-eat food. Foods, 8(10), 480.

- Mritunjay, S. K., & Kumar, V. (2017). A study on prevalence of microbial contamination on the surface of raw salad vegetables. *3 Biotech*, 7(1), 13.
- Nightingale, K. K., Schukken, Y. H., Nightingale, C. R., Fortes, E. D., Ho, A. J., Her, Z., ... & Wiedmann, M. (2004). Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 4458-4467.
- Nousiainen, L. L., Joutsen, S., Lunden, J., Hänninen, M. L., & Fredriksson-Ahomaa, M. (2016). Bacterial quality and safety of packaged fresh leafy vegetables at the retail level in Finland. *International Journal of Food Microbiology*, 232, 73-79.
- Nüesch-Inderbinen, M., Zurfluh, K., Peterhans, S., Hächler, H., & Stephan, R. (2015). Assessment of the prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in ready-to-eat salads, fresh-cut fruit, and sprouts from the swiss market. *Journal of food protection*, 78(6), 1178-1181.
- Nyila, M. A. (Ed.). (2018). *Listeria monocytogenes*. BoD–Books on Demand.
- Oethinger, M. (2004). Spezielle Bakteriologie: Mikrobiologie und Immunologie, 11. Auflage, Urban & Fischer Verlag, München, Deutschland
- Pichhardt, K. (2013). Hygieneschulung Lebensmittel: Nach der neuen Lebensmittelhygiene-Verordnung (LMHV) Unter Berücksichtigung der Norm DIN 10514. Springer-Verlag.
- Pletz, M. W., Wollny, A., Dobermann, U. H., Rödel, J., Neubauer, S., Stein, C., ... & Maschmann, J. (2018). A nosocomial foodborne outbreak of a VIM carbapenemase-expressing *Citrobacter freundii*. *Clinical Infectious Diseases*, 67(1), 58-64.
- Puga, C. H., Dahdouh, E., SanJose, C., & Orgaz, B. (2018). *Listeria monocytogenes* colonizes *Pseudomonas fluorescens* biofilms and induces matrix over-production. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1706.
- Queiroz, O. C. M., Ogunade, I. M., Weinberg, Z., & Adesogan, A. T. (2018). Silage review: Foodborne pathogens in silage and their mitigation by silage additives. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4132-4142.
- Rabast, U. (2018). Gesunde Ernährung, gesunder Lebensstil: Was schadet uns, was tut uns gut, Springer Verlag GmbH, Berlin, Deutschland
- Raposo, A., Pérez, E., de Faria, C. T., Ferrús, M. A., & Carrascosa, C. (2017). Food spoilage by *Pseudomonas* spp.—an overview. *Food borne Pathogens and Antibiotic Resistance*, 41-58.
- Ryser, E. T., & Marth, E. H. (Eds.). (2007). *Listeria, listeriosis, and food safety*. CRC press.
- Sant'Anna, P. B., de Melo Franco, B. D., & Maffei, D. F. (2020). Microbiological safety of ready-to-eat minimally processed vegetables in Brazil: an overview. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(13), 4664-4670.
- Santos, M. I., Cavaco, A., Gouveia, J., Novais, M. R., Nogueira, P. J., Pedroso, L., & Ferreira, M. A. S. S. (2012). Evaluation of minimally processed salads commercialized in Portugal. *Food Control*, 23(1), 275-281.
- Saranraj, P., Stella, D., & Reetha, D. (2012). Microbial spoilage of vegetables and its control measures: a review. *International Journal of Natural Product Science*, 2(2), 1-12.
- Schikora, A., Carreri, A., Charpentier, E., & Hirt, H. (2008). The dark side of the salad: *Salmonella typhimurium* overcomes the innate immune response of *Arabidopsis thaliana* and shows an endopathogenic lifestyle. *PLoS One*, 3(5), e2279.

