



HOCHSCHULE OSNABRÜCK
UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Metastudie

Mikrobielle Risiken an Obst und Gemüse

Helen Behn & Andreas Ulbrich, Hochschule Osnabrück

16.11.2017

INHALTSVERZEICHNIS

1	<u>EINLEITUNG</u>	5
2	<u>AUSBRUCHSINZIDENZ UND RISIKOEINSTUFUNG HÄUFIGER LEBENSMITTEL/PATHOGEN-KOMBINATIONEN</u>	6
2.1	AKTUELLE SITUATION	6
2.2	ENTWICKLUNG DER AUSBRUCHSINZIDENZ	6
2.3	HÄUFIGSTE AUSLÖSER DURCH PFLANZLICHE LEBENSMITTEL VERURSACHTER KRANKHEITSAUSBRÜCHE	7
2.4	RISIKOEINSTUFUNG HÄUFIGER LEBENSMITTEL/PATHOGEN-KOMBINATIONEN	8
3	<u>DAS PFLANZLICHE MIKROBIOM</u>	11
3.1	DAS MIKROBIOM DER RHIZOSPHÄRE	11
3.2	DAS MIKROBIOM DER PHYLLOSPHÄRE	12
3.3	DAS MIKROBIOM DER ENDOSPHÄRE	12
3.4	EINFLUSSFAKTOREN DER DICHT E UND ZUSAMMENSETZUNG DER PFLANZLICHEN MIKROBIOTA	12
3.5	INTERAKTIONEN ZWISCHEN HUMANPATHOGENEN ERREGERN UND MIKROBIOM	13
4	<u>ZUR BESIEDLUNG VON PFLANZEN ERFORDERLICHE BAKTERIELLE FÄHIGKEITEN</u>	15
4.1	ANPASSUNG AN NÄHRSTOFFMANGEL	16
4.2	ADHÄSION	16
4.3	BIOFILMBILDUNG	16
4.4	INTERNALISIERUNG	18
4.5	VBNC-ZUSTAND	19
4.6	RESISTENZ GEGENÜBER OXIDATIVEM STRESS	20
4.7	TYP-III-SEKRETIONSSYSTEM	20
4.8	DIE ROLLE MOBILER GENETISCHER ELEMENTE	21
5	<u>PFLANZLICHE ABWEHRMECHANISMEN GEGEN MIKROORGANISMEN</u>	23
6	<u>EINTRAGSWEGE UND PERSISTENZ HUMANPATHOGENER ERREGER</u>	24
6.1	VORERNT E- UND ERNTEPHASE	25
6.1.1	NUTZUNG DER ANGRENZENDEN FLÄCHEN UND FRÜHERE NUTZUNG DER ANBAUFLÄCHE	25
6.1.2	KLIMABEDINGUNGEN	25
6.1.3	WILDTIERE	26
6.1.4	SAATGUT	26
6.1.5	KULTURART UND -SORTE	26
6.1.6	KULTURSYSTEM	27
6.1.7	ORGANISCHE DÜNGEMITTEL	27

6.1.8	WASSER	28
6.1.9	ERNTWERKZEUGE UND -GERÄTE	29
6.1.10	ERNTARBEITER	30
6.1.11	BAKTERIELLE UND VIRALE PERSISTENZ IM BODEN, AUF DEN PRODUKTEN UND UNBELEBTEN FLÄCHEN	31
6.2	NACHERNTEPHASE	32
6.2.1	UMGEBUNGSBEDINGUNGEN	32
6.2.2	WASCHWASSER	32
6.2.3	KONTAKTFLÄCHEN VON MASCHINEN, GERÄTEN UND BEHÄLTERN	33
6.2.4	MITARBEITER	33
6.3	ZUSAMMENFASSUNG	33
7	<u>PRÄVENTIONS- UND DEKONTAMINATIONSMAßNAHMEN</u>	35
7.1	VORERNTE- UND ERNTEPHASE	35
7.1.1	NUTZUNG DER ANGRENZENDEN FLÄCHEN UND FRÜHERE NUTZUNG DER ANBAUFLÄCHE	35
7.1.2	KLIMABEDINGUNGEN	36
7.1.3	WILDTIERE	36
7.1.4	SAATGUT	36
7.1.5	ORGANISCHE DÜNGEMITTEL	37
7.1.6	WASSER	37
7.1.7	ERNTWERKZEUGE UND -GERÄTE	38
7.1.8	ERNTARBEITER	38
7.1.9	ZÜCHTUNG	38
7.1.10	STIMULATION DES PFLANZLICHEN IMMUNSYSTEMS	39
7.1.11	ANTAGONISTISCHE MIKROORGANISMEN	39
7.2	NACHERNTEPHASE	39
7.2.1	UMGEBUNGSBEDINGUNGEN WÄHREND DER VERARBEITUNG, VERPACKUNG UND LAGERUNG	40
7.2.2	WASCHWASSER	40
7.2.3	DEKONTAMINATION VON FRISCHEPRODUKTEN	40
7.2.4	KONTAKTFLÄCHEN VON MASCHINEN, GERÄTEN UND BEHÄLTERN	46
7.2.5	VERPACKUNG UND LAGERUNG	47
7.2.6	MITARBEITER	47
7.3	ZUSAMMENFASSUNG	47
8	<u>MIKROBIELLE RISIKOBEWERTUNG IN WISSENSCHAFT UND LANDWIRTSCHAFTLICHER PRAXIS</u>	48
8.1	VERORDNUNGEN ZUR LEBENSMITTELHYGIENE	48
8.2	WISSENSCHAFTLICHE RISIKOBEWERTUNG	49
8.3	RISIKOBEWERTUNG UND -MANAGEMENT IN DER PRAXIS	51
8.4	MIKROBIOLOGISCHE KRITERIEN	53
9	<u>MIKROBIOLOGISCHE NACHWEISMETHODEN</u>	54
9.1	KLASSISCHE METHODEN	54

9.2 PCR-BASIERTE METHODEN	54
9.2.1 KLASSISCHE POLYMERASEKETTENREAKTION	54
9.2.2 REAL-TIME PCR	55
9.2.3 NUCLEIC ACID SEQUENCE-BASED AMPLIFICATION (NASBA)	56
9.2.4 LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP)	56
9.3 METHODEN DER HOCHDURCHSATZ-SEQUENZIERUNG	57
9.3.1 METAGENOMISCHE SEQUENZIERUNG	57
9.3.2 EINZELZELL-SEQUENZIERUNG	57
9.3.3 DNA-BARCODING	57
9.4 DNA-MICROARRAY-METHODEN	58
9.5 IMMUNOLOGISCHE METHODEN	58
9.6 BIOSENSOR-BASIERTE METHODEN	59
9.6.1 OPTISCHE BIOSENSOREN	59
9.6.2 ELEKTROCHEMISCHE BIOSENSOREN	60
9.7 ZUSAMMENFASSUNG	60
9.8 STANDARDISIERUNG VON PROBENAHME UND PROBENAUFBEREITUNG	61
<u>10 RESULTIERENDE WISSENSCHAFTLICHE FRAGESTELLUNGEN UND EMPFEHLUNGEN</u>	<u>63</u>
10.1 RESULTIERENDE WISSENSCHAFTLICHE FRAGESTELLUNGEN	63
10.1.1 DAS PFLANZLICHE MIKROBIOM (KAPITEL 3)	63
10.1.2 ZUR BESIEDLUNG VON PFLANZEN ERFORDERLICHE BAKTERIELLE FÄHIGKEITEN (KAPITEL 4)	64
10.1.3 PFLANZLICHE ABWEHRMECHANISMEN (KAPITEL 5)	66
10.1.4 EINTRAGSWEGE UND PERSISTENZ HUMANPATHOGENER ERREGER (KAPITEL 6)	67
10.1.5 PRÄVENTIONS- UND DEKONTAMINATIONSMAßNAHMEN (KAPITEL 7)	69
10.1.6 MIKROBIELLE RISIKOBEWERTUNG IN WISSENSCHAFT UND LANDWIRTSCHAFTLICHER PRAXIS (KAPITEL 8)	71
10.1.7 MIKROBIOLOGISCHE NACHWEISMETHODEN (KAPITEL 9)	72
10.1.8 RISIKOGRUPPEN	73
10.2 AKTUELLE FORSCHUNGSTHEMEN MIT HOHER RELEVANZ FÜR DIE MIKROBIELLE SICHERHEIT FRISCHER PRODUKTE	74
<u>11 LITERATUR</u>	<u>78</u>

1 Einleitung

Obst und Gemüse sind reich an gesundheitsfördernden Inhaltsstoffen und stellen einen wichtigen Bestandteil einer gesunden Ernährung dar. Sind roh verzehrbare frische Produkte mit humanpathogenen Erregern kontaminiert, können sie jedoch Infektionen und Lebensmittelvergiftungen auslösen. Diese Literaturstudie gibt auf Basis aktueller Publikationen einen Überblick über Quellen und Eintragswege humanpathogener Bakterien und Viren sowie über Präventions- und Dekontaminationsmaßnahmen entlang der Produktions- und Verarbeitungskette von Obst und Gemüse. Auf pflanzlichen Oberflächen sind humanpathogene Erreger vergleichsweise unwirtlichen Umweltbedingungen ausgesetzt, wie z.B. wechselnden Klimabedingungen, Nährstoffmangel, der Konkurrenz mit dem natürlichen Mikrobiom und pflanzlichen Immunreaktionen. Die Überlebensfähigkeit bakterieller Erreger auf frischen Produkten ist daher von ihrer Anpassungs- und Konkurrenzfähigkeit abhängig. Diese beruht auf spezifischen Eigenschaften, wie der Fähigkeit zur Anpassung des Stoffwechsels, zur Adhäsion an die pflanzliche Oberfläche und zum Schutz vor biotischen und abiotischen Umwelteinflüssen. Zur Anpassung humanpathogener Bakterien an Habitate außerhalb des menschlichen bzw. tierischen Wirtes können mobile genetische Elemente beitragen, die durch horizontalen Gentransfer übertragen werden. Ein verbessertes Verständnis dieser ökologischen Wechselwirkungen wird die Identifikation neuer Ansatzpunkte zur Verbesserung der mikrobiellen Lebensmittelsicherheit vorantreiben. Das gewachsene wissenschaftliche Interesse hat auch zu einer Weiterentwicklung der mikrobiologischen Methoden und der quantitativen Risikobewertung geführt. Basierend auf diesem breiten Literaturüberblick werden abschließend kritische Verständnislücken und entscheidende wissenschaftliche Fragestellungen im Bereich der mikrobiellen Sicherheit verzehrfertiger pflanzlicher Lebensmittel aufgezeigt. Als Leser haben Sie die Möglichkeit, diese Literaturstudie auch ausgehend von den resultierenden wissenschaftlichen Fragestellungen in Kapitel 10 zu lesen, die Sie zu den entsprechenden Kapiteln führen.

2 Ausbruchsinzidenz und Risikoeinstufung häufiger Lebensmittel/Pathogen-Kombinationen

2.1 Aktuelle Situation

Jedes Jahr erkranken Millionen Menschen weltweit an lebensmittelbedingten Infektionen; tausende von ihnen sterben (Yeni, Alpas, & Soyer, 2016). Die jährlich verursachten Schäden durch Mehrbelastung des Gesundheitssystems und Produktionsausfälle in der Landwirtschaft liegen in Milliardenhöhe (Yeni et al., 2016). Die Ursachen lebensmittelbedingter Infektionen sind vielfältig und unterliegen infolge der Globalisierung des Lebensmittelmarktes, der Veränderungen in Demographie und Konsumgewohnheiten sowie modifizierter Produktions- und Verarbeitungspraktiken einem grundlegenden Wandel (James, 2006).

Ausbruchsquellen sind überwiegend Lebensmittel tierischen Ursprungs, aber auch pflanzliche Produkte können Krankheitsausbrüche verursachen. Als Infektionsausbruch werden nach dem Infektionsschutzgesetz zwei oder mehr gleichartige Erkrankungen bezeichnet, bei denen ein epidemiologischer Zusammenhang, das heißt eine gemeinsame Infektionsquelle, wahrscheinlich ist (IfSG, 2000). Im Jahr 2015 wurden 4,5% der 422 lebensmittelbedingten Ausbrüche in der EU auf pflanzliche Lebensmittel zurückgeführt, während 61,4% auf Lebensmittel tierischen Ursprungs zurückgingen (EFSA, 2016). Hauptauslöser durch pflanzliche Lebensmittel verursachter Ausbrüche waren Gemüse und Gemüseprodukte (2,8%), gefolgt von Getreideprodukten einschließlich Hülsenfrüchten, Nüssen und Mandeln (0,9%), Früchten, Beeren und Fruchtprodukten (0,5%) sowie Kräutern und Gewürzen (0,2%; EFSA, 2016).

Ausbrüche durch pflanzliche Lebensmittel kommen zwar seltener vor, sind aber mit höheren Fallzahlen verbunden und tragen somit überproportional zur Morbidität bei. So wurden im Jahr 2015 nur 4,5% der Infektionsausbrüche, aber 7,3% der Krankheitsfälle durch pflanzliche Lebensmittel verursacht (EFSA, 2016). Trotz der hohen Fallzahlen verlaufen Infektionen durch pflanzliche Lebensmittel milder. Die Zahl der Krankenhauseinweisungen und Todesfälle ist geringer als bei Erkrankungen durch tierische Lebensmittel (EFSA Panel on Biological Hazards, 2013; Painter et al., 2013).

2.2 Entwicklung der Ausbruchsinzidenz

Erste Hinweise auf die Bedeutung pflanzlicher Lebensmittel als Vektoren humanpathogener Erreger lieferte eine Datenauswertung aus den Jahren 1973 – 1997, durchgeführt vom US-amerikanischen Center for Disease Control and Prevention (CDC) (Sivapalasingam, Friedman, Cohen, & Tauxe, 2004). Der Studie zufolge stieg der Anteil durch frisches Obst und Gemüse verursachter Ausbrüche in den USA von 0,7% (13 von 1.857) in den 1970ern auf 6% (114 von 1.788 Ausbrüchen) in den 1990ern. Eine spätere Berechnung, die zusätzlich elektronisch erfasste Daten ab 1998 einschloß, ergab einen Anstieg von 2% (1973-1997) auf 5% (1998-2012; Herman, Hall, & Gould, 2015).

In der Europäischen Union werden seit 2004 Daten zu lebensmittelbedingten Ausbrüchen in einer gemeinsamen Datenbank zusammengeführt. Publikationsorgan ist der jährlich erscheinende Zoonose-Monitoring-Bericht der EFSA (European Food Safety Authority) und des ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). Die Analysen sind jedoch nur begrenzt repräsentativ, da die Berichterstattung in den ersten Jahren noch unvollständig war und die Datenerhebung in den

Mitgliedsländern nicht harmonisiert ist (EFSA Panel on Biological Hazards, 2013). Den Berichten zufolge wurden im Untersuchungszeitraum 2006 bis 2015 jedes Jahr 14 bis 86 durch Obst und Gemüse verursachte Infektionsausbrüche gemeldet (EFSA, 2007, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015a, 2015b, 2016). Zwischen 2008 und 2011 wurde ein Anstieg von 22 auf 62 Ausbrüche pro Jahr registriert (EFSA Panel on Biological Hazards, 2013). Der Trend setzte sich jedoch nicht fort. In den Folgejahren lagen die Ausbruchszahlen durch *Gemüse, Säfte und deren Produkte* und *Früchte, Beeren, Säfte und deren Produkte* bei insgesamt 47 (2013), 50 (2014) und 14 (2015). Aufgrund der hohen Variabilität der Gesamtzahl lebensmittelbedingter Ausbrüche pro Jahr (zwischen 422 und 839) schwankte der prozentuale Anteil durch pflanzliche Lebensmittel bedingter Ereignisse im Untersuchungszeitraum zwischen 2,8% und 7,1% (EFSA, 2015a, 2015b, 2016).

2.3 Häufigste Auslöser durch pflanzliche Lebensmittel verursachter Krankheitsausbrüche

Die häufigsten Verursacher durch pflanzliche Lebensmittel bedingter Krankheitsausbrüche waren in der EU 2015 bakterielle Toxine (überwiegend aus *Bacillus*-, *Clostridium*- und *Staphylococcus*-Arten, ausgenommen *C. botulinum*, 31.6%), Salmonellen (26.3%) und Calicivirus einschließlich Norovirus (21.1%, Abb. 1, EFSA, 2016).

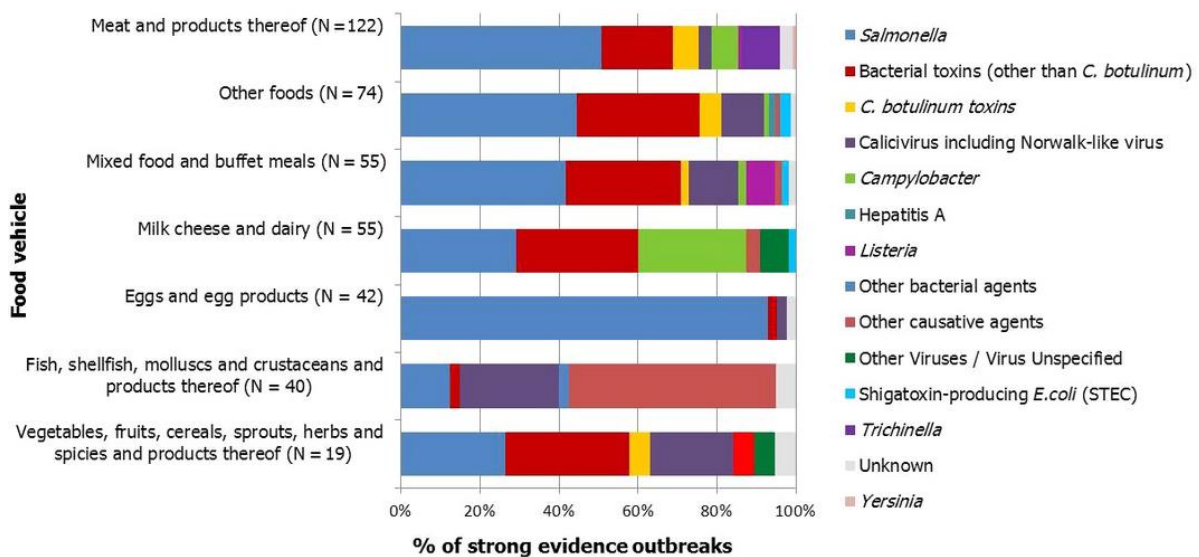


Abb. 1: Häufigkeitsverteilung der Auslöser lebensmittel- und wasserbedingter Krankheitsausbrüche nach Lebensmittelkategorie in der EU im Jahr 2015 (EFSA, 2016)

Darüber hinaus erfasst das Zoonose-Monitoring der EFSA standardmäßig Daten zu den folgenden Erregern: thermotolerante *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, verotoxigene *Escherichia coli*, *Mycobacterium bovis*, *Brucella* spp., *Trichinella* spp. und *Echinococcus* spp. In der wissenschaftlichen Literatur werden zudem weitere Bakterienarten (*Shigella* spp., *Yersinia* spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp., *Bacillus cereus*, *Vibrio* spp.), aber auch Viren (Hepatitis A Virus), Parasiten (*Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayentanensis*) und Pilze (Hefen, Schimmelpilze) als relevante humanpathogene Erreger bei Obst und Gemüse genannt (Jung, Jang, & Matthews, 2014; Yeni et al., 2016).

2.4 Risikoeinstufung häufiger Lebensmittel/Pathogen-Kombinationen

Obwohl in der EU anders als in den USA seit Beginn der gemeinsamen Datenauswertung kein kontinuierlich ansteigender Trend von Infektionsausbrüchen durch Obst und Gemüse zu verzeichnen ist, wächst auch hierzulande das Problembewusstsein. Dies ist unter anderem die Folge einiger großer Ausbrüche in den vergangenen Jahren, z.B. des EAHEC O104:H4-Ausbruchs im Jahr 2011 in Norddeutschland mit 3.842 Erkrankungs- und 53 Todesfällen (Beutin & Martin, 2012). Daher hat die Europäische Kommission das Panel on Biological Hazards der EFSA beauftragt, eine *Scientific Opinion* zum Risiko humanpathogener Erreger an pflanzlichen Lebensmitteln zu verfassen. Die 2013 erschienene wissenschaftliche Stellungnahme beinhaltet ein multifaktorielles Analysemodell zur Identifikation und Risikoeinstufung häufiger Lebensmittel/Pathogen-Kombinationen (EFSA Panel on Biological Hazards, 2013). Die Risikobewertung erfolgt anhand von sieben Beurteilungskriterien: (1) Der Stärke des Zusammenhangs zwischen Lebensmittel und Pathogen (Ausbruchsdaten des EU Zoonose-Monitorings), (2) der Häufigkeit der Erkrankung, (3) der Krankheitslast, (4) der Dosis-Wirkungs-Beziehung, (5) dem Konsum, (6) der Häufigkeit der mikrobiellen Kontamination und (7) der Pathogenvermehrung während der Haltbarkeitsdauer. Das Modell ist ausschließlich für verzehrfertige (*ready-to-eat*) Produkte entwickelt worden, die ohne vorherige antimikrobielle Verarbeitung roh verzehrt werden.

Für den Zeitraum 2007 – 2011 ergab eine Risikobewertung anhand dieses multifaktoriellen Analysemodells die nachstehende Rangfolge von Lebensmittel/Pathogen-Kombinationen (EFSA Panel on Biological Hazards, 2013):

- Position 1:
 - *Salmonella* spp. / Salat und Blattgemüse (roh verzehrt)
- Position 2:
 - *Salmonella* spp. / Zwiebel- und Stängelgemüse
 - *Salmonella* spp. / Tomaten
 - *Salmonella* spp. / Melonen
 - pathogene *E. coli* / frische Schoten, Hülsenfrüchte und Getreide
- Position 3:
 - Norovirus / Salat und Blattgemüse (roh verzehrt)
 - *Salmonella* spp. / Sprossen
 - *Shigella* spp. / frische Schoten, Hülsenfrüchte und Getreide.

Bereits im Jahr 2008 hatten FAO und WHO ein ähnliches Risikobewertungssystem entwickelt (FAO/WHO, 2008). Dieses beruhte auf sechs Beurteilungskriterien: (1) Häufigkeit und Schwere der Erkrankungen, (2) Produktionsumfang, (3) Komplexität der Produktions- und Verarbeitungskette, (4) Vermehrungspotential der Humanpathogene, (5) Kontrollmöglichkeiten sowie (6) internationales Handelsvolumen und ökonomischer Stellenwert eines Produktes. Eine Risikobewertung anhand dieses Modells schrieb ebenfalls Blattgemüse und frischen Kräutern weltweit das höchste Risikopotential zu (Tab. 1).

Tab. 1: Risikobewertung nach dem System der FAO und WHO (FAO/WHO, 2008)

Produkt	Krankheitserreger	Gründe für Einstufung
1. Priorität		
Blattgemüse, frische Kräuter	<p>Enterohaemorrhagische <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella enterica</i> <i>Campylobacter</i> <i>Shigella</i> spp. Hepatitis-A-Virus Norovirus <i>Cyclospora cayatenensis</i> <i>Cryptosporidium</i> <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> <i>Listeria monocytogenes</i></p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Zahlreiche Ausbrüche in mindestens drei Regionen der Welt berichtet, einhergehend mit Krankheit und Tod. 2. In Großbetrieben angebaut, verbreitet und zunehmend konsumiert, insbesondere im pre-cut-Bereich. 3. Die Produkte breiten sich auch in Ländern aus, in denen sie nicht traditionell angebaut werden. 4. Unterschiedliche Systeme der Verarbeitung und Distribution, die für einige Länder neu sind. 5. Ausbaupotential gegeben, vor allem für Fresh-cut Produkte. 6. Produktion und Distribution sind komplex, viele verschiedene Kontrollpunkte zur Minimierung der Kontamination und Kreuzkontamination, mehrstufiger Ansatz notwendig. 7. In großem Umfang international gehandelt.
2. Priorität		
Beeren	<p><i>Cyclospora cayatenensis</i> <i>Cryptosporidium parvum</i> Norovirus (tiefgekühlte Beeren) Hepatitis-A-Virus</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ausbrüche in einigen Regionen. 2. Ausgedehnte Produktion einiger Beersorten. 3. Produktion variiert je nach Sorte und schließt das Sammeln wilder Beeren ein. 4. Ausbaupotential stark begrenzt. 5. Menschen als primäre Kontaminationsquelle, intensiver Handkontakt. 6. International gehandelt, aber bestimmte Beeren zunächst eingefroren (Probleme mit Viren fortbestehend).
Frühlingszwiebeln	<p>Hepatitis-A-Virus <i>Shigella</i> spp.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ausbrüche in nur ein oder zwei Ländern berichtet. 2. Geringe, aber zunehmende Produktion, vielerorts konsumiert. 3. Ähnliche Produktionssysteme in verschiedenen Ländern. 4. Humanpathogene Erreger können sich im Inneren des Blattes befinden und dort vermehren. 5. Handling bei Ernte kritisch. 6. International gehandelt.
Melonen	<p><i>Salmonella enterica</i></p> <p>Niedrigere Priorität: Enterohaemorrhagische <i>Escherichia coli</i> Norovirus</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ausbrüche in einigen Regionen der Welt. 2. Weit verbreitete, ganzjährige Produktion. 3. Ähnliche Produktionssysteme weltweit. Unterschiedliche Praktiken, um die Melonen vom Boden fernzuhalten. 4. Melonen begünstigen Pathogenvermehrung. 5. Zur Bewässerung, zum Waschen und Kühlen verwendetes Wasser kann eine Kontaminationsquelle darstellen. 6. Weit verbreiteter internationaler Handel.
Sprossen	<p><i>Salmonella enterica</i> Enterohaemorrhagische <i>Escherichia coli</i> (und</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ausbrüche in einigen Regionen der Welt. 2. Regionale Unterschiede, kleine Produktionsstätten.

Metastudie *Mikrobielle Risiken an Obst und Gemüse*

	enterotoxische <i>E. coli</i>) <i>Bacillus cereus</i>	<ol style="list-style-type: none"> 3. Abhängig von Art der Sprossen. 4. Pathogenvermehrung begünstigt. 5. Präventive Kontrollen und Behandlungen der Samen und des Wassers vor der Keimung. 6. Sprossensamen verbreitet gehandelt, nicht aber die Sprossen.
Tomaten	<i>Salmonella enterica</i> Hepatitis-A-Virus	<ol style="list-style-type: none"> 1. Zahlreiche Ausbrüche, aber auf die USA beschränkt. 2. Ausgedehnte Produktion, aber nicht komplett für den Verzehr bestimmt. 3. Diverse Produktionssysteme und Transportketten. 5. Mangel an Informationen zu Kontaminationsquellen in Primärproduktion. 6. Verbreitet gehandelt.

Humanpathogene Salmonellen und Noroviren in Kombination mit roh verzehrtem Blattgemüse wurden von EFSA und FAO/WHO übereinstimmend als Hochrisikokombinationen eingestuft (EFSA Panel on Biological Hazards, 2013; FAO/WHO, 2008). Daher werden in den Kapiteln 6, 7 und 8 dieser Literaturübersicht Studien an Salmonellen und Noroviren als wichtige Vertreter humanpathogener Bakterien bzw. Viren herangezogen. In der wissenschaftlichen Literatur erscheinen Viren als Lebensmittel-assoziierte Erreger gegenüber Bakterien häufig unterrepräsentiert. Daher wurde in dieser Literaturstudie versucht, virale Erreger angemessen zu berücksichtigen.

3 Das pflanzliche Mikrobiom

Als Mikrobiom wird die Gesamtheit der epi- und endophytischen Mikroorganismen, die eine Pflanze besiedeln, bezeichnet. Die Bedeutung des pflanzlichen Mikrobioms für die Landwirtschaft liegt in seinem weitreichenden Einfluss auf Samenkeimung, Entwicklung, Ernährung und Gesundheit der Pflanze sowie Produktivität und Ertrag einer Kultur (Mendes, Garbeva, & Raaijmakers, 2013). Ob eingetragene humanpathogene Mikroorganismen sich auf einer pflanzlichen Oberfläche etablieren und vermehren können, wird auch von der Interaktion mit dem pflanzlichen Mikrobiom beeinflusst. Mit der Einführung technischer Innovationen, wie des Next Generation Sequencing, haben sich neue Möglichkeiten der Omics-Forschung eröffnet. Eine Analyse des Metagenoms, also der gesamten genetischen Information einer mikrobiellen Gemeinschaft, erlaubt komparative ökologische Untersuchungen und gewährt neue Einblicke in die Struktur, Funktion und Variabilität des pflanzlichen Mikrobioms (Rastogi, Coaker, & Leveau, 2013).

Die mikrobielle Gemeinschaft einer Pflanze zeigt eine ausgeprägte räumliche Heterogenität. Zu unterscheiden sind vor allem die Mikrobiota der

- Rhizosphäre,
- Phyllosphäre und
- Endosphäre.

3.1 Das Mikrobiom der Rhizosphäre

Die Rhizosphäre, der unmittelbar die Wurzel umgebende Bodenraum, gilt als eines der komplexesten Ökosysteme der Erde (Hinsinger, Bengough, Vetterlein, & Young, 2009; Lambers, Mougel, Jaillard, & Hinsinger, 2009). Es ist von Bakterien, Pilzen, Oomyceten, Nematoden, Protozoen, Algen, Viren, Archebakterien und Arthropoden besiedelt (Buée, de Boer, Martin, van Overbeek, & Jurkevitch, 2009). Unter den Bakterienstämmen bzw. -abteilungen dominieren die Proteobacteria, gefolgt von Firmicutes, Actinobacteria und Bacteroidetes (Roesch et al., 2007; Weinert et al., 2011). Ernährungsgrundlage dieser Bakteriengesellschaft sind die Wurzelexsudate der Pflanze (Mendes et al., 2013). Wurzelexsudate bestehen aus einer Vielzahl unterschiedlicher Verbindungen, darunter organische Säuren, anorganische Ionen, Phytosiderophore (Eisenchelatoren), Zucker, Vitamine, Aminosäuren, Purine, Nukleoside und die von der Wurzelhaube produzierten Schleimstoffe (Bulgarelli, Schlaeppli, Spaepen, Ver Loren van Themaat, & Schulze-Lefert, 2013). Auf diese Weise werden je nach Pflanzenart rund 11% der Nettoprimärproduktion wieder ausgeschieden (D. L. Jones, Nguyen, & Finlay, 2009). Da die Mehrzahl der bodenlebenden Bakterien organotroph ist, d.h. organische Verbindungen als Wasserstoff-Donatoren nutzt, und deren Verfügbarkeit bzw. Zugänglichkeit in den meisten Böden begrenzt ist, regen Wurzelexsudate die mikrobielle Vermehrung an (Demoling, Figueroa, & Bååth, 2007). Somit stellt die Ausscheidung von Wurzelexsudaten (Rhizodeposition) eine der treibenden Kräfte in der Regulation der mikrobiellen Diversität der Rhizosphäre dar (Bulgarelli et al., 2013). Die Konkurrenzfähigkeit eines Bakteriums in der Rhizosphäre ist davon abhängig, wie angepasst es an die Herausforderungen dieses Lebensraums ist. Einen Überlebensvorteil stellen die Fähigkeit zur Motilität, Chemotaxis und Adhäsion sowie eine hohe Stressresistenz und Vermehrungsrate dar (Bulgarelli et al., 2013).

3.2 Das Mikrobiom der Phyllosphäre

Die Phyllosphäre, der Lebensraum auf der Oberfläche von Blättern und Blattscheiden, bietet im Vergleich zur Rhizosphäre deutlich ungünstigere Bedingungen. In diesem exponierten Lebensraum sind Mikroorganismen starken Fluktuationen von Temperatur, Feuchtigkeit und Sonnenstrahlung ausgesetzt und müssen sich an eine begrenzte Nährstoffverfügbarkeit anpassen (Vorholt, 2012). Dennoch ist die Phyllosphäre von einem dichten und artenreichen Mikrobiom aus Bakterien, Pilzen, Archebakterien und anderen Mikroorganismen besiedelt (Rastogi et al., 2013). Die höchste Dichte haben mit durchschnittlich 10⁸ Zellen pro cm² Blattfläche die Bakterien (Leveau, 2006). Das bakterielle Mikrobiom verschiedener Nutzpflanzen, wie z.B. Weizen, Reis, Apfel, Salat und Spinat, setzt sich überwiegend aus den Stämmen bzw. Abteilungen der Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes und Proteobacteria zusammen (Bulgarelli et al., 2013). Der Kern des Phyllosphärenmikrobioms vieler Pflanzenarten wird von nur wenigen Bakteriengattungen gebildet, darunter *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Methylobacterium*, *Bacillus*, *Massilia*, *Arthrobacter* und *Pantoea* (Bulgarelli et al., 2013). Eine erfolgreiche Kolonisierung der Phyllosphäre erfordert spezifische Anpassungen, wie den Besitz von Pigmenten, DNA-Reparatursystemen, Stressresistenzproteinen und Flagellen zur aktiven Nährstoffaufnahme (Delmotte et al., 2009). Darüber hinaus ist die Fähigkeit zur Produktion extrazellulärer Polysaccharide von Vorteil, die eine Zellaggregation ermöglichen und so vor Austrocknung und osmotischem Stress schützen (Monier & Lindow, 2004).

3.3 Das Mikrobiom der Endosphäre

Nicht nur pflanzliche Oberflächen, sondern auch das Pflanzeninnere kann von Mikroorganismen besiedelt werden. Diese sogenannte Endosphäre stellt eine besondere ökologische Nische dar, da sie schwer zugänglich, aber vergleichsweise nährstoffreich ist. Der Besitz von Kutikula, Zellwänden und Trichomen schützt Pflanzen vor der unkontrollierten Invasion von Mikroorganismen (Melotto, 2014). Stomata, Beschädigungen der Oberfläche und seitliche Wurzelsprosse bieten jedoch potentielle Eintrittspforten. Nach erfolgreicher Invasion können Mikroorganismen nicht nur den Interzellularraum besiedeln, sondern auch in den Apoplasten und das Xylem eindringen, was eine Ausbreitung in der Pflanze ermöglicht (Turner, James, & Poole, 2013). Das Mikrobiom der Endosphäre weist gegenüber der Rhizosphäre eine geringere Dichte und Diversität auf. Actinobacteria, Bacteroidetes und Proteobacteria kommen in der Endosphäre vermehrt vor, während Acidobacteria, die Hauptbesiedler von Boden und Rhizosphäre, fast vollständig fehlen. Dieses taxonomische Profil der Endosphäre zeigt sich bemerkenswert konsistent, unabhängig von Boden und geographischer Lage (Bulgarelli et al., 2012; Lundberg et al., 2012). Diese Ergebnisse sprechen gegen eine zufällige Nischenbesetzung und deuten auf gezielte Selektionsmechanismen der Wirtspflanze hin.

Bei humanpathogenen Mikroorganismen hat die Fähigkeit zur Internalisierung eine besondere Relevanz, da sie auf diese Weise einer eventuell angewandten Oberflächendesinfektion der Produkte entgehen (M. C. Erickson, 2012).

3.4 Einflussfaktoren der Dichte und Zusammensetzung der pflanzlichen Mikrobiota

Unter natürlichen Bedingungen wird die Dichte und Zusammensetzung eines pflanzlichen Mikrobioms unter anderem von der geographischen Lage, dem Boden, den Klimabedingungen und dem pflanzlichen Genotyp bestimmt (Rastogi et al., 2013). In einem gartenbaulichen Kultursystem

sind die jeweiligen Eintragswege und Wachstumsbedingungen entscheidend für die Entwicklung des Mikrobioms. Beispielsweise zählen dazu in Salatkulturen

- kulturbedingte Einträge von Mikroorganismen, u.a. durch Bewässerung,
- die Salatsorte,
- das Pflanzenorgan als ökologische Nische,
- die geographische Lage und
- das Kultursystem und die Kulturbedingungen (Rastogi et al., 2012; Williams, Moyne, Harris, & Marco, 2013).

Kulturbedingte Einträge von Mikroorganismen in Obst- und Gemüsekulturen sind offenkundig eine Hauptdeterminante der Dichte und Zusammensetzung eines pflanzlichen Mikrobioms. So zeigten Pflanzen in hydroponischer Kultur in der Nacherntephase eine geringere mikrobielle Besiedlungsdichte als Pflanzen, die in Erde kultiviert wurden (Selma et al., 2012).

Die Sorte, d.h. die genetische Ausstattung einer Pflanze, entscheidet darüber, welche Mikroorganismen sich am besten etablieren und vermehren können. Der Einfluss der Salatsorte wird auf Unterschiede in Morphologie, Oberflächeneigenschaften und Blatt- bzw. Wurzelexsudaten zurückgeführt (Hunter et al., 2010; Klerks, Franz, Gent-pelzer, & Zijlstra, 2007; Mitra et al., 2009).

Die mikrobielle Besiedlung einer Pflanze ist nicht homogen, sondern je nach ökologischer Nische unterschiedlich. Pflanzliche Oberflächenstrukturen wie Wölbungen und Vertiefungen an Blattrippen, Trichomen, Stomata und Hydathoden (wasserabscheidende Drüsen) können ein erhöhtes Nährstoff- und Wasserangebot sowie Schutz vor extremen Temperaturen und Strahlung bieten (Turner et al., 2013). Hier findet sich häufig eine erhöhte Mikrobendichte. Salmonellen favorisieren beispielsweise den Stiel gegenüber der Spitze und die Unter- gegenüber der Oberseite eines Salatblattes (Kroupitski, Pinto, Belausov, & Sela, 2011).

Der Einfluss der geographischen Lage wurde von Rastogi untersucht, der mit zunehmender Entfernung zwischen den Salatfeldern eine abnehmende Übereinstimmung der Mikrobiomzusammensetzung fand (Rastogi et al., 2012).

Die Effekte klimatischer Bedingungen auf die Mikrobiomzusammensetzung von Salatpflanzen konnte durch den Vergleich zweier Pflanzzeitpunkte deutlich gemacht werden. Während bei den frühen Pflanzungen im Juni die Firmicutes dominierten, waren es im August und Oktober die Proteobacteria (Williams et al., 2013).

3.5 Interaktionen zwischen humanpathogenen Erregern und Mikrobiom

Die Etablierung und Vermehrung eingetragener humanpathogener Krankheitserreger ist abhängig von der Dichte und Zusammensetzung des pflanzlichen Mikrobioms (Teplitski, Warriner, Bartz, & Schneider, 2011). Die bestehende Mikrobengesellschaft kann durch unterschiedliche Interaktionsmechanismen einen fördernden oder hemmenden Effekt auf Adhäsion, Persistenz und Vermehrung humanpathogener Erreger ausüben. Hemmend wirken z.B. die Produktion von antibiotisch wirksamen Substanzen oder Exoenzymen, die Konkurrenz um Eisen oder Makronährstoffe und die Induktion pflanzlicher Abwehrmechanismen (Whipps, 2001). Einen fördernden Einfluss können phytopathogene Mikroorganismen (einschließlich Pilze) haben, die durch

pektinolytische Aktivität Nährstoffe freisetzen, die Integrität des pflanzlichen Gewebes stören, dadurch seinen pH-Wert erhöhen und pflanzeneigene Abwehrmechanismen schwächen (Wade & Beuchat, 2003). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass *Enterobacter asburiae* das Überleben des *E. coli* Serovars O157:H7 auf Salatblättern um den Faktor 20 - 30 verminderte, während *Wausteria paucula* es auf das sechsfache verlängerte (Cooley, Chao, & Mandrell, 2006). Die pflanzlichen Mikrobiota stellen somit einen entscheidenden Einflussfaktor der Etablierung humanpathogener Mikroorganismen auf pflanzlichen Oberflächen dar (Brandl, 2006).

4 Zur Besiedlung von Pflanzen erforderliche bakterielle Fähigkeiten

Die Fähigkeit humanpathogener Bakterien, außerhalb des tierischen oder menschlichen Wirtes zu überleben und sich auf Pflanzen zu etablieren, beruht auf einer Reihe unterschiedlicher Strategien (Abb. 2 und 4). Diese Strategien dienen der bakteriellen Anhaftung an die pflanzliche Oberfläche, der Anpassung des Stoffwechsels, dem Schutz vor Umwelteinflüssen einschließlich pflanzlicher Abwehrmechanismen sowie ihrer weiteren Adaptation. Diese Anpassungsfähigkeit basiert auf spezifischen bakteriellen Eigenschaften, darunter die Fähigkeit zur

- Anpassung des Stoffwechsels an Nährstoffmangel (siehe Abschnitt 4.1),
- Fortbewegung (siehe Abschnitt 4.1),
- Chemotaxis (siehe Abschnitt 4.1),
- Adhäsion (siehe Abschnitt 4.2),
- Biofilmbildung (siehe Abschnitt 4.3),
- Internalisierung (siehe Abschnitt 4.4),
- Ausbildung des VBNC-Stadiums (siehe Abschnitt 4.5),
- Resistenz gegenüber oxidativem Stress und DNA-Reparatur (siehe Abschnitt 4.6),
- Unterdrückung der pflanzlichen Abwehr mit Hilfe des Typ-III-Sekretionssystems (siehe Abschnitt 4.7) und
- Steigerung ihrer Persistenz und Pathogenität durch Aufnahme mobiler genetischer Elemente (siehe Abschnitt 4.8, Martínez-Vaz et al., 2014).

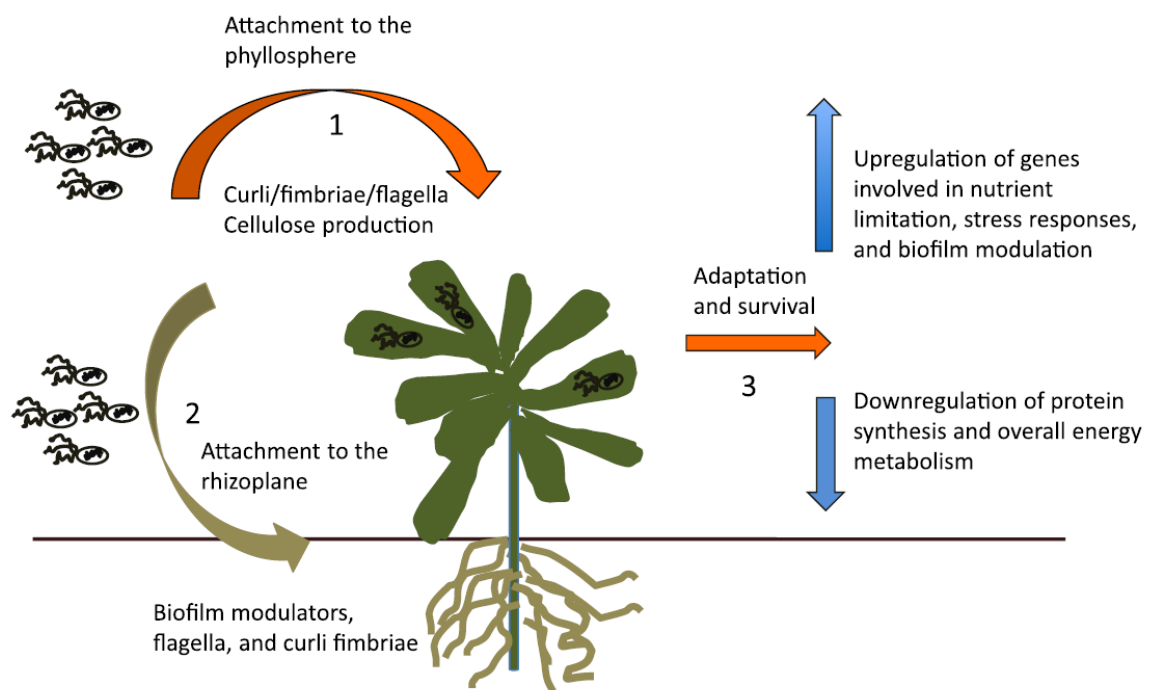


Abb. 2: Molekulare Mechanismen, die der Besiedlung von Blattgemüse durch humanpathogene Erreger zugrunde liegen. Die Adhäsion an pflanzliche Oberflächen in der Phyllosphäre oder Rhizosphäre wird durch bakterielle Oberflächenstrukturen vermittelt, die auch in der Biofilmbildung eine Rolle spielen (Punkte 1 und 2). Das Überleben in der unwirtlichen pflanzlichen Umwelt erfordert die Induktion von Stressreaktionen und das Herunterregulieren von Genen für Proteinsynthese und Energiehaushalt (Punkt 3; Martínez-Vaz et al., 2014).

4.1 Anpassung an Nährstoffmangel

Die Blattoberfläche stellt aufgrund des begrenzten Wasser- und Nährstoffangebotes einen unwirtlichen Lebensraum für humanpathogene Bakterien dar. Einige Humanpathogene sind jedoch in der Lage, unter diesen Bedingungen zu überleben, indem sie ihren Stoffwechsel verlangsamen und an die verfügbaren Nährstoffquellen anpassen. Dazu wird die Expression von Genen mit einer Funktion in Transportprozessen, Stoffwechsel und Energiehaushalt (z.B. in der Synthese ribosomaler RNA oder der Eisen-Homöostase) herunterreguliert (Fink et al., 2012). Gene, die in die Anpassung an Nährstoffmangel oder die Aufrechterhaltung der Zellintegrität involviert sind, werden hochreguliert (Martínez-Vaz et al., 2014). Neben einer allgemeinen Verlangsamung des bakteriellen Stoffwechsels kommt es zu einer Umstellung auf pflanzenspezifische Substrate. Durch Bildung entsprechender Enzyme können humanpathogene Bakterien sich diese pflanzlichen Kohlenstoffquellen, wie Saccharose und Raffinose, zu Nutze machen (Méric, Kemsley, Falush, Siggers, & Lucchini, 2013). Zudem steigern sie die Effizienz ihrer Nährstoffausnutzung. Die Fähigkeit zu Chemotaxis und Fortbewegung ermöglicht darüber hinaus eine aktive Nährstoffaufnahme. Einen weiteren Beitrag zum bakteriellen Überleben in der nährstoffarmen Phyllosphäre leistet die Bildung schützender Zellaggregate (Poza-Carrion, Suslow, & Lindow, 2013). Internalisierten, also endophytisch lebenden, Bakterien steht demgegenüber ein vergleichsweise großes Nährstoffangebot zur Verfügung. Um dieses nutzen zu können, müssen Endophyten jedoch die zur Verfügung stehenden Kohlenstoffquellen erschließen (siehe Abschnitt 4.4). Diese Mechanismen befähigen humanpathogene Erreger, sich an die begrenzte Nährstoffverfügbarkeit im pflanzlichen Lebensraum anzupassen.

4.2 Adhäsion

Die bakterielle Besiedlung einer Pflanze beginnt stets mit der Adhäsion der Bakterien an eine pflanzliche Oberfläche. Dies kann sowohl in der Phyllosphäre als auch in der Rhizosphäre geschehen. Die Adhäsion beruht auf unterschiedlichen Wechselwirkungen, an denen Curli, Fimbrien, Flagellen, Zellulose und Lipopolysaccharide beteiligt sein können (Tan, Rahman, & Dykes, 2016; Teplitski et al., 2011). So ist gezeigt worden, dass Gene, die Curli und aggregative Fimbrien kodieren (z.B. das agf-Operon in Salmonellen und die csg-Operone in *E. coli*) an der bakteriellen Adhäsion an Salat und Alfalfa-Samen beteiligt sind (Macarisin, Patel, Bauchan, Giron, & Sharma, 2012). Die Bedeutung von Curli und Fimbrien für die Kolonisierung der Wurzeln ist ebenfalls belegt (Hou, Fink, Sugawara, Diez-Gonzalez, & Sadowsky, 2013). Zusammen mit den O-Antigenen (Kohlenhydratseitenketten der Lipopolysaccharide in der äußeren Membran) bilden Curli, Fimbrien und Zellulose die extrazelluläre Matrix. Diese polymere Struktur dient der Biofilmbildung, dem Quorum Sensing sowie der Stresstoleranz (Barak, Jahn, Gibson, & Charkowski, 2007). Somit kommt der extrazellulären Matrix eine wichtige Funktion in der Besiedlung des pflanzlichen Wirtes zu.

4.3 Biofilmbildung

Biofilme sind Aggregate von Mikroorganismen (Bakterien, Pilzen, Algen und Protozoen), die von einer extrazellulären polymeren Matrix umgeben und an eine biotische oder abiotische Oberfläche gebunden sind (Mario Jacques, Aragon, & Tremblay, 2010). Sie schützen auch humanpathogene Bakterien vor schädlichen Umwelteinflüssen, wie Trockenheit, Bakteriophagen, Amöben und industriell angewendeten Bioziden (Costerton, Stewart, & Greenberg, 1999). Die Ausbildung eines Biofilms erfolgt in einem vierstufigen Prozess: (1) Sie beginnt mit dem initialen Kontakt, gefolgt von

(2) der Bindung der Mikroorganismen an die Oberfläche, (3) der Reifung des Biofilms und schließlich (4) der Dispersion oder Streuung der Mikroorganismen (Abb. 3). Während der Reifungsphase nimmt der Biofilm durch fortlaufende Proliferation und Produktion extrazellulärer Matrix (bestehend aus Exopolysacchariden) eine dreidimensionale Struktur an. In dieser Phase der Biofilmbildung werden konzertierte Veränderungen der Populationsdichte und der Genexpression über das Quorum Sensing System koordiniert (Walters & Sperandio, 2006). *Quorum Sensing* bezeichnet eine Kommunikationsform, die auf der Sekretion und Erkennung von Signalmolekülen (*Autoinducern*) beruht. Die weitere wissenschaftliche Aufklärung dieses Mechanismus könnte Ansatzpunkte zur Entwicklung von Dekontaminationsmaßnahmen aufzeigen.

Die anschließende Zerstreuung des Biofilms und die Verbreitung der Mikroorganismen, insbesondere die zugrunde liegenden molekularen und biochemischen Mechanismen, sind ebenfalls von großem wissenschaftlichem Interesse für die Lebensmittelsicherheit. Ein besseres Verständnis dieser Prozesse könnte die Entwicklung von Maßnahmen zur Beseitigung von Biofilmen im klinischen oder industriellen Umfeld entscheidend vorantreiben (Vogeleer, Tremblay, Mafu, Jacques, & Harel, 2014).

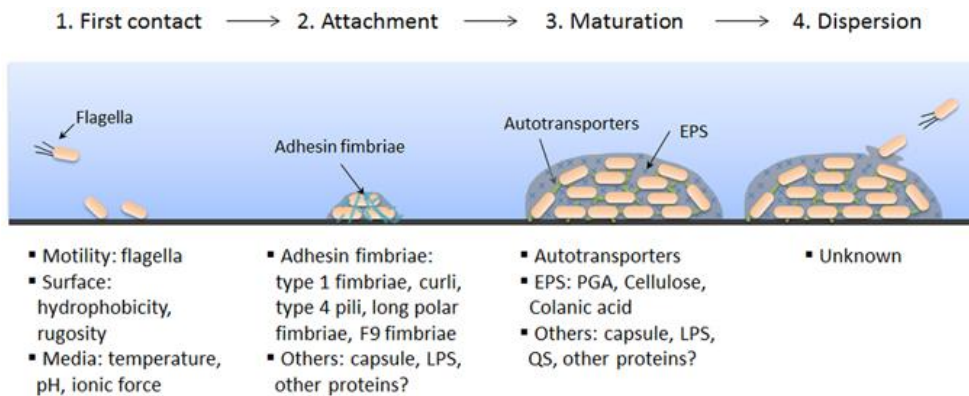


Abb. 3: Schematische Darstellung der Biofilmbildung bei Shiga-Toxin produzierenden *E. coli* (STEC). Die Biofilmbildung erfolgt in vier Schritten: (1) Initialer Kontakt, (2) Anhaftung, (3) Reifung und (4) Zerstreuung des Biofilms. Unter den vier Stadien sind jeweils die für STEC charakteristischen beteiligten Strukturen angegeben. PGA = Poly-N-Acetylglucosamin, EPS = Extrazelluläre Polymere Substanzen, LPS = Lipopolysaccharide, QS = Quorum Sensing (Vogeleer et al., 2014).

Die Bildung eines Biofilms wird durch Umweltbedingungen reguliert. Angeregt wird die Biofilmbildung durch verminderte Nährstoffverfügbarkeit, aerobe Bedingungen, niedrige Osmolarität und gemäßigte Temperaturen wie es für pflanzliche Oberflächen typisch ist (Gerstel & Römling, 2003). Bei 37°C hingegen, also unter Temperaturen, die im tierischen Wirt herrschen, bildet beispielsweise *S. Typhimurium* weder Zellulose noch Fimbrien (Tan et al., 2016).

Zur Rolle an der Biofilmbildung beteiligter Gene bei der Besiedlung frischer Produkte liegen widersprüchliche Ergebnisse vor. Die Fähigkeit zur Biofilmbildung geht bei verschiedenen *E. coli*- und *S. enterica*-Stämmen unter Laborbedingungen mit einer vermehrten Besiedlung pflanzlicher Oberflächen einher (Patel, Sharma, & Ravishakar, 2011). Andere Autoren berichten von einer Unterdrückung der Biofilmbildung während der Besiedlung pflanzlicher Habitate durch *E. coli* (Hou et

al., 2013). Unter realen Bedingungen eines gartenbaulichen Betriebes ist davon auszugehen, dass humanpathogene Erreger in Obst- und Gemüsekulturen auf ein bereits etabliertes Mikrobiom (zur Mikrobiomzusammensetzung und Interaktionsmechanismen siehe Kapitel 3) und eventuell bestehende Biofilme treffen (Fett, 2000). In diesem Fall könnten Proteine, denen eine Funktion in der Biofilmbildung zugeschrieben wird, die Integration humanpathogener Bakterien in bestehende Biofilme vermitteln (Martínez-Vaz et al., 2014).

Die beste Wirkung gegen Biofilme zeigen Dekontaminationsmethoden, die humanpathogene Bakterien im Biofilm abtöten und die Matrix des Biofilms von der Oberfläche lösen. Eine Kombination aus Wasserdampf und Milchsäure zeigte diese duale Wirkung auf bakterielle Pathogene (*E. coli* O157:H7) und Biofilmmatrix (Ban, Park, Kim, Ryu, & Kang, 2012). Die genaue Wirkungsweise von *Antibiofilm*-Molekülen, wie ätherischen Ölen, auf die Zerstreuung von Biofilmen ist bislang wenig verstanden und sollte eingehender untersucht werden. Ein weiterer Fokus sollte auf der Untersuchung gemischter Biofilme aus pathogenen und nicht-pathogenen Bakterienarten und -stämmen liegen (Vogeleer et al., 2014).

4.4 Internalisierung

Eine weitere Strategie von Bakterien, sich vor Umwelteinflüssen zu schützen und ihre Persistenz zu sichern, besteht in der Invasion von pflanzlichem Gewebe (Deering, Mauer, & Pruitt, 2012). Die Internalisierung von Bakterien kann sowohl unterirdisch durch die Wurzel als auch oberirdisch durch Öffnungen wie Stomata, Hydathoden, Lentizellen oder Gewebeschäden erfolgen (Deering et al., 2012). Nach Invasion des pflanzlichen Gewebes können Bakterien innerhalb der gesamten Pflanze transloziert werden. So hat eine Studie von Gu gezeigt, dass *S. Typhimurium* ausgehend vom Boden die gesamte Tomatenpflanze einschließlich der Früchte endophytisch besiedeln kann (G. Gu et al., 2011). Ein eindeutiger Nachweis der Aufnahme internalisierter Bakterien in den Symplasten steht nach Fornefeld jedoch noch aus (Fornefeld et al., 2015). Die Erreger verfügen über verschiedene Mechanismen, die ihnen erlauben, nach der Invasion pflanzliche Nährstoffquellen zu erschließen und so ihr Überleben im Pflanzeninneren zu sichern. Einer Hypothese von Deering zufolge sind im Apoplasten lebende Enterobakterien in der Lage, Polysaccharide der Zellwände abzubauen und als Kohlenstoffquelle zu nutzen (Deering et al., 2012). Die Internalisierung stellt ein komplexes Phänomen dar, das auf spezifische Bakterienstämme beschränkt zu sein scheint. Das Ausmaß der Internalisierung ist zudem von den experimentellen oder natürlichen Umgebungsbedingungen, der Jahreszeit und dem Genotyp der Wirtspflanze abhängig (Golberg, Kroupitski, Belausov, Pinto, & Sela, 2011; Martínez-Vaz et al., 2014). So zeigte eine Studie, in der das Vorkommen von *Salmonella Typhimurium* auf der Oberfläche und unter der Epidermis von Blättern verschiedener Gemüsesorten fluoreszenzmikroskopisch quantifiziert wurde, das höchste Maß an Internalisierung bei Rucolablättern ($88 \pm 16\%$) und Eisbergsalat ($81 \pm 16\%$), gefolgt von Basilikum ($46 \pm 12\%$), rotblättrigem Salat ($20 \pm 15\%$), Romanasalat ($16 \pm 16\%$), Petersilie ($1.9 \pm 3.3\%$) und Tomatenblättern ($0.56 \pm 1.36\%$, Golberg et al., 2011). Die Internalisierung humanpathogener Bakterien ist für die Lebensmittelsicherheit ein relevantes Phänomen, da internalisierte Erreger geschützt von pflanzlichem Gewebe eventuell angewandten Dekontaminationsmaßnahmen während der Verarbeitungsphase entgehen (M. C. Erickson, 2012).

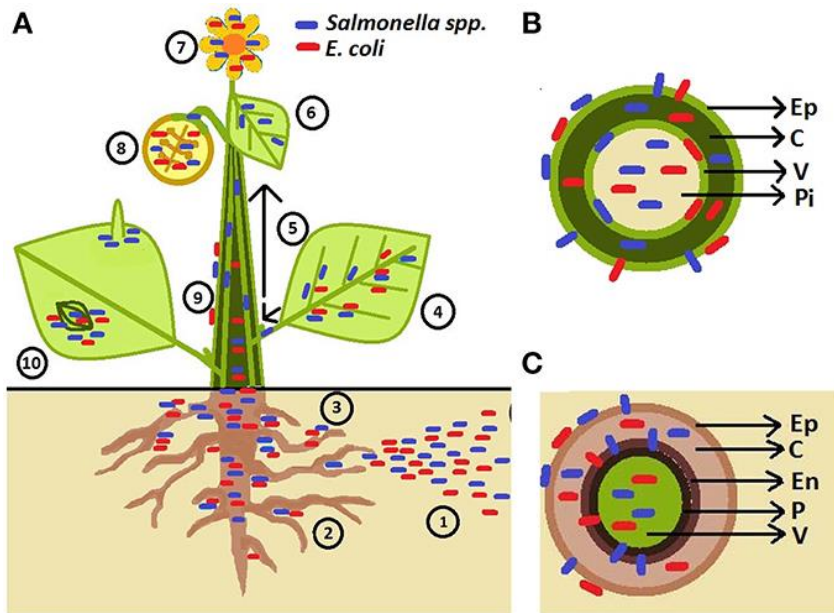


Abb. 4: Schematische Darstellung der Besiedlung einer Pflanze durch Humanpathogene. (A) Humanpathogene Krankheitserreger gelangen über Wasser, organische Düngemittel und Pestizide in den Boden (1). Humanpathogene werden von der Rhizosphäre angezogen (2) und dringen an empfindlichen Stellen, wie Wurzelbrüchen oder seitlichen Wurzelansätzen, in das Gewebe ein (3). Humanpathogene Erreger wurden auf der Blattoberfläche in der Nähe von Blattvenen, bevorzugt auf der abaxialen Seite des Blattes, und im Pflanzeninneren im Apoplasten (Interzellularraum) gefunden (4). *Salmonella enterica*, Serovar *Typhimurium*, kann über die Blätter in Tomatenpflanzen eindringen und über die Leitbündel (5) nicht-inokulierte Blätter (6) und Früchte (8) besiedeln. *Salmonella* kann ausgehend von infizierten Blättern (4), Sprossen (5) und Blüten (7) in das Innere der Früchte und in den Fruchtkelch (Calyx, 8) gelangen. Die Fortbewegung auf der Blattoberfläche ist ebenfalls beobachtet worden (9). Epiphytische *Salmonellen* und *E. coli* O157:H7 können in der Umgebung der Stomata aggregieren, in den substomatären Raum eindringen und das Schwammparenchym besiedeln (10). (B) Spross im Querschnitt. Bakterien besiedeln Epidermis (Ep), Cortex (C), Gefäßgewebe (V), Markröhre (Pi). (C) Wurzelquerschnitt mit Bakterien auf der Wurzeloberfläche, zwischen den Zellen der Epidermis und am äußeren und inneren Cortex, der Endodermis (En), dem Perizykel (P) und dem Gefäßsystem (Melotto, 2014).

4.5 VBNC-Zustand

VBNC, *viable but non-culturable*, bezeichnet einen Zustand, in dem Bakterien physiologisch aktiv, aber nicht kultivierbar sind. Die morphologischen und physiologischen Veränderungen im VBNC-Stadium stellen eine Anpassung an ungünstige Umweltbedingungen dar und dienen der Persistenz unter langfristigem Stress. Bakterien im VBNC-Stadium haben eine verminderte Stoffwechselaktivität (Oliver, 2005) und einen eingeschränkten Nährstofftransport, weisen jedoch gleichzeitig hohe ATP-Spiegel, ein hohes Membranpotential (Signoretto C., Lleo M., Tafi M.C., 2000) und eine fortbestehende Genexpression auf (Maalej, Denis, & Dukan, 2004). Morphologisch zeigen sie eine verminderte Zellgröße, die mit einer veränderten chemischen Zusammensetzung der Zellwand und der Membran einhergeht (Day & Oliver, 2004; Signoretto C., Lleo M., Tafi M.C., 2000). Gegenüber physikalischen und chemischen Stressoren weisen VBNC-Zellen möglicherweise infolge Folge der reduzierten Stoffwechselaktivität und der verstärkten Zellwände eine höhere Resistenz auf (Signoretto C., Lleo M., Tafi M.C., 2000). So zeigte eine 2013 publizierte Studie, dass *V. vulnificus* im VBNC-Stadium eine erhöhte Resistenz gegenüber Hitze, niedrigen pH-Werten, Ethanol, Antibiotika,

Schwermetallen sowie oxidativem und osmotischem Stress besitzt (Nowakowska & Oliver, 2013). Dennoch bleiben humanpathogene Bakterien im VBNC-Stadium virulent und können nach Aufnahme durch einen geeigneten Wirt rasch in den kultivierbaren Zustand zurückkehren. So können auch nicht-kultivierbare Erreger schwere Infektionen hervorrufen (Du et al., 2007).

Zu den externen Stressoren, die den VBNC-Zustand induzieren können, zählen nicht nur natürliche Umweltbedingungen, sondern auch antimikrobielle Substanzen und Methoden, die zur Behandlung von Infektionen und zur Desinfektion von Wasser und Oberflächen eingesetzt werden. Besonders kritisch ist die Beobachtung, dass zahlreiche Methoden der Lebensmittelsicherheit, beispielweise die UV-Behandlung von Trinkwasser und die Kühlung frischer Produkte, nachweislich das VBNC-Stadium induzieren können (Dinu & Bach, 2011; Nowakowska & Oliver, 2013; S. Zhang, Ye, Lin, Lv, & Yu, 2015). Ist das VBNC-Stadium einmal induziert, können eventuell angewendete Dekontaminationsmaßnahmen gegenüber diesen Erregern ihre Wirksamkeit verlieren (Martínez-Vaz et al., 2014). Eine noch größere hygienische Herausforderung stellen VBNC-Zellen als Bestandteile von Biofilmen dar (Vogeleer et al., 2014).

Die fehlende Kultivierbarkeit von Krankheitserregern im VBNC-Stadium führt insbesondere bei Verwendung der klassischen, kulturbasierten Nachweisverfahren zu einer Unterschätzung der Keimlast und somit zu einer Gefährdung der Lebensmittelsicherheit. Mit Hilfe alternativer Detektionsmethoden, die auf einem Nachweis pathogen-spezifischer Nukleinsäuren und Antigene beruhen, lassen sich Bakterien im VBNC-Stadium nachweisen. Nach Meinung einiger Autoren würde sich eine Weiterentwicklung der kulturbasierten Nachweistekniken für bislang nicht kultivierbare Mikroorganismen dennoch lohnen (T. F. Jones & Gerner-Smidt, 2012).

4.6 Resistenz gegenüber oxidativem Stress

Eine weitere entscheidende Eigenschaft, die Bakterien zur Besiedlung von Pflanzen befähigt, ist ihre induzierbare Resistenz gegenüber oxidativem Stress und eine effektive DNA-Reparatur. So zeigten pathogene *E. coli*-Stämme nach Exposition gegenüber einem Salat-Lysat eine starke Induktion von Genen, die an oxidativem Stress und DNA-Reparatur beteiligt sind. Salat-Lysate werden zur Simulation verletzten pflanzlichen Gewebes verwendet und enthalten erhebliche Konzentrationen an reaktiven Sauerstoffformen wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2 ; Kyle, Parker, Goudeau, & Brandl, 2010). Der Umgang mit diesem oxidativen Stress erfordert eine ausgeprägte bakterielle Stressreaktion. Einer Hypothese von Kyle et al. zufolge kann der Kontakt humanpathogener Bakterien mit reaktiven Sauerstoffformen aus verletztem pflanzlichem Gewebe die Erreger bereits auf eine spätere Behandlung mit oxidativen Desinfektionsmitteln (z.B. Calciumhypochlorit oder Wasserstoffperoxid) vorbereiten (zum Zulassungstatus von Desinfektionsmitteln in der Verarbeitung frischer Produkte siehe Abschnitt 7.2.3, Kyle et al., 2010). Dies würde ihre teils hohe Toleranz gegenüber oxidativen Desinfektionsmitteln erklären (Martínez-Vaz et al., 2014).

4.7 Typ-III-Sekretionssystem

Humanpathogene Bakterien sind in der Lage, das Immunsystem des Wirts mit Hilfe sogenannter Effektorproteine gezielt zu unterdrücken. Durch das Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) in die pflanzliche Zelle eingeschleust, hemmen diese Effektorproteine zentrale Bestandteile des Immunsystems, wie z.B. Erkennungsmechanismen oder Signalkaskaden (Fornfeld et al., 2015, 2017).

Ein Inokulationsversuch an *Arabidopsis* mit dem *S. Typhimurium* Wildtypstamm und Stämmen mit Mutationen in den Genen beider T3SS (*prgH*, *invA*, *ssaV* und *ssaJ*) zeigte, dass beide T3SS für eine erfolgreiche Besiedlung der Pflanzen erforderlich sind (A. Schikora et al., 2011; M. Schikora et al., 2012). Die T3SS-Mutanten ohne funktionierendes Typ-III-Sekretionssystem induzierten eine wesentlich stärkere pflanzliche Immunantwort und waren nicht in der Lage, diese zu unterdrücken (M. Schikora et al., 2012).

Entscheidend für die Suppression der Abwehrmechanismen und die erfolgreiche Besiedlung der Pflanze ist nicht das Typ-III-Sekretionssystem selbst, sondern die von ihm sezernierten Effektorproteine. Bei Salmonellen sind 40 solcher Proteine bekannt (Heffron, 2011). Die genaue Funktion der Effektorproteine humanpathogener Bakterien bei der Unterdrückung der pflanzlichen Abwehr ist noch relativ unklar. Von SpvC, einem Effektorprotein aus Salmonellen, ist jedoch bekannt, dass es als Phosphothreonin-Lyase fungiert, welche MAP(mitogen-activated protein)-Kinasen inaktiviert und so die pflanzliche Immunantwort unterdrückt (Mazurkiewicz et al., 2008). Der Besitz eines Typ-III-Sekretionssystems stellt im Hinblick auf die mikrobielle Sicherheit von Obst und Gemüse einen weiteren Risikofaktor dar.

4.8 Die Rolle mobiler genetischer Elemente

Je besser ein humanpathogener Erreger an seine pflanzliche Umwelt angepasst ist, umso länger ist er in Obst- und Gemüsekulturen persistent. Eine längere Überlebensfähigkeit auf frischen Produkten erhöht wiederum die Wahrscheinlichkeit einer Übertragung auf den Menschen. Beschleunigt wird die bakterielle Anpassung durch horizontalen Transfer von Genen, beispielsweise aus wasser- oder bodenlebenden Mikrobengesellschaften in humanpathogene Bakterien (Van Overbeek et al., 2014). Der horizontale Gentransfer erfolgt durch Übertragung mobiler und mobilisierbarer genetischer Elemente. Dies können Bakteriophagen, Plasmide, Transposons, Integrons oder Pathogenitätsinseln sein (Fornfeld et al., 2015). Der häufigste Mechanismus der Übertragung von Pathogenitätsfaktoren besteht in einer Transduktion (Übertragung bakterieller DNA durch einen Bakteriophagen) oder lysogenen Konversion (Infektion eines Bakteriums mit einem Bakteriophagen, dessen DNA ins Wirtsgenom integriert wird; Van Overbeek et al., 2014). Auf diese Weise können humanpathogene Erreger mit gesteigerter Persistenz, Pathogenität und Resistenz entstehen (Brzuszkiewicz et al., 2011; Ghigo, 2001). Die Rhizosphäre könnte neben dem menschlichen und tierischen Magen-Darm-Trakt einen weiteren Hotspot des horizontalen Gentransfers darstellen (Stecher et al., 2012; Van Overbeek et al., 2014).

Ein Beispiel für die Bedeutung mobiler genetischer Elemente für die Fitness und Pathogenität humanpathogener Erreger ist der *E. coli* O104:H4-Stamm, der im Jahr 2011 einen der größten durch frische Produkte bedingten Ausbrüche in Deutschland verursachte (Brzuszkiewicz et al., 2011). Das Genom des Ausbruchsstamms entstand durch Aufnahme mehrerer mobiler genetischer Elemente. Diese bislang einzigartige Kombination von Pathogenitätsdeterminanten enteroaggregativer (EAEC) und enterohämorrhagischer (EHEC) *E. coli*-Stämme wird von vielen Autoren als enteroaggregativer-hämorrhagischer *E. coli* (EAHEC) bezeichnet (Brzuszkiewicz et al., 2011). Für die hohe Pathogenität des Ausbruchsstamms ist ein Shiga-Toxin kodierender Prophage verantwortlich, der charakteristisch für EHEC-Stämme ist. Zudem trägt der *E. coli* O104:H4-Stamm ein Inc11-Plasmid, das β -Laktamasen (extended spectrum β -lactamases, ESBL) kodiert und Resistenz gegenüber β -Laktam-Antibiotika der dritten Generation vermittelt. Der Stamm besitzt darüber hinaus ein IncF11IA-Plasmid, das Fimbrien

kodiert (Brzuszkiewicz et al., 2011). Diese dienen den Bakterien zur Anhaftung an die Darmschleimhaut.

Mobile genetische Elemente können humanpathogenen Bakterien neben Pathogenitätseigenschaften und Antibiotikaresistenzen auch eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegen Desinfektionsmittel, Schwermetalle und UV-Strahlung sowie die Fähigkeit zur Biofilmbildung vermitteln (Fornfeld et al., 2015). Auf diese Weise trägt der horizontale Gentransfer neben der natürlichen Selektion zur Anpassung an die harschen Umweltbedingungen auf pflanzlichen Oberflächen und zur Resistenz gegenüber Dekontaminationsmaßnahmen bei (Smalla, Jechalke, & Top, 2015). Um die mikrobielle Sicherheit pflanzlicher Lebensmittel zu gewährleisten, müssen neu entstandene Krankheitserreger, die eine potentielle Bedrohung der Lebensmittelsicherheit darstellen, rasch erkannt werden. Ein engmaschiges Monitoring mit frischen Produkten assoziierter Krankheitserreger hinsichtlich neu erworbener Persistenz-, Pathogenitäts- und Resistenzeigenschaften ist daher zu empfehlen (P. Noguera et al., 2011; P. S. Noguera et al., 2011). Die Verbreitung der Hochdurchsatztechniken wird ein effizienteres Screening von Humanpathogenen ermöglichen (Van Overbeek et al., 2014).

5 Pflanzliche Abwehrmechanismen gegen Mikroorganismen

Pflanzen verfügen über eine Vielzahl von spezifischen und unspezifischen Abwehrmechanismen gegen Mikroorganismen. Diese können konstitutiv vorhanden oder induzierbar sein (Y. Gu, Zavaliev, & Dong, 2017; Neilson, Goodger, Woodrow, & Møller, 2013; Nürnberger & Lipka, 2005):

- Konstitutiv
 - Physische Barrieren (z. B. Zellwand, Kutikula)
 - Chemische Barrieren (z. B. Exsudate)
- Induzierbar
 - Produktion von Phytoalexinen (z. B. Isoflavone, Sesquiterpene)
 - Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Superoxidanionen, Hydroxyl-Radikale, Wasserstoffperoxid)
 - Polarisierter Sekretion (z. B. antimikrobielle Substanzen, Abwehrproteine)
 - Hypersensitive Reaktion / Apoptose.

Zum Aufbau einer konstitutiven chemischen Barriere tragen unter anderem pflanzliche Exsudate bei. Diese Exsudate beeinflussen auch die Etablierung humanpathogener Erreger auf pflanzlichen Oberflächen. Durch Ausscheidung spezifischer Substanzen können Pflanzen die Vermehrung bestimmter Bakterienstämme auf ihrer Oberfläche fördern oder hemmen. In einer Studie von Han und Micallef wurden von verschiedenen Tomaten-Kultivaren mit unterschiedlicher Anfälligkeit für eine Salmonellen-Besiedlung Proben von Wurzel-, Sproß- und Frucht-Exsudaten genommen. Zucker, Zuckeralkohole und organische Säuren waren mit einer gesteigerten Vermehrung von *S. enterica* assoziiert. Fettsäuren hingegen zeigten einen negativen Effekt auf die Salmonellenvermehrung. Dieser Metabolomics-Ansatz stellt eine weitere Untersuchungsebene der Pflanze-Pathogen-Interaktion dar. Ein besseres Verständnis dieser Wechselwirkungen könnte die Identifikation oder Züchtung besiedlungsresistenter Kultivare ermöglichen. Dies wäre eine neue Strategie zur Verbesserung der mikrobiellen Sicherheit frischer Produkte (Han & Micallef, 2016).

Zu den induzierbaren Abwehrmechanismen gehören unter anderem pflanzliche Immunantworten. Diese werden durch Erkennung Pathogen-assoziiertes molekularer Muster (pathogen associated molecular patterns, PAMP) mittels pflanzlicher Rezeptoren (pattern-recognition receptors, PRRs) ausgelöst. Man spricht von *PAMP-triggered immunity* (PTI). Bei molekularen Mustern handelt es sich je nach Bakterienstamm um Flagellin- oder Curli-Proteine, Lipopolysaccharide oder extrazelluläre polymere Substanzen. Wird beispielsweise ein PAMP humanpathogener Salmonellen erkannt, erfolgt die Signaltransduktion unter Beteiligung von MAPK-Kaskaden, Salicylsäure, NPR1, Jasmonsäure und Ethylen. In der Folge werden pflanzliche Abwehrreaktionen aktiviert, beginnend mit der Induktion Abwehr-assoziiertes Gene, über die Alkalinisierung des extrazellulären Raumes und die Produktion reaktiver Sauerstoffformen, bis zum Verschluss der Stomata, zur hypersensitiven Reaktion und Apoptose. Diese Reaktionen sind jedoch hochgradig Art- bzw. Stamm-spezifisch (Melotto, 2014). Wird die PTI von Bakterien durch Sekretion von Effektorproteinen mit Hilfe des Typ-III-Sekretionssystems unterdrückt, können die Effektorproteine von der Pflanze erkannt werden und eine *effector-triggered immunity* (ETI) auslösen (Dodds & Rathjen, 2010).

6 Eintragswege und Persistenz humanpathogener Erreger

Angesichts der hohen Umweltpersistenz zahlreicher humanpathogener Erreger sind diese in verschiedenen Überträgermedien überlebensfähig und können in allen Phasen der Produktion und Verarbeitung auf frische Produkte gelangen. Im Folgenden werden daher die möglichen Quellen und Eintragswege humanpathogener Bakterien und Viren in Gemüsekulturen während der Vorernte- und Ernte- (siehe Abschnitt 6.1) sowie der Nacherntephase (siehe Abschnitt 6.2) dargestellt.

Dazu werden überwiegend Studien an Salmonellen als Vertreter humanpathogener Bakterien und auf Noroviren als Vertreter humanpathogener Viren herangezogen. Diese Auswahl basiert auf Risikobewertungen der EFSA und der FAO/WHO, auf die in Abschnitt 2 detaillierter eingegangen wird. Beiden Krankheitserregern ist gemeinsam, dass sie über den fäkal-oralen Infektionsweg übertragen werden. Ein großer Unterschied besteht jedoch in der Wirtsspezifität. Reservoir humanpathogener Noroviren ist fast ausschließlich der Mensch, während humanpathogene Salmonellen-Serovare, wie *S. typhimurium* und *S. enteritidis*, ein breites Wirtsspektrum haben und neben dem Menschen auch eine Vielzahl von Nutz- und Wildtieren besiedeln können (Silva, Calva, & Maloy, 2014).

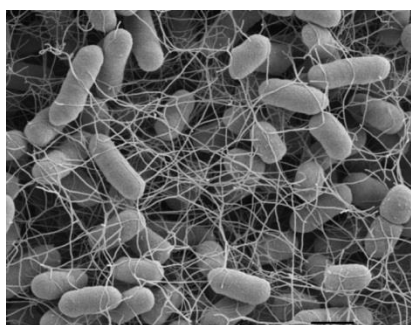


Abb. 5: *Salmonella typhimurium* unter dem Elektronenmikroskop (Quelle: RKI)

Zur Gattung *Salmonella* (Familie: Enterobacteriaceae) gehören stäbchenförmige gramnegative Bakterien (Abb. 5). Die Untergruppe der Enteritis-Salmonellen, wie *Salmonella enterica* Ssp. *enterica* Ser. *Enteritidis* und *Salmonella enterica* Ssp. *enterica* Ser. *Typhimurium*, verursachen beim Menschen Durchfallerkrankungen. In der Regel heilen diese spontan aus, bei Risikogruppen wie Säuglingen, Senioren und immungeschwächten Patienten können jedoch schwere generalisierte Infektionen hervorgerufen werden. Salmonellosen zählen zu den Zoonosen, da sie zwischen Tier und Mensch übertragbar sind. Zwischen 2007 und 2011 waren EU-weit jährlich drei bis zwölf Salmonellen-Ausbrüche zu verzeichnen (EFSA Panel on Biological Hazards, 2013).

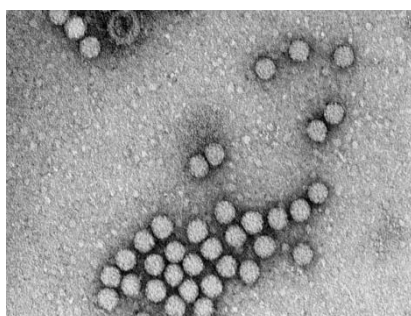


Abb. 6: Noroviren unter dem Elektronenmikroskop (Quelle: RKI)

Die Gattung Norovirus (Familie: Caliciviridae) umfasst unbehüllte RNA-Viren mit einem ikosaedrischen (zwanzigflächigen) Kapsid und annähernd runder Form (Abb. 6). Noroviren werden genetisch in fünf verschiedene Genogruppen (GI - GV) eingeteilt, von denen die Gruppen GI, GII und GIV Menschen infizieren können. Humanpathogene Noroviren verursachen beim Menschen virale Gastroenteritiden (Brechdurchfälle). Die Ausbruchsinzidenz durch Noroviren schwankte im Zeitraum 2007 - 2015 EU-weit zwischen drei und 36 Ausbrüchen im Jahr (EFSA Panel on Biological Hazards, 2013, Zoonose-Monitoring 2007-2015).



Abb. 7: Salatfeld (Quelle: Autoren)

Zu den roh verzehrbaren Blattgemüsesorten zählen vor allem Salatartige (*Lactuca sativa*, *Cichorium endivia*, *Beta vulgaris*, *Valerianella locusta*, *Cichorium intybus*, *Eruca vesicaria* subsp. *Sativa* und *Spinacia oleracea*), aber auch blättrige *Brassica rapa*- und *Brassica oleracea*-Sorten, kopfbildende *Brassica oleracea*-Sorten, *Cichorium intybus*-Sorten und *Nasturtium officinale*-Sorten (Abb. 7, EFSA Panel on Biological Hazards, 2014)

6.1 Vorernte- und Erntephase

Während der Produktion und der Ernte ist das mikrobielle Kontaminationsrisiko von umweltbedingten Faktoren sowie von Kultur- und Erntebedingungen abhängig (Abb. 8).

Zu den relevanten Umweltfaktoren zählen

- die Nutzung der angrenzenden Flächen und die frühere Nutzung der Anbaufläche (siehe Abschnitt 6.1.1),
- die Klimabedingungen (siehe Abschnitt 6.1.2) sowie
- der direkte oder indirekte Kontakt mit Wildtieren (siehe Abschnitt 6.1.3).

Zu den Kultur- und Erntebedingungen gehören

- das Saatgut (siehe Abschnitt 6.1.4),
- die Kulturart und -sorte (siehe Abschnitt 6.1.5),
- die organischen Düngemittel (siehe Abschnitt 6.1.6),
- das Wasser (6.1.7),
- die Erntewerkzeuge und -geräte (siehe Abschnitt 6.1.8) sowie
- die Erntearbeiter (siehe Abschnitt 6.1.9, Europäische Kommission, 2017).

6.1.1 Nutzung der angrenzenden Flächen und frühere Nutzung der Anbaufläche

Die räumliche Nähe einer Anbaufläche zu Tierställen erhöht das Risiko einer mikrobiellen Kontamination der Produkte. Die Erreger können direkt oder indirekt durch Abflüsse und Aerosole aus der Tierhaltung oder über Wildtiere als Vektoren (z.B. Vögel, Nagetiere und Fliegen) übertragen werden (Maria T Brandl, 2006; FAO Committee on Agriculture, 2003). Dies belegen zwei *E. coli* O157-Ausbrüche durch Blattgemüse, die auf eine nahe gelegene Rinderzucht zurückgeführt wurden (Jay et al., 2007; Soderstrom et al., 2008). Den Grundsätzen der Lebensmittelhygiene des Codex Alimentarius zufolge soll der Anbau von Obst und Gemüse daher nicht in der Nähe von Tierhaltungseinrichtungen betrieben werden (CAC, 2003).

Neben der Nutzung der angrenzenden Flächen ist auch die frühere Nutzung einer Anbaufläche ein entscheidender Einflussfaktor für die mikrobielle Belastung des Bodens. Wie eine Anbaufläche in der Vergangenheit genutzt wurde, lässt sich rückwirkend jedoch oft nicht vollständig aufklären. In diesem Zusammenhang spielt die mikrobielle Persistenz eine wichtige Rolle.

6.1.2 Klimabedingungen

Hohe Temperaturen steigern die Vermehrungsraten der meisten Bakterienarten (Park et al., 2012). Zudem haben sie einen positiven Effekt auf potentiell Pathogen-übertragende Insektenpopulationen. Meist gehen erhöhte Temperaturen jedoch gleichzeitig mit einer gesteigerten UV-Strahlung einher, welche die bakterielle und virale Belastung von Boden und Produkten wiederum vermindert (Maatouk, Zaafrane, Gauthier, & Bakhrouf, 2004).

Regen steigert das Risiko einer Kontamination von Blattgemüse durch verspritzte Boden- und Düngerpartikel (Cevallos-Cevallos, Danyluk, Gu, Vallad, & van Bruggen, 2012). Häufige und starke Regenfälle können zudem zu einer Kontamination von Grund- und Oberflächenwasser durch Zufluss

mikrobiell belasteter Abwässer aus Landwirtschaft, Haushalten und Industrie führen (Solomon et al., 2007). Dies führt zu einem weiteren Anstieg des Kontaminationsrisikos.

Extreme Wetterereignisse nehmen im Zuge des globalen Klimawandels zu und werden sich nach Meinung vieler Autoren auf mikrobielle Kontaminationsquellen und -wege auswirken. So können wechselnde Phasen von Überschwemmung und Wasserknappheit lokal zu einer erhöhten Keimlast in Böden und Gewässern führen und das mikrobielle Kontaminationsrisiko für Gemüsekulturen steigern (Liu, Hofstra, & Franz, 2013; Tirado, Clarke, Jaykus, McQuatters-Gollop, & Frank, 2010). Wie eine Untersuchung von Castro-Ibañez zeigte, wiesen Salatpflanzen nach Überschwemmungen eine erhöhte Salmonellenbelastung auf (Castro-Ibañez, Gil, & Allende, 2013).

Das Wechselspiel der verschiedenen klimatischen Einflussfaktoren ist jedoch komplex und noch nicht ausreichend aufgeklärt.

6.1.3 Wildtiere

Humanpathogene Salmonellen-Serovare, wie *S. typhimurium* und *S. enteritidis*, besiedeln ein breites Wirtsspektrum (Liebana et al., 2003). Sie sind bereits aus einer Vielzahl von Wildtieren isoliert worden, darunter Wildschweine (Zottola et al., 2013), Hirsche, Rehe, Vögel (Kruse, Kirkemo, & Handeland, 2004; Lawson et al., 2010), Kaninchen (Vieira-Pinto et al., 2011), Ratten (Lapuz et al., 2008) und Insekten (Pava-Ripoll, Pearson, Miller, & Ziobro, 2012). Dieses vielfältige Wirtsspektrum fördert das Überleben und die Ausbreitung der Bakterien im Ökosystem (Silva et al., 2014). So ist beispielsweise eine Salmonellen-Übertragung von tierischen Abfällen über Milben auf Hühner nachgewiesen worden (Silva et al., 2014). Bislang konnten aber nur wenige Fälle von Lebensmittelkontaminationen zu Wildtieren zurückverfolgt werden. Ein Beispiel ist der Nachweis einer bakteriellen Übertragungskette von Eidechsen über Rucolasalat auf den Menschen (Sagoo, Little, Ward, Gillespie, & Mitchell, 2003).

6.1.4 Saatgut

Salmonella enterica kann auf Kopfsalatsamen zwei Jahre überdauern und nach der Keimung die Jungpflanze besiedeln, wie eine Untersuchung von Van der Linden zeigte (Van der Linden et al., 2013). Es wird angenommen, dass die Kontamination der Samen direkt durch die Spreu oder durch Invasion der Blüte oder Schote erfolgt (Cooley, Miller, & Mandrell, 2003). Bislang liegen jedoch keine Berichte von Salmonellen-Kontaminationen von Blattgemüse durch mikrobiell belastetes Saatgut vor.

Eine hohe Persistenz auf Saatgut zeigen auch Viren. Murine Noroviren (MNV) und Tulane-Viren (TV), die als Surrogat-Organismen stellvertretend für Noroviren untersucht wurden, erwiesen sich nach 50 Tagen auf der Oberfläche von Alfalfa-Samen noch als infektiös. Nach der darauffolgenden siebentägigen Keimungsphase waren die Erreger in allen Geweben der Jungpflanze nachweisbar (Wang, Hirneisen, Markland, & Kniel, 2013).

6.1.5 Kulturart und -sorte

Morphologie und Physiologie einer Kulturart und -sorte bestimmen maßgeblich das Kontaminationsrisiko. Blattgemüse ist aufgrund seiner morphologisch bedingten Bodennähe besonders anfällig für eine mikrobielle Kontamination (Hamilton, Stagnitti, Premier, Boland, & Hale, 2006). Struktur und Textur einer Blattoberfläche spielen eine große Rolle für die Adhäsion bakterieller und viraler Erreger sowie für die Wirksamkeit von Waschvorgängen oder

Dekontaminationsmaßnahmen (Crawford, Webb, Truong, Hasan, & Ivanova, 2012; Hirneisen & Kniel, 2013; Takeuchi & Frank, 2001). Je rauer und unregelmäßiger die Oberfläche eines Produktes, umso länger können Viren daran anhaften (Hirneisen & Kniel, 2013).

Neue Ansätze, durch Züchtung die Adhärenz und Persistenz humanpathogener Bakterien und Viren zu beeinflussen, werden in Abschnitt 7.1.9 erläutert.

6.1.6 Kultursystem

Blattgemüse kann in unterschiedlichen Kultursystemen angebaut werden: erdegebunden, substratgebunden oder erdelos (hydroponisch). Pflanzen in hydroponischer Kultur zeigten in der Nacherntephase eine geringere mikrobielle Besiedlung und eine langsamere bakterielle Vermehrung als Pflanzen, die in Erde kultiviert wurden (Selma et al., 2012). Studien zeigen jedoch, dass in hydroponischen Kultursystemen sowohl bakterielle als auch virale Krankheitserreger aus dem Medium über die Wurzel in die Pflanze aufgenommen werden können (Sharma et al., 2009; Sirsat & Neal, 2013). Ob die Internalisierungsrate in hydroponischen gegenüber erdegebundenen Systemen erhöht ist, bleibt zu untersuchen (Sharma et al., 2009). Der Erhalt der Wasserqualität ist somit eine entscheidende Voraussetzung für die mikrobielle Sicherheit hydroponischer Anbausysteme (WHO / FAO, 2008). Das Wasser sollte daher seiner Qualität entsprechend aufbereitet und regelmäßig ausgetauscht werden (Gil et al., 2013). Ein Vergleich der mikrobiellen Belastung frischer Produkte im Gewächshaus- und Freilandanbau zeigte zudem, dass die Anbaupraktiken im Freiland ein größeres Risiko fäkaler Kontaminationen bergen (Kevin Holvoet, Sampers, Seynnaeve, Jacxsens, & Uyttendaele, 2015).

6.1.7 Organische Düngemittel

Organische Düngemittel tierischen Ursprungs stellen einen potentiellen Eintragsweg enterischer Bakterien wie Salmonellen dar. Im Hinblick auf humanpathogene Noroviren besteht praktisch kein Kontaminationsrisiko, da die Erreger auf den menschlichen Wirt beschränkt sind und in tierischen Düngemitteln in der Regel nicht vorkommen (D. Li, De Keuckelaere, & Uyttendaele, 2015). Die Gefahr einer bakteriellen Kontamination ist von der Art des Düngers, seiner Aufbereitung und vom zeitlichen Abstand zwischen Düngung des Bodens und Auspflanzung des Blattgemüses abhängig (Blaiotta, Di Cerbo, Murru, Coppola, & Aponte, 2016; EFSA Panel on Biological Hazards, 2014).

Die Art des tierischen Düngemittels, aber auch der Bodentyp bestimmen die mikrobielle Besiedlung und Persistenz (Roberts, Bailey, McLaughlin, & Brooks, 2016). In einer britischen Studie, die Gülle- und Mistproben unterschiedlicher Nutztierarten mikrobiologisch untersuchte, schwankte der prozentuale Anteil Salmonellen-belasteter Proben je nach Tierart zwischen fünf und 18% (Hutchison, Walters, Avery, Syngé, & Moore, 2004). Die Persistenz von Salmonellen war in Geflügeldung höher als in Rinderdung (Nyberg, Vinnerås, Ottoson, Aronsson, & Albiñ, 2010).

Eine fachgerechte Behandlung tierischer Düngemittel sowie die Einhaltung der geltenden Fristen zwischen Düngung und Auspflanzung kann das Kontaminationsrisiko für Blattgemüse erheblich senken (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014). Diese Maßnahmen werden im Abschnitt 7.1.5 detaillierter beschrieben.

Klärschlamm enthält als einziges organisches Düngemittel menschliche Exkremente und kann folglich mit Noroviren belastet sein (D. Li et al., 2015). Werden die vorgeschriebenen Fristen (siehe Abschnitt

7.1.5) eingehalten, kann das Kontaminationsrisiko jedoch auf ein akzeptables Maß gesenkt werden (Bundesregierung, 1992; Deutscher Bundestag, 2017; EWG, 1986).

Experimentell ist die Möglichkeit einer Übertragung von Salmonellen und Noroviren aus organischem Dünger auf Blattgemüse bereits mehrfach nachgewiesen worden (Arthurson, Sessitsch, & Jäderlund, 2011; Wei, Jin, Sims, & Kniel, 2010). Infektionsausbrüche durch Salmonellen oder Noroviren konnten bislang jedoch nicht auf kontaminierten organischen Dünger zurückgeführt werden (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014; D. Li et al., 2015). Grund hierfür ist wahrscheinlich, dass Düngemittel normalerweise einige Wochen vor der Ernte ausgebracht werden und zum Zeitpunkt eines Ausbruchs nicht mehr für Untersuchungen zur Verfügung stehen.

6.1.8 Wasser

Zur Bewässerung, Pestizidanwendung oder Reinigung von Geräten verwendetes Wasser gilt als einer der größten Risikofaktoren einer mikrobiellen Kontamination von Blattgemüse in der Produktionsphase (Gil et al., 2013). Dies bestätigt auch eine aktuelle Studie, der zufolge Wasser häufiger als Erde mit Salmonellen, STEC, *Campylobacter* und generischen *E. coli* belastet ist (Jacxsens, Uyttendaele, Luning, & Allende, 2017). Die Kontaminationsgefahr durch das Wasser ist abhängig von (1) der Wasserquelle, (2) der Bewässerungstechnik, (3) den angewendeten Pflanzenschutzmaßnahmen und (4) Wetterereignissen wie starken Regenfällen.

Die Wahl der Wasserquelle bestimmt maßgeblich die Qualität des Wassers und somit das Kontaminationsrisiko. Die höchste Qualität hat Trinkwasser, gefolgt von Regenwasser, Grundwasser, Oberflächenwasser und geklärtem Abwasser (Uyttendaele et al., 2015). Am häufigsten wird in Europa Oberflächenwasser aus Flüssen und Seen, Brunnen- und Regenwasser sowie Trinkwasser verwendet (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014). Letzteres insbesondere in hydroponischen Kultursystemen. Oberflächenwasser kann jedoch eine erhebliche mikrobielle - vor allem virale - Belastung aufweisen (Tabelle 2, Walter, 2000; López-Gálvez et al., 2016). Fäkale virale Verunreinigungen von Oberflächen- und Grundwasser sind vor allem menschlichen Ursprungs, wie eine aktuelle Studie zur Wasserqualität in der Produktion von Blattgemüse und Beeren an verschiedenen europäischen Standorten zeigt (Petros Kokkinos, 2017). Die Bewässerung stellt somit insbesondere im Hinblick auf humanpathogene Viren einen wichtigen Übertragungsweg dar. Oberflächenwasser sollte daher nicht ohne vorgerige Aufreinigung verwendet werden (Gil et al., 2013).

Das Vorkommen enterischer Viren in Wasser unterschiedlicher Quellen ist einer niederländischen Studie zufolge mit ihrer hohen Umweltpersistenz und ihrer Beständigkeit gegenüber den gängigen Verfahren der Abwasseraufbereitung, dem mangelhaften Zustand der Kanalisation und unkontrollierten Verbreitungsquellen zu erklären (Hijnen, Brouwer-Hanzens, Charles, & Medema, 2005).

Tab. 2: Viruskonzentrationen in Oberflächenwasser und Abwasser in MPN (most probable number) oder PFU (plaque forming unit) pro Liter (ohne Berücksichtigung der Wiederfindungsraten der Nachweismethoden, Walter, 2000)

Abwasser roh	Abwasser gereinigt	Oberflächenwasser	Referenzen
		0,2 – 60 (0 – 180)	(Hughes, Coyle, & Connolly, 1992)
		7,5 (0,3 – 52,3)	(Johl, Kerkmann, Kramer, & Walter, 1991)
		13 - 192	(Tani et al., 1992)
		13,3	(Hahn & Botzenhart, 1991)
		1,2 (0 – 14,4)	(Walter et al., 1989)
	89 ± 188		(Hahn & Botzenhart, 1991)
	41 ± 79		(Hahn & Botzenhart, 1991)
	0 – 9,6		(Schwartzbrod, Lucena, & Finance, 1979)
36 – 4.600			(Schwartzbrod et al., 1979)
120 – 9.140			(Slade, 1982)

Neben der Wasserqualität spielt auch die Bewässerungstechnik eine entscheidende Rolle. Bewässerungssysteme, die das Wasser in direkten Kontakt mit den essbaren oberirdischen Pflanzenorganen bringen und solche, die das Wasser über größere Distanzen verbreiten, bergen das höchste Kontaminationsrisiko (Fonseca, Fallon, Sanchez, & Nolte, 2011).

Werden Pestizidlösungen mit kontaminiertem Wasser angesetzt, stellt auch dies einen potentiellen Eintragungsweg humanpathogener Erreger in Gemüsekulturen dar. Wie Studien zeigen, sind sowohl Salmonellen als auch Noroviren in einigen Pflanzenschutzmitteln über längere Zeit persistent (S.W. Stine, Song, Choi, & Gerba, 2011; Verhaelen, Bouwknecht, Rutjes, & de Roda Husman, 2013).

Nach starken Regenfällen, die zum Abfluss unbehandelten Abwassers führen, ist die Konzentration fäkaler Indikatorkeime in Oberflächenwasser häufig erhöht (Dorner et al., 2007). In US-amerikanischen Flüssen wurden nach vermehrten Niederschlägen deutlich erhöhte *E. coli*-Konzentrationen gemessen (Schilling, Zhang, Hill, Jones, & Wolter, 2009).

6.1.9 Erntewerkzeuge und -geräte

Sämtliche Erntewerkzeuge und -geräte, die in direkten Kontakt mit den Ernteprodukten kommen, stellen ein Übertragungsrisiko dar (Y. Yang, Luo, Millner, Turner, & Feng, 2012). Besonders kritisch sind die ersten Weiterverarbeitungsschritte noch auf dem Feld, beispielsweise das Entfernen der äußeren Blätter. Dabei können humanpathogene Erreger durch Schneidewerkzeuge vom Boden auf Salatpflanzen übertragen werden, wie Studien von McEvoy und Yang zeigen (McEvoy, Luo, Conway, Zhou, & Feng, 2009; Y. Yang et al., 2012). Mechanische Erntemaschinen, Sammelbehälter und Förderbänder bergen das Risiko einer Kreuzkontamination (Izumi, Tsukada, Poubol, & Hisa, 2008;

Johnston et al., 2006). Ausgehend von einer oder wenigen Pflanzen können durch Kreuzkontaminationen ganze Chargen mikrobiell kontaminiert werden.

Eine weitere Kontaminationsgefahr stellt die Vakuumkühlung dar, die zur raschen Kühlung der Ernteprodukte eingesetzt wird. Riskant ist zum einen das Besprühen mit Wasser, zum anderen der Unterdruck, der das Eindringen bakterieller und viraler Erreger ins pflanzliche Gewebe begünstigt (H. Li, Tajkarimi, & Osburn, 2008; Ranjbaran & Datta, 2017).

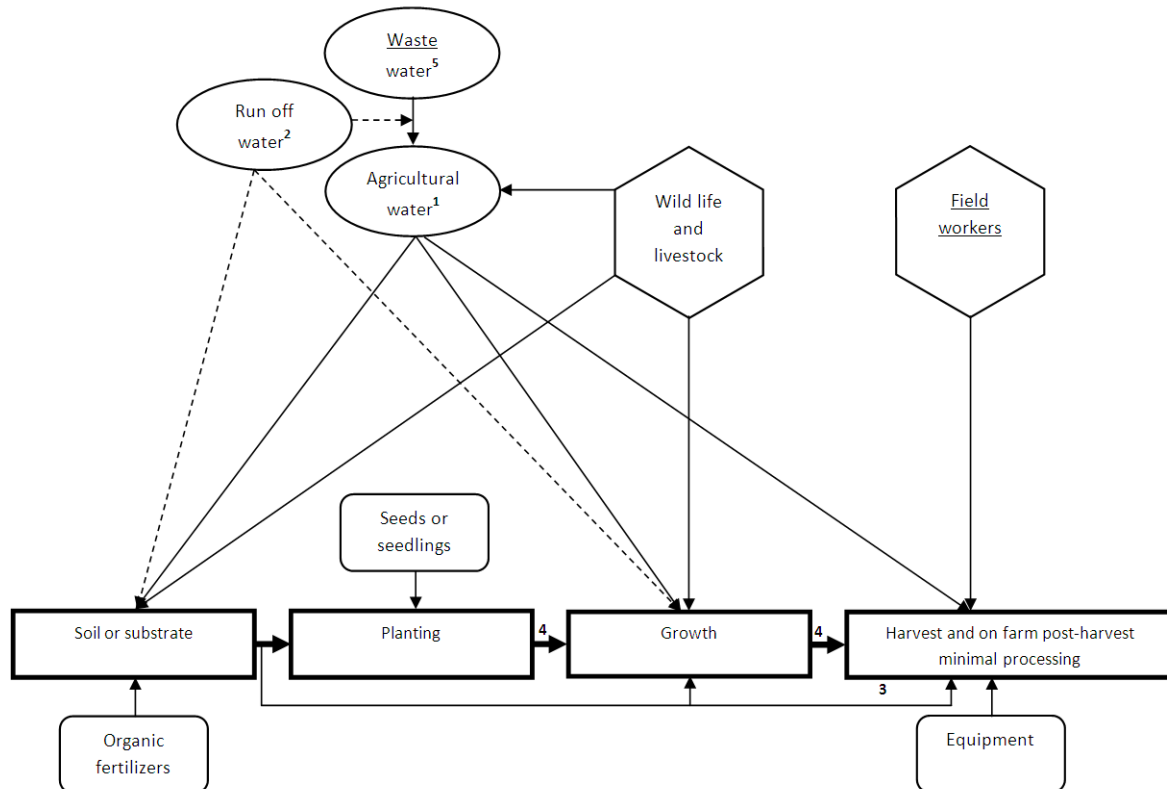


Abb. 8: Übersicht der Hauptrisikofaktoren in der Primärproduktion und Ernte von Blattgemüse. Unterstrichene Risikofaktoren haben eine besondere Relevanz für Noroviren. Durchgezogene Pfeile beziehen sich auf mögliche Kontaminationswege von Blattgemüse. Gestrichelte Pfeile kennzeichnen Möglichkeiten, eines gesteigerten Kontaminationsrisikos. Dicke Linien markieren den Produktionsprozess von Blattgemüse, dünne Linien mögliche Kontaminationsquellen. (1) Bewässerung, Pestizidlösungen, Waschen des Ernteproduktes. (2) Der Transfer von Humanpathogenen aus Tierhaltung, tierischen Exkrementen, Abwasser und kontaminiertem Boden auf Blattgemüse kann durch Überschwemmung, Abfluss und starke Regenfälle gesteigert werden. (3) Die Übertragung von Humanpathogenen aus dem Boden auf Blattgemüse kann bei der Ernte erhöht sein. (4) Anhaftung und Internalisierung von humanpathogenen Erregern in Blattgemüse. (5) Unzureichende Reduktion der Keimlast im Abwasser (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014).

6.1.10 Erntearbeiter

Infizierte Erntearbeiter stellen insbesondere im Hinblick auf Noroviren eine der wichtigsten Kontaminationsquellen dar (Gil et al., 2013). Das Übertragungsrisiko ist dabei von der Erntemethode sowie von der Erregerausscheidung, den Hygienegewohnheiten und der rechtzeitigen Krankmeldung

des Mitarbeiters abhängig (James, 2006). Noroviren gelten in dieser Hinsicht als besonders gefährlich, da sie auch von asymptomatischen Trägern, das heißt vor dem Auftreten und nach dem Abklingen der Symptome, in relevanter Dosis übertragen werden können. So sind in einer japanischen Studie ~14% der Stuhlproben von asymptomatischen Mitarbeitern eines Lebensmittelverarbeitenden Betriebes positiv auf Noroviren getestet worden (Okabayashi et al., 2008).

Mitarbeiter verarbeitender Betriebe können nicht nur Quelle, sondern auch Überträger von Infektionserregern sein. In einer Untersuchung wurde beobachtet, dass nach einer dreistündigen Paprika-Ernte 13,9% der ursprünglich unbelasteten Hände mit Noroviren kontaminiert waren (León-Félix, Martínez-Bustillos, Báez-Sañudo, Peraza-Garay, & Chaidez, 2010). Die Übertragung von Viren beim Kontakt zwischen Ernteprodukten und Händen scheint von Feuchtigkeit, Druck und Reibung beeinflusst zu sein (Escudero, Rawsthorne, Gensel, & Jaykus, 2012).

6.1.11 Bakterielle und virale Persistenz im Boden, auf den Produkten und unbelebten Flächen

Sind über einen oder mehrere der beschriebenen Eintragswege humanpathogene Erreger auf die Oberfläche von Blattgemüse gelangt, hängt ihre Adhärenz und Persistenz auf der pflanzlichen Oberfläche von einer Vielzahl unterschiedlicher Faktoren ab. Dazu zählen (1) die Pflanzenart (Park et al., 2012), (2) das Serovar (Berger et al., 2009), (3) das Alter der Pflanze (Park et al., 2012), (4) die Eigenschaften der Wirtspflanze, wie Wassergehalt, inhibitorische Phenole, Dicke des Mesophylls (Yadav, Karamanoli, & Vokou, 2005), einschließlich (5) schützender Nischen auf der pflanzlichen Oberfläche, wie Stomata, Wachstrukturen oder Schnitte (D. Li et al., 2015), die Virusart (Bosch, Pintó, & Abad, 2003) und (6) die Konkurrenz durch andere Mikroorganismen (Lima, São José, Andrade, Pires, & Ferreira, 2013).

Grundsätzlich ist die bakterielle und virale Persistenz dort am höchsten, wo die Erreger am besten vor Umwelteinflüssen, wie UV-Strahlung und Austrocknung, geschützt sind (Choi, Song, Stine, Pimentel, & Gerba, 2004). Daher sind die Krankheitserreger im Boden länger überlebensfähig als auf pflanzlichen Oberflächen (Choi et al., 2004; Islam, Doyle, Phatak, Millner, & Jiang, 2004). Im Boden zeigten *E. coli* O157:H7 je nach Kontaminationsquelle eine Persistenz zwischen 154 und 217 Tagen, während sie auf Salat und Petersilie bis zu 77 bzw. 177 Tage nach der Aussaat überlebensfähig waren (Islam et al., 2004). Besonders kritisch für die Keimbelastung frischer Produkte sind daher Kontaminationsereignisse kurz vor der Ernte (z.B. durch Bewässerung oder Überflutung), während des Erntens (z.B. durch infizierte Erntearbeiter oder kontaminierte Geräte) oder in der frühen Nacherntephase (z.B. durch Kontakt mit Händen, Oberflächen oder Waschwasser). Den Zeitraum zwischen Kontamination und Ernte bzw. Verbrauch überdauern Noroviren mit größerer Wahrscheinlichkeit als enterische Bakterien, da sie auf Blattgemüse persistenter sind (Scott W Stine, Song, Choi, & Gerba, 2005b).

Insgesamt zeigen Studien zur Persistenz von Salmonellen, dass Überleben und Vermehrung der Bakterien von komplexen Interaktionen mit biotischen und abiotischen Umweltfaktoren abhängig sind. Die häufig widersprüchlichen Ergebnisse spiegeln die Diversität der Bakterienstämme und ihrer Überlebensstrategien, aber auch die Unterschiede in den verwendeten Versuchsaufbauten wider (Fornfeld et al., 2017).

6.2 Nacherntephase

Die Gefahr des Eintrages, der Vermehrung und der Internalisierung humanpathogener Erreger in gartenbauliche Produkte bleibt über die Ernte hinaus bestehen (Abb. 9). Die höchsten Risiken bestehen in der Nacherntephase in einer Kreuzkontamination der Ernteprodukte durch Waschwasser oder Geräte und einem gesteigerten Bakterienwachstum an den Schnittflächen der Pflanzen. Zu den Risikofaktoren gehören

- die Umgebungsbedingungen (siehe Abschnitt 6.2.1),
- das Waschwasser (siehe Abschnitt 6.2.2),
- die Kontaktflächen von Maschinen, Geräten und Behältern (siehe Abschnitt 6.2.3) sowie
- die Mitarbeiter (siehe Abschnitt 6.2.4).

6.2.1 Umgebungsbedingungen

Die Überlebens- und Vermehrungsfähigkeit enterischer Pathogene in der Nacherntephase ist von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Dazu zählen die Temperatur, die relative Luftfeuchte, die Gaszusammensetzung der Atmosphäre, der pH-Wert des Umgebungsmediums und möglicherweise vorhandene antimikrobielle Substanzen (Doyle & Erickson, 2008).

Die Temperatur hat weitestgehend gegensätzliche Effekte auf Bakterien und Viren. Wie eine Studie an Fresh-Cut-Salat erneut bestätigte, ist die bakterielle Vermehrung unter niedrigen Temperaturen vermindert (Oliveira et al., 2010; RIVM, 2013). Humanpathogene Viren hingegen zeigen unter niedrigen Temperaturen eine erhöhte Persistenz (RIVM, 2013). Dies gilt nicht nur unter den Temperaturen der Kühlkette, sondern auch der Tiefkühlung. Auf tiefgefrorenen Zwiebeln, Spinat, Kräutern und Beeren waren enterische Viren über mehrere Monate stabil (Butot, Putallaz, & Sanchez, 2008).

Studienergebnisse deuten darauf hin, dass nicht die relative, sondern die absolute Luftfeuchte (die tatsächliche Menge an Wasser in einer Luftprobe) ein entscheidender Faktor für den Erhalt der Infektiosität von Noroviren ist. Eine niedrige absolute Luftfeuchte (unter 0.007 kg Wasser/kg Luft) scheint die Persistenz von Noroviren zu begünstigen. Dies könnte die Saisonabhängigkeit von Norovirus-Infektionen erklären (Colas de la Noue et al., 2014).

Gegenüber niedrigen pH-Werten, wie sie z.B. in Fruchtsäften und auf Beeren herrschen, zeigen enterische Viren ebenfalls eine hohe Beständigkeit. Diese pH-Stabilität befähigt sie auf dem oral-fäkalen Infektionsweg zur Passage des Magens (Verhaelen, Bouwknecht, Lodder-Verschoor, Rutjes, & de Roda Husman, 2012).

6.2.2 Waschwasser

Das Waschen der Ernteprodukte dient dem Entfernen von Verschmutzungen und der Reduktion der Keimzahl. Ist das Wasser jedoch mikrobiell verunreinigt oder reichern sich humanpathogene Erreger darin an, können ganze Chargen kontaminiert werden (et al., 2008). Das Waschen der Ernteprodukte stellt daher eine der wichtigsten Ursachen von Kontaminationen und Kreuzkontaminationen in der Nacherntephase dar (K. Holvoet et al., 2014; Luo et al., 2011).

Die Übertragung bakterieller und viraler Infektionserreger aus dem Waschwasser auf Salat ist in einer Simulationsstudie experimentell nachgewiesen worden (K. Holvoet et al., 2014). Obwohl nur ein

Anteil von weniger als 1,5% der im Wasser enthaltenen Mikroorganismen übertragen wurde, verdeutlicht die Studie die Anfälligkeit von Blattgemüse gegenüber einer Kontamination durch humanpathogene Erreger.

6.2.3 Kontaktflächen von Maschinen, Geräten und Behältern

Geräte, Behälter und andere Flächen, mit denen die Produkte in Kontakt kommen, aber auch Rückstände vorangegangener Chargen können Kreuzkontaminationen verursachen. Mikrobielle Hot Spots in der Weiterverarbeitung stellen Förderbänder und Schredder dar (Buchholz, Davidson, Marks, Todd, & Ryser, 2012). So berichtete Stafford 2002 von einem Salmonellen-Ausbruch durch industriell verarbeiteten Fresh-Cut-Salat, der auf eine kontaminierte Schredderanlage zurückgeführt wurde (Stafford et al., 2002).

Das Kontaminationsrisiko ist sehr variabel, da es von verschiedenen Faktoren abhängig ist. Ein entscheidender Faktor ist die Fähigkeit der Bakterien zur Biofilmbildung (siehe Abschnitt 4.3). Biofilme können sich auf Oberflächen von Maschinen, Förderbändern und Wasserbecken bilden. Da sie häufig resistent gegenüber den gängigen Reinigungsmaßnahmen der Lebensmittelverarbeitenden Betriebe sind, können sie sich dort dauerhaft etablieren (Romanova, Gawande, Brovko, & Griffiths, 2007; Stafford et al., 2002).

Auch Viren können sich durch Kontakt mit den Oberflächen der Aufbereitungsanlagen verbreiten (Escudero et al., 2012). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass eine Assoziierung von Viren mit bakteriellen Biofilmen die virale Persistenz beeinflusst (M. Jacques, Grenier, & Labrie, 2015).

6.2.4 Mitarbeiter

Der Handkontakt durch infizierte Mitarbeiter ist als wichtigste Quelle viraler Kontaminationen in der Verarbeitungsphase identifiziert worden (Bouwknegt et al., 2015). Eine Studie an Blattgemüsearten hat in drei europäischen Ländern eine verbreitete virale Kontamination der Hände von Erntearbeitern nachgewiesen (P. Kokkinos et al., 2012). Insbesondere unter feuchten Bedingungen können Viren leicht von Händen auf Lebensmittel übertragen werden (Bidawid, Farber, & Sattar, 2000). So können Kontaminationsereignisse durch bakteriell oder viral infizierte Mitarbeiter zu gastrointestinalen Infektionsausbrüchen führen, wie ein großer Shigellen-Ausbruch durch Fresh-cut Salat in den USA zeigte (Davis et al., 1988).

6.3 Zusammenfassung

Die wichtigsten Risikofaktoren für eine Kontamination von Blattgemüse mit Salmonellen in der Produktions- und Verarbeitungsphase (Abb. 8 und 9) sind

- die Nähe der Anbaufläche zu Tierställen,
- der direkte oder indirekte Kontakt mit Wild- oder Nutztieren,
- die Verwendung unbehandelter oder unzureichend behandelter tierischer Düngemittel,
- schwere Regenfälle mit Überschwemmungen,
- die Nutzung von kontaminiertem Wasser zur Bewässerung oder Pestizidbehandlung und
- der Kontakt mit Mitarbeitern, Wasser und Geräten sowohl während der Ernte, als auch während der Verarbeitung.

Die Hauptrisikofaktoren für eine Noroviren-Kontamination von Blattgemüse während des Anbaus und der Verarbeitung (Abb. 8 und 9) sind

- schwere Regenfälle und Überschwemmungen, die den Eintrag von Noroviren aus Abwässern in Bewässerungswasser begünstigen,
- die Bewässerung und Pestizidbehandlung mit kontaminiertem Wasser sowie
- der Kontakt mit Mitarbeitern, Wasser und Geräten während der Ernte, wie auch während der Verarbeitung.

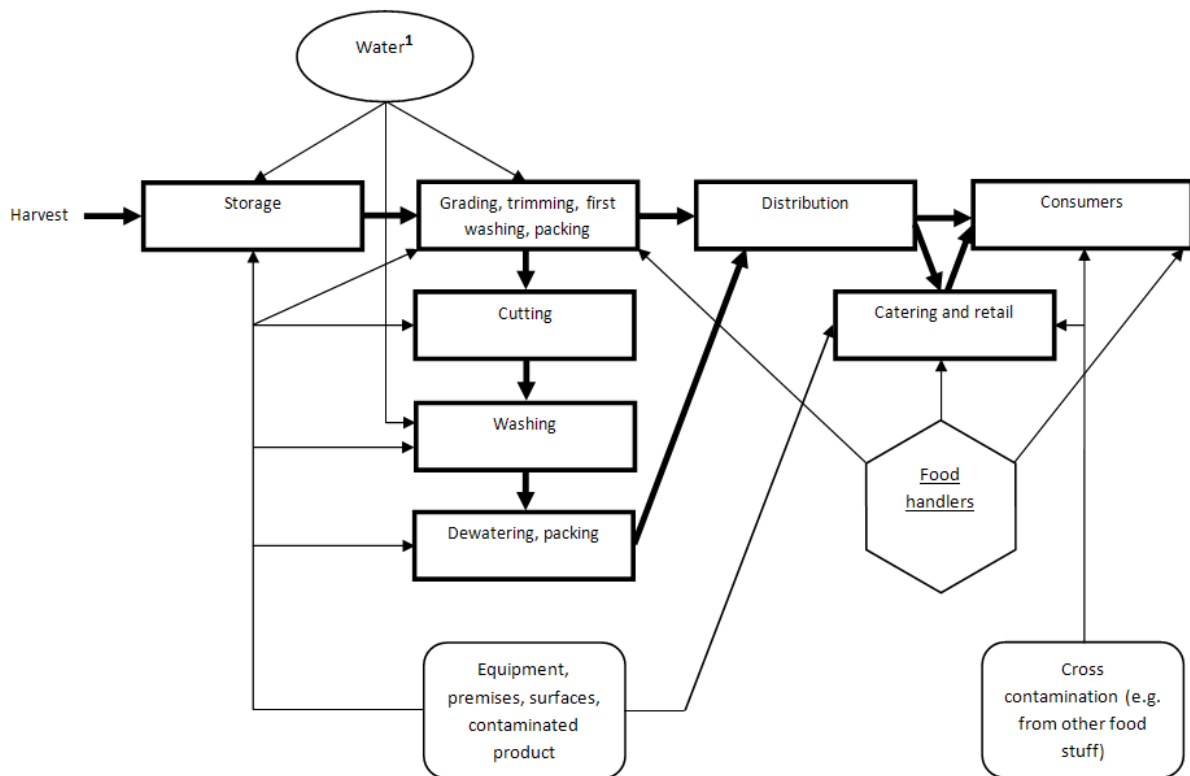


Abb. 9: Übersicht der Hauptrisikofaktoren für eine mikrobielle Kontamination von Blattgemüse während der Verarbeitung. Unterstrichene Risikofaktoren haben eine besondere Relevanz für Noroviren. Dicke Linien markieren die Verarbeitungsschritte von Blattgemüse, dünne Linien mögliche Kontaminationsquellen. (1) Das bei der Verarbeitung verwendete Wasser muss Trinkwasserqualität haben; es kann jedoch während des Prozesses kontaminiert werden und zur Verbreitung von Humanpathogenen beitragen (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014).

7 Präventions- und Dekontaminationsmaßnahmen

7.1 Vorernte- und Erntephase

Angesichts der vielfältigen umwelt- und kulturbedingten Kontaminationsrisiken (siehe Abschnitt 6.1) müssen Präventionsmaßnahmen in der Vorernte- und Erntephase an verschiedenen Punkten des Produktionsprozesses ansetzen. In Ihrem *Leitfaden zur Eindämmung mikrobiologischer Risiken durch gute Hygiene bei der Primärproduktion von frischem Obst und Gemüse* hat die Europäische Kommission im Mai 2017 Checklisten zur Überprüfung der Einhaltung dieser Präventionsmaßnahmen herausgegeben (Europäische Kommission, 2017). Über die bestehenden Maßnahmen hinaus werden derzeit neue Ansätze zur Verbesserung der mikrobiellen Sicherheit frischer Produkte entwickelt.

Maßnahmen zur Kontrolle umweltbedingter Risikofaktoren beziehen sich auf

- die Nutzung der angrenzenden Flächen und die frühere Nutzung der Anbaufläche (siehe Abschnitt 7.1.1),
- die Klimabedingungen (siehe Abschnitt 7.1.2) sowie
- den direkten oder indirekten Kontakt mit Wildtieren (siehe Abschnitt 7.1.3).

Präventionsmaßnahmen zur Verminderung des Kontaminationsrisikos durch Kultur- und Erntebedingungen betreffen

- Saatgut (siehe Abschnitt 7.1.4),
- organische Düngemittel (siehe Abschnitt 7.1.5),
- Wasser (siehe Abschnitt 7.1.6),
- Erntewerkzeuge und -geräte (siehe Abschnitt 7.1.7) und
- Erntearbeiter (siehe Abschnitt 7.1.8).

Zu den neuen Ansatzpunkten in der Entwicklung befindlicher Präventionsmaßnahmen zählen z.B.

- Züchtung (siehe Abschnitt 7.1.9),
- Stimulation des pflanzlichen Immunsystems (siehe Abschnitt 7.1.10) und
- Einsatz antagonistischer Mikroorganismen (siehe Abschnitt 7.1.11).

7.1.1 Nutzung der angrenzenden Flächen und frühere Nutzung der Anbaufläche

Generell sollte der Anbau von Obst und Gemüse nicht an Orten erfolgen, an denen von einem hohen Pathogenvorkommen auszugehen ist (CAC, 2003). Dies ist jedoch nicht immer leicht umzusetzen. Häufig fehlen Landwirten die notwendigen Kenntnisse über mögliche Kontaminationen der eigenen Flächen oder die Zeit, um diese auf ein akzeptables Maß zu reduzieren (Gil et al., 2013; James, 2006).

Wird auf angrenzenden Flächen Tierhaltung betrieben, ist die Einrichtung von Pufferzonen oder physischen Barrieren, wie Gräben und Erdwällen, zu empfehlen. Diese können den Transfer von humanpathogenen Erregern aus der Tierhaltung über Wasser, Aerosole oder Wildtiere auf die Anbaufläche vermindern (James, 2006).

Erweisen sich die mikrobiellen Risiken, wie Quellen von Fäkalerregern, auf einer Anbaufläche als unkontrollierbar, darf die Fläche nicht genutzt werden, bis die Gefahr unter Kontrolle gebracht ist.

Dies kann die Installation von Wasseraufbereitungsanlagen oder Drainagesystemen zum Auffangen von überschüssigem kontaminiertem Wasser erfordern (FAO Committee on Agriculture, 2003).

7.1.2 Klimabedingungen

Unter klimatischen Bedingungen, die das Kontaminationsrisiko erhöhen, sind vermehrte mikrobiologische Kontrollen der Produkte erforderlich. Besonders kritisch sind (1) hohe Temperaturen, die die bakterielle Vermehrung fördern, (2) Wasserknappheit, welche die Nutzung alternativer Wasserquellen erforderlich macht und (3) extreme Wetterereignisse, wie Überschwemmungen, die den Kontaminationsgrad von Böden und Wasser erhöhen können (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014). In diesen Fällen ist die mikrobielle Sicherheit frischer Produkte durch zusätzliche mikrobiologische Untersuchungen zu gewährleisten.

7.1.3 Wildtiere

Vorbeugende Maßnahmen, wie Vogelscheuchen oder Reflexstreifen, können einige Wildtierarten von der Anbaufläche und den Wasserquellen fernhalten. Eine regelmäßige Überprüfung der Anlagen, insbesondere vor der Ernte, wird empfohlen (CAC, 2003).

Landwirtschaftliche Abfälle können Wildtiere anlocken und sollten daher rechtzeitig und angemessen entsorgt werden. Nischen, die den Tieren Unterschlupf bieten, sind aufmerksam zu beobachten und gegebenenfalls zu entfernen (Franklin & VerCauteren, 2016). Darüber hinaus hat sich die Überwachung von Wildtieren anhand von Spuren, Kot und Fraßschäden als wirksame Kontrolle erwiesen (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014).

7.1.4 Saatgut

Nach Einschätzung der EFSA steht bislang keine chemische Desinfektionsmethode zur Verfügung, die Saatgut unterschiedlicher Art wirksam und zuverlässig von Humanpathogenen befreit (EFSA Panel on Biological Hazards, 2011). Nur wenige Methoden erzielen eine signifikante Reduktion ($> 5 \log_{10}$ -Stufen) der Pathogenzahl. Selbst die in den USA empfohlene Behandlung mit 20.000 ppm Chlor (CaOCl_2) führt meist nur zu einer Verminderung der KbE/g um 2,5 \log_{10} -Stufen (Montville & Schaffner, 2005). Neuere physikalische Methoden, wie Hochdruckbehandlung, zeigen hingegen vielversprechende Ergebnisse (Ding, Fu, & Smith, 2013).

Zur Gewährleistung und Dokumentation der mikrobiellen Unbedenklichkeit des verwendeten Saatgutes sollte die Einhaltung der folgenden Grenzwerte überprüft werden (Europäische Kommission, 2013; QS-GAP, 2017).

- EHEC, VTEC, STEC (nicht nachweisbar in 25 g)
- Salmonellen (nicht nachweisbar in 100 g)
- *E. coli* ($< 10^3$ KbE/g)
- *Bacillus cereus* ($< 10^3$ KbE/g)
- *Listeria monocytogenes* ($< 10^2$ KbE/g)

Ergänzend wird die Untersuchung des Saatgutes auf folgende Erreger empfohlen:

- Enterobakterien
- aerobe mesophile Keimzahl

Eine besondere hygienische Herausforderung stellt die Desinfektion von Samen zur Produktion von Sprossen dar. Selbst geringe Mengen auf den Samen zurückbleibender Bakterien können während der Keimung zu einer hohen Erregerlast anwachsen. Da die mikrobielle Belastung des Endproduktes häufig höher als die der Samen ist, sind im Produktionsprozess weitere Kontrollen nötig (EFSA Panel on Biological Hazards, 2011).

7.1.5 Organische Düngemittel

Unbehandelte organische Düngemittel zählen zu den wichtigsten Kontaminationsquellen im Gemüsebau. Allgemein gilt: Eine fachgerechte Behandlung des organischen Düngers und die Einhaltung festgelegter zeitlicher Abstände zwischen Düngung und Pflanzung können das Kontaminationsrisiko für Blattgemüse erheblich senken. Daher wird vor der Ausbringung organischer Dünger eine Risikoanalyse empfohlen, die folgende Punkte berücksichtigt: Art und Herkunft des organischen Düngers, Kompostierungsmethode, Zeitpunkt der Anwendung und Wahrscheinlichkeit des direkten Kontaktes mit essbaren Teilen der Kulturen (QS-GAP, 2017).

Je nach Art und Herkunft des Düngemittels gelten (mit wenigen Ausnahmen) folgende Fristen:

- Wirtschaftsdünger tierischen Ursprungs: Bei Blattgemüse ist die Ausbringung ab der Pflanzung verboten. Bei anderen Kulturen ist zwischen Ausbringung und Ernte ein Abstand von mindestens 60 Tagen einzuhalten (QS-GAP, 2017).
- Klärschlamm: Im Jahr der Ausbringung des Klärschlammes und im darauf folgenden Jahr ist der Gemüseanbau auf den betreffenden Flächen verboten (Bundesregierung, 1992; Deutscher Bundestag, 2017; EWG, 1986).
- Gärsubstrate: Im Jahr der Ausbringung von Gärsubstraten und im darauf folgenden Jahr ist der Anbau von Feldgemüsen und Erdbeeren untersagt (QS-GAP, 2017).

Eine adäquate Lagerung und Behandlung kann die mikrobielle Belastung organischer Düngemittel erheblich reduzieren (M. Erickson, Critzer, & Doyle, 2004; Suslow et al., 2003). Zur Aufbereitung bietet sich eine Kombination unterschiedlicher Behandlungsverfahren an, darunter Kompostierung, Pasteurisierung, Hitze, Trocknung, Sandtrocknung, Sonnenstrahlung und alkalischer Aufschluss (CAC, 2003; FDA, 2008). Fachgerecht behandelte tierische Abfälle stellen nach Einschätzung der EFSA kein Kontaminationsrisiko für Blattgemüse mehr dar (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014).

Eine Kopfdüngung mit flüssigen Wirtschaftsdüngern tierischer Herkunft ist im deutschen Gemüsebau grundsätzlich verboten (BMEL, 2017).

7.1.6 Wasser

Die Wahl einer geeigneten Wasserquelle für Bewässerung und Pflanzenschutzmaßnahmen ist eine der wichtigsten vorbeugenden Maßnahmen (siehe Abschnitt 6.1.8). Die sicherste Wasserquelle ist Trinkwasser, gefolgt von Regenwasser, Grundwasser und Oberflächenwasser (D. Li et al., 2015; Pachepsky, Shelton, McLain, Patel, & Mandrell, E, 2011; Uyttendaele et al., 2015).

Zur Verminderung mikrobieller Verunreinigungen des Wassers wird Anbauern empfohlen, ein System zur Identifikation und Bewertung möglicher Kontaminationsquellen zu etablieren (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014). Dies beinhaltet die Erhebung der Konzentration von Indikatororganismen, wie z.B. *E. coli*, in Abhängigkeit von geographischer Lage, Jahreszeit und Wasserquelle (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014). Für *E. coli* wird beispielsweise ein Grenzwert von < 1000 KBE/100 ml

(Koloniebildende Einheiten / Milliliter) angegeben (QS-GAP, 2017). Zeigt das Risikobewertungssystem eine erhöhte Kontaminationsgefahr für Oberflächen- oder Grundwasser an, ist eine Aufbereitung erforderlich (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014). Als Aufbereitungsverfahren bieten sich Koagulation, Ausflocken, Filtration, Desinfektion und Exposition gegenüber Sonnenlicht an (Gil et al., 2013).

Darüber hinaus hat die Bewässerungstechnik einen entscheidenden Einfluss auf das Kontaminationsrisiko. Zu bevorzugen sind Systeme, die den direkten Kontakt des Wassers mit den essbaren Teilen der Pflanze vermeiden. Eine unterirdische Tröpfchenbewässerung ist mit dem geringsten Risiko verbunden; Beregnung und Furchenbewässerung bergen hingegen die größte Kontaminationsgefahr (Choi et al., 2004; FAO/WHO, 2008). Zudem kann eine Sprinklerbewässerung im Wasser enthaltene Bakterien und Viren über erhebliche Distanzen verbreiten (FAO Committee on Agriculture, 2003).

7.1.7 Erntewerkzeuge und -geräte

Für jedes Gerät, Werkzeug oder Behältnis, das im Gemüsebau verwendet wird, sollten spezifische Hygieneanforderungen identifiziert und eingehalten werden (FDA, 2008). Dies beinhaltet eine Reinigung, gegebenenfalls eine Desinfektion und bei Bedarf einen Ersatz nicht weiter verwendbarer Utensilien (Gil et al., 2013; James, 2006). Die Wirksamkeit der getroffenen Hygienemaßnahmen ist durch mikrobiologische Untersuchungen regelmäßig zu überprüfen (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014).

7.1.8 Erntearbeiter

Jeder Obst und Gemüse produzierende Betrieb sollte über eigene Standard Operating Procedures (SOPs) verfügen, in denen die erforderlichen Hygienevorschriften und Mitarbeiterschulungen festgelegt sind (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014).

Als wirksame Maßnahme zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen mit enterischen Viren wird die Kombination aus Handwäsche, dem Tragen von Handschuhen und der Desinfektion der Handschuhe empfohlen (Stals, Jacxsens, Baert, Van Coillie, & Uyttendaele, 2015).

Sind Mitarbeiter verletzt, müssen Kontaminationsquellen wie Schnitte oder andere Wunden wasserdicht abgedeckt werden (Simonne, Brecht, Sargent, Ritenour, & Schneider, 2008). Erkrankten Mitarbeitern ist der Zutritt zu den Lebensmittel-verarbeitenden Bereichen zu untersagen (FAO Committee on Agriculture, 2003).

7.1.9 Züchtung

Auch die Züchtungsforschung hat sich bereits dem Thema der mikrobiellen Sicherheit von Obst und Gemüse zugewandt. Die Wissenschaftler sehen Potential in der Erzeugung neuer Sorten, die gegen die Besiedlung durch humanpathogene Erreger resistent sind. Denkbar ist eine Kombination aus Screening besiedlungsresistenter Sorten und gezielter Züchtung im Hinblick auf sicherheitsrelevante pflanzliche Eigenschaften, wie Oberflächentextur, Blattausscheidungen, Anfälligkeit für Internalisierung von Mikroorganismen oder Aktivität des pflanzlichen Immunsystems. Dies könnte eine weitere Lösungsstrategie auf dem Weg zur mikrobiellen Sicherheit frischer Produkte sein (Sela Saldinger & Manulis-Sasson, 2015).

7.1.10 Stimulation des pflanzlichen Immunsystems

Nicht nur phytopathogene, sondern auch humanpathogene Mikroorganismen können vom Immunsystem der Wirtspflanze detektiert werden. Durch Kontakt mit *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) wird eine systemische Immunreaktion der Pflanze ausgelöst, die als *PAMP-triggered immunity* (PTI) bezeichnet wird (siehe auch Kapitel 5). Wie Meng 2013 zeigte, kann die PTI durch bakterielle Peptide auch künstlich induziert werden. Die ausgelöste Immunreaktion kann dann die Vermehrung humanpathogener Erreger auf der pflanzlichen Oberfläche hemmen (Meng, Altier, & Martin, 2013). Humanpathogene Bakterien verfügen aber auch über Strategien, pflanzliche Immunreaktionen zu unterdrücken. Ist dieser auf dem Typ-III-Sekretionssystem basierende Mechanismus defekt, kann sich der Bakterienstamm nur begrenzt ausbreiten (A. Schikora, Garcia, & Hirt, 2012). Die Stimulation pflanzlicher Immunreaktionen und die Hemmung des Typ-III-Sekretionssystems bieten möglicherweise neue Ansatzpunkte, um die mikrobielle Kontamination von Obst und Gemüse mit humanpathogenen Erregern zu reduzieren (Sela Saldinger & Manulis-Sasson, 2015). Dies erfordert jedoch noch detailliertere Untersuchungen.

7.1.11 Antagonistische Mikroorganismen

Humanpathogene Erreger, die in die Phyllosphäre, Rhizosphäre oder Endosphäre einer Pflanze gelangen, interagieren mit dem natürlichen pflanzlichen Mikrobiom. Die Interaktionsmechanismen können einen positiven oder negativen Effekt auf die Etablierung und Vermehrung von Humanpathogenen in diesem Lebensraum haben. Mikroorganismen, die einen hemmenden Effekt auf Humanpathogene ausüben, werden als antagonistische Mikroorganismen bezeichnet. Die Hemmung kann beispielsweise auf der Ausscheidung antimikrobieller Metabolite, wie Bacteriocinen, beruhen. Studien deuten auf eine potentielle Nutzbarkeit antagonistischer Mikroorganismen als Maßnahme gegen humanpathogene Erreger auf frischen Produkten hin (Goodburn & Wallace, 2013). In einer Untersuchung von Matos und Garland konnte die Salmonellenbesiedlung von Alfalfa-Sprossen sowohl durch einzelne als auch durch gemischte Bakterienstämme reduziert werden (Matos & Garland, 2005). Saldinger und Manulis-Sasson sehen in der Suche nach antagonistischen Mikroorganismen in Kombination mit High-Throughput Screening Programmen Potential zur Entwicklung von Biokontrollmaßnahmen (Sela Saldinger & Manulis-Sasson, 2015). Neben antagonistischen Bakterien werden auch lytische Phagen auf ihre Eignung als potentielle Biokontroll-Agenzien untersucht (M. Jacques et al., 2015).

7.2 Nacherntephase

In der Nacherntephase werden neben präventiven Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen und Kreuzkontaminationen je nach Zulassungsstatus auch Methoden zur Dekontamination frischer Produkte angewendet. Zu diesen Maßnahmen bzw. Ansatzpunkten zählen

- die Umgebungsbedingungen während der Verarbeitung, Verpackung und Lagerung (siehe Abschnitt 7.2.1),
- das Waschwasser (siehe Abschnitt 7.2.2),
- die Dekontamination der Produkte (siehe Abschnitt 7.2.3),
- die Kontaktflächen von Maschinen, Geräten und Behältern (siehe Abschnitt 7.2.4),
- die Verpackung und Lagerung (siehe Abschnitt 7.2.5) und

- die Mitarbeiter (siehe Abschnitt 7.2.6).

Abbildung 10 gibt einen Überblick über die einzelnen Schritte in der Verarbeitung frischer Produkte.

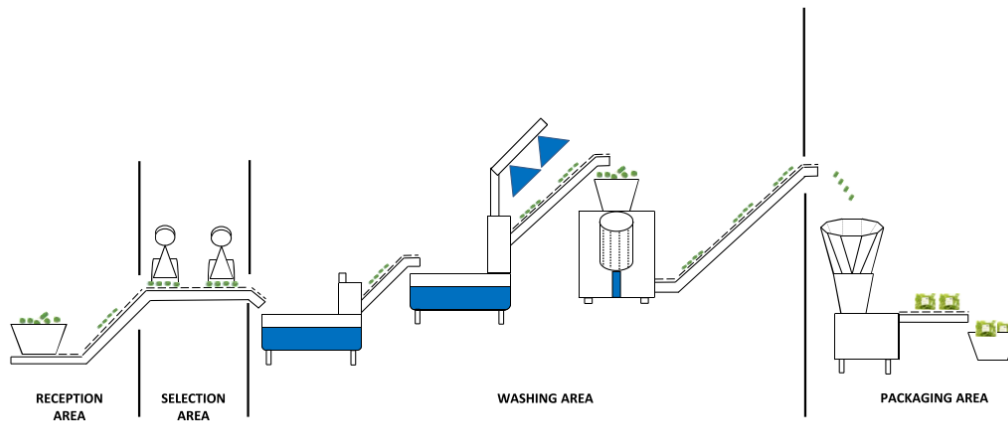


Abb. 10: Schematische Darstellung der Verarbeitung von frischem Gemüse einschließlich des Wareneingangs, der Sortierung, des Waschens und Verpackens (Castro-Ibáñez, Gil, & Allende, 2016).

7.2.1 Umgebungsbedingungen während der Verarbeitung, Verpackung und Lagerung

Die Temperatur, unter der Blattgemüse verarbeitet, transportiert und gelagert wird, beeinflusst die Vermehrungsfähigkeit humanpathogener Bakterien. Niedrige Temperaturen senken die Wachstumsraten der meisten bakteriellen Erreger erheblich (Oliveira et al., 2010). Eine lückenlose Kühlkette ist daher eine wirksame Strategie zur Eindämmung des Bakterienwachstums in der Nacherntephase (Sant'Ana, Barbosa, Destro, Landgraf, & Franco, 2012).

7.2.2 Waschwasser

Mikrobiell verunreinigtes Waschwasser gehört zu den wichtigsten Ursachen von Kontaminationen und Kreuzkontaminationen in der Nacherntephase. Der Erhalt der Wasserqualität durch regelmäßigen Austausch und Vermeidung von organischen Rückständen ist daher von entscheidender Bedeutung.

7.2.3 Dekontamination von Frischeprodukten

Da präventive Maßnahmen das Risiko einer mikrobiellen Kontamination nicht vollständig eliminieren können, werden während der Verarbeitung auch Verfahren zur Dekontamination frischer Produkte angewendet. Dazu zählen chemische (Tab. 3), biologische (Tab. 4) und physikalische (Tab. 5) Methoden. Der Zulassungsstatus der verschiedenen Dekontaminationsverfahren ist jedoch regional sehr unterschiedlich. Während beispielsweise in den USA die Chlorierung des Waschwassers von der FDA (Food and Drug Administration) zugelassen ist und zur gängigen Praxis gehört, ist sie in der EU gar nicht reguliert (U. S. Food and Drug Administration, 2010). In der EU-Verordnung 852/2004 zur Lebensmittelhygiene findet sich keine eindeutige Aussage zur Dekontamination frischer Produkte (Europäisches Parlament / Rat, 2004). Einige Dekontaminationsverfahren sind in EU-Mitgliedsländern auf nationaler Ebene geregelt. So ist z. B. die direkte Chlorierung und die Bestrahlung von frischem Obst und Gemüse in Deutschland verboten (BfR Stellungnahme Nr. 022/2013, 2013; Bundesministerium für Gesundheit, 2000).

Tab. 3: Chemische Dekontaminationsmethoden (Goodburn & Wallace, 2013; Ramos, Miller, Brandão, Teixeira, & Silva, 2013)

Methode	Vorteile	Nachteile	Wirksamkeit
Chlor (Hypochlorit)	<p>Wässrig</p> <p>Niedrige Kosten</p> <p>Leicht verfügbar</p> <p>Seit langem verwendet</p>	<p>Wässrig</p> <p>Freisetzung von Chlordämpfen</p> <p>In Gegenwart organischer Substanzen Bildung potentiell gesundheitsschädlicher Nebenprodukte (z.B. Trihalomethane)</p> <p>Anschließendes Spülen mit Wasser erforderlich</p> <p>Wirksamkeit durch organisches Material vermindert</p> <p>Korrosiv</p> <p>Aktivität pH-abhängig</p> <p>Empfindlichkeit gegenüber Temperatur, Licht und Luft</p> <p>In einigen EU-Ländern verboten</p>	<p>Wässrig</p> <p>Gegen pathogene Bakterien und Viren wirksam</p> <p>Selbst in sehr hohen Dosen, relativ geringe Wirksamkeit</p> <p>In den USA übliche Chlor-Dosen (50–200 ppm) und Einwirkzeiten (1–2 Min.) führen zu einer Reduktion von Bakterien und Viren um 1-2 log₁₀-Stufen</p> <p>Gegen Bakteriensporen und Oozysten von Protozoen unwirksam</p>
Chlordioxid	<p>Wässrig</p> <p>Im Vergleich zu Chlor höhere antimikrobielle Wirksamkeit bei neutralem pH</p> <p>Wirksamkeit weniger pH-abhängig</p> <p>Geringere Bildung chlorierter Nebenprodukte</p> <p>Weniger korrosiv als Chlor und Ozon</p> <p>Kann Reifung von Frischeprodukten verzögern</p> <p>Gasförmig (ClO₂)</p> <p>Über einen weiten pH-Bereich wirksam</p> <p>Dringt leicht ins Gewebe ein</p>	<p>Wässrig</p> <p>In zugelassenen Dosen relativ geringe Wirksamkeit</p> <p>Muss vor Ort hergestellt werden</p> <p>Explosiv</p> <p>In den USA für Fresh-cut Produkte nicht zugelassen, in der EU nicht reguliert</p> <p>Anschließendes Spülen mit Wasser erforderlich</p> <p>Bildung spezifischer Nebenprodukte, Chlorit und Chlorat</p> <p>In Innenräumen Überwachung erforderlich</p> <p>Gasförmig (ClO₂)</p> <p>Zersetzt sich in Chlor und Sauerstoff</p> <p>Muss vor Ort hergestellt werden</p> <p>Aktivität beeinflusst von Gaskonzentration, Dauer der Exposition, Feuchtigkeit und Temperatur.</p>	<p>Wässrig</p> <p>In zugelassener Konzentration reduziert Chlordioxid die bakterielle und virale Belastung eines Produktes um 1-2 log₁₀-Stufen</p> <p>In höheren Dosen ist Chlordioxid dreimal so wirksam wie Chlor. Dies würde jedoch zu hohe Konzentrationen, Temperaturen oder Behandlungszeiten erfordern</p> <p>Gasförmig (ClO₂)</p> <p>Inaktiviert <i>E. coli</i> O157:H7 und <i>L. monocytogenes</i></p>

Metastudie *Mikrobielle Risiken an Obst und Gemüse*

Methode	Vorteile	Nachteile	Wirksamkeit
<p>Peroxyessigsäure (=Peressigsäure und Wasserstoffperoxid)</p>	<p>Keine Bildung chlorierter Nebenprodukte Wirksamkeit nicht von organischen Verunreinigungen des Wassers oder Temperaturveränderungen beeinflusst Gute antimikrobielle Wirksamkeit bei niedrigen Temperaturen im pH-Bereich 5–8 In zugelassener Konzentration nicht korrosiv (<80 ppm) Wirksamer als Chlor und Chlordioxid</p>	<p>In den für Gemüse zugelassenen Konzentrationen geringe antimikrobielle Wirksamkeit</p>	<p>Wirksam gegen pathogene Bakterien und Viren Wirksamkeit auch in der maximal zugelassener Konzentration (80 ppm) nicht ausreichend, um die mikrobielle Belastung substantiell zu reduzieren</p>
<p>Ozon</p>	<p>Wässrig Hohe antimikrobielle Aktivität Wirksam in niedrigen Dosen und bei kurzer Einwirkzeit Breites Spektrum Dringt leicht ins Gewebe ein Wirksamkeit gegen Protozoen berichtet Als sicher angesehen Keine Bildung chlorierter Nebenprodukte Zerfällt in ungiftige Produkte Hinterlässt keine gesundheitsgefährdenden Rückstände auf Lebensmitteln Geringere Kosten Gasförmig Höhere antimikrobielle Wirksamkeit als</p>	<p>Wässrig Veränderung von Farbe, Geschmack und Inhaltsstoffen des Produktes möglich Instabil, hoch reaktiv Potentiell gesundheitsschädigend für Mitarbeiter Korrosiv gegenüber Geräten Muss vor Ort hergestellt werden In Innenräumen Überwachung notwendig Höhere Investitionen zu Beginn Gasförmig Gefährlich, muss sicher entsorgt werden Giftig und reaktiv Kann pflanzliche Gewebe schädigen Qualitätsverluste möglich Kontrolle auf Lecks erforderlich</p>	<p>Wässrig Wirksam gegen eine Reihe pathogener Bakterien und Viren an Obst und Gemüse Gasförmig Wirksamer als die flüssige Form</p>

Metastudie *Mikrobielle Risiken an Obst und Gemüse*

Methode	Vorteile	Nachteile	Wirksamkeit
	in Lösung Keine nennenswerte Beeinträchtigung der Lebensmittelqualität Wirksam gegen pathogene Mikroorganismen		
Elektrolysiertes Wasser	Wirksam gegen einige pathogene Mikroorganismen Neutralisiert schädliche Substanzen wie Cyanid und Ammonium	Beeinträchtigt Qualität von Fresh-cut Produkten Noch nicht industriell einsetzbar	Starke bakterizide Wirkung auf pathogene Mikroorganismen an Obst und Gemüse

Tab. 4: Biologische Dekontaminationsmethoden (Goodburn & Wallace, 2013)

Methode	Vorteile	Nachteile	Wirksamkeit
Bakteriozine (= kationische antimikrobielle Peptide)	Milchsäurebakterien werden von FDA als sicher beurteilt Keine Bildung toxischer Nebenprodukte Langfristiger Effekt	Für die praktische Anwendung muss jeder Milchsäurebakterien-Stamm auf Sicherheit untersucht werden, da sie pathogen sein können.	Antibakteriell wirksam Effekt auf Viren noch nicht aufgeklärt
Bakteriophagen	Keine Bildung toxischer Nebenprodukte	Bakterienspezifisch Temperaturabhängig Anwendbarkeit in verarbeitenden Betrieben noch zu prüfen	Sehr effektiv gegen bestimmte Bakterienarten Keine antivirale Wirksamkeit

Tab. 5: Physikalische Dekontaminationsmethoden (Goodburn & Wallace, 2013; Ramos et al., 2013)

Methode	Vorteile	Nachteile	Wirksamkeit
Ionisierende Strahlung (Gamma-, Röntgen- und Elektronenstrahlen)	Behandlung kann bei Raumtemperatur erfolgen Kann nach dem Verpacken angewandt werden Verzögert Reifung, verlängert Haltbarkeit Geringe Energiekosten	Bei hohen Dosen Beeinträchtigung der Produktqualität möglich Veränderung der Oberflächentextur Nach Ernte schnelle Anwendung erforderlich, da Biofilmbildung Wirksamkeit vermindert In Deutschland für frisches Obst und Gemüse verboten	Variable Wirksamkeit gegenüber pathogenen Bakterien und Viren Wirkt auch gegen Parasiten und Schimmelpilze Gute Penetrationseigenschaften
UV-Strahlung	Kein giftigen Rückstände Kostengünstig Verzögert das Verderben der Produkte	In der Regel Vorbehandlung nötig Exakte Messung der UV-Dosis schwierig Erhöht Stress und Respirationsrate Induziert Prozess ähnlich der Lignifizierung Geringe Eindringtiefe Anwendbarkeit begrenzt bei festen Früchten und lichtundurchlässigen Oberflächen Kann geschmackliche und farbliche Veränderungen verursachen	Wirkung beruht auf einer Schädigung der bakteriellen und viralen DNA bzw. RNA durch UV-C-Strahlung (200 - 280 nm) Hemmt bakterielles Wachstum auf Frischeprodukten Wirkt nur oberflächlich Viren resistenter als Bakterien und Protozoen
Gepulstes Licht (200 - 1100 nm)	Schnelle und effektive Inaktivierung von Mikroorganismen auf festen und flüssigen Lebensmitteln Wenig Rückstände Geringer Energieverbrauch	Lebensmittelzusammensetzung beeinflusst Wirksamkeit Wirksamkeit sinkt bei starker Kontamination Resistenzen möglich Unerwünschte chemische Effekte möglich	Wirkt auf bakterielle und virale Humanpathogene Wirkung beruht auf UV-C-Anteil Wirkt nur oberflächlich, internalisierte Erreger werden nicht erreicht
Hochdruckbehandlung	Inaktivierung von Mikroorganismen und Enzymen Kein Effekt auf Inhaltsstoffe	Hohe Investitionen Produkte sollten für eine gute antimikrobielle Wirksamkeit ca. 40% freies Wasser haben Abhängig von Erregerstamm, Produkt, Temperatur und	Wirkt auf die meisten bakteriellen und viralen Erreger bei Drücken über 200 MPa Wirkt auch auf internalisierte Mikroorganismen

Metastudie *Mikrobielle Risiken an Obst und Gemüse*

Methode	Vorteile	Nachteile	Wirksamkeit
	<p>Geringer Effekt auf Farbe und Textur</p> <p>Kein Hinweis auf Toxizität</p> <p>Hohe Konsumentenakzeptanz</p> <p>Einheitliche Behandlung aller Produkte</p>	<p>pH-Wert</p>	
Ultraschall	<p>Fördert das Eindringen der Lösungen in unzugängliche Bereiche</p> <p>Wärmeleitfähigkeit erhöht</p> <p>Verminderte Behandlungsdauer und -temperatur</p>	<p>Nur in Kombination mit flüssigen Desinfektionsmitteln wirksam</p> <p>Veränderungen der Lebensmittelqualität</p>	<p>Wirksam gegen verbreitete Humanpathogene an Frischeprodukten</p> <p>Wirkt auch gegen Sporen</p>
Kaltes Plasma (=teil-ionisiertes Gas)	<p>Hohe Wirksamkeit</p> <p>Geringe Veränderung der Produktqualität</p> <p>Keine Rückstände</p> <p>Ressourcen-effizient</p> <p>Erreicht auch schwer zugängliche Bereiche</p>	<p>Physikochemische Veränderungen des Produktes können vorkommen</p> <p>Dürftiger Informationsstand zu Stabilität und Interaktionen des Plasmas</p> <p>Inaktivierung abhängig von Mikroorganismus, Umgebungsbedingungen und Gaszusammensetzung bzw. -fluss</p>	<p>Antivirale und antibakterielle Wirksamkeit nachgewiesen</p>

Die Wirksamkeit dieser Dekontaminationsverfahren ist von einer Vielzahl von Faktoren abhängig. Diese umfassen

- das Produkt,
- die lokalen Unterschiede auf dem Produkt,
- die mikrobielle Besiedlung des Produktes,
- die Arten humanpathogener Erreger,
- die eventuelle Internalisierung von Humanpathogenen,
- ein eventueller Schutz durch einen Biofilm,
- die Art, Dosis, Einwirkzeit und Applikationsform des Desinfektionsverfahrens,
- die Zeit zwischen Kontamination und Waschvorgang,
- das Vorhandensein organischen Materials,
- der pH-Wert,
- die Temperatur und
- das Spülen nach der Anwendung (Goodburn & Wallace, 2013).

Wissenschaftliche Bemühungen, die Effizienz der Dekontaminationsmethoden zu steigern, müssen diese Einflussfaktoren berücksichtigen. Zudem ist zu untersuchen, zu welchem Zeitpunkt im Verarbeitungsprozess und in welcher Kombination die Verfahren am wirksamsten gegenüber Humanpathogenen an frischen Produkten sind (Goodburn & Wallace, 2013). Darüber hinaus muss bei der Weiterentwicklung der Verfahren die betriebliche Anwendbarkeit im Blick behalten werden. Für Lebensmittel-verarbeitende Betriebe relevante Parameter, wie Dauer des Verfahrens, Wasser- und Energieverbrauch, Einfluss auf die Qualität und Haltbarkeit des Produktes sowie Verbraucherakzeptanz sind in vielen bisherigen Untersuchungen nicht ausreichend berücksichtigt worden. Damit sich die neuen Verfahren künftig in Lebensmittel-verarbeitenden Betrieben durchsetzen können, ist es notwendig, diese Faktoren stärker in die Forschung und Entwicklung einzubeziehen (Goodburn & Wallace, 2013).

Bei aller Effizienzsteigerung der Dekontaminationsverfahren bleiben präventive Maßnahmen jedoch voraussichtlich die wirksamsten Strategien der mikrobiellen Sicherheit frischer Produkte.

7.2.4 Kontaktflächen von Maschinen, Geräten und Behältern

Maschinen und Geräte zum Schneiden frischer Produkte, sollten in regelmäßigen Abständen gereinigt und desinfiziert werden, um der Ansammlung organischer Rückstände und der Bildung von Biofilmen vorzubeugen (Artés & Allende, 2014). Gleiches gilt für Behälter, Förderbänder und andere Kontaktflächen.

Bei geschnittenen Salaten, sogenannten Fresh-cut-Produkten, ist das Risiko einer mikrobiellen Kontamination erhöht, da verletztes pflanzliches Gewebe (Schnittkanten, Brüche in Kutikula und Blattgewebe) einen besseren Nährboden für das Wachstum humanpathogener Bakterien bietet (M. T. Brandl, 2008). Kritische Erreger sind hier vor allem Salmonellen, pathogene *E. coli* und *L. monocytogenes* (Francis et al., 2012). Das Waschen ganzer Salatblätter vor dem Schneiden kann die Wirksamkeit des Waschvorgangs erhöhen und das Risiko einer Kreuzkontamination vermindern (Nou & Luo, 2010).

7.2.5 Verpackung und Lagerung

Der letzte Verarbeitungsschritt, das Verpacken der Gemüseprodukte, findet idealerweise in einer separaten Halle, räumlich getrennt von den Wascheinrichtungen statt. Das Verpacken erfolgt unmittelbar nach dem Trocknen und unter kontrollierten hygienischen Bedingungen (FAO/WHO, 2008). Darüber hinaus sind auch Verpackungsmaterial, abgewogenes Gewicht und Gaszusammensetzung in einer Packung Parameter, die für jedes Produkt überprüft werden müssen, um seine mikrobielle Sicherheit und Haltbarkeit sicherzustellen (Jacxsens, Devlieghere, Ragaert, Vanneste, & Debevere, 2003).

7.2.6 Mitarbeiter

Um das Kontaminationsrisiko zu minimieren, sind während der Verarbeitung von Frischeprodukten die Hygienevorschriften der Good Manufacturing Practices (GMP), der Good Hygiene Practices (GHP), des Codex Alimentarius (CAC) oder des Panel on Biological Hazards der EFSA einzuhalten.

Eine der wichtigsten Maßnahmen ist die Handhygiene: Hier wird die Kombination aus Handwäsche, dem Tragen von Handschuhen und der Desinfektion der Handschuhe empfohlen, um die Übertragung und Verbreitung insbesondere viraler Erreger zu vermeiden (Stals et al., 2015).

7.3 Zusammenfassung

Humanpathogene Noroviren werden nur vom Menschen ausgeschieden, während Salmonellen auch von Wild- und Nutztieren übertragen werden können. Die Haupteintragswege humanpathogener Erreger in Gemüsekulturen bestehen daher im Kontakt mit Menschen und Tieren bzw. deren Exkrementen. Die korrekte Aufbereitung tierischer Düngemittel bzw. die Einhaltung entsprechender Fristen sowie die Wahl der Wasserquelle und der Bewässerungstechnik gehören daher zu den wichtigsten Vermeidungsstrategien. Im Hinblick auf die Verbreitung von Noroviren sind vor allem die Handhygiene und der Gesundheitszustand der Mitarbeiter relevant. Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen ganzer Produktionschargen müssen Washwasser und sämtliche Kontaktflächen möglichst erregerefrei gehalten werden. Eine wirksame Prävention ist hier besonders wichtig, da die Wirksamkeit der gängigen Desinfektionsmittel gegen Noroviren zum Teil nur unzureichend untersucht ist. Dies gilt auch für internalisierte Viren und Bakterien, die eventuell angewandten Dekontaminationsmethoden entgehen. Grundsätzlich ist bei allen Präventions- und Dekontaminationsmaßnahmen zu berücksichtigen, dass sie unterschiedliche Wirkungen auf Bakterien und Viren haben.

8 Mikrobielle Risikobewertung in Wissenschaft und landwirtschaftlicher Praxis

8.1 Verordnungen zur Lebensmittelhygiene

Produzenten und Verarbeiter frischer Produkte sind gesetzlich verpflichtet, Hygienestandards einzuhalten. In Deutschland gelten dabei die Anforderungen folgender Regelwerke:

- die allgemeinen Hygienevorschriften (GHP) des Anhangs I (für Primärproduzenten) und des Anhangs II (für produzierende, verarbeitende und vertreibende Lebensmittelunternehmer) der Verordnung (EG) Nr. 852/2004 (Europäisches Parlament / Rat, 2004) sowie der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 (Europäische Kommission, 2005), zusammengefasst im Leitfaden zur Eindämmung mikrobiologischer Risiken durch gute Hygiene bei der Primärproduktion von frischem Obst und Gemüse (Europäische Kommission, 2017)
- die nationale Lebensmittelhygiene-Verordnung (Bundesregierung, 2007),
- branchenspezifische Leitlinien der Lebensmittelwirtschaft für Gute Hygiene- und Verfahrenspraxis (QS-GAP, 2017; QS, 2017) sowie
- betriebliche Eigenkontrollverfahren nach den Grundsätzen des HACCP-Konzeptes, wie in Verordnung (EG) Nr. 852/2004 vorgeschrieben (Europäisches Parlament / Rat, 2004).

Die mikrobielle Sicherheit frischer Produkte wird also auf mehreren Ebenen geregelt: Die Mindesthygieneanforderungen sind in Rechtsvorschriften festgelegt. Die Erfüllung dieser Anforderungen durch die Lebensmittelunternehmer wird durch amtliche Kontrollen überwacht. Darüber hinaus sind die Lebensmittelunternehmer aufgefordert, eigenverantwortlich Programme zur Gewährleistung der Lebensmittelsicherheit einzuführen, die sich an den Prinzipien des HACCP-Konzeptes orientieren.

Das HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points)-Konzept, auf Deutsch *Gefährdungsanalyse und kritische Lenkungspunkte*, ist ein strukturiertes Vorgehen zum Identifizieren, Bewerten und Beherrschen gesundheitlicher Gefahren durch Lebensmittel. Es ist auf mikrobiologische, aber auch chemische und physikalische Gesundheitsgefahren anwendbar. Eine international verbindliche Version des HACCP-Konzeptes findet sich im Regelwerk des FAO/WHO Codex Alimentarius und ist Bestandteil der *Allgemeinen Grundsätze der Lebensmittelhygiene* (FAO /WHO, 1996).

Die Umsetzung des HACCP-Plans erfolgt in sieben Schritten: (1) Durchführen einer Gefahrenanalyse, (2) Identifikation der für die Lebensmittelsicherheit kritischen Kontrollpunkte, (3) Festlegen von Grenzwerten an den kritischen Kontrollpunkten (CCP), (4) Etablierung eines Überwachungssystems, (5) Festlegen von Korrekturmaßnahmen für den Fall von Abweichungen, (6) Durchführen von Evaluierungsmaßnahmen zur Überprüfung der Effizienz des HACCP-Systems und (7) Dokumentation der Maßnahmen. Eine vollständige Umsetzung des HACCP-Plans ist in der Primärproduktion jedoch noch nicht möglich (Europäisches Parlament / Rat, 2004). Dies betrifft insbesondere die Festlegung kritischer Kontrollpunkte und die Verifikation der Effizienz des HACCP-Systems (Bundesinstitut für Risikobewertung, 2005; Cerf, Donnat, & Working, 2011). Die in der Primärproduktion zur Verfügung stehenden Kontrollpunkte erfüllen in verschiedener Hinsicht nicht die Charakteristika eines CCP. So ist beispielsweise die Überwachbarkeit der Kontrollpunkte nicht gegeben, da mikrobiologische Untersuchungen hierfür zu zeitaufwändig sind, und es fehlen wirksame Gegenmaßnahmen, die bei Grenzwertüberschreitungen ergriffen würden. Die Verordnungen der Europäischen Union sehen daher ein flexibles System zur Entwicklung strukturierter spezifischer Präventionsmaßnahmen vor,

das sich an einzelnen HACCP-Grundsätzen orientiert, aber keine vollständige Umsetzung des Systems darstellt (Europäisches Parlament / Rat, 2004).

Neben den grundlegenden Standards der Guten Hygienepraxis und dem HACCP-Konzept nennt die wissenschaftliche Literatur eine dritte Ebene, das Risiko-basierte Sicherheitsmanagement (Membre & Guillou, 2016). Dieses folgt einer vorausgegangenen Risikobewertung. Die Methoden der Risikobewertung sind auf wissenschaftlicher und landwirtschaftlicher Ebene jedoch zwangsläufig sehr unterschiedlich.

8.2 Wissenschaftliche Risikobewertung

Um gezieltere Maßnahmen zur Prävention bakterieller und viraler Lebensmittelkontaminationen entwickeln zu können, ist eine differenziertere Kenntnis des quantitativen Beitrages verschiedener Kontaminationswege zur mikrobiellen Gesamtbelastung eines Produktes zum Zeitpunkt des Verzehrs erforderlich. Aufschluss über den Anteil eines Eintragsweges am Gesamtrisiko kann die mikrobiologische Risikobewertung geben (*Microbiological Risk Assessment, MRA*). Risikomanagement sollte daher auf Basis einer vorangegangenen Risikobewertung erfolgen, empfiehlt die WHO in ihren *Working principles for risk analysis* (WHO, 2007).

Eine Expositionsbeurteilung ist nach Definition von Lammerding und Fazil eine Abschätzung der Wahrscheinlichkeit, dass ein Individuum oder eine Population einer mikrobiellen Gefährdung ausgesetzt wird und in welchem Maße sie exponiert wird (Lammerding & Fazil, 2000). Zur Einschätzung der Exposition werden Eintrag und Persistenz humanpathogener Mikroorganismen entlang der Produktions- und Verarbeitungskette von den Kontaminationsquellen bis zum Verzehr modelliert. Durch Berechnung des mikrobiellen Ein- und Austrages (input / output) in jeder Phase der Produktion und Verarbeitung, quantifiziert dieses Übertragungsmodell die Pathogenbelastung des Endproduktes und die Exposition des Konsumenten (Abb. 11). Ein- und Austrag sind jedoch aufgrund der hohen Prozess-inhärenten Variabilität meist nicht exakt anzugeben.

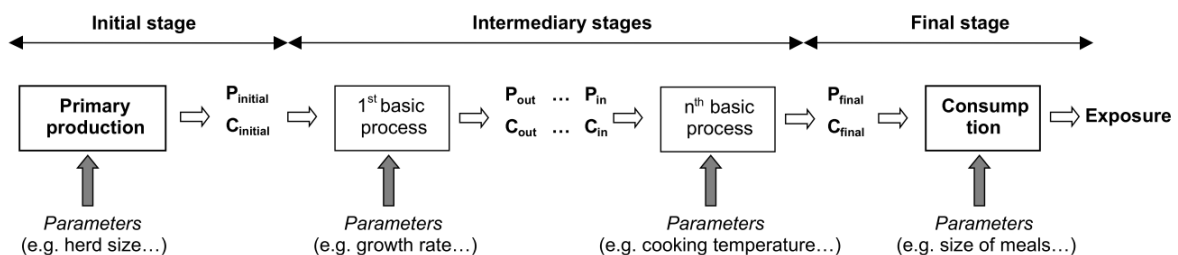


Abb. 11: Mikrobielles Übertragungsmodell (in/out) in den aufeinanderfolgenden Phasen einer Lebensmittelproduktions- und -verarbeitungskette. P = Prävalenz oder Häufigkeit, C = Kontamination des Produktes (Europäische Kommission, 2003).

Die einem Modell zugrunde liegenden Daten zum mikrobiellen Ein- und Austrag können unterschiedlichen Ursprungs sein (Europäische Kommission, 2003):

- a) Monitoring,
- b) experimentelle Datenerhebung oder
- c) mathematische Modellierung.

Im Folgenden werden exemplarisch zwei Modelle zur quantitativen Risikobewertung in der Produktion frischer Produkte vorgestellt, die auf Monitoringdaten (a) und experimentell erhobenen Daten (b) basieren.

- a) Ein auf Monitoringdaten von Maunula et al. und Kokkinos et al. basierendes Risikobewertungsmodell erlaubt die Quantifizierung des Beitrages verschiedener Kontaminationsquellen zur Belastung von Salat, Himbeeren und Erdbeeren mit humanen Adenoviren, Hepatitis-A-Viren und Noroviren zum Zeitpunkt des Verkaufs (Bouwknegt et al., 2015; P. Kokkinos et al., 2012; Maunula et al., 2013). In das Modell wurden sechs verschiedene Produktionsketten mit jeweils bis zu sechs potentiellen Kontaminationswegen (Bewässerung, Erntearbeiter, Verarbeiter, Abspülen und Förderband) einbezogen (A – F, Tab. 2). Die Bewertung des quantitativen Beitrages der modellierten Übertragungswege zur gesamten Erregerlast ergab, dass der Kontakt mit Händen eine größere Kontaminationsgefahr birgt als die Bewässerung. Der Handhygiene von Erntekräften und Verarbeitern sollte demnach bei der Vorbeugung viraler Kontamination von Salaten und Beeren höchste Priorität gegeben werden (siehe auch Kapitel 6 und 7). So kann eine quantitative Risikobewertung zu einer gezielteren Prävention beitragen.

Tab. 6: Potentielle mikrobielle Kontaminationswege, modelliert für sechs Produktionssysteme (A – F). Die angegebenen Daten stammen aus Beobachtungsstudien von Kokkinos et al. und Maunula et al. (Bouwknegt et al., 2015; P. Kokkinos et al., 2012; Maunula et al., 2013). Die Werte sind in Anzahl kontaminierter Proben/Gesamtzahl der Proben angegeben.

Chain	Product	Irrigation	Harvesters	Food handlers	Rinsing	Conveyor belt	Consumption & dose-response
A	Romaine lettuce	■ hAdV: 17/22 NoV: 1/5	■ hAdV: 31/87 NoV: 1/12		■ hAdV: 2/6 NoV: na ^a		■
B	Butterhead lettuce	■ hAdV: 0/17	■ hAdV: 3/66				■
C	Butterhead lettuce	■ hAdV: 0/22 HAV: 0/20	■ hAdV: 1/86 HAV: 2/87				■
D	Raspberries ^b			■ hAdV: 1/51		■ hAdV: 0/15	
E	Raspberries ^b		■ hAdV: 4/64			■ hAdV: 0/24	
F	Strawberries ^b		■ hAdV: 1/60				

(a) Nicht verfügbar. (b) Keine Angabe zu Konsum und Dosis-Wirkungsbeziehung, da in diesen Produktionsketten keine humanpathogenen Viren gefunden wurden und daher nur humane Adenoviren modelliert wurden. NoV=Norovirus, hAdV=humanes Adenovirus, HAV=Hepatitis-A-Virus.

- b) Ein Beispiel für eine quantitative Risikobewertung auf Basis experimentell erhobener Daten ist das 2005 publizierte Modell von Stine et al. (Scott W Stine, Song, Choi, & Gerba, 2005a). Modelliert wurde die mikrobielle Kontamination durch die Bewässerung. Das Wasser wurde dazu mit nicht-pathogenen Surrogatorganismen (dem Coliphagen PRD 1 und *E. coli* ATCC 25922) inokuliert. Zwei Bewässerungstechniken (Furchen- und unterirdische Tröpfchenbewässerung) wurden in Kombination mit verschiedenen zeitlichen Abständen zwischen Bewässerung und

Ernte (1 und 14 Tage) an drei Kulturarten (Cantaloupe-Melone, Eisbergsalat und Paprika) untersucht. Ausgehend von dem Grenzwert der US-Umweltschutzbehörde für ein akzeptables Infektionsrisiko durch Trinkwasser (1:10.000) wurde berechnet, welche Erregerkonzentration im Wasser zu einem jährlichen Risiko von 1:10.000 für eine Hepatitis-A- oder Salmonelleninfektion führen würden (Abb. 12). Risikobewertungssysteme dieser Art können als Grundlage zur Entwicklung von Standards für enterische Pathogene im Bewässerungswasser dienen.

Der beschriebene Inokulationsversuch stellt darüber hinaus einen methodischen Ansatz dar, wie die Übertragung und Persistenz humanpathogener Erreger im Verlauf des Produktions- und Verarbeitungsprozesses verfolgt werden kann. Beim Fachgespräch *Aufkommen von humanpathogenen Keimen bei frischem Obst und Gemüse* am 30.06.2015 in Rheinbach war dies als Thema für die Ausschreibung eines Forschungsprojektes vorgeschlagen worden (Jaenicke & Kriesemer, 2015).

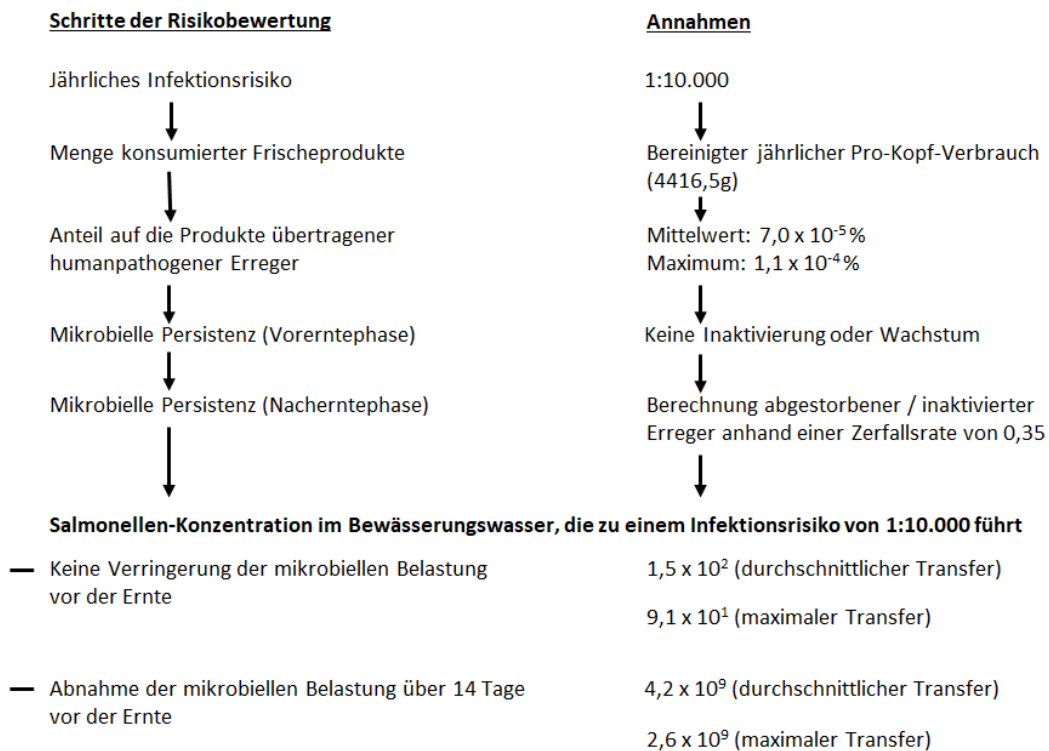


Abb. 12: Berechnung der Salmonellenkonzentration im Bewässerungswasser (Furchenbewässerung), die zu einem jährlichen Infektionsrisiko von 1:10.000 führt. Dargestellt sind die Schritte der Risikobewertung (links) und die zugrundeliegenden Annahmen (rechts). Die Konzentrationen sind für eine Ernte einen Tag (keine Verringerung der Keimbelastung) bzw. 14 Tage nach der Bewässerung (verringerte Keimlast) berechnet (Scott W Stine et al., 2005a).

8.3 Risikobewertung und -management in der Praxis

Um während der Produktion gegebenenfalls Gegenmaßnahmen ergreifen zu können, muss auch der Produzent selbst in der Lage sein, ein erhöhtes Kontaminationsrisiko rechtzeitig zu erkennen. Im Fachgespräch 2015 war daher die Entwicklung von Kriterien zur Risikoeinschätzung durch den

Produzenten gefordert worden (Jaenicke & Kriesemer, 2015). Die aktuellen Leitlinien empfehlen den Anbauern bereits, Systeme zur Risikobewertung des verwendeten Wassers (siehe Abschnitt 7.1.6) und tierischer Düngemittel (siehe Abschnitt 7.1.5) zu implementieren (QS-GAP, 2017).

Im März 2017 hat ein international zusammengesetztes Expertengremium der Frischwarenindustrie einen Ansatz zur Risikobewertung durch den Anbauer vorgestellt (Monaghan et al., 2017). Anwendungsbereich des Systems ist der Anbau frischer Produkte, insbesondere von Blattgemüse. Eine Risikobewertung durch den Produzenten entspricht nicht der Begriffsdefinition der Codex Alimentarius Commission (FAO, 1999) und unterscheidet sich zwangsläufig von den oben beschriebenen Risikobewertungsmodellen. So ist in der Primärproduktion nur eine qualitative statt einer quantitativen Risikobewertung realisierbar, da die hierzu erforderlichen Daten nur sehr begrenzt erhoben werden können. Zudem kann der Produzent weder die Gefahr, noch das Risiko spezifisch charakterisieren (Monaghan et al., 2017). Das Expertengremium hat dennoch versucht, die vom CAC definierten Prinzipien der Risikobewertung (FAO, 1999) in sein System einzubeziehen. Der Produzent kann dieses System zur Risikobewertung und -beherrschung in vier Schritten anwenden:

- Identifizierung der Gefährdung aus verfügbaren Informationsquellen.
- Beurteilung der Exposition: Wie wahrscheinlich ist es, dass die mikrobielle Kontamination eines Produktes während der Vorerntephase eine Konzentration erreicht, die zum Zeitpunkt des Verzehrs gesundheitsgefährdend wäre.
- Beurteilung der Gegenmaßnahmen: Mit welcher Wahrscheinlichkeit wird eine einzelne Intervention während der Produktionsphase die mikrobielle Kontamination des Produktes reduzieren?
- Beurteilung der Exposition nach Durchführung der Maßnahme: Wie wahrscheinlich ist es, dass nach Durchführung einer oder mehrerer Gegenmaßnahmen die mikrobielle Kontamination eines Produktes so hoch ist, dass sie zum Zeitpunkt des Verzehrs gesundheitsgefährdend wäre.

In drei beispielhaften Szenarien wird die Anwendung dieser vier Fragestellungen dargestellt. In den ersten beiden Szenarien ist eine offene Wasserquelle gegeben. Im ersten Szenario besteht keine Möglichkeit der Wasserbehandlung; im zweiten Szenario wird das Vorhandensein einer UV-C-Aufbereitungsanlage angenommen. Das letzte Szenario geht von einer allgemeinen fäkalen Kontaminationsgefahr aufgrund mangelhafter Hygiene der Erntearbeiter aus.

Beurteilt wird die potentielle Exposition der Produkte gegenüber humanpathogenen Erregern (vernachlässigbar, sehr gering, gering / mittel, hoch, sehr hoch) und die Wirksamkeit der Gegenmaßnahmen (teilweise wirksam / wirksam). Ein Eingreifen des Produzenten ist dann erforderlich, wenn die potentielle Exposition der Produkte als *mittel*, *hoch* oder *sehr hoch* und die Gegenmaßnahme als nur *teilweise wirksam* beurteilt wird.

Eine Risikobewertung durch den Produzenten, einschließlich des vorgestellten Systems, hat jedoch Schwächen. Der entscheidende Kritikpunkt ist, dass der Produzent seine Risikobewertung meist nur auf Annahmen statt auf Evidenz stützen kann. Dies hat verschiedene Gründe. Zum einen liegen zu den Effekten mehrerer kombinierter Gegenmaßnahmen kaum aussagekräftige Studienergebnisse vor. Zum anderen richten sich wissenschaftliche Publikationen in der Regel nicht an Risikomanager kleiner oder mittlerer Anbaubetriebe und bleiben daher ungenutzt. Die Autoren empfehlen daher, Forschungsergebnisse, die eine genauere Einschätzung der mikrobiellen Belastung von Obst- und

Gemüsekulturen ermöglichen, zusammenzufassen und zu übersetzen, um sie Primärproduzenten zugänglich zu machen (Monaghan et al., 2017). Dies würde eine stärker Evidenz-basierte Risikobewertung und -beherrschung in der gartenbaulichen Praxis ermöglichen.

Eine für die Produzenten aufwändigere Alternative wäre die Etablierung einer breiten Überwachung mikrobieller Indikatoren. Als Indikator fäkaler Verunreinigungen empfiehlt die EFSA *E. coli*. Gleichzeitig betont sie jedoch die Notwendigkeit standardisierter Probenahmeverfahren sowie einer soliden Datengrundlage. Erst wenn diese bestehen, können Hygienekriterien für das Monitoring festgelegt werden (Monaghan et al., 2017).

Neue Möglichkeiten im Bereich der Risikobewertung eröffnet die zunehmende Verbreitung von Hochdurchsatztechniken und Big Data-Analysen. So lassen sich beispielsweise die Ergebnisse mikrobiologischer Untersuchungen differenzierter mit dem Verlauf verschiedener Kulturbedingungen korrelieren. Auf diese Weise könnte die benötigte Evidenz für eine fundierte Bewertung und Handhabung mikrobieller Risiken in der Produktion frischer Produkte generiert werden (Monaghan et al., 2017).

8.4 Mikrobiologische Kriterien

Ein wichtiges Instrument in Risikobewertung und -management der Lebensmittel produzierenden und verarbeitenden Industrie soll an dieser Stelle kurz vorgestellt werden: Die mikrobiologischen Kriterien (CAC, 2013; Europäische Kommission, 2005). Zu den mikrobiologischen Kriterien gehören Lebensmittelsicherheitskriterien, die zur Beurteilung der mikrobiologischen Sicherheit eines Endproduktes dienen, und Prozesshygienekriterien, die eine Überprüfung der Prozesshygiene ermöglichen. Die EFSA empfiehlt die Etablierung von Prozesshygienekriterien für die Produktionsprozesse von Blattgemüsearten, um auf dieser Basis die Good Agricultural Practices (GAP) und die Good Hygiene Practices (GHP) validieren zu können (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014). Bislang fehlen diese in den entsprechenden EU-Verordnungen. Nach Definition der Codex Alimentarius Commission bestehen mikrobiologische Kriterien aus einem Grenzwert für einen festgelegten nachzuweisenden Mikroorganismus und dem Lebensmittel, Prozess oder Hygienekontrollsystem, auf das sich das mikrobiologische Kriterium bezieht (CAC, 2013). Daneben beinhaltet es aber auch einen definierten Zweck, einen (Zeit-)Punkt in der Prozesskette, einen Probenahmeplan, eine mikrobiologische Nachweismethode sowie statistische Analysemethoden (CAC, 2013).

9 Mikrobiologische Nachweismethoden

Für den qualitativen und quantitativen Nachweis bakterieller und viraler Humanpathogene in Lebensmitteln sind verschiedene methodische Ansätze entwickelt worden. Nachfolgend werden

- klassische Methoden (siehe Abschnitt 9.1),
- PCR-basierte Methoden (siehe Abschnitt 9.2),
- Methoden der Hochdurchsatz-Sequenzierung (siehe Abschnitt 9.3),
- DNA-Microarray-Methoden (siehe Abschnitt 9.4),
- immunologische Methoden (siehe Abschnitt 9.5) und
- Biosensor-basierte Methoden (siehe Abschnitt 9.6)

insbesondere zum Nachweis von Salmonellen und Noroviren vorgestellt und hinsichtlich ihrer Vor- und Nachteile bewertet.

Sofern verfügbar, werden die von den zuständigen Normungsgremien, dem Deutschen Institut für Normung (DIN), dem Europäischen Komitee für Normung (Comité Européen de Normalisation, CEN) und der Internationalen Organisation für Normung (Organization for Standardization, ISO), validierten Standardmethoden angegeben.

9.1 Klassische Methoden

Die klassischen mikrobiologischen Methoden beruhen auf dem kulturellen Nachweis von Infektionserregern. Zum Nachweis von Salmonellen in pflanzlichen Lebensmitteln steht die neu herausgegebene Methode DIN EN ISO 6579-1:2017-07 zur Verfügung. Die Methode besteht aus vier Schritten: (1) Der Voranreicherung in einem nicht selektiven, flüssigen Medium, (2) der Anreicherung in/auf selektiven Medien, (3) der Ausplattierung auf festen Selektivmedien und (4) der Bestätigung der Identität durch biochemische und serologische Untersuchungen einer Subkultur vermuteter Salmonellen (DIN EN ISO 6579-1:2017-07, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren zum Nachweis, zur Zählung und zur Serotypisierung von Salmonellen - Teil 1: Nachweis von Salmonella spp.*).

Vorteile der klassischen Methoden: Die kulturbasierten konventionellen Isolations- und Nachweismethoden sind weltweit anerkannte Standardmethoden. Sie zeichnen sich durch Verlässlichkeit, Sensitivität für den Zielorganismus und eine breite Anwendbarkeit bei unterschiedlichen Lebensmittelmatrices aus (Yeni, Acar, Polat, Soyer, & Alpas, 2014).

Nachteile der klassischen Methoden: Gleichzeitig erfordern die klassischen Methoden eine umfangreiche Laborausstattung, große Mengen von Kulturmedien und einen vergleichsweise hohen Zeitaufwand von mehreren Tagen zum Nachweis des Zielorganismus (Yeni et al., 2014). Probleme ergeben sich bei nicht-kultivierbaren Erregern und Sporen bzw. VBNC-Stadien. Für Viren existieren keine Kultur-basierten Nachweismethoden.

9.2 PCR-basierte Methoden

9.2.1 Klassische Polymerasekettenreaktion

Der Erregernachweis mit Hilfe der klassischen Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) beruht auf der Amplifikation pathogenspezifischer Nukleinsäuresequenzen (Mullis et al., 1986).

Für die Amplifikation werden neben der Original-DNA, der DNA-Polymerase und den Desoxyribonucleosidtriphosphaten (DNA-Bausteinen) zwei spezifische Primer (kurze komplementäre Oligonukleotide) benötigt, die auf den beiden Einzelsträngen der DNA jeweils den Startpunkt der DNA-Synthese markieren. Die Reaktion wird im Thermocycler in mehreren aufeinanderfolgenden Amplifikationszyklen durchgeführt. Die PCR-Produkte können durch gelelektrophoretische Auftrennung und Vergleich mit einem Größenstandard nachgewiesen werden.

Die PCR lässt sich auch mit einer reversen Transkriptase durchführen und wird dann als *Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion* (RT-PCR) bezeichnet.

Werden durch Zugabe mehrerer Primerpaare verschiedene Nukleinsäuresequenzen gleichzeitig amplifiziert, spricht man von einer *Multiplex PCR* (mPCR). Eine methodische Schwierigkeit stellen bei der mPCR mögliche Interaktionen zwischen den Primerpaaren dar.

9.2.2 Real-time PCR

Für den quantitativen Nachweis empfiehlt sich die Real-time PCR (quantitative PCR, qPCR). Die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgt durch Fluoreszenzmessung im Thermocycler ohne vorherige gelelektrophoretische Auftrennung.

Zum Nachweis von Salmonellen in Lebensmitteln ist neben diversen kommerziell verfügbaren Testkits eine DIN-genormte Real-time PCR-Methode verfügbar, die DIN 10135:2013-05 (*Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln - Verfahren zum Nachweis von Salmonellen*).

Aufgrund ihrer niedrigen Nachweisgrenze (theoretisch ein einziges RNA-Molekül pro RT-PCR-Reaktion) ist die quantitative RT-PCR die Methode der Wahl für humane Noroviren in Lebensmitteln, wo die Viruskonzentration in der Regel relativ gering ist. Als Standardmethoden zum Nachweis von Noroviren mittels quantitativer RT-PCR sind die Methoden EN ISO 15216-1:2017 (*Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren zur Bestimmung von Hepatitis-A-Virus und Norovirus mittels Real-time-RT-PCR - Teil 1: Verfahren zur Quantifizierung*) und CEN ISO/TS 15216-2:2013 (*Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Horizontales Verfahren zur Bestimmung von Hepatitis A-Virus und Norovirus in Lebensmitteln mittels Real-time-RT-PCR - Teil 2: Verfahren für den qualitativen Nachweis*) etabliert.

Vorteile von PCR-Methoden: PCR-Methoden liefern verlässliche, reproduzierbare und spezifische Ergebnisse (Klein, 2002; Lindstrom et al., 2001). Sie leisten gleichzeitig die Identifikation, Quantifizierung und Subtypisierung einer Spezies (Girones et al., 2010). Gegenüber den klassischen mikrobiologischen Methoden sind sie schneller und ermöglichen die parallele Detektion verschiedener Humanpathogene (De Boer, Ott, Keszyüs, & Kooistra-Smid, 2010). Die Sensitivität der Methode kann durch die Entwicklung neuer Primer und die Verbesserung der Amplifikations- und Detektionsparameter weiter gesteigert werden (S. Yang et al., 2002).

Nachteile von PCR-Methoden: Die Sensitivität einer PCR-Methode kann durch die komplexe Matrix der Lebensmittelprobe, insbesondere durch sogenannte PCR-Inhibitoren, beeinträchtigt sein (Perez et al., 2003). Eine sorgfältige Isolation und Aufreinigung der DNA bzw. RNA ist daher wichtig; gegebenenfalls kann auch eine kulturelle Anreicherung der Bakterien erforderlich sein.

Um einen lebensmittelbedingten Ausbruch zuverlässig auf einen Infektionserreger zurückzuführen, müssen PCR-Ergebnisse (im Falle bakterieller Erreger) durch kulturbasierte Methoden bestätigt werden.

Die genannte quantitative RT-PCR-Methode zum Nachweis von Noroviren ermöglicht keine Unterscheidung zwischen infektiösen und nicht-infektiösen Viren. Dies ergibt sich daraus, dass die RT-qPCR kurze Nukleinsäuresequenzen (von ca. 100 Basen) amplifiziert und detektiert, die sowohl von einem intakten Virus, als auch von defekten Viren mit partiell intaktem Genom oder von RNA-Bruchstücken aus zerfallenen und inaktivierten Viren stammen können. Daher besteht großes wissenschaftliches Interesse an der Entwicklung von Methoden, die intakte und infektiöse Viren von defekten Viren oder RNA-Bruchstücken unterscheiden können (Knight, Li, Uyttendaele, & Jaykus, 2012; Marti, Ferrary-Américo, & Barardi, 2017).

9.2.3 Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)

Im Gegensatz zur PCR erfolgt die Reaktion bei der Nukleinsäuresequenz-basierten Amplifikation (Nucleic acid sequence-based amplification, NASBA) bei gleichbleibender Temperatur (isothermal). Zur Amplifikation eines einzelsträngigen RNA-Templates werden drei Enzyme verwendet, die T7-RNA-Polymerase, die RNase H und eine spezifische Reverse Transkriptase (avian myeloblastosis virus reverse transcriptase). Die Methode bietet sich zum Nachweis humanpathogener Viren mit einzelsträngigen RNA-Genomen an; mit einem weiteren Zwischenschritt kann aber auch DNA als Template eingesetzt werden. Wie eine Studie von Simpkins zeigte, kann mittels NASBA mRNA aus *Salmonella enterica* spezifisch nachgewiesen und die Lebensfähigkeit der Bakterien untersucht werden (Simpkins, Chan, Hays, Popping, & Cook, 2000). Auch zum Nachweis von Noroviren ist eine Reihe von NASBA-Methoden entwickelt worden (Lamhoujeb, Charest, Fliss, Ngazoa, & Jean, 2009; Patterson et al., 2006).

Vorteile der NASBA: Der gerätetechnische Aufwand der NASBA ist vergleichsweise gering.

Nachteil: Wie bei der RT-qPCR ist auch mit der NASBA keine Unterscheidung zwischen infektiösen und nicht-infektiösen Viren möglich.

9.2.4 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Die Schleifen-vermittelte isothermale Amplifikation (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) stellt eine alternative Variante der isothermalen Amplifikation dar. Sie arbeitet mit einer strangversetzenden DNA-Polymerase; dabei kommen vier bis sechs Primer zum Einsatz. Der Name leitet sich aus den Endprodukten der Reaktion ab, blumenkohllartigen DNA-Strukturen mit vielfachen Schleifen- und Stamm-Schleifen-Strukturen (loop / stem loop structures, Zhao, Lin, Wang, & Oh, 2014). LAMP- bzw. RT-LAMP-Methoden sind sowohl für Salmonellen (Ye et al., 2011) als für Noroviren (Fukuda, Sasaki, & Seno, 2008) entwickelt worden.

Vorteile der LAMP: Bei der LAMP können wie bei der Multiplex-PCR mehrere DNA-Sequenzen parallel nachgewiesen werden. Die Quantifizierung der Amplifikationsprodukte kann wie bei der Real-time PCR optisch erfolgen.

Nachteil der LAMP: Das Primerdesign ist aufwändig und muss softwaregestützt entwickelt werden. Auch die LAMP ermöglicht keine Unterscheidung zwischen infektiösen und nicht-infektiösen Viren.

9.3 Methoden der Hochdurchsatz-Sequenzierung

9.3.1 Metagenomische Sequenzierung

Die Methoden der Hochdurchsatz-Sequenzierung (Next Generation Sequencing, NGS) können im Bereich der Lebensmittelsicherheit zur Analyse des Mikrobioms (metagenomische Sequenzierung) oder einzelner Erreger (Einzelzell-Sequenzierung) eingesetzt werden. Zur Analyse eines Mikrobioms, beispielsweise eines Biofilms, wird die DNA der Mikroorganismen aus dem Biofilm isoliert, definierte (z.B. die 16SrRNA) oder unspezifische Bereiche des Erbguts mithilfe der PCR amplifiziert und die PCR-Produkte parallel sequenziert. Durch Abgleich der erhaltenen Sequenzen mit Datenbanken können die Bakterien taxonomisch eingeordnet werden. Die Anzahl identischer Sequenzen gibt zusätzlich Auskunft über die Häufigkeit eines Bakteriums in einer Probe (Frontzek, 2015).

Bei den Methoden zur Charakterisierung des viralen Metagenoms besteht allerdings noch Entwicklungsbedarf. Aw hat 2016 erstmals eine Methode zur metagenomischen Analyse des Viroms von Salatpflanzen publiziert (Aw, Wengert, & Rose, 2016).

Vorteile der metagenomischen Sequenzierung: Die Probenahme ist einfach (Gewinnung eines Abstrichs), eine vorherige Anreicherung ist nicht erforderlich. Der Probendurchsatz ist hoch, der Zeitaufwand gering. Die Methode erlaubt funktionale und taxonomische Analysen. Die gute Lagerfähigkeit der Proben erleichtert Verlaufskontrollen. Inzwischen stehen günstige Geräte zur Verfügung, so dass diese Analysen auch für die Frischwarenindustrie infrage kommen. