

Aus dem Department für Nutztiere  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und öffentliches  
Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin, Abteilung Lebensmittelmikrobiologie  
(Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Martin Wagner Dipl. ECVPH)

## **Mikrobieller Eintrag aus den Primärprodukten und Kontaminationswege in die Verarbeitungskette bei der Herstellung von vegetarischen Convenience-Produkten auf Pilzbasis**

Sources of microorganism entry from primary products and  
contamination pathways into the processing chain during the  
production of mushroom-based vegetarian convenience  
products

**Diplomarbeit**

Veterinärmedizinische Universität Wien

Vorgelegt von  
Natalie Propadalo  
Wien, im Juni 2023



**Betreuer/in**

Dr. med. vet. Martina Ludewig

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

Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie  
Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und Öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin  
Leitung: Prof. Dr. med. vet. Martin Wagner, Dipl. ECVPH

**Begutachter/in**

Univ.-Prof. Dr. med. vet. Karin Schwaiger

Abteilung Hygiene und Technologie von Lebensmitteln  
Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin  
Leitung: Prof. Dr. med. vet. Martin Wagner, Dipl. ECVPH

**Förderung:**

Diese Arbeit wurde im Rahmen eines Forschungsvorhabens des Austrian Competence Centre for Feed and Food Quality, Safety and Innovation (FFoQSI) erstellt.

Das Comet-K1 Kompetenzzentrum wird im Rahmen von Comet – Competence Centres for Excellent Technologies durch BMVIT, BMDW und die Bundesländer Niederösterreich, Oberösterreich und Wien gefördert. Das Programm Comet wird durch die FFG abgewickelt.

## **Inhaltsverzeichnis**

1 Einleitung .....	1
1.1 Gesetzliche Anforderungen bei der Herstellung von Lebensmitteln .....	1
1.2 Convenience-Produkte und Risiken für den gesundheitlichen Verbraucherschutz .....	1
1.2.1 Definition und Ernährungstrends .....	1
1.2.2 Mikrobiologie.....	2
1.2.3 Vorkommen von Zoonoseerregern .....	5
1.2.4 Rekontamination nach der Erhitzung.....	7
1.3 Ziel der Untersuchungen.....	9
2 Material und Methoden .....	11
2.1 Studiendesign.....	11
2.2 Beschreibung der verwendeten Isolate .....	12
2.3 16S rRNA Sequenzierung .....	13
2.3.1 DNA-Extraktion und Durchführung der PCR.....	13
3 Ergebnisse.....	15
3.1 Gruppierung der sequenzierten Isolate.....	15
3.2 Isolate aus Rohware, Gewürzen und Endprodukten .....	16
3.3 Isolate aus dem Produktionsumfeld .....	22
3.4 Vergleich der sequenzierten Isolate bezogen auf die Probenart .....	25
4 Diskussion und Schlussfolgerung.....	26
5 Zusammenfassung .....	30
6 Summary.....	31
7 Abkürzungen.....	32
8 Literaturverzeichnis .....	34
9 Tabellenverzeichnis .....	42
10 Abbildungsverzeichnis .....	42
11 Anhang.....	43

# **1 Einleitung**

## **1.1 Gesetzliche Anforderungen bei der Herstellung von Lebensmitteln**

Nach dem aktuellen Recht der Europäischen Union müssen Lebensmittel, die KonsumentInnen abgegeben werden, die Anforderungen an die Lebensmittelsicherheit erfüllen (EU VO 178/2002). In diesem Kontext ist der Lebensmittelunternehmer verpflichtet, die gesundheitliche Unbedenklichkeit sowie die gute Qualität der Produkte (d. h. diese müssen frei von Fremdstoffen und Kontaminanten sein bzw. dürfen nicht verdorben sein) gewährleisten.

In der VO 852/2004 sind die Rahmenbedingungen, unter denen eine hygienisch einwandfreie Lebensmittelproduktion ausgehend vom Primär- bis zum fertigen Produkt zu erfolgen hat, festgelegt. Danach müssen die LebensmittelunternehmerInnen ein HACCP-System etablieren (Hazard Analysis and Critical Control Points), um mögliche Gefahren zu erkennen und um daraus Risiken für die KonsumentInnen abzuleiten. In diesem System werden Maßnahmen festgelegt, die zu einer Vermeidung, Minimierung bzw. Ausschaltung dieser potenziellen Gefahren führen (z. B. Festlegung von Kühl- oder Erhitzungstemperaturen). Grundsätzlich ist eine nachteilige Beeinflussung aller Rohstoffe und der Endprodukte zu vermeiden. Aus diesem Grund sind die darin festgelegten Vorgaben für bauliche Voraussetzungen und Ausrüstungen, die Vorschriften zur Beförderung, Verpackung, Kühlung und Wärmebehandlung einzuhalten.

## **1.2 Convenience-Produkte und Risiken für den gesundheitlichen Verbraucherschutz**

### **1.2.1 Definition und Ernährungstrends**

Unter Convenience-Food versteht man Lebensmittel, die je nach dem Grad der Verarbeitung, in fünf unterschiedliche Fertigungsstufen (küchen-, gar-, misch-/aufbereitungs-, zubereitungs-/regenerier- und verzehrfertig) eingeteilt werden. Die Palette reicht vom zugeschnittenen Fleisch, über Trockennudeln, Puddingpulver, Tiefkühlpizza, vorgegarte Schnitzel bis hin zum fertigen Salat mit Dressing (<https://www.oesterreich-ist-informiert.at/herstellung/convenience-food-das-steckt-dahinter/> Zugriff 22.10.2020). Nach aktuellen Trendschätzungen wird für das Jahr 2021 in Österreich für Convenience Food (ohne

Tiefkühlgemüse, geschnittenes Obst, Gemüse und Salat) ein pro Kopf-Verbrauch von 19,4 kg erwartet (<https://de.statista.com/outlook/cmo/lebensmittel/convenience-food/oesterreich> Zugriff 08.09.2021). In Österreich ernähren sich 8,0 % der Bevölkerung vegetarisch oder vegan und 42 % sind sogenannte FlexitarierInnen, die zunehmend auf Fleisch verzichten (<https://de.statista.com/themen/3804/vegetarismus-und-veganismus-in-oesterreich> Zugriff 09.09.2021).

Diese Gruppe verzehrt weniger Fleisch, bevorzugt aber gern Produkte, die fleischhaltigen Erzeugnissen im Geschmackserlebnis ähneln. Neben den traditionellen Komponenten aus Fleisch oder Käse werden diese Erzeugnisse aus Soja, z. B. Tofu und dem Vitamin B12-haltigen Tempeh, Lupinen-, Erbsen- und Weizenmehl hergestellt angeboten (JETZKE ET AL. 2016). Lupinentofu eignet sich z. B. für die Herstellung von Würsten, Burgern und schnitzelartigen Erzeugnissen (LEITZMANN 2013). In Österreich finden sich am Markt auch fleischähnliche Produkte bei denen Frischpilze und Reis als Hauptzutat verwendet werden.

### **1.2.2 Mikrobiologie**

In Abhängigkeit vom Verarbeitungsgrad ist die mikrobiologische Belastung von Convenienceprodukten sehr unterschiedlich. Für ausgewählte Produkte wurden von der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) mikrobiologische Richt- und Warnwerte, die bis zum Ende des Mindesthaltbarkeitsdatums (MHD) eingehalten werden sollten, publiziert. Danach werden für die verschiedenen Fertigprodukte (gegarte Tiefkühlfertiggerichte, vor Verzehr zu erhitzende bzw. verzehrfertige Komponenten, wie Schnitzel, vegetarische oder vegane Produkte) Richtwerte für die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl (GKZ) von 5,0 log bis 6,0 log koloniebildende Einheiten/g (KbE/g) angegeben. Der Richtwert für vergleichbare Fleischerzeugnisse (z. B. Brätwurst) liegt bei 4,7 log KbE/g. Die Anzahl der *Enterobacteriaceae* soll 2,0 bzw. 3,0 log KbE/g nicht überschreiten (DGHM 2021, <http://www.dghm-richt-warnwerte.de/de/dukkumente> Zugriff 10.09.2021).

In erhitzten Fleischerzeugnissen werden unmittelbar nach der Herstellung niedrige Gesamtkeimzahlen (1,5 bis 3,0 log KbE/g) ermittelt. Während der Lagerung der verpackten Erzeugnisse kommt es in der Regel vor allem durch die Vermehrung von Milchsäurebakterien

zu einem Anstieg der Gesamtkeimzahl (MANTIS ET AL. 2005, FENG ET AL. 2014, RIEL ET AL. 2017, RANUCCI ET AL. 2019). Allerdings werden in der Literatur für die Gesamtkeimzahl unterschiedliche Werte angegeben. So lagen die Gesamtkeimzahlen in erhitzten vakuumverpackten Fleischerzeugnissen nach 15 Tagen bereits bei 6,0 bzw. >8,0 log KbE/g (SAMELIS ET AL. 2000). In Brätwurst (ebenfalls vakuumverpackt) wurden in Abhängigkeit von der Art nach zwei Wochen Lagerung deutlich niedrigere Werte zwischen 4,6 und 5,1 log KbE/g festgestellt. Erst nach sieben Wochen wurden in dieser Studie höhere Werte (5,9 bis 8,9 log KbE/g) beobachtet (MANTIS ET AL. 2005).

In vegetarischer Alheira, einer geräucherten portugiesischen Wurstart, die aus erhitzten Zutaten hergestellt wird, wurden sehr hohe Gesamtkeimzahlen zwischen 5,4 und 7,5 log KbE/g und *Enterobacteriaceae*-Keimzahlen zwischen 5,7 bis 7,7 log KbE/g festgestellt (AZEVEDO ET AL. 2020). Dagegen lagen diese Keimzahlwerte bei Alheira-Würsten aus veganen Zutaten unterhalb der Nachweisgrenze (< 1,0 log KbE/g). *Escherichia (E.) coli* wurde in dieser Studie weder in vegetarischen noch veganen Produkten nachgewiesen. Sehr niedrige Gesamtkeimzahlen (zwischen 0,8 und 0,9 log KbE/g) wurden ebenfalls in erhitzten Würsten auf Pilzbasis nachgewiesen (WANG ET AL. 2019). Schimmelpilze und coliforme Bakterien konnten in diesen Proben nicht angezüchtet werden.

Bei aus Sojaproteinen hergestellten Produkten, wie Tofu lag in einer brasilianischen Studie die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl immer über 5,63 log KbE/g (RIBEIRO ET AL. 2016). Die in Brasilien festgelegten Grenzwerte für *E. coli* und koagulase positive *Staphylokokken* von 3,7 log KbE/g wurden in fast allen Tofuproben überschritten. In Belgien wurden bei Tofu aus dem Einzelhandel generell deutlich niedrigere Werte ermittelt. In dieser Studie lag die mittlere Gesamtkeimzahl bei 3,4 log KbE/g am Tag des Einkaufs (TUYTSCHAEVER ET AL. 2023).

In anderen aus pflanzlichen Zutaten hergestellten Produkten, wie Hummus, welcher traditionell auf Kichererbsenbasis hergestellt wird, war die mittlere Gesamtkeimzahl in Proben aus dem Supermarkt generell niedriger. In Studien aus den Vereinigten Arabischen Emiraten und Belgien wurden mittlere Gesamtkeimzahlen von 2,7 log KbE/g bzw. 3,7 log KbE/g festgestellt (ALMUALLA ET AL. 2010, TUYTSCHAEVER ET AL. 2023). Die Werte für *E. coli* waren

mit 0,5 log KbE/g ebenfalls sehr niedrig (ALMUALLA ET AL. 2010). Dagegen wurden bei Lagerungsversuchen in Brokkoli-Hummus nach 15 Tagen Keimgehalte von über 6,0 log KbE/g ermittelt (KLUG ET AL. 2018).

Die Ursachen für die unterschiedlichen Keimbelastungen innerhalb einer Produktgruppe sind vielfältig. AZEVEDO ET AL. (2020) führen die Schwankungsbreite bei der Gesamtkeimzahl von Alheira-Würsten auf die Keimdiversität und –anzahl in den Zutaten zurück. Für den Geschmack von Fertigprodukten sind Gewürze und Kräuter von Bedeutung. Jedoch können damit auch Verderbniskeime und pathogene Mikroorganismen in das Produkt gelangen, welche bei unzureichender Erhitzung den Verderb des Produktes beeinflussen bzw. zu Erkrankungen von KonsumentInnen führen können. Es gibt sowohl im nationalen Lebensmittelrecht in Österreich als auch auf europäischer Ebene keine rechtlich verbindlichen mikrobiologischen Kriterien für Gewürze und getrocknete Küchenkräuter (SCHAARSCHMIDT ET AL. 2016). Die Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) gibt Richt- und Warnwerte vor. So sollen Salmonellen in 25 g nicht nachweisbar sein. Für *Bacillus (B.) cereus* und *E. coli* liegen die Richtwerte bei jeweils 3,0 log KbE/g und der Warnwert bei 4,0 log KbE/g (DGHM 2021, SCHAARSCHMIDT ET AL. 2016). In einer Studie von GRYCZKA ET AL. (2020) wurde die Auswirkung von Bestrahlung und Hitzebehandlung auf die Keimbelastung und die Zusammensetzung der Mikroflora von Gewürzen untersucht. In unbestrahlten Gewürzen ist vorwiegend *B. subtilis* zu finden. In bestrahltem schwarzem Pfeffer lässt sich hingegen hauptsächlich *Cronobacter sakazaki* und *B. megaterium* nachweisen. Sehr hohe Keimbelastungen mit Keimzahlen von bis zu 6,4 log KbE/g wurden beispielsweise in unbehandeltem schwarzem Pfeffer nachgewiesen. Bei weißem Pfeffer und nach der Anwendung von Behandlungen wurden generell niedrigere Gesamtkeimzahlen von 5,5 log bis < 2,0 log KbE/g festgestellt (GRYCZKA ET AL. 2020).

Andere mögliche Grundzutaten für vegetarische und vegane Produkte sind z. B. Weizen, Soja, Kicherebsen, Lupine bzw. Pilze. So wurde in einer türkischen Studie in Weizenmehl eine aerobe mesophile Gesamtkeimzahl von 2,0 log und 8,0 log KbE/g nachgewiesen. Außerdem waren in den Proben *E. coli*- (bis 1,4 log MPN/g) und *B. cereus*-Keimzahlen (von 1,0 log bis 3,0 log KbE/g) vorhanden (AYDIN ET AL. 2009). Die Gesamtkeimzahl von Sojabohnenmehl, das von

verschiedenen Märkten in Benin stammte, variierte stark (<2,0 bis 6,9 log KbE/g). *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp.) waren die bedeutendste Keimgruppe in diesen Mehlen. Außerdem wurden in den Proben diverse *Bacillus* spp. differenziert (MADUKA ET AL. 2021).

In rohen Speisepilzen lagen die mittleren Gesamtkeimzahlen zwischen 3,7 und 5,6 log KbE/g, die Anzahl der *Pseudomonadaceae* und *Enterobacteriaceae* zwischen 2,7 und 4,9 log KbE/g bzw. zwischen 1,9 und 4,2 KbE/g (SCHILL ET AL. 2021).

### **1.2.3 Vorkommen von Zoonoseerregern**

Mit dem steigenden Angebot an vegetarischen und veganen Produkten nehmen auch die Meldungen im Europäischen Schnellwarnsystem für Lebens- und Futtermittel (Rapid Alert System for Food and Feed - RASFF) in dieser Produktgruppe zu. Das betrifft sowohl vegetarische Zutaten als auch verzehrfertige Lebensmittel. Ab den Jahren 2020 bis zum September 2022 wurden im RASFF allein 188 Events unter der Rubrik „Nüsse, Nussprodukte und Körner“ registriert (RASFF 2022, <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/search> Zugriff 12.09.2022). Am häufigsten war der Nachweis von *Salmonella* spp. in Sesamsamen (176 Meldungen im Zeitraum vom 1.1.2020 bis 30.9.2022). Weiters waren diese auch in Mandeln (4 Fälle) und vereinzelt in Chiasamen und in Kürbiskernen zu finden. Davon betroffen waren auch verarbeitete Produkte, wie Tahin, einer Sesampaste, aus Syrien und Jordanien (RASFF 2022, <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/559826>, <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/559485> Zugriff 13.9.2022). Bereits im Jahr 2011 gab es in Amerika einen Salmonellose Ausbruch, der durch *Salmonella (S.) enterica Serovar Bovismorbisficans* in Hummus und Sesampaste ausgelöst wurde (GOPINATH ET AL. 2014).

*Listeria (L.) monocytogenes* wurde bei wiederholten Kontrollen in frischen Enoki Pilzen aus China und Korea, die ebenfalls in vegetarischen Gerichten Verwendung finden, nachgewiesen und entsprechend im RASFF-Portal veröffentlicht. Dabei wurden im Einzelfall sehr hohe Keimzahlen von über 5,0 log KbE/g in 25 g festgestellt (RASFF 2022, <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/547886>, <https://webgate>.

ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/538926,  
<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/538924> Zugriff 13.9.2022).  
Zudem liegen aktuelle RASFF-Meldungen über den Nachweis von *L. monocytogenes* in  
veganen verzehrfertigen Fertiggerichten (Slowakei), in veganem Käse (Frankreich) sowie  
Falafel, mit Kichererbsen als Hauptzutat, (Niederlande) vor (RASFF 2022,  
<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/564362>,  
(<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/561073>,  
<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/555145> Zugriff 13.9.2022).  
Eine andere Studie ergab, dass 32 % der beprobten vegetarischen Würste *Clostridium (C.)  
botulinum* enthielten (20-1200 Zellen/kg). In erster Linie waren sie in den vakuumverpackten,  
gekühlten Produkten zu finden, aber auch in einer tiefgekühlten Produktprobe kam *C.  
botulinum* vor (PERNU ET AL. 2020). In pilzbasierten und in Alheira Würsten waren  
*Staphylococcus (Staph.) aureus* nicht nachweisbar. Jedoch wurde *L. monocytogenes* in Alheira  
Würsten nachgewiesen. *Salmonellen* hingegen fand man darin keine (WANG ET AL. 2019,  
AZEVEDO ET AL. 2020).

Bei einer Tofu-Beprobung in Brasilien konnten *B. cereus* und *Listerien* nicht isoliert werden,  
dennoch waren alle Proben für den menschlichen Verzehr, aufgrund der überschrittenen  
Grenzwerte für koagulase positive *Staphylokokken* und *E. coli*, ungeeignet (RIBEIRO ET AL.  
2017). In Tofu aus dem koreanischen Handel waren Pathogene wie *B. cereus*, *Salmonella* spp.,  
*L. monocytogenes*, *Enterohämorrhagische E. coli (EHEC)* und *Staph. aureus* nicht nachweisbar  
(LEE ET AL. (2017). Allerdings konnte in Lagerungsuntersuchungen *B. cereus* als  
vorherrschende Keimspezies in den verdorbenen Produkten ermittelt werden. Bei der  
Untersuchung des Wachstums von *B. cereus* bei den verschiedenen Lagerungstemperaturen  
wurde herausgefunden, dass die maximale Lagerungsdauer von Tofu bei Temperaturen von  
5°, 10° und 15°C bei rund 10, 4 bzw. 2 Tagen liegt (LEE ET AL. 2017).

In Hummus aus den Arabischen Emiraten waren *Staph. aureus*, *Salmonella* und *L.  
monocytogenes* nicht nachweisbar (ALMUALLA ET AL. 2010).

In Gewürzen sind häufig Zoonoseerreger zu finden. So wurden zum Beispiel *Salmonellen* in den Niederlanden Anfang April 2022 darin entdeckt und im Jahr 2020 aus indischem Zwiebelpulver in Deutschland isoliert (RASFF 2022, <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/416133> Zugriff 14.9.2022). Zudem wird in Gewürzen *B. cereus* regelmäßig nachgewiesen. Ende Oktober 2021 wurden in Österreich bei einer aus Deutschland kommenden Gewürzmischung aus italienischen Kräutern sehr hohe *B. cereus*-Keimzahlen ( $> 5,0 \log \text{KbE/g}$ ) festgestellt (RASFF 2022, <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/510724> Zugriff 14.9.2022).

In einer Gewürzmischung aus Basilikum, Pfeffer und Paprika lag die *B. cereus*-Keimzahl mit  $3,20 \log \text{KbE/g}$  bereits über dem Richtwert der DGHM (FRENTZEL ET AL. 2018, DGHM 2021.) FOGLE ET AL. (2018) untersuchte Curry, schwarzen Pfeffer, Kümmel, Gewürznelken, Zimt, Thymian, Basilikum und Rosmarin auf *B. cereus*, wobei die Keimzahlen zwischen  $1,10$  und  $3,09 \log \text{KbE/g}$  lagen. In gemahlenem Pfeffer war die Kontamination mit einem Mittelwert von  $2,49 \log 10 \text{KbE/g}$  am höchsten. Die in der Studie getesteten *B. cereus* Isolate enthielten das emetische Toxin Cereulid (ces) nicht. Hingegen wurde das Hämolytische-BL(HBL) Toxin in 72% der *B. cereus* Isolate gefunden (FOGLE ET AL. 2018).

#### **1.2.4 Rekontamination nach der Erhitzung**

Die im Projekt untersuchten Convenience Produkte sind hitzebehandelte Erzeugnisse. In hitzebehandelten Lebensmitteln werden vegetative Bakterienzellen, Hefen und Schimmelpilze in Abhängigkeit von der Behandlungsintensität (Temperatur und Zeit) und der Matrix (pH-,  $a_w$ -Wert, Struktur) sicher abgetötet. Eine Einwirktemperatur von  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  führt innerhalb von wenigen Sekunden bzw. von 30 Minuten zur Inaktivierung von vegetativen Zellen. Für die Abtötung von Sporen werden Temperaturen von  $100$  bis  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  benötigt, die in der Lebensmittelverarbeitung nur im Ausnahmefall erreicht werden (z. B. Vollkonserven, Haltbarmilch) (PARK ET AL. 2014, CEBRIAN ET AL. 2017). Die Stabilität der Produkte muss auch nach der Erhitzung in allen Prozessschritten gewährleistet werden. Wird das bereits stabilisierte Lebensmittel (z. B. nach dem Erhitzungsschritt) wieder mit Mikroorganismen kontaminiert, handelt es sich um Rekontamination. Die Eintragsmöglichkeiten sind sehr

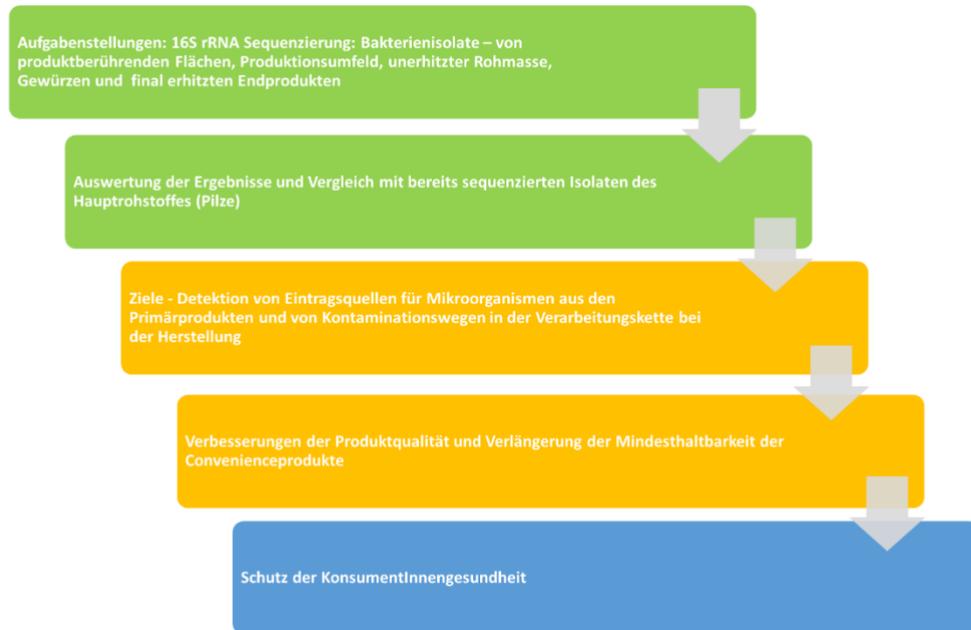
vielfältig, wobei lebensmittelassoziierte Kontaktflächen, Personal, Luft und Wasser zu berücksichtigen sind. Rekontaminationen mit Pathogenen und mit Verderbniskeimen sind gleichermaßen bedeutend (DEN AANTREKKER ET AL. 2003, ZWIETERING ET AL. 2016, MASOTTI ET AL. 2019). Daten die im Rahmen des Surveillance-Programmes der WHO (World Health Organization) erhoben wurden ergaben, dass 9,0 % der Lebensmittel-assoziierten Krankheitsausbrüche durch Rekontaminationen aus der Umwelt (Personal, kontaminierte Ausrüstung bzw. Räumlichkeiten) verursacht wurden (TIRADO und SCHMIDT 2001). Bestimmte Bakterienarten können sogenannte Biofilme auf den Oberflächen bilden, so dass sie auch Reinigungs- und Desinfektionsprozesse gut überstehen. Dadurch ist diese Gruppe auch oft für Rekontaminationen verantwortlich (DEN AANTREKKER ET AL. 2003). Die Auswertung zahlreicher Literaturquellen ergab, dass bei der Verarbeitung in Abhängigkeit von der Produktart unterschiedliche Bakteriengruppen, nach Reinigung und Desinfektion auf Lebensmittel-assoziierten Kontaktflächen dominierten (MØRETRØ ET AL. 2017). Verschiedene *Enterobacteriaceae* spp. werden bei fast allen Produktgruppen (Fleisch, Fisch, Milch, Eis und Brot) nachgewiesen. In der Fleisch-verarbeitenden Industrie sind außerdem *Pseudomonas* spp und Milchsäurebakterien von Bedeutung. In der Milchverarbeitung werden oft auch grampositive Kokken, wie z. B. *Microbacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* spp. isoliert. Zudem kamen sporenbildende Bakterien, v. a. *Bacillus* und *Peaenibacillus* spp. bei allen Produktgruppen regelmäßig auf den Kontaktflächen vor (MØRETRØ ET AL. 2017). Oft sind sie in den Rohstoffen zu finden und ihre Sporen können Desinfektionsmittel und minutenlanges Erhitzen bei 100°C überleben (ANDRÉ ET AL. 2017). In Backwaren war beispielsweise *B. amyloliquefaciens* häufig am Verderb beteiligt, in erhitzter Milch sind Vertreter der *B. cereus* Gruppe und *Peaenibacillus* spp. am Verderb beteiligt. In einem Gemüseverarbeitungsbetrieb waren *Pseudomonas* spp., welche besonders gern Biofilme bilden, dominierend. Aber auch *Enterobacteriaceae*, wie *Erwinia* spp. und *Rahnella aquatilis*, waren zu finden. Das Förderband hat sich als die größte Kontaminationsquelle herausgestellt, aber auch über die Luftkühlungsanlage kam es in diesem Fall zur Kontamination (MEIRELES ET AL. 2017).

Bei der Untersuchung von gekochtem Schweineschinken wurden hauptsächlich *Leuconostoc* spp. als Verderbnisursache identifiziert. In diesem Fall fand die Rekontamination nach der Erhitzung bei der Lagerung und in der Verpackungszone statt (BLANCO-LIZARAZO ET AL. 2022). Es ist häufig nachgewiesen worden, dass Verderbniserreger bzw. pathogene Bakterien im Produktionsumfeld (Kontaktflächen, Verarbeitungsmaschinen, Fußböden, etc.) und gleichzeitig im Produkt vorkommen (DE FILIPPIS ET AL. 2021).

### **1.3 Ziel der Untersuchungen**

In der vorliegenden Diplomarbeit wurden Bakterienisolate mittels 16S rRNA sequenziert, die aus Endprodukten, rohen Zwischenprodukten und dem Produktionsumfeld im Rahmen der Produktionskontrolle gewonnen wurden. Die Hauptzutaten der vegetarischen Convenience-Produkte bestehen aus geschnittenen Frischpilzen (Kräuterseitling), Reis und Gewürzen. Die ermittelten Sequenzierergebnisse werden mit bereits erhobenen Daten des Hauptrohstoffes (Pilze) verglichen.

Ziel dieser Arbeit ist es, Eintragsquellen für Mikroorganismen aus den Primärprodukten und Kontaminationswege in der Verarbeitungskette bei der Herstellung von vegetarischen Convenience-Produkten auf Pilzbasis zu erkennen, um Verbesserungen in der Produktqualität erzielen zu können, die Haltbarkeit zu verlängern und die Gesundheit der KonsumentInnen zu schützen (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Aufgabenstellung- und Ziele der Diplomarbeit

Ausgehend von der Auswertung der Literatur kann die folgende Hypothese angenommen werden:

Bakterienspezies, welche in den Rohstoffen (Pilze, Gewürze) der vegetarischen Produkte isoliert und mittels 16S rRNA differenziert wurden, können auch auf Lebensmittelkontaktflächen, Maschinen und im Endprodukt nachgewiesen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studiendesign

Das experimentelle Programm umfasste die Sequenzierung von Bakterienisolaten und die Auswertung der Ergebnisse (Abbildung 2).

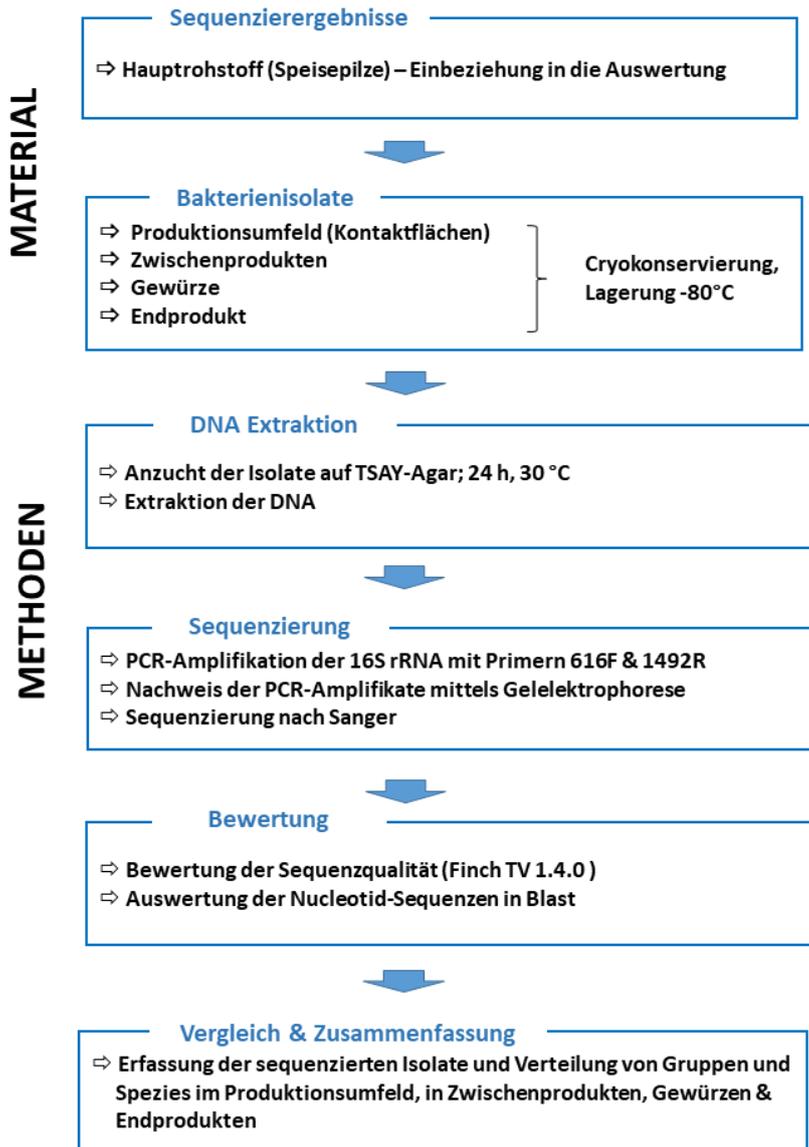
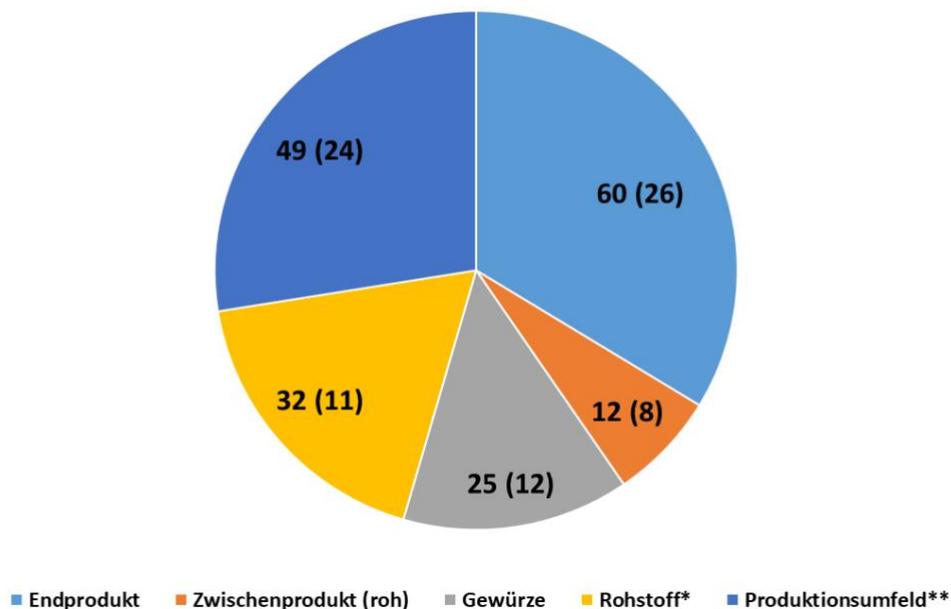


Abbildung 2: Überblick Material und Methoden

## 2.2 Beschreibung der verwendeten Isolate

Es wurden insgesamt 146 Isolate von 70 Proben (Endprodukte, unerhitzte Zwischenprodukte, Gewürze, Produktionsumfeld) für die Sequenzierung verwendet. Die bereits vorhandenen Sequenziererergebnisse von Isolatproben der Rohstoffproben (n = 32, Kräuterseitling) werden zum Verständnis mit in die Abbildung 3 aufgenommen. 27/60 Isolate stammten aus Endprodukten, bei denen nach der Erhitzung die Umhüllung entfernt wird und danach erst die Verpackung erfolgte. Die Isolate aus dem Produktionsumfeld stammen aus zwei Bereichen: a) Verpackungsbereich inklusive Maschine (n = 37) und b) Wurstschälmaschine (n = 6), in denen die Produkte bereits fertig erhitzt waren.



**Abbildung 3:** Herkunft und Anzahl der sequenzierten Isolate. Die Zahlen in der Klammer geben die jeweilige Anzahl der untersuchten Proben an. \*Die Sequenziererergebnisse lagen bereits vor und fließen in die Auswertung ein. \*\*In diesem Produktionsumfeld war das Endprodukt bereits erhitzt.

Alle Bakterienisolate, die für die Sequenzierung verwendet wurden, lagerten bei -80 °C in 25%igen Glycerinkulturen in der Stammsammlung der Abteilung für Lebensmittel-mikrobiologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien. Um die Isolate zu reaktivieren, wurde ein Verdünnungsaustich auf Trypton-Soja-Hefeextrakt-Agar (0,6 % Hefeextrakt, TSAY) (Biokar, GroupeSolabia, PantinCedex, France) durchgeführt. Dazu wurde eine volle 10 µl Öse

aus den aufgetauten Kryogefäßen entnommen und mittels Drei-Ösen-Ausstrich auf der Platte verdünnt. Anschließend wurden die Platten bei 30°C für 18 – 24 h bebrütet. Die kultivierten Isolate wurden auf Reinheit geprüft. Waren die Ausstriche ausnahmsweise mit Fremdkulturen kontaminiert, wurde der Zielkeim erneut subkultiviert.

Mit dem Kaliumhydroxid-Test (KOH; 3 %; Merck KgaA) erfolgte eine erste Differenzierung der Isolate in Gram-negativ und -positiv. Zur weiteren Gruppierung wurden die Isolate auf das Enzym Katalase (3 %; Merck KgaA) und Zytochrom-Oxidase (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich) geprüft.

Eine Listung der verwendeten Verbrauchsmaterialien und Geräte ist im Anhang zu finden (ANHANG Tabelle 1).

## **2.3 16S rRNA Sequenzierung**

### **2.3.1 DNA-Extraktion und Durchführung der PCR**

Die Extraktion der DNA wurde nach der Methode von WALSH ET AL. (1991) durchgeführt. Dazu wurde zunächst von der Reinkultur eine halbe 10 µl Öse in 100 µl 0,1 M Tris/HCl-Puffer pH 7,0 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) verquirlt, alles für 30 Sekunden gevortext und anschließend mit 400µl Chelex® 100 Resin Lösung (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) für 10-15 Sekunden gemischt. Die Bakteriensuspension wurde im Anschluss bei 100°C für 10 min im Heizblock erhitzt, danach bei 15000xg für 25 Sekunden zentrifugiert und 100 µl der extrahierten DNA vorsichtig von der Oberfläche in die sterilen Maximum Recovery Eppendorf Tubes® (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) pipettiert. Die extrahierten DNA-Stocks wurden bei -20°C gelagert, bis sie für die 16S rRNA-Sequenzierung weiterverwendet wurden.

Für die Amplifikation des 16S rRNA-Genes wurden die Universalprimer 616F (JURETSCHKO ET AL. 1998) und 1492R (LANE ET AL. 1991) verwendet (Sequenzen in Tabelle 1). Die Zusammensetzung des Mastermixes kann Tabelle 1 entnommen werden. Die Vervielfältigung der DNA erfolgte in einem Thermocycler (T100 Biorad, Hercules, CA, USA) nach dem folgenden Protokoll: a) Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten, b) 35 Denaturierungszyklen (94°C für 30 Sekunden), c) Primer-Hybridisierung (52°C für 30 Sekunden), d) Elongation (72°C für 60 Sekunden) und e) einer abschließenden Elongation bei 72°C für 7 Minuten.

**Tabelle 1** Komponenten für den PCR-Ansatz

Mastermixkomponenten	End-konzentration	Stamm-konzentration	Einheit
Diethylpyrocarbonate (DEPC) Wasser			
10x PCR Puffer	1x		
MgCl <sub>2</sub>	2	50	mM
Primer 616F (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTC-3')	200	5000	nM
Primer 1492R (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3')	200	5000	nM
dNTP's	250	5000	μM
Taq-Polymerase (Platinum)	2	5	U/μl

Die PCR-(Polymerase Chain Reaction) Produkte wurden in einem 1,5 %igen PeqGold Agarosegel (VWR International, Radnor, USA), welches 1,0 × Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer und 2 μl peqGREEN-DNA-Gelfarbstoff (VWR International, Radnor, USA) enthielt, bei 120 V für 30 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auswertung der Gele erfolgte in der GelDoc 2000 75S/03005 (Biorad, Hercules, CA, USA).

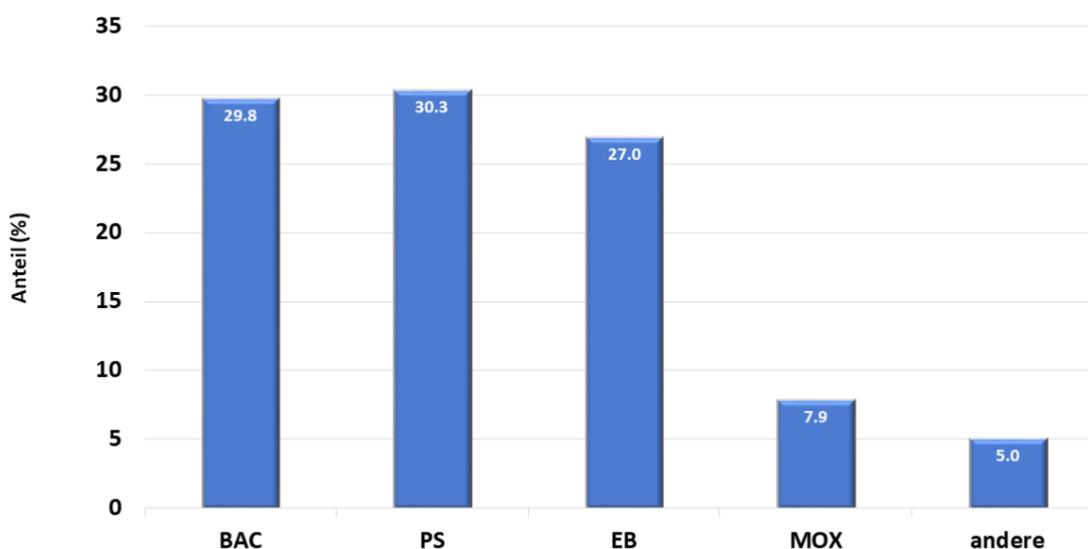
### 2.3.2 Sequenzierung und Auswertung

Nach dem Abschluss der Amplifikation wurden die PCR-Produkte bis zum Verschicken bei 4,0 °C gelagert. Die PCR-Produkte (40,0 μl) wurden in 96-Well Platten pipettiert und am Tag bzw. Folgetag der Amplifikation per Kurier zu einem externen Dienstleister (LGC Genomics GmbH, Berlin, Deutschland) verschickt. Dort wurde eine partielle Sequenzanalyse nach Sanger durchgeführt. Die Qualität der Nukleotidsequenzen wurden mit Finch TV (Geospiza Inc.; <https://digitalworldbiology.com/FinchTV>) beurteilt und anschließend wurden Sequenzen im Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (National Center for Biotechnology Information (NCBI), <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ausgewertet. Bei einer Übereinstimmung von  $\geq 97,0$  % wurden die Sequenzen der angegebenen Spezies zugeordnet (ALTSCHUL ET AL. 1990). Das potenzielle Infektionsrisiko der sequenzierten Bakterienstämme (Einteilung Risikogruppen 1 oder 2) wurde auf der Grundlage der Metadatenbank BacDive (2023, <https://bacdive.dsmz>, Zugriff: 13.04.2023) bewertet.

### 3 Ergebnisse

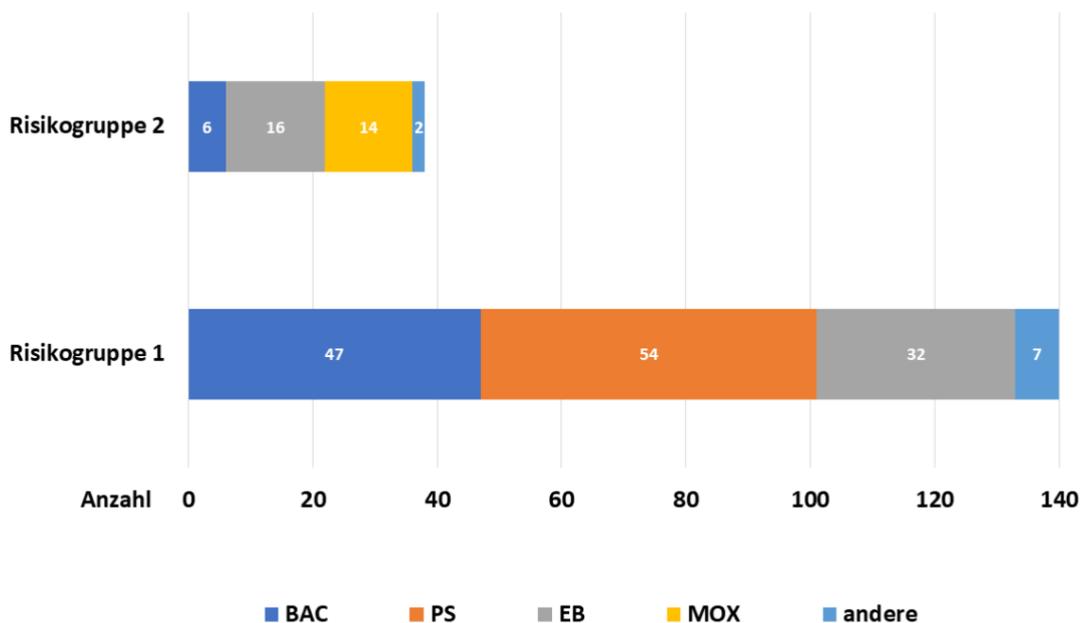
#### 3.1 Gruppierung der sequenzierten Isolate

Von den gefundenen Isolaten waren 64 % Gram-negativ und 36 % Gram-positiv. Der Großteil der Isolate verteilte sich auf die Gattung *Bacillus* (53 Isolate), die Familie *Pseudomonadaceae* (54 Isolate) und die Ordnung *Enterobacteriales* (48 Isolate) (Abbildung 4). Unter der Gram-positiven *Bacillus*-Gruppe, war die *B.-subtilis*-Gruppe mit 34 Isolaten am häufigsten zu finden. Bei den *Pseudomonadaceae* dominierte der *Pseudomonas (P.)-fluorescens*-Spezies-Complex (90,7%; 49 Isolate), mit den Subgruppen *P. fluorescens* (57,4%; 31 Isolate), *P. mandelii* (14,8%; 8 Isolate), *P. fragi* (7,4%; 4 Isolate) *P. gessardii* und *P. korensis* (jeweils 3,7%; 2 Isolate), sowie *P. corrugata* und *P. jessenii* (jeweils 1,8%, 1 Isolat). Die Spezies *P. azotoformans* (17 Isolate) und *P. tolaasii* (9 Isolate) waren am meisten verbreitet. Isolate aus der *P.-putida*-Gruppe waren selten ((9,5%, 5 Isolate). Die Spezies *Serratia quinivorans* (31,2%; 15 Isolate), *Ewingella americana* (18,7%; 9 Isolate) und *Pantoea brenneri* (14,6%; 7 Isolate) kamen bei den *Enterobacteriales* und am häufigsten vor.



**Abbildung 4:** Isolate, die aus den Proben isoliert und sequenziert wurden, Anteil taxonomisch gruppiert: BAC – *Bacillus*, PS – *Pseudomonadaceae*, EB – *Enterobacteriales*, MOX - *Moraxellaceae*

Die Sequenzierung ergab, dass 78,7% der Isolate, bezogen auf das Infektionsrisiko, der Risikogruppe 1 und 21,3% der Isolate der Risikogruppe 2 zugeordnet wurden (BacDive, 2023). Die Isolate der Familie *Pseudomonadaceae*, z. B. die Spezies *P. azotoformans* und *P. tolaasii*, gehörten ausschließlich zur Risikogruppe 1, die Isolate der Familie *Moraxellaceae* (alle Genus *Acinetobacter*) generell zur Risikogruppe 2 (Abbildung 5). In der *Bacillus*-Gruppe finden sich die Isolate der *B. subtilis*-Gruppe in der Risikogruppe 1 und die der *B. cereus*-Gruppe in Risikogruppe 2. Bei den *Enterobacterales* gehört z. B. *Ewingella americana* zur Risikogruppe 2 und *Pantoea brenneri* zur Risikogruppe 1.



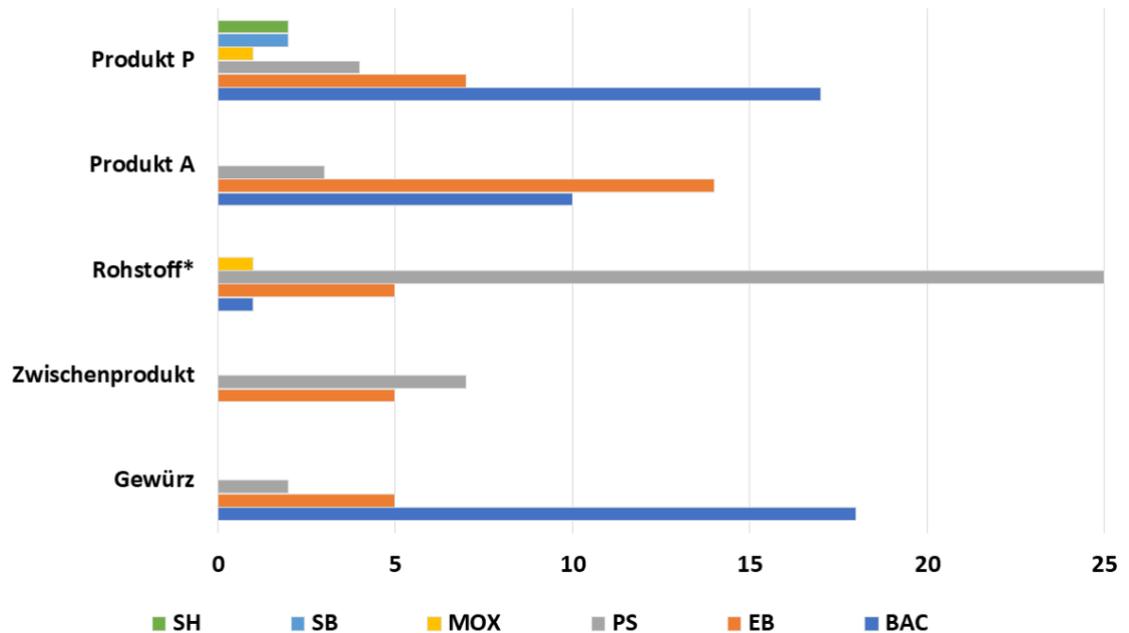
**Abbildung 5:** Verteilung der Bakteriengruppen auf die Risikogruppen 1 und 2 (Beurteilung des Infektionsrisikos nach BacDive, 2023 <https://bacdive.dsmz.de>).

BAC – *Bacillus*, PS – *Pseudomonadaceae*, EB – *Enterobacterales*, MOX - *Moraxellaceae*

### 3.2 Isolate aus Rohware, Gewürzen und Endprodukten

Die Isolate der *Bacillus*-Gruppe wurden, bis auf ein Isolat aus dem Rohstoff, ausschließlich aus Gewürzen und aus den fertigen Endprodukten isoliert (Tabellen 3 und 4). Der überwiegende Anteil dieser Isolate waren Vertreter der *B. subtilis*-Gruppe (64,2%; 34 Isolate). Isolate der *B. cereus*-Gruppe wurden am zweithäufigsten (11,3%; 6 Isolate) isoliert. Sie kamen ausschließlich in den Gewürzen vor. *Enterobacterales* und *Pseudomonadaceae* konnten sowohl aus Zwischenprodukten als auch aus dem Rohstoff (Tabelle 2), den Gewürzen (Tabelle 3) und den

fertigen Endprodukten (Tabelle 4) isoliert werden. *Sphingobacteriaceae*, *Shewanella* und *Moraxellaceae* (alles *Acinetobacter spp.*) konnten nur in den Endprodukten nachgewiesen werden (Tabelle 4). In der Abbildung 6 sind die Ergebnisse taxonomisch gruppiert zusammengefasst.



**Abbildung 6:** Anzahl der sequenzierten Isolate geordnet nach Herkunft und taxonomischer Gruppe. Abkürzungen: BAC – *Bacillus*, PS – *Pseudomonadaceae*, EB – *Enterobacterales*, MOX – *Moraxellaceae*, SB – *Sphingobacteriaceae*, SH – *Shewanella*, \*Die Sequenziererergebnisse lagen bereits vor und fließen in die Auswertung ein. Produkt P - direkt nach Erhitzung verpackt, Produkt A - Hülle vor Verpackung entfernt.

**Tabelle 2** Zuordnung der Isolate pro Probe aus dem Zwischenprodukt und dem Rohstoff\*

Produkt	Verarbeitungsstatus	Anzahl der Isolate	Bakterienisolat	Gruppe <sup>1</sup>	Gramverhalten <sup>2</sup>	Risikogruppe <sup>3</sup>
Rostbratwurst	Zwischenprodukt (roh)	1	<i>P. tolaasii</i>	FLUO	N	1
		2	<i>Ewingella americana</i>	EB	N	1
		1	<i>Pantoea beijingensis</i>	EB	N	1
Gyros		2	<i>P. tolaasii</i>	FLUO	N	1
Bratstreifen		1	<i>P. tolaasii</i>	FLUO	N	1
		1	<i>Ewingella americana</i>	EB	N	1
		2	<i>P. tolaasii</i>	FLUO	N	1
		1	<i>P. azotoformans</i>	FLUO	N	1
		1	<i>Kluyvera intermedia</i>	EB	N	1
rohe Pilze		Rohstoff	1	<i>P. azotoformans</i>	FLUO	N
	1		<i>P. deceptionensis</i>	FRAGI	N	1
	1		<i>P. tolaasii</i>	FLUO	N	1
	1		<i>P. plecoglossicida</i>	PUT	N	1
	1		<i>P. tolaasii</i>	FLUO	N	1
	1		<i>P. azotoformans</i>	FLUO	N	1
	1		<i>P. lini</i>	MAND	N	1
	1		<i>P. azotoformans</i>	FLUO	N	1
	1		<i>P. koreensis</i>	KOR	N	1
	1		<i>P. azotoformans</i>	FLUO	N	1
	1		<i>P. proteolytica</i>	FLUO	N	1
	1		<i>Ewingella americana</i>	EB	N	1
	1		<i>P. marginalis</i>	FLUO	N	1
	1		<i>P. azotoformans</i>	FLUO	N	1
	1		<i>P. prosekii</i>	MAND	N	1
	1		<i>P. umsongensis</i>	JESS	N	1
	1		<i>P. plecoglossicida</i>	PUT	N	1
	1		<i>P. plecoglossicida</i>	PUT	N	1

		1	<i>P. proteolytica</i>	FLOU	N	1
		1	<i>Ewingella americana</i>	EB	N	1
		1	<i>P. azotoformans</i>	FLUO	N	1
		1	<i>Ewingella americana</i>	EB	N	1
		1	<i>P. azotoformans</i>	FLUO	N	1
		1	<i>P. brenneri</i>	GESS	N	1
		1	<i>Ewingella americana</i>	EB	N	1
		1	<i>P. azotoformans</i>	FLUO	N	1
		1	<i>P. azotoformans</i>	FLUO	N	1
		1	<i>P. brenneri</i>	GESS	N	1
		1	<i>P. helleri</i>	FRAGI	N	1
		1	<i>Ewingella americana</i>	EB	N	1
		1	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	MOX	N	2
		1	<i>B. circulans</i>	BAC	P	1

Abkürzungen: *P.* – *Pseudomonas*, *B.* – *Bacillus*

<sup>1</sup>EB – *Enterobacterales*, BAC - *Bacillus spp.*, *P.-fluorescens*-Spezies-Complex, Subgruppen: FLUO – *P. fluorescens*, FRAGI – *P. fragi*, GESS – *P. gessardii*, JESS – *P. jessenii*, KOR – *P. koreensis*, MAND – *P. mandeli*, PUT – *P. putida*-Gruppe, MOX – *Moraxellaceae*.

<sup>2</sup>P – Gram-positiv, N – Gram-negativ.

<sup>3</sup>Beurteilung des Infektionsrisikos nach BacDive, 2023 <https://bacdive.dsmz.de>.

**Tabelle 3** Zuordnung der Isolate pro Gewürzprobe

Gewürz	Anzahl der Isolate	Bakterienisolat	Gruppe <sup>1</sup>	Gramverhalten <sup>2</sup>	Risikogruppe <sup>3</sup>
Bio Rosmarin	1	<i>B. halotolerans</i>	SUBT	P	1
	1	<i>P. plecoglossicida</i>	PUT	N	1
Bio Oregano	1	<i>B. wiedmannii</i>	BCER	P	2
	1	<i>P. plecoglossicida</i>	PUT	N	1
Bio Majoran	1	<i>B. endophyticus</i>	BAC	P	1
	1	<i>Mixta theicola</i>	EB	N	1
Bio Zitronen	1	<i>B. paramycoides</i>	BCER	P	1
	1	<i>Pantoea dispersa</i>	EB	P	1
Zitronengras	1	<i>B. megaterium</i>	BAC	P	1
	1	<i>B. safensis</i>	PUM	P	1
Muskatblüte	1	<i>B. nakamurai</i>	SUBT	P	1
	1	<i>B. zhangzhouensis</i>	PUM	P	1
Senf-Saat	1	<i>B. wiedmannii</i>	BCER	P	2
Bockshornklee	1	<i>B. amyloliquefaciens</i>	SUBT	P	1
	1	<i>B. filamentosus</i>	BAC	P	1
	1	<i>Curtobacterium plantarum</i>	EB	N	
Ingwer	1	<i>B. wiedmannii</i>	BCER	P	2
Pfeffer	1	<i>B. paramycoides</i>	BCER	P	2
	1	<i>Atlantibacter hermannii</i>	EB	N	2
Rauch Pfeffer	2	<i>B. subtilis subsp. Inaquosorum</i>	SUBT	P	1
Käsekrainer Gewürz	1	<i>B. halotolerans</i>	SUBT	P	1
	1	<i>B. pumilus</i>	PUM	P	1
	1	<i>B. wiedmannii</i>	BCER	P	2
	1	<i>Curtobacterium plantarum</i>	EB	N	

Abkürzungen: P. – *Pseudomonas*, B. – *Bacillus*

<sup>1</sup>EB – *Enterobacterales*, BAC - *Bacillus spp.*, B.-Gruppen: BCER - *B. cereus*, LICH - *B. licheniformis*, PUM - *B.*

*pumilus*, SUBT – *B. subtilis*, -Gruppe, P. *putida*-Gruppe.<sup>2</sup>P – Gram-positiv, N – Gram-negativ. <sup>3</sup>Beurteilung des Infektionsrisikos nach BacDive, 2023 <https://bacdive.dsmz.de>

**Tabelle 4** Zuordnung der Isolate pro Probe aus den Endprodukten

Produkt	Verarbeitungs-Status <sup>1</sup>	Anzahl der Isolate	Bakterienisolat	Gruppe <sup>2</sup>	Gram-Verhalten <sup>3</sup>	Risiko-gruppe <sup>4</sup>
Gyros	Endprodukt P	2	<i>P. prosekii</i>	MAND	N	1
		1	<i>B. halotolerans</i>	SUBT	P	1
		2	<i>B. velezensis</i>	SUBT	P	1
		1	<i>B. piscis</i>	LICH	P	1
		2	<i>B. tequilensis</i>	SUBT	P	1
		1	<i>B. nakamurai</i>	SUBT	P	1
		1	<i>B. velezensis</i>	SUBT	P	1
Käsebrat-wurst	Endprodukt P	1	<i>B. piscis</i>	LICH	P	1
		1	<i>B. subtilis subsp. inaquosorum</i>	SUBT	P	1
		1	<i>B. subtilis subsp. inaquosorum</i>	SUBT	P	1
		1	<i>B. halotolerans</i>	SUBT	P	1
		1	<i>B. velezensis</i>	SUBT	P	1
		1	<i>B. halotolerans</i>	SUBT	P	1
		1	<i>B. piscis</i>	LICH	P	1
Bratstreifen	Endprodukt P	1	<i>B. piscis</i>	LICH	P	1
		1	<i>B. velezensis</i>	SUBT	P	1
		2	<i>P. synxantha</i>	FLUO	N	1
		2	<i>Yersinia nurmii</i>	EB	N	1
		1	<i>Sphingobacterium faecium</i>	SB	N	1
		1	<i>Sphingobacterium kitahiroshimense</i>	SB	N	1
		1	<i>Yersinia nurmii</i>	EB	N	1
		2	<i>Shewanella putrefaciens</i>	SH	N	2
		2	<i>Serratia quinivorans</i>	EB	N	1
		2	<i>Serratia quinivorans</i>	EB	N	1
		1	<i>Acinetobacter lactucae</i>	MOX	N	2

Rostbratwurst	Endprodukt A	1	<i>B. nakamurai</i>	SUBT	P	1
		1	<i>B. velezensis</i>	SUBT	P	1
		2	<i>B. subtilis subsp. inaquosorum</i>	SUBT	P	1
		1	<i>B. velezensis</i>	SUBT	P	1
		1	<i>B. nakamurai</i>	SUBT	P	1
		1	<i>B. velezensis</i>	SUBT	P	1
		1	<i>B. subtilis</i>	SUBT	P	1
		1	<i>B. velezensis</i>	SUBT	P	1
		1	<i>B. xiamenensis</i>	PUM	P	1
		3	<i>Serratia quinivorans</i>	EB	N	1
		2	<i>Serratia quinivorans</i>	EB	N	1
		2	<i>Yersinia enterocolitica</i>	EB	N	1
		2	<i>P. deceptionensis</i>	FRAGI	N	1
		2	<i>Serratia quinivorans</i>	EB	N	1
		2	<i>Lelliottia amnigena</i>	EB	N	2
		2	<i>Lelliottia amnigena</i>	EB	N	2
		1	<i>P. prosekii</i>	MAND	N	1
		1	<i>Pantoea brenneri</i>	EB	N	1

Abkürzungen: <sup>1</sup>Endprodukt P - direkt nach Erhitzung verpackt, Endprodukt A - Hülle vor Verpackung entfernt.  
P. – *Pseudomonas*, B. – *Bacillus*

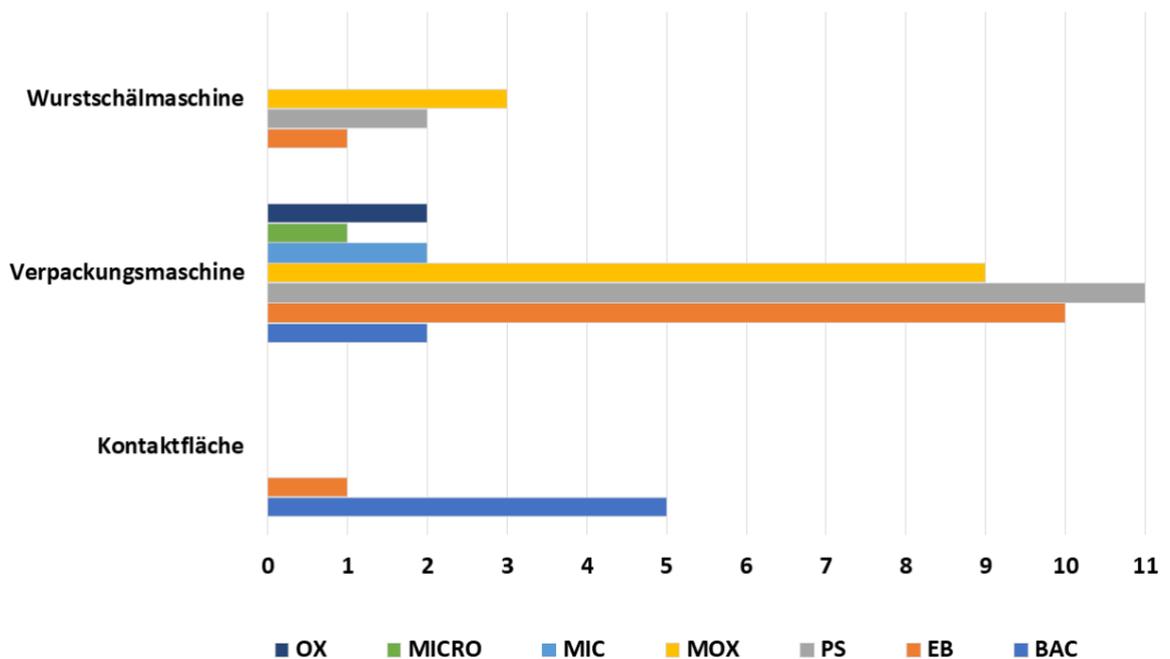
<sup>2</sup>EB – *Enterobacterales*, B.-Gruppen: LICH - *B. licheniformis*, PUM – *B. pumilus*, SUBT- *B. subtilis*, *P.-fluorescens*-Spezies-Complex, Subgruppen: FLUO – *P. fluorescens*, FRAGI – *P. fragi*, MAND – *P. mandeli*, MOX – *Moraxellaceae*, SB – *Sphingobacteriaceae*, SH – *Shewanella*.

<sup>3</sup>P – Gram-positiv, N – Gram-negativ.

<sup>4</sup>Beurteilung des Infektionsrisikos nach BacDive, 2023 <https://bacdive.dsmz.de>.

### 3.3 Isolate aus dem Produktionsumfeld

Im Produktionsumfeld entfielen die meisten Isolate auf die *Pseudomonadaceae* (26,5%; 13 Isolate), gefolgt von den *Moraxellaceae* und *Enterobacterales* (jeweils 24,5%, 12 Isolate). *Bacillus* spp. wurden vergleichsweise weniger isoliert (14,3%, 7 Isolate). Die höchste Speziesdiversität wurde in der Verpackungsmaschine festgestellt (Abbildung 7 und Tabelle 5).



**Abbildung 7:** Anzahl der sequenzierten Isolate geordnet nach Herkunft im Produktionsumfeld und taxonomischer Gruppe.

Abkürzungen: BAC – *Bacillus*, PS – *Pseudomonadaceae*, EB – *Enterobacterales*, MOX – *Moraxellaceae*, MIC – *Micrococcaceae*, MICRO – *Microbacteriaceae*, OX – *Oxalobacteraceae*, Produkt P - direkt nach Erhitzung verpackt, Produkt A - Hülle vor Verpackung entfernt.

**Tabelle 5** Isolate pro Probe aus dem Produktionsumfeld

Produktionsumfeld	Anzahl der Isolate	Bakterienisolat	Gruppe <sup>1</sup>	Gramverhalten <sup>2</sup>	Risikogruppe <sup>3</sup>
Kontaktfläche LM	1	<i>Yersinia nurmii</i>	EB	N	1
	1	<i>B. nakamurai</i>	SUBT	P	1
	1	<i>B. firmus</i>	SUBT	P	1
	1	<i>B. firmus</i>	SUBT	P	1
	1	<i>B. piscis</i>	LICH	P	1
	1	<i>B. velezensis</i>	SUBT	P	1
Verpackungsmaschine	1	<i>P. silesiensis</i>	MAND	N	1
	2	<i>P. silesiensis</i>	MAND	N	1
	1	<i>P. koreensis</i>	KOR	N	1
	1	<i>P. tolaasii</i>	FLOU	N	1
	1	<i>P. azotoformans</i>	FLOU	N	1
	2	<i>Pantoea brenneri</i>	EB	N	1

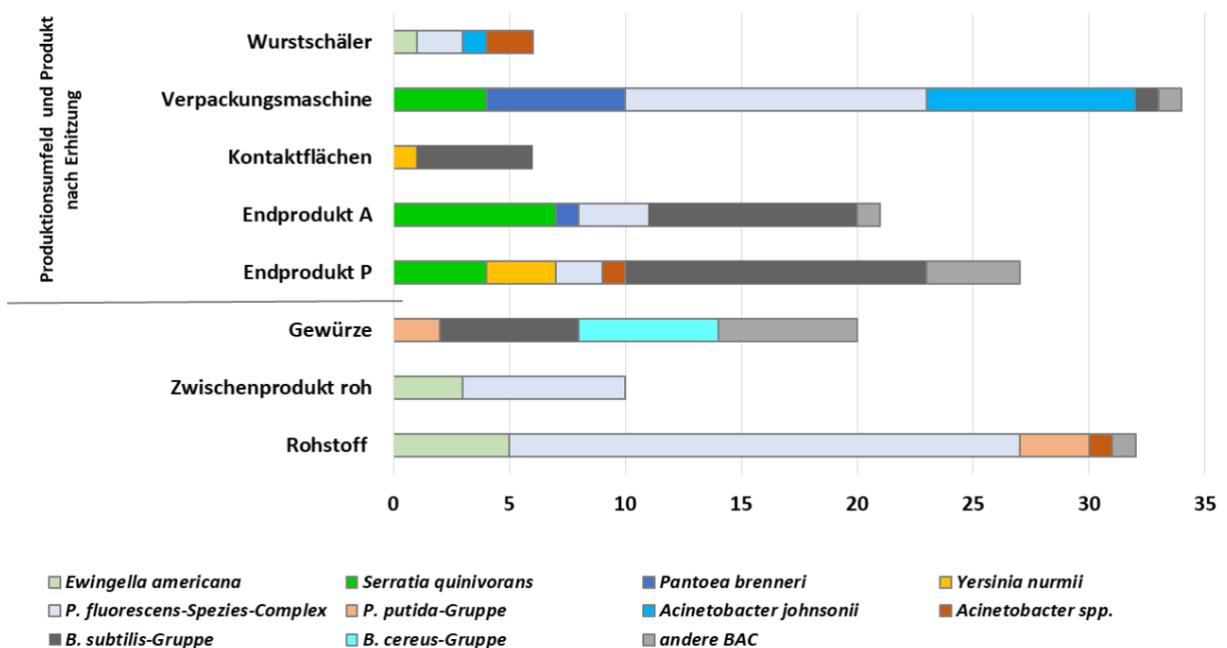
	2	<i>P. azotoformans</i>	FLUO	N	1
	3	<i>P. azotoformans</i>	FLUO	N	1
	2	<i>Pantoea brenneri</i>	EB	N	1
	2	<i>Collimonas fungivorans</i>	OX	N	1
	1	<i>Pantoea brenneri</i>	EB	N	1
	1	<i>Pantoea brenneri</i>	EB	N	1
	1	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i>	MICRO	P	1
	1	<i>B. safensis</i>	PUM	P	1
	1	<i>B. nakamurai</i>	PUM	P	1
	1	<i>Arthrobacter halodurans</i>	MIC	P	1
	1	<i>Pseudarthrobacter polychromogenes</i>	MIC	P	1
	1	<i>Serratia quinivorans</i>	EB	N	1
	2	<i>Serratia quinivorans</i>	EB	N	1
	2	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	MOX	N	2
	2	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	MOX	N	2
	2	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	MOX	N	2
	1	<i>Serratia liquefaciens</i>	EB	N	1
	1	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	MOX	N	2
	2	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	MOX	N	2
<b>Wurstschälmaschine</b>	1	<i>Ewingella americana</i>	EB	N	2
	1	<i>Acinetobacter gyllenbergii</i>	MOX	N	2
	1	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	MOX	N	2
	1	<i>Acinetobacter gyllenbergii</i>	MOX	N	2
	1	<i>P. corrugata</i>	CORR	N	1
	1	<i>P. azotoformans</i>	FLUO	N	1

Abkürzungen: P. – *Pseudomonas*, B. – *Bacillus*

<sup>1</sup>EB – *Enterobacterales*, B.-Gruppen: LICH - *B. licheniformis*, PUM – *B. pumilus*, SUBT- *B. subtilis*, P.-*fluorescens*-Complex, Subgruppen: CORR – *P. corrugata*, FLUO – *P. fluorescens*, KOR – *P. koreensis*, MAND – *P. mandeli*, MOX – *Moraxellaceae*, MIC – *Micrococcaceae*, MICRO – *Microbacteriaceae*, OX – *Oxalobacteraceae*. <sup>2</sup>P – Gram-positiv, N – Gram-negativ. <sup>3</sup>Beurteilung des Infektionsrisikos nach BacDive, 2023 <https://bacdive.dsmz.de>.

### 3.4 Vergleich der sequenzierten Isolate bezogen auf die Probenart

Bakterien vom *P. fluorescens*-Spezies-Complex waren in den Endprodukten nach Verpackung (Produkt P), den Zwischenprodukten, im Rohstoff sowie in der Verpackungs- und Wurstschälmaschine vertreten. Ähnlich verbreitet waren Vertreter der *B. subtilis*-Gruppe, die vor allem in den Gewürzen, Endprodukten A und P, den Kontaktflächen und in der Verpackungsmaschine vorkamen (Abbildung 8). Dagegen konnten Isolate der *B. cereus*-Gruppe nur in Gewürzen nachgewiesen werden. Bei den *Enterobacteriales* wurden die Spezies *Pantoea brenneri* und *Yersinia nurmii* im Endprodukt A und in der Verpackungsmaschine bzw. im Endprodukt P und im Produktionsumfeld auf den Kontaktflächen festgestellt. *Serratia quinivorans* war in den Endprodukten und der Verpackungsmaschine zu finden. *Pantoea brenneri*, *Yersinia nurmii*, als auch *Serratia quinivorans* waren weder in den in den rohen Zutaten und Zwischenprodukten noch in den Gewürzen nachweisbar. *Acinetobacter johnsonii* und andere *Acinetobacter* spp. wurden vor allem im Produktionsumfeld (Verpackungs- und Wurstschälmaschine) festgestellt (Abbildung 8).



**Abbildung 8:** Vorkommen häufiger Gruppen und Spezies in den unterschiedlichen Probenarten  
 Abkürzungen: Endprodukt P - direkt nach Erhitzung verpackt, Endprodukt A - Hülle vor Verpackung entfernt.  
 P. – *Pseudomonas*, B. – *Bacillus*, BAC – *Bacillus* spp.

## 4 Diskussion und Schlussfolgerung

Für die Bewertung der Rekontaminationswege eines Lebensmittelunternehmens wurden Bakterienisolate, die aus dem Rohstoff (Pilze, Hauptanteil im Produkt), Gewürzen, Zwischenprodukten, dem produktassoziierten Produktionsumfeld und den Endprodukten isoliert wurden, mittels 16 S rRNA-Technik sequenziert. Im Rohstoff (Pilze, Kräuterseitling) und erwartungsgemäß in den Zwischenprodukten wurden überwiegend *Pseudomonadaceae* gefolgt von *Enterobacterales* nachgewiesen. Auch in früheren Studien wurde festgestellt, dass in kultivierten Speisepilzarten *Pseudomonas* spp. dominieren (REYES ET AL. 2004, VENTURINI ET AL. 2011). Die 16 S rRNA-Sequenzierung von *Pseudomonas* spp.-Isolaten aus Champignons ergab diverse *P.*-Spezies. *P. azotoformans* wurde in 2,5%, in unserer Studie in 81,5% der Proben und damit am häufigsten isoliert (ROSSOUW ET AL. 2016). Die für Pilze pathogene *P.*-Spezies *P. tolaasii* sowie *P. marginalis* waren ebenfalls in den Pilzen beider Studien nachweisbar. Die Differenzierungsergebnisse von MU ET AL. (2015) von Isolaten aus Austernpilzen ergab ein ähnliches Bild, wobei neben den bereits genannten Spezies, wie in unseren Untersuchungen auch noch, *P. plecoglossicida* und *P. brenneri* nachgewiesen wurden. In 34,8% der Rohstoff- und Zwischenproduktproben wurde die ebenfalls als pilzpathogen beschriebene Spezies *Ewingella americana* nachgewiesen. Andere *Enterobacterales*-Spezies spielten keine Rolle. In der Arbeit von REYES ET AL. (2004) wird das pathogene Potenzial von *Ewingella americana* bei der Kultivierung von verschiedenen Kulturpilzen untersucht. Zudem kann *Ewingella americana* in seltenen Fällen beim Menschen Erkrankungen auslösen. Das Bakterium gehört deshalb zur Risikogruppe 2 (ESPOSITO ET AL. 2019, BacDive 2023). Dagegen dominierten in den Gewürzproben sporenbildende Bakterien der *B. cereus*- (50,0%) und *B. subtilis*-Gruppe (41,6%). *B. subtilis* wurde vor allem in unbehandelten Gewürzen nachgewiesen (GRYCZKA ET AL. 2020). *B. cereus* in Gewürzen war in den vergangenen Jahren im europäischen Schnellwarnsystem (RASFF 2022) veröffentlicht worden. Außerdem liegen Publikationen zu *B. cereus* in diversen Gewürzen und Gewürzmischungen vor. Der Erreger gehört zur Risikogruppe 2. Eine Erkrankung des Menschen ist vor allem davon abhängig, ob der Erreger Toxine und welche Toxine er bilden kann (FOGELE ET AL. 2018, FRENTZEL ET AL. 2018). Des Weiteren wird der zur *B. cereus*-Gruppe gehörende *B. thuringiensis* als Biopestizid

in der landwirtschaftlichen Produktion eingesetzt (FRENTZEL ET AL. 2018). Eine abschließende Risikobewertung kann erst nach der Bestimmung des Toxinprofils erfolgen.

Im Produktionsumfeld wurden in diesen Untersuchungen hauptsächlich *Pseudomonadaceae* (26,5%) gefunden, welche auch in anderen Lebensmittelproduktionsbetrieben auf produktberührenden Flächen vorherrschend waren. Der Nachweis erfolgte in der Salat- und Gemüseverarbeitung sowie in der Fisch- und Fleischverarbeitung (BRIGHTWELL ET AL. 2006, LIU ET AL. 2013, LANGSRUD ET AL. 2016, MEIRELES ET AL. 2017). *Enterobacterales*, wie die Gattungen *Serratia* (2.0 – 15 %) und *Yersinia*, waren in diesen Studien ebenfalls häufiger nachweisbar. In der vorliegenden Arbeit wurden Vertreter dieser Gruppe auch häufig gefunden. Am häufigsten wurde *Serratia quinivorans* (vier Isolate aus der Verpackungsmaschine) isoliert. Außerdem wurde in der Literatur häufiger über das Vorkommen von *Acinetobacter* spp. im Produktionsumfeld von Betrieben, die Fisch und pflanzliche Produkte verarbeiten, berichtet (LIU ET AL. 2013, LANGSRUD ET AL. 2016). In unserer Studie wurde *Acinetobacter johnsonii*, welcher der Risikogruppe 2 angehört, in den Proben der Verpackungs- und Wurstschälmaschine (insgesamt 10 Isolate) festgestellt. Es fällt auf, dass in der Verpackungsmaschine sowie in der Wurstschälmaschine eine Vielfalt an Bakterien-Spezies bzw. –Gruppen nachgewiesen wurden. Bei Beprobungen von Kontaktflächen kam es immer wieder zum Nachweis von sporenbildenden Bakterien, wie *Bacillus* und *Paenibacillus* spp. (Møretrø ET AL. 2017). Die in den Endprodukten (A & P) nachgewiesenen Isolate waren großteils Vertreter der Risikogruppe 1, wobei *Bacillus* spp., diverse *Enterobacterales* (*Serratia quinivorans*, *Yersinia nurmii* & *Pantoea brenneri*) und Isolate vom *P.-fluorescens*-Spezies-Complexes dominierten (Abbildung 7). Grundsätzlich können sporenbildende Bakterien, wie *Bacillus* spp., in erhitzten Produkten vorkommen, da die Sporen Temperaturen von 100°C mehrere Minuten lang überleben. Bei unzureichender Kühlung oder Unterbrechung der Kühlkette können diese Sporen wieder auskeimen und es kann zur Vermehrung im Produkt kommen (ANDRÉ ET AL. 2017). *Pseudomonadaceae*, *Enterobacterales* und *Acinetobacter* spp. werden durch Erhitzung abgetötet. In unserer Studie waren sie aber in den verpackten Produkten zu finden. Überwiegend waren es Bakterien der Risikogruppe 1, die gesundheitlich unbedenklich sind, aber während der Lagerung Verderbnis

von Lebensmitteln auslösen können (GRAM ET AL. 2002). In drei Proben wurden aber auch Vertreter der Risikogruppe 2 (*Yersinia enterocolitica*, *Lelliottia amnigena* & *Acinetobacter lactucae*) nachgewiesen. Andere Untersuchungen ergaben auch potenziell Pathogene wie *Clostridium botulinum*, *L. monocytogenes*, koagulase positive *Staphylokokken* und *E. coli* in diversen vegetarischen Produkten (PERNU ET AL. 2020, WANG ET AL. 2019, AZEVEDO ET AL. 2020, RIBEIRO ET AL. 2017). Diese gelangen oft über das Produktionsumfeld und insbesondere über den Verpackungsbereich in das bereits erhitzte Endprodukt (BLANCO-LIZARAZO ET AL. 2022, DE FILIPPIS ET AL. 2021). Auch im Ergebnis unserer Studie ist der Verpackungsbereich für die Rekontamination der Endprodukte bedeutend. Es zeigte sich, dass im Produktionsumfeld (Verpackungsmaschine, Wurstschäler & Kontaktflächen im Verpackungsraum) und in den Endprodukten A & P die gleichen Bakteriengruppen nachweisbar waren. Vor allem *Serratia quinivorans*, *Yersinia nurmii*, *Pantoea brenneri* und Isolate vom *P.-fluorescens*-Spezies-Complex fanden sich in diesen Bereichen und in den Endprodukten. Die Fähigkeit Biofilme zu bilden, ermöglicht es einigen Bakterien die Reinigung und Desinfektion zu überstehen. So zeigten in der Studie von LIU ET AL. (2013) Isolate vom *P.-fluorescens*-Spezies-Complex eine niedrige bis moderate, *Acinetobacter* spp. und *B. pumilus* eine geringe Biofilmbildung. Bei *Serratia quinivorans* wurde eine moderate Biofilmbildung in der Milchproduktion nachgewiesen (YUAN ET AL. 2018). Die Bewertung von Anlagen in verschiedenen Lebensmittelbetrieben ergab, dass durch Verpackungsmaschinen die größte Gefahr für Rekontaminationen ausging, da sie oft schwer zu reinigen und desinfizieren waren und zum Teil ungeeignete und raue Oberflächen aufwiesen (AARNISALO ET AL. 2006).

### **Schlussfolgerungen**

Die durchgeführten Sequenzierungen von Isolaten aus Zutaten und Produktionsumfeld ermöglichten es, die Eintragsquellen der unterschiedlichen Bakteriengruppen in das Endprodukt zu erkennen.

Die in den Endprodukten nachgewiesenen *Bacillus* spp. wurden überwiegend durch Gewürze eingetragen. *Bacillus*-Sporen werden durch die produktübliche Erhitzungstemperatur (90 °C) nicht zuverlässig abgetötet. Durch Kühlung kann eine Vermehrung der Sporenbildner während

der Lagerung effektiv vermieden werden. *Pseudomonadaceae* und *Enterobacterales* gelangten über Rekontaminationsprozesse aus dem Produktionsumfeld in die Endprodukte. Vor allem in der Verpackungsmaschine wurden diese Keimgruppen regelmäßig nachgewiesen. Um eine Ansiedlung von Mikroorganismen auch an nicht gut zugänglichen Nischen der Maschine zu erkennen, müssen diese regelmäßig mit mikrobiologischen Methoden überwacht werden. Generell ist die Wirksamkeit von Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen von Geräten und Lebensmittel-berührenden Flächen zu überprüfen.

## 5 Zusammenfassung

Um mögliche Eintragsquellen für Mikroorganismen aus den Primärprodukten und Kontaminationswege in der Verarbeitungskette bei der Herstellung von vegetarischen Convenience-Produkten auf Pilzbasis zu detektieren, wurden in dieser Arbeit Bakterienisolate mittels 16S rRNA sequenziert. Die Isolate wurden bei Kontrollen aus Proben, die aus dem Produktionsumfeld, den rohen Zwischenprodukten und den Endprodukten stammten genommen. Diese Sequenzierergebnisse wurden mit den bereits vorhandenen Daten aus dem Hauptrohstoff Pilz verglichen. Das Ziel ist es, die Produktqualität zu verbessern, eine Verlängerung der Haltbarkeit zu erreichen und die Konsumentengesundheit zu schützen.

Im Rohstoff (Kräuterseitling) sowie auch in den rohen Zwischenprodukten waren hauptsächlich *Pseudomonadaceae* und *Enterobacterales* zu finden. Darunter war *P. azotoformans* (in 81,5% der Proben) die am stärksten vertretene Spezies. *Pseudomonadaceae* (26,5 %) waren auch im Produktionsumfeld die dominierende Familie, aber auch *Enterobacterales* (24,5 %), wie *Serratia* und *Yersinia*, und *Moraxellaceae* waren hier nachzuweisen. *Serratia quinivorans* waren in der Verpackungsmaschine und auch in den Endprodukten zu finden, was auf eine Rekontamination schließen lässt. Dies zeigt, wie wichtig es ist die Wirksamkeit von Reinigungs- und Desinfektionsmitteln zu überprüfen und eine regelmäßige Beprobung der zu reinigenden Flächen durchzuführen, um Mikroorganismen auch an schwer zugänglichen Nischen zu entdecken. Die weitere Differenzierung der isolierten Bakterien erlaubt es, Kontaminationswege zu erkennen. Des Weiteren ist eine adäquate Kühlung der Produkte während der Lagerung von großer Bedeutung um eine Vermehrung von Sporenbildnern wie *Bacillus* spp., welche in dieser Untersuchung vorwiegend über Gewürze in das Endprodukt gelangten und dessen Sporen eine Erhitzung von 90°C überleben können, zu verhindern.

## 6 Summary

This work sequenced bacterial isolates using 16S rRNA in order to detect possible sources of microorganism entry from primary products and pathways of contamination in the production chain of mushroom-based vegetarian convenience products. The isolates were collected from quality check samples taken from the production environment, raw intermediates and final products. The sequencing results were compared to existing data from the main raw material, mushroom. The objective is to improve product quality, to extend shelf life and to protect consumer health.

*Pseudomonadaceae* and *Enterobacterales* were most frequently found in the raw material (king oyster mushroom) as well as in the raw intermediate products. Among them, *P. azotoformans* (in 81.5% of samples) was the most presented species. *Pseudomonadaceae* (26.5%) were also the dominant family found at the production environment, but *Enterobacterales* (24.5%), such as *Serratia* and *Yersinia*, and *Moraxellaceae* were also detected there. *Serratia quinivorans* were present inside the packaging machine and also in the final products, which suggests re-contamination. This demonstrates the importance of checking the effectiveness of cleaning and disinfecting agents. In addition, it is important to inspect the surfaces to be cleaned regularly to detect persistent microorganisms, especially in hard-to-reach niches. Further differentiation of the isolated bacteria can identify contamination pathways in the processing chain. Adequate cooling of the products during storage is of great importance to prevent proliferation of spore-forming organisms such as *Bacillus spp.* which in this study predominantly found in the final product via spices and whose spores can survive being heated to 90°C.

## 7 Abkürzungen

---

HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points
DGHM	Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
MHD	Mindesthaltbarkeitsdatum
GKZ	Gesamtkeimzahl
KbE	Koloniebildende Einheiten
MPN	most probable number
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
spp.	species pluralis
RASFF	Rapid Alert System for Food and Feed
<i>L.</i>	<i>Listeria</i>
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
<i>C.</i>	<i>Clostridium</i>
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Staph. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>EHEC</i>	<i>Enterohämorrhagische E. coli</i>
ces	Cereulid
<i>HBL</i>	Hämolysin-BL
WHO	World Health Organization
PCR	Polymerase Chain Reaction
DEPC-Wasser	Diethylpyrocarbonate Wasser

TSAY	Trypton Soja Agar mit 0,6 % Hefeextrakt
MR Tubes	Maximum Recovery Tubes
SLB	Sample Loading Buffer
TBE	Tris-Borate-EDTA Puffer
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
NCBI	National Center for Biotechnology Information

---

## **8 Literaturverzeichnis**

Aarnisalo, K., Tallavaara, K., Wirtanen, G., Maijala, R., & Raaska, L. (2006). The hygienic working practices of maintenance personnel and equipment hygiene in the Finnish food industry. *Food control*, 17(12), 1001-1011.

Almualla, N. A., Laleye, L. C., Abushelaibi, A. A., Al-Qassem, R. A., Wasesa, A. A., & Baboucarr, J. (2010). Aspects of the microbiological quality and safety of ready-to-eat foods in Sharjah supermarkets in the United Arab Emirates. *Journal of food protection*, 73(7), 1328-1331.

Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990, 215, 403–410, doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

André, S., Vallaey, T., & Planchon, S. (2017). Spore-forming bacteria responsible for food spoilage. *Research in Microbiology*, 168(4), 379-387.

Aydin, A., Paulsen, P., & SMULDERS, F. J. M. (2009). The physico-chemical and microbiological properties of wheat flour in Thrace. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 33(5), 445-454.

Azevedo, I., Barbosa, J., Albano, H., & Teixeira, P. (2020). Non meat-based alheiras—a safer novel trend?. *Food Control*, 113, 107177.

Blanco-Lizarazo, C. M., Sierra-Cadavid, A., & Ospina-E, J. C. (2022). Analysis of microbiota structure in cooked ham as influenced by chemical composition and processing treatments: Identification of spoilage bacteria and elucidation on contamination route. *Current Research in Food Science*, 5, 726-734.

Brightwell G, Boerema J, Mills J, Mowat E, Pulford D. 2006. Identifying the bacterial community on the surface of Intralox™ belting in a meat boning room by culture-dependent and culture-independent 16S rDNA sequence analysis. *Int J Food Microbiol* 109:47-53.

Cebrián, G., Condón, S., & Mañas, P. (2017). Physiology of the inactivation of vegetative bacteria by thermal treatments: mode of action, influence of environmental factors and inactivation kinetics. *Foods*, 6(12), 107

De Filippis, F., Valentino, V., Alvarez-Ordóñez, A., Cotter, P. D., & Ercolini, D. (2021). Environmental microbiome mapping as a strategy to improve quality and safety in the food industry. *Current Opinion in Food Science*, 38, 168-176.

Den Aantrekker, E. D., Boom, R. M., Zwietering, M. H., & van Schothorst, M. (2003). Quantifying recontamination through factory environments—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 80(2), 117-130.

Esposito, S.; Miconi, F.; Molinari, D.; Savarese, E.; Celi, F.; Marchese, L.; Valloscuro, S.; Miconi, G.; Principi, N. What is the role of *Ewingella americana* in humans? A case report in a healthy 4-year-old girl. *BMC Infect. Dis.* 2019, 19, 386, doi:10.1186/s12879-019-4021-4.

Feng, C. H., Drummond, L., & Sun, D. W. (2014). Modelling the growth parameters of lactic acid bacteria and total viable count in vacuum-packaged Irish cooked sausages cooled by different methods. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(12), 2659-2667.

Fogele, B., Granta, R., Valciņa, O., & Bērziņš, A. (2018). Occurrence and diversity of *Bacillus cereus* and moulds in spices and herbs. *Food Control*, 83, 69-74.

Frentzel, H., Kraushaar, B., Krause, G., Bodi, D., Wichmann-Schauer, H., Appel, B., & Mader, A. (2018). Phylogenetic and toxinogenic characteristics of *Bacillus cereus* group members isolated from spices and herbs. *Food Control*, 83, 90-98.

Gopinath, G., Jean-Gilles Beaubrun, J., Grim, C., Blaylock, M., Blackwell, R., Merid, S., ... & Hanes, D. (2014). Whole-genome sequences of six *Salmonella enterica* Serovar Bovismorbificans isolates associated with a 2011 multistate hummus-borne outbreak. *Genome Announcements*, 2(2), e01239-13.

Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., & Givskov, M. (2002). Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. *International journal of food microbiology*, 78(1-2), 79-97.

Gryczka, U., Kameya, H., Kimura, K., Todoriki, S., Migdał, W., & Bułka, S. (2020). Efficacy of low energy electron beam on microbial decontamination of spices. *Radiation Physics and Chemistry*, 170, 108662.

Jetzke, T., Bovenschulte, M., & Ehrenberg-Silies, S. (2016). Fleisch 2.0—unkonventionelle Proteinquellen. *ISSN-Internet* 2629-287.

Juretschko, S.; Timmermann, G.; Schmid, M.; Schleifer, K.H.; Pommerening-Röser, A.; Koops, H.P.; Wagner, M. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998, 64, 3042–3051, doi:10.1128/AEM.64.8.3042-3051.1998.

Klug, T. V., Martínez-Hernández, G. B., Collado, E., Artés, F., & Artés-Hernández, F. (2018). Effect of microwave and high-pressure processing on quality of an innovative broccoli hummus. *Food and Bioprocess Technology*, 11(8), 1464-1477.

Lane, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic Acids Techniques in Bacterial Systematics*; Stackebrandt, E., Goodfellow, M., Eds.; John Wiley & Sons: Chichester, UK, 1991; pp. 115–147.

Langsrud S, Moen B, Møretrø T, Løype M, Heir E. 2016. Microbial dynamics in mixed culture biofilms of bacteria surviving sanitation of conveyor belts in salmon-processing plants. *J Appl Microbiol* 120:366-78.

Lee, D. Y., Kwon, K. H., Chai, C., & Oh, S. W. (2017). Microbial contamination of tofu in Korea and growth characteristics of *Bacillus cereus* isolates in tofu. *LWT*, 78, 63-69.

Leitzmann, C. (2013). Fleischersatz–rein pflanzlich. In *UGB-Forum* 30: 296 (Vol. 299). <https://www.ugb.de/vollwert-ernaehrung/fleischersatz/druckansicht.pdf> (Zugriff 30.05.2023)

Liu NT, Lefcourt AM, Nou X, Shelton DR, Zhang G, Lo YM. 2013. Native microflora in fresh-cut produce processing plants and their potentials for biofilm formation. *J Food Prot* 76:827-32.

Maduka, N., Egwali, O. B., & Ire, F. S. (2021). Microbial analysis of packaged and exposed soybean flour sold in selected markets in Benin City, Nigeria doi. org/10.33500/ijambr. 2021.09. 005.

Mantis, F. N., Tsachev, I., Sabatakou, O., Burriel, A. R., Vacalopoulos, A., & Ramantanis, S. B. (2005). Safety and shelf-life of widely distributed vacuum packed, heat treated sausages. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 8(4), 245-254.

Masotti, F., Cattaneo, S., Stuknyte, M., & De Noni, I. (2019). Airborne contamination in the food industry: An update on monitoring and disinfection techniques of air. *Trends in Food Science & Technology*, 90, 147-156.

Meireles, A., Fulgêncio, R., Machado, I., Mergulhão, F., Melo, L., & Simões, M. (2017). Characterization of the heterotrophic bacteria from a minimally processed vegetables plant. *LWT-Food Science and Technology*, 85, 293-300.

Møretreth, T., & Langsrud, S. (2017). Residential bacteria on surfaces in the food industry and their implications for food safety and quality. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 16(5), 1022-1041.

Mu, L. L., Yun, Y. B., Park, S. J., Cha, J. S., & Kim, Y. K. (2015). Various pathogenic *Pseudomonas* strains that cause brown blotch disease in cultivated mushrooms. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 58(4), 349-354.

Park, S. H., Lamsal, B. P., & Balasubramaniam, V. M. (2014). Principles of food processing. *Food processing: principles and applications*, 2.

Pernu, N., Keto-Timonen, R., Lindström, M., & Korkeala, H. (2020). High prevalence of *Clostridium botulinum* in vegetarian sausages. *Food Microbiology*, 103512.

Ranucci, D., Roila, R., Andoni, E., Braconi, P., & Branciarri, R. (2019). *Punica granatum* and *Citrus* spp. extract mix affects spoilage microorganisms growth rate in vacuum-packaged cooked sausages made from pork meat, emmer wheat (*Triticum dicoccum* Schübler), almond (*Prunus dulcis* Mill.) and hazelnut (*Corylus avellana* L.). *Foods*, 8(12), 664.

Reyes, J. E., Venturini, M. E., Oria, R., & Blanco, D. (2004). Prevalence of *Ewingella americana* in retail fresh cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus*) in Zaragoza (Spain). *FEMS microbiology ecology*, 47(3), 291-296.

Ribeiro, T. T. B. C., Costa, G., & Costa, M. D. (2016). Microbial contamination in industrial tofu. *Ciência Rural*, 47.

Riel, G., Boulaaba, A., Popp, J., & Klein, G. (2017). Effects of parsley extract powder as an alternative for the direct addition of sodium nitrite in the production of mortadella-type sausages—Impact on microbiological, physicochemical and sensory aspects. *Meat Science*, 131, 166-175.

Rossouw, W., & Korsten, L. (2017). Cultivable microbiome of fresh white button mushrooms. *Letters in Applied Microbiology*, 64(2), 164-170.

Samelis, J., Kakouri, A., & Rementzis, J. (2000). Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4 C. *Food Microbiology*, 17(3), 329-340.

Schaarschmidt, S., Spradau, F., Mank, H., Banach, J. L., van der Fels-Klerx, H. J., Hiller, P., ... & Mader, A. (2016). Public and private standards for dried culinary herbs and spices—Part II: Production and product standards for ensuring microbiological safety. *Food Control*, 70, 360-370.

Schill, S., Stessl, B., Meier, N., Tichy, A., Wagner, M., & Ludewig, M. (2021). Microbiological Safety and Sensory Quality of Cultivated Mushrooms (*Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*) at Retail Level and Post-Retail Storage. *Foods*, 10(4), 816.

Tirado, C., & Schmidt, K. (2001). WHO surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications: preliminary results and trends across greater Europe. *Journal of Infection*, 43(1), 80-84.

Tuytschaever, T., Jacxsens, L., De Boeck, E., & Uyttendaele, M. (2023). Microbiological characteristics and applied preservation method of novel ready-to-eat vegetarian spreads and dips. *Food Control*, 109313.

Venturini, M. E., Reyes, J. E., Rivera, C. S., Oria, R., & Blanco, D. (2011). Microbiological quality and safety of fresh cultivated and wild mushrooms commercialized in Spain. *Food microbiology*, 28(8), 1492-1498.

Walsh, P.S.; Metzger, D.A.; Higuchi, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 1991, 10, 506–513.

Wang, L., Guo, H., Liu, X., Jiang, G., Li, C., Li, X., & Li, Y. (2019). Roles of *Lentinula edodes* as the pork lean meat replacer in production of the sausage. *Meat science*, 156, 44-51.

Yuan, L., Burmølle, M., Sadiq, F. A., Wang, N., & He, G. (2018). Interspecies variation in biofilm-forming capacity of psychrotrophic bacterial isolates from Chinese raw milk. *Food Control*, 91, 47-57.

Zwietering, M. H., Jacxsens, L., Membré, J. M., Nauta, M., & Peterz, M. (2016). Relevance of microbial finished product testing in food safety management. *Food Control*, 60, 31-43.

### **Verordnungen**

VERORDNUNG (EG) Nr. 178/2002 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 28. Januar 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit, ABl. L 31

VERORDNUNG (EG) Nr. 852/2004 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 29. April 2004 über Lebensmittelhygiene, ABl. L139/1

### **In dieser Arbeit verwendete Webseiten.**

Fachverband der Lebensmittelindustrie. 2020. <https://www.oesterreich-isst-informiert.at/herstellung/convenience-food-das-steckt-dahinter/> (Zugriff 22.10.2020)

Statista. 2021. <https://de.statista.com/outlook/cmo/lebensmittel/convenience-food/oesterreich> (Zugriff 08.09.2021)

Statista. 2021. <https://de.statista.com/themen/3804/vegetarismus-und-veganismus-in-oesterreich> (Zugriff 09.09.2021)

DGHM 2021. <https://www.dghm-richt-warnwerte.de/de/dokumente> (Zugriff 10.09.2021)

RASFF 2022. <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/569376> (Zugriff 12.9.2022)

RASFF 2022. <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/568566> (Zugriff 12.9.2022)

RASFF 2022. <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/568582> (Zugriff 13.9.2022)

RASFF 2022. <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/559826> (Zugriff 13.9.2022)

RASFF 2022. <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/559485> (Zugriff 13.9.2022)

RASFF 2022. <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/561073> (Zugriff 13.9.2022)

RASFF 2022. <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/555145> (Zugriff 13.9.2022)

RASFF 2022. <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/542311> (Zugriff 14.9.2022)

RASFF 2022. <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/416133> (Zugriff 14.9.2022)

RASFF 2022. <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/510724> (Zugriff 14.9.2022)

Geospiza Inc.; <https://digitalworldbiology.com/FinchTV>

National Center for Biotechnology Information (NCBI).

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

BacDive 2023. <https://bacdive.dsmz.de> (Zugriff: 13.04.2023)

## 9 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1:** Komponenten für den PCR-Ansatz
- Tabelle 2:** Zuordnung der Isolate pro Probe aus dem Zwischenprodukt und dem Rohstoff\*
- Tabelle 3:** Zuordnung der Isolate pro Gewürzprobe
- Tabelle 4:** Zuordnung der Isolate pro Probe aus den Endprodukten
- Tabelle 5:** Isolate pro Probe aus dem Produktionsumfeld

## 10 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Aufgabenstellung- und Ziele der Diplomarbeit.
- Abbildung 2:** Überblick Material und Methoden.
- Abbildung 3:** Herkunft und Anzahl der sequenzierten Isolate.
- Abbildung 4:** Isolate, die aus den Proben isoliert und sequenziert wurden, Anteil taxonomisch gruppiert.
- Abbildung 5:** Verteilung der Bakteriengruppen auf die Risikogruppen 1 und 2 (Beurteilung des Infektionsrisikos nach BacDive, 2023 <https://bacdive.dsmz.de>).
- Abbildung 6:** Anzahl der sequenzierten Isolate geordnet nach Herkunft und taxonomischer Gruppe.
- Abbildung 7:** Anzahl der sequenzierten Isolate geordnet nach Herkunft im Produktionsumfeld und taxonomischer Gruppe.
- Abbildung 8:** Vorkommen häufiger Gruppen und Spezies in den unterschiedlichen Probenarten.

## 11 Anhang

Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte, Hilfsmittel, Chemikalien und Nährmedien

Bezeichnung	Hersteller/Händler
<b>I. Geräte</b>	
Inkubator 30 °C	Ehret, Emmendingen, Deutschland
Inkubator 25 °C	Ehret, Emmendingen, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortexer	VWR, Laboratory Equipment, Pennsylvania, USA
Thermocycler	VWR
Gefrierschrank -80 °C	Sanyo/Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
T100 Thermocycler	Biorad, Hercules, CA, USA
GelDoc 2000 75S/03005	Biorad, Hercules, CA, USA
Elektrophorese PowerPac Universal Power Supply	Biorad, Hercules, CA, USA
Mikroskop Nikon Alphaphot YS-2	Nikon, Tokyo, Japan
Heizblock MBT 250	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden, Deutschland
Eppendorf Tischzentrifuge 5424	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<b>II Hilfsmittel</b>	
Pipette 100-1000 µl	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Pipette 10-100 µl	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Pipette 1-10 µl	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Pipettenspitzen 1250 µl	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Pipettenspitzen 100 µl	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Latex-Handschuhe	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Ösen 1, 10 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Maximum Recovery Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Safe-Lock-Tubes 1,5, 2,0 and 5,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Falcon™ Zentrifugenröhrchen, 50 ml	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
PCR-Reaktionsgefäße	Unilab, Innsbruck, Österreich
Multiply® PCR Plates	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mikrozid	Schülke&Mayr, Norderstedt, Deutschland
Kaliumhydroxid-Lösung	Merck KgaA, Darmstadt, Germany
Zytochrom-Oxidase-Lösung	BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France
Katalase-Reagenz	Merck KgaA, Darmstadt, Germany
<b>IV. PCR-Reagenzien und Nährmedien</b>	
Chelex® 100 Resin Lösung	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Primer 616F (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTC-3')	Microsynth AG, Blagach, Switzerland
Primer 1492R (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3')	Microsynth AG, Blagach, Switzerland
dNTPs	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Taq DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
MgCl <sub>2</sub>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Diethylpyrocarbonate Wasser (DEPC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PeqGold-Agarose	VWR International, Radnor, USA
peqGREEN DNA Gelfärbung	VWR International, Radnor, USA
Tris-Borate-EDTA Puffer	VWR International, Radnor, USA
Tris-HCl Puffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
LoadingDye Solution	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tryptic Soy Agar plus 0,6 % Yeast (TSAY)	Biokar, GroupeSolabia, PantinCedex, France