- Selbitz, H. J., Truyen, U., Valentin- Weigand, P. (2015). *Enterobacteriaceae*. In: Wieler, L. H., Ewers, C., Selbitz, H. J. (Hrsg): Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. zehnte Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, Deutschland.
- Sharief, I. (2015). Die Lebensmittelkette beim Schaf: Transfer von Zoonoseerregern vom Tier zum Lebensmittel. Inauguraldissertation, Freie Universität Berlin Fachbereich Veterinärmedizin.
- Sheng, J., Tao, T., Zhu, X., Bie, X., Lv, F., Zhao, H., & Lu, Z. (2018). A multiplex PCR detection method for milk based on novel primers specific for *Listeria monocytogenes* 1/2a serotype. *Food Control*, 86, 183-190.
- Shiota, M., Saitou, K., Mizumoto, H., Matsusaka, M., Agata, N., Nakayama, M., ... & Hata, D. (2010). Rapid detoxification of cereulide in *Bacillus cereus* food poisoning. *Pediatrics*, 125(4), e951-e955.
- Siddiqui, M. W., & Rahman, M. S. (Eds.). (2014). Minimally processed foods: Technologies for Safety, Quality, and Convenience. Springer.
- Soare, C., McNeilly, T. N., & Seguino, A. (2021). A review of potential risk factors linked to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in wild deer populations and the practices affecting the microbial contamination of wild deer carcasses with enteric bacteria. *Food Control*, 108128.
- Söderqvist, K. (2017). Is your lunch salad safe to eat? Occurrence of bacterial pathogens and potential for pathogen growth in pre-packed ready-to-eat mixed-ingredient salads. *Infection Ecology & Epidemiology*, 7(1), 1407216.
- Söderqvist, K., Lambertz, S. T., Vågsholm, I., & Boqvist, S. (2016). Foodborne bacterial pathogens in retail prepacked ready-to-eat mixed ingredient salads. *Journal of Food Protection*, 79(6), 978-985.
- Stange, R., Leitzmann, C. (2017). Ernährung und Fasten als Therapie, Springer Verlag GmbH, Berlin, Deutschland.
- Stephan, R., Althaus, D., Kiefer, S., Lehner, A., Hatz, C., Schmutz, C., ... & Mäusezahl-Feuz, M. (2015). Foodborne transmission of *Listeria monocytogenes* via ready-to-eat salad: A nationwide outbreak in Switzerland, 2013–2014. *Food Control*, 57, 14-17.
- Stranieri, S., Ricci, E. C., & Banterle, A. (2017). Convenience food with environmentally sustainable attributes: A consumer perspective. *Appetite*, 116, 11-20.
- Suerbaum, S., Hahn, H., Burchard, G.D., Kaufmann, S.H.E., Schulz, T.F. (2012). Enterobakterien. In: Suerbaum, S., Bockemühl, J., Karch H (Hrsg): Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. siebte Auflage, Springer-Verlag GmbH, Heidelberg, Deutschland.
- Tango, C. N., Choi, N. J., Chung, M. S., & Oh, D. H. (2014). Bacteriological quality of vegetables from organic and conventional production in different areas of Korea. *Journal of Food Protection*, 77(8), 1411-1417.
- Tango, C. N., Wei, S., Khan, I., Hussain, M. S., Kounkeu, P. F. N., Park, J. H., ... & Oh, D. H. (2018). Microbiological quality and safety of fresh fruits and vegetables at retail levels in Korea. *Journal of Food Science*, 83(2), 386-392.
- Tomasi, N., Pinton, R., Dalla Costa, L., Cortella, G., Terzano, R., Mimmo, T., ... & Cesco, S. (2015). Ne 'solutions' for floating cultivation syste of ready-to-eat salad: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 46(2), 267-276
- Townsend, A., Strawn, L. K., Chapman, B. J., & Dunn, L. L. (2021). A Systematic Review of *Listeria* Species and *Listeria monocytogenes* Prevalence, Persistence, and Diversity throughout the Fresh Produce Supply Chain. *Foods*, 10(6), 1427.

- Umutoni, N., Jakobsen, A. N., Mukhatov, K., Thomassen, G. M. B., Karlsen, H., & Mehli, L. (2020). Occurrence, diversity and temperature-dependent growth kinetics of *Aeromonas* spp. in lettuce. International Journal of Food Microbiology, 335, 108852.
- Wöstemeyer, J., Schimek, C., & Siegmund, L. (2019). Grundpraktikum Mikrobiologie. utb GmbH.
- Wright, K. M., Chapman, S., McGeachy, K., Humphris, S., Campbell, E., Toth, I. K., & Holden, N. J. (2013). The endophytic lifestyle of *Escherichia coli* O157: H7: quantification and internal localization in roots. Phytopathology, 103(4), 333-340.
- Zikel, K. (2007). Convenience Food: Fertiggerichte in aller Munde, Genios Verlag, München, Deutschland.
- Yang, R., Liu, P., & Ye, W. (2017). Illumina-based analysis of endophytic bacterial diversity of tree peony (*Paeonia Sect. Moutan*) roots and leaves. Brazilian Journal of Microbiology, 48(4), 695-705.
- Yousuf, B., Deshi, V., Ozturk, B., & Siddiqui, M. W. (2020). Fresh-cut fruits and vegetables: Quality issues and safety concerns. In Fresh-cut fruits and vegetables (pp. 1-15). Academic Press.

6 Zusammenfassung

Die mikrobiologische Qualität von Rohstoffen tierischen und nichttierischen Ursprungs und von daraus hergestellten Fertigsalaten war Fokus dieser Diplomarbeit.

Bei sogenannte „res Cut“- Produkten handelt es sich um Lebensmittel, die minimal prozessiert werden und meist in Produktionsküchen der einzelnen Hersteller frisch zubereitet werden. Die Kontamination mit humanpathogenen Keimen und mit relevanten Hygieneindikatoren kann schon während der Ernte der Rohstoffe stattfinden und sich negativ auf den Verarbeitungsbetrieb auswirken. Hohe Hygienestandards bei Anbau, Ernte, Verarbeitung und Verpackung sind Voraussetzung für die Produktsicherheit und -qualität.

Ziel dieser Arbeit war es einen mikrobiologischen Status von Fertigsalaten, der Rohstoffkomponenten und Dressings zu bekommen. Analysiert wurden dabei insgesamt 87 Proben, die von einem lebensmittelherstellenden Betrieb bereitgestellt wurden. Dazu wurde das Produkt „Fertigsalat“ und die dazugehörigen Rohstoffe bzw. Dressings mikrobiologisch und molekularbiologisch untersucht. Die Methodik umfasste Verfahren zur Kultivierung ausgewählter Mikroorganismen (ISO Normen) und deren Bestätigung anhand entsprechender biochemischer und molekularbiologische Methoden. Die erhobenen Ergebnisse sprechen für eine gute Qualität der Produkte und Rohstoffe. Die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl, der präsumptive Grenzwert für *Bacillus cereus* nach Deutscher Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) wurden nicht überschritten. *Salmonella* und *E. coli* waren weder in Rohstoffen noch Produkten nachweisbar. *L. monocytogenes* war in einem Rohstoff (Extrawurst geschnitten) und korrespondierendem Produkt nachweisbar (Wurtsalat), was den Eintrag über die Rohstoffseite beleuchtet und auf eine Hygieneschwachstelle am Slicer des Lieferanten hinweist. Die *Enterobacteriaceae* Zahlen waren teilweise über 3 log kolonienbildende Einheiten (KBE)/g. Die genaue Differenzierung der Spezies ist wichtig, um eine Risikobewertung durchzuführen, da einige *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonadaceae*, die auf den Nährmedien nachgewiesen werden, mit pflanzlichen Rohstoffen stark verbunden sind. Präsumtive *Bacillus cereus* wurden in einigen Salat-Rohstoffen nachgewiesen, was eine Differenzierung zu *B. thuringiensis* Biopestizidstämmen notwendig macht, um dem Herstellerbetriebe in seiner Risikobewertung der Rohstoffe zu unterstützen. Auffällig waren die Sporenbildnerzahlen in Hinblick auf das Knoblauchdressing, wobei schon der Rohstoff Knoblauchpulver *B. subtilis* Gruppe Vertreter enthielt und den Eintrag verdeutlichte. Im Joghurt-Kräuter Dressing waren Schimmelpilze nachweisbar, was den kritischen Eintrag über Kräuter und Gewürze verdeutlicht und am Ende des Herstellungsprozesses hinzugefügt, die Endproduktqualität - Sicherheit und Haltbarkeit minimieren.

Diese Detailanalyse von Fertigsalaten hilft, die Herstellungsprozesse zu verbessern, die Rohstoffqualität zu bewerten und ein gezieltes Monitoring System zur Eigenkontrolle zu installieren.

7 Extended Summary

The microbiological quality of raw materials of animal and non-animal origin and of prepared salads made from them was the focus of this diploma thesis.

So-called "fresh cut" products are foodstuffs that are minimally processed and are usually freshly prepared, in the production kitchens of the individual manufacturers. Contamination with human pathogenic germs and with relevant hygiene indicators can already take place during the harvest of the raw materials and have a negative impact on the processing plant. High hygiene standards during cultivation, harvesting, processing and packaging are prerequisites for product safety and quality.

The aim of this work was to obtain a microbiological status of ready-to-eat salads, the raw material components and dressings. A total of 87 samples provided by a food manufacturing company were analyzed. For this purpose, the product "ready-to-eat salad" and the associated raw materials or dressings were examined microbiologically and by molecular biological methods. The methodology included procedures for the cultivation of selected microorganisms (ISO standards) and their confirmation using appropriate biochemical and molecular biological methods. The results obtained indicate a good quality of the products and raw materials. The aerobic mesophilic total plate count, the presumptive limit for *Bacillus cereus* according to the German Society for Hygiene and Microbiology (DGHM) were not exceeded. *Salmonella* and *E. coli* were not detectable in raw materials or products. *L. monocytogenes* was detectable in one raw material (sliced Extrawurst) and corresponding product (sausage salad), which illuminates the entry via the raw material side and indicates a hygiene weak point at the supplier's slicer. *Enterobacteriaceae* numbers were in some cases above 3 log colony forming units (CFU)/g. Accurate species differentiation is important to perform a risk assessment, as some *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonadaceae* detected on the culture media are strongly associated with plant raw materials. Presumptive *Bacillus cereus* were detected in some lettuce raw materials, necessitating differentiation to *B. thuringiensis* biopesticide strains to assist the manufacturing plant in its risk assessment of raw materials. Spore-forming counts were striking with respect to the garlic dressing, with the raw material garlic powder already containing *B. subtilis* group representatives, highlighting the entry. Molds were detectable in the yogurt-herb dressing, highlighting the critical entry via herbs and spices, and added at the end of the manufacturing process, minimizing final product quality-safety and shelf-life. This detailed analysis of ready-to-eat salads helps to improve the manufacturing processes, to evaluate the raw material quality and to install a targeted monitoring system for self-control.

8 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: CDC Meldungen in der Kategorie „fruits and vegetables“ im Zeitraum 2010-2020.	11
Tabelle 2: RASFF Meldungen im Zusammenhang mit Salaten im Zeitrahmen 2018-2021.	12
Tabelle 3: Möglichkeiten der Kontamination/Übertragung von Mikroorganismen.	15
Tabelle 4: Prozesszyklen inneren und externen E. coli für „vorzereinertes“ Obst und Gemüse (verzehrfertig)“ [Anhang II K. 2 V (E) Nr. 2073/2005].	32
Tabelle 5: Richt- und Warnwerte Mischsalate roh, frisch, verzehrfertig.	33
Tabelle 6: Auflistung der analysierten Fertigsalatsorten und Inhaltsstoffe laut Herstellerangaben auf dem Etikett.	36
Tabelle 7: Auflistung der analysierten Salat Dressings.	36
Tabelle 8: Auflistung der analysierten Rohware.	37
Tabelle 9: Übersicht zur mikrobiologischen Analyse.	39
Abbildung 1: Bedeutung der Mikroorganismen im Lebensmittel.	13
Abbildung 2: Arten des mikrobiellen Verderbs.	14
Abbildung 3: Verdünnungsreihe für Rohstoffe, Salate und Dressings.	39
Abbildung 4: Anreicherungsschema Listeria gemäß ISO 11290-1.	41
Abbildung 5: Verfahrensschema Salmonellen.	42
Abbildung 6: Kryokonservierung von verdächtigen Isolaten zur näheren Speziesbestätigung.	43
Abbildung 7: Probenumfang (insgesamt n= 87) bestehend aus Endprodukt /Salat (blau), Rohware (rot) und Dressing (grün).	45
Abbildung 8: Mikrobiologische Qualität von Fertigsalaten.	46
Abbildung 9: Mikrobiologische Qualität von Rohstoffen.	47
Abbildung 10: Mikrobiologische Qualität von Dressings.	48
Abbildung 11: Enterobakterien Präsenz im Rohstoff und Produkt.	50
Abbildung 12: Pseudomonaden und Aeromonaden Präsenz im Rohstoff und Produkt.	52

9 Appendix

Appendix Tabelle 1 Verwendete Materialien und Geräte

Geräte	
Inkubator 37°C	Ehret, Emmendingen, Deutschland
Inkubator 30°C	Ehret, Emmendingen, Deutschland
Inkubator 42°C	Sanyo, Morigushi, Japan
Sicherheits-Bunsenbrenner schuett phoenix II	schuett-biotec GmbH, Göttingen, Deutschland
Reagenzglasmixer VTX-3	A.Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Stomacher Lab- Blender 400	Gemini BV, Apeldoorn, Niederlande
Tiefkühlschrank -80°C	Sanyo, Morigushi, Japan
verdichtetes Gas, N.A.G. (Stickstoff, Kohlendioxid)	Linde Gas a.s. , Prag, Tschechien
Manueller Kolonienzähler E Count	Hearthrow Scientific, Illinois, USA
Waage	VWR International, Milani MI, Italien
Verbrauchsmaterialien	
BagFilter P400	Interscience, Saint Nom la Bretèche, Frankreich
Raucotupf Stieltpf	Lohmann und Rauscher GmbH, Rengsdorf, Deutschland
Tubes 5 ml mit Schnappdeckel	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Safe-Lock Tubes 1,5ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Finnpipetten 10-1000 µl	Thermo Fischer Scientific, Vantaa, Finnland
Sapphire Pipettenspitzen	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Oxidase Reagenz	Biomerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
Kryoröhrchen 2,0ml	Biologix Group Ltd, Shandong China
Impfschlingen 1,10 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Latex-Handschuhe	Semperit Technische Produkt GmbH, Wien, Österreich
Nitril-Handschuhe	Paul Hartmann GmbH, Wiener Neudorf, Austria
Glas Pasteur Pipetten	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Pipettierhelfer pipetus®	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Pipette 1ml	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co.KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipette 10ml	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co.KG, Nümbrecht, Deutschland
API Listeria	Biomerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
API 20E, API10S, rapid ID32E	Biomerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
Medien und Platten	
Rappaport-Vassiliadis Soya Peptone Broth (RVS)	Oxoid Limited, Hampshire, Großbritannien
Bouillon MKTTn (base with novobiocin)	Biokar Diagnostics, Beauvais Cedex, Frankreich
Kristallviolett Galle Glukose Agar (VRBD)	Oxoid Limited, Hampshire, Großbritannien
Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar (M.Y.P.)	Oxoid Limited, Hampshire, Großbritannien
Brilliance™ Listeria Agar Base (Aloa)	Oxoid Limited, Hampshire, Großbritannien
APT Agar (All-purpose-Agar mit Tween®)	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Tryptic- Casein Soy Agar (TSA)	Biokar Diagnostics, Beauvais Cedex, Frankreich
Bacillus ChromoSelect Agar (Bacillus cereus Chromo Select Agar)	Sigma Aldrich Co LCC, St. Louis, USA
Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar (XLD)	Oxoid Limited, Hampshire, Großbritannien

Thermo Scientific Oxoid EGG YOLK EMULSION	Oxoid Limited, Hampshire, Großbritannien
Half Fraser selective Supplement	Biokar Diagnostics, Beauvais Cedex, Frankreich
Buffered Peptone Broth with Sodium Chloride ph 7,0 (BPW)	Biokar Diagnostics, Beauvais Cedex, Frankreich
Fraser Broth (base II)	Biokar Diagnostics, Beauvais Cedex, Frankreich
Glycerol	Sigma Aldrich Co LCC, St. Louis, USA
Brain Heart Broth (BHI)	Biokar Diagnostics, Beauvais Cedex, Frankreich

Appendix Nährmedien

Für die jeweiligen Keimdifferenzierungen wurden die entsprechenden unselektiven oder Selektiv- Nährmedium verwendet.

Trypto Casein Soya Agar (TSAY)

Trypto Casein Soya Agar ist ein universelles Allzweck-Kulturmedium, dessen Formulierung ein rasches Wachstum einer Vielzahl von anspruchsvollen bzw. weniger anspruchsvollen Mikroorganismen (anaerobe und aerobe Bakterien) ermöglicht

(file:///C:/Users/irene/AppData/Local/Temp/TDS_TRYPTO%20CASEINE%20SOJA%20AGAR_BK047_BM017_049_050_ENv11-2.pdf; eingesehen am 03.03.2022).

Appendix Tabelle 2 Zusammensetzung des Trypto Casein Soya Agar (Biokar).

BESTANDTEILE	g/Liter
Caseinpepton (Trypton/Pankreashydrolysat)	15,0
Sojapepton (Papainhydrolysat)	5,0
Natriumchlorid	5,0
Agar	15,0
pH 7.3 ± 0.2 @ 25°C	

Quelle: BIOKAR Diagnostics; Solabia group; Pantin Cedex, Frankreich;
file:///C:/Users/irene/AppData/Local/Temp/TDS_TRYPTO%20CASEINE%20SOJA%20AGAR_BK047_BM017_049_050_ENv11-1.pdf; eingesehen am: 03.03.2022.

Mannitol Eigelb Polymyxin Agar (MYP)

Mannitol Eigelb Polymyxin Agar ist ein Differenzialnährmedium, das von Mossel et al für den Nachweis und Auszählung von *Bacillus cereus* aus Lebensmittelproben entwickelt wurde. Es ist auf Grund zweier diagnostischer Merkmale, fehlende Fermentation von Mannitol und Bildung von Lecithinase, selektiv für diesen Mikroorganismus. Anhand dessen kann eine gute Differenzierung zwischen *Bacillus cereus* (undurchsichtiger Halo-Niederschlagszone um die Kolonien) und anderen grampositiven Organismen (ohne Hemmzone) erfolgen. Durch den Zusatz von Polymyxin B wird eine Hemmung der grammnegativen Bakterien erzielt (https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/CM0929B#/CM0929B; eingesehen am 03.03.2022).

Appendix Tabelle 3 Zusammensetzung des Mannitol Eigelb Polymyxin Agar (Oxoid Limited).

BESTANDTEILE	g/Liter
Fleischextrakt	1,0
Pepton	10,0
Mannitol	10,0
Natriumchlorid	10,00
Phenol rot	0,025
Agar	12,0
pH 7.2 ± 0.2 @ 25°C	
Polymyxin B (Code: SR0099)	100.000 IE

Quelle: Oxoid; Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA;
http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0929&c=UK&lang=EN; eingesehen am: 03.03.2022.

All-purpose medium with Tween Agar (APT)

APT Agar wird laut der ursprünglichen Formulierung nach Evans and Niven (1951) and Deibel, Evans and Niven (1957) zur Zählung und Kultivierung von heterofermentativen Milchsäurebakterien wie Lactobacilli, Lactococci oder *Leuconostoc* sowie von Mikroorganismen mit hohem Thiaminbedarf in Fleischprodukten verwendet. Da es sich um ein nicht selektives Nährmedium handelt, kommt es ebenfalls zu einer guten Vermehrung der Begleitflora. Um optimale Wachstumsbedingungen für Laktobazillen zu erzielen, werden dem Nährboden entsprechende Nährstoffe und Zusätze darunter Thiamin, Tween® und verschiedenen essentielle Bestandteile beigesetzt. (file:///C:/Users/irene/AppData/Local/Temp/171-APT%20Agar-110453-5.pdf; eingesehen am 03.03.2022).

Appendix Tabelle 4 Zusammensetzung des All purpose medium with Tween Agar (Merck).

BESTANDTEILE	g/Liter
Casein Pepton	12,5
Hefeextrakt	7,5
D (+) Glucose	10,0
Natriumchlorid	5,0
Trinatriumcitrat	5,0
Di- Kaliumhydrogenphosphat	5,0
Tween® 80	0,2
Magnesiumsulfat	0,8
Manganchlorid	0,14
Eisen (II) Sulfat	0,04
Thiaminium Dichlorid	0,001
Agar	13,5
pH 6.7 ± 0.2 @ 25°C	

Quelle: Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland; file:///C:/Users/irene/AppData/Local/Temp/171-APT%20Agar-110453.pdf; eingesehen am: 03.03.2022.

Kristallviolett- Galle- Glucose Agar (VRBD)

Kristallviolett- Galle- Glucose Agar, ein selektives Nährmedium, das gemäß der ISO Normen ISO 21528 und ISO 11133:2014 zur Detektion und Zählung von Enterobakterien aus Lebensmitteln und pharmazeutischen Proben eingesetzt wird. Die Nachweismethode beruht auf der Fähigkeit der Enterobakterien, Glukose unter Säurebildung

abzubauen. Diese rasche Ph Wert Senkung äußert sich durch den Farbumschlag des Indikators Phenolrots und des im Medium enthaltenen Kristallviolett, sodass es zur Entstehung von rosa bis violett gefärbte Kolonien kommt. Zusätzlich kann es durch die Ausfällung der Gallensalze zu einer Präzipitationsbildung um die betreffende Kolonie kommen. Um das Wachstum der Gram-positiven Begleitflora weitgehend zu unterdrücken, wird der Zusatz von Kristallviolett und Gallensalze verwendet (<https://www.dvg.net/index.php?id=291#Kultur>; eingesehen am 03.03.2022).

Appendix Tabelle 5 Zusammensetzung des Kristallviolett-Galle-Glucose Agar (Oxoid Limited).

BESTANDTEILE	g/Liter
Enzymatisch verdautes tierisches Gewebe	7,0
Hefeextrakt	3,0
Gallensalz Nummer 3	1,5
Natriumchlorid	5,0
Neutralrot	0,03
Kristallviolett	0,002
Glukose	10,0
Agar	12,0
pH 7.4 ± 0.2 @ 25°C	

Quelle: Oxoid; Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA;
http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1082+&c=UK&lang=EN; eingesehen am: 03.03.2022.

Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar (XLD)

Xylose Lysine Desoxycholate Agar gehört in die Gruppe der Selektivnährboden und wird für die Isolierung von enteropathogenen Bakterien, insbesonders Salmonellen und Shigellen benutzt. Der Nachweis dieser gramnegativen enterischen Pathogenen beruht auf drei chemischen Reaktionen: dem Abbau von Xylose, Lactose und Sacharose, Lysin-Decarboxylierung und der Produktion von Schwefelwasserstoff. Die Hemmung der grampositiven Begleitflora wird durch Zugabe von Natriumdesoxycholat erreicht. Salmonellen sind in der Lage, das Natriumsalz in Schwefelwasserstoff zu metabolisieren, was zu einer zentralen Schwarzfärbung der Bakterienkolonie führt (<https://www.chemie-schule.de/KnowHow/XLD-Agar>; eingesehen am 03.03.2022).

Appendix Tabelle 6 Zusammensetzung des Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar (Oxoid Limited).

BESTANDTEILE	g/Liter
Hefeextrakt	3,0
L-Lysine HCL	5,0
Xylose	3,75
Laktose	7,5
Saccharose	7,5
Natriumdesoxycholat	1,0
Natriumchlorid	5,0
Natriumthiosulfat	6,8
Eisenammoniumcitrat	0,8
Phenol rot	0,08
Agar	12,5
pH 7.4 ± 0.2 @ 25°C	

Quelle: Oxoid; Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA;
http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0469+&c=UK&lang=EN; eingesehen am: 03.03.2022.

Brilliance *Listeria* Agar Base

Brilliance *Listeria* Agar Base ist ein chromogenes, selektives Medium zur Isolierung, Zählung und präsumtive Differenzierung von *Listeria* spp. und *Listeria monocytogenes* aus Lebensmittelproben. In Anlehnung an die Rezeptur von Ottaviani und Agosti erfolgt das Nachweisprinzip auf zwei wesentliche Enzymaktivitäten. Dabei unterscheidet sich die modifizierte Variante des Brilliance *Listeria* Agar von der ursprünglichen Formulierung von Ottaviani und Agosti nur hinsichtlich der von den Listerien produzierten Phospholipase, PCPLC bzw. PIPLC.

Das im Nährboden enthaltenen Substrat X Glucosid wird durch die in allen Listerien Arten gebildete β Glucosidase gespalten, wodurch es zu Entstehung von blauen Kolonien kommt. Anderer Organismen, die ebenso diese Enzymaktivität aufweisen, werden durch selektive Ergänzungsmittel gehemmt. So wird das Wachstum von zB. Enterokokken mittels Lithiumchlorid, Polymyxin B und Nlidixinsäure bzw. Hefe und Schimmelpilzen mittels Amphotericin verhindert. Eine weitere Unterscheidung von pathogenen *L. ivanovii* und *L. monocytogenes* erfolgt an and des Nac ei ses der Lecit inase Diese tr ben r zi itationszonen e rden auc als „a lo“ bezeic net.

Appendix Tabelle 7 Zusammensetzung des Brilliance *Listeria* Agar Base (Oxoid Limited).

BESTANDTEILE	g/Liter
Pepton	18,5
Hefeextrakt	4,0
Natriumchlorid	9,5
Natriumpyrovat	2,0
Lithiumchlorid	15,0
Maltose	4,0
X- Glucosid- chromogene Mischung	0,2
Agar	14,00
pH 7,2 ± 0,2 @ 25°C	

Quelle: Oxoid; Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA;
http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1080&cat=&c=UK&lang=EN; eingesehen am: 03.03.2022.

Appendix Tabelle 8 Ergänzungen Brilliance *Listeria* Agar Base (Oxoid Limited).

BESTANDTEILE	1 Flasche pro 500 ml Medium	Pro Liter
Nalidixinsäure (Code: SR0227)	13,0 mg	26,0 mg
Polymyxin B (Code: SR0227)	5,0 mg	10,0 mg
Ceftazidim (Code: SR0227)	3,0 mg	6,0 mg
Amphotericin (Code: SR0227)	5,0 mg	10,0 mg
Lecithinlösung (Code: SR0228)	20,0 mg	40,0 mg

Quelle: Oxoid; Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA;
http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1080&cat=&c=UK&lang=EN; eingesehen am: 03.03.2022.

Bacillus ChromSelect Agar

Beim *Bacillus* ChromSelect Agar handelt es sich um ein besonderes Wachstumsmedium, wodurch eine bessere Differenzierung und schnelle Identifikation von *Bacillus* Arten aus Lebensmittelproben möglich gemacht wird. Die spezielle Blaufärbung entsteht durch eine Spaltung der im Medium beigemengten chromogenen Substanzen durch das im *Bacillus cereus* vorhandene Enzym- β -Glucosidase zustande. Die grundlegende Zusammensetzung des Mediums basiert auf der Formulierung des MYP Agars, formuliert von Mossel et al. Zusätzlich dienen Fleischextrakte und Pepton aus Fleisch, welches durch peptische Verdauung aus tierischem Gewebe gewonnen wird, als stickstoffhaltige Verbindungen. Die Beimengung von Mannit dient zur Detektion von Mannit negativen Vertreter der *B. cereus* Gruppe. Andere Sporenbildner färben den Agar durch Mannitol Fermentation gelb.

Appendix Tabelle 9 Zusammensetzung des *Bacillus cereus* ChromoSelect Agar (Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, USA).

BESTANDTEILE	g/Liter
Peptisch verdautes tierisches Gewebe	10,0
Fleischextrakt	1,0
D- Mannitol	10,0
Natriumchlorid	10,0
Mischung von chromogenen Substanzen	3,2
Phenolrot	0,025
Agar	15,0
pH 7.1 ± 0.2 @ 25°C	

Quelle: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/92325?lang=de®ion=AT>;
<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Datasheet/1/92325dat.pdf>; eingesehen am: 03.03.2022.

Appendix Tabelle 10 Untersuchungsansätze

PROBEN	ABKÜR Z.	BESTANDTEIL VON	US-ANSÄTZE
Produkt: Ready-to eat Salat			
Thunfischsalat			5
Crispy Chicken Salat			5
Blattsalat mit Lachs			5
Bunter Wurstsalat			5
Caesar Salad			5
Mediterraner Pastasalat			5
Falafel-Salat			4
Sommersalat, Grillkäse			4
Thai-BBQ-Chicken			
Salad			4
Tomaten-Mozzarellasalat			4
DRESSING/PESTO			
Cesardressing	CD	Caesar Salad	3
Wiener Marinade (Essig/Öl)	WM	Blattsalat mit Lachs; Bunter Wurstsalat	3
Joghurt Kräuter Dressing	JKD	Thunfischsalat; Sommersalat, Grillkäse	3
Knoblauchdressing	KD	Falafel-Salat; Crispy Chicken Salat	3
Balsamico Dressing	BD	Tomaten-Mozzarellasalat	2
Thai Dressing	TD	Thai-BBQ-Chicken Salad	2
Pesto Rosso	Pesto R	Mediterraner Pastasalat	1
Gewürz			
Knoblauchpulver	Kp	Falafel-Salat; Crispy Chicken Salat	1
ROHSTOFF (SALAT)			
Grüner Salatmix	gSM	Falafel-Salat, Thunfischsalat; Crispy Chicken Salat; Blattsalat mit Lachs; Sommersalat, Grillkäse; Thai-BBQ-Chicken Salad; Bunter Wurstsalat; Caesar Salad; Tomaten-Mozzarellasalat	5
Rucola grob geschnitten	Rg	Sommersalat, Grillkäse; Mediterraner Pastasalat	4
Vogerlsalat	Vs	Blattsalat mit Lachs	2
ROHSTOFF (GEMÜSE)			
Cocktailtomaten	CT	Sommersalat, Grillkäse; Thai-BBQ-Chicken Salad	1
Tomaten ganz	Tg	Falafel-Salat; Crispy Chicken Salat; Tomaten-Mozzarellasalat; Mediterraner Pastasalat	1
Karotten Julienne	Kj	Thunfischsalat; Crispy Chicken Salat	1
Paprika gelb	Pg	Sommersalat, Grillkäse; Crispy Chicken Salat	1
Paprika rot geschnitten	Pr	Bunter Wurstsalat	1
Gurkerl Julienne	Gj	Bunter Wurstsalat	1
Radieschen ganz geputzt	Rad	Sommersalat, Grillkäse; Crispy Chicken Salat; Blattsalat mit Lachs	1
Zwiebel Julienne	Zj	Bunter Wurstsalat, Thai-BBQ-Chicken Salad	1
Jungzwiebel frisch	Jz	Bunter Wurstsalat, Thai-BBQ-Chicken Salad	1
ROHSTOFF (TEIGWAREN)			
Penne gekocht	Pe	Mediterraner Pastasalat	1
ROHSTOFF (PRODUKTE TIERISCHER HERKUNFT)			
Emmentaler geschnitten	ET	Bunter Wurstsalat	1
Pulled Chicken gebraten	PC	Thai-BBQ-Chicken Salad	1
S+R Extrawurst in Streifen	S+R	Bunter Wurstsalat	1
Wurstsalat- Mischung	Ws Mix	Bunter Wurstsalat	1

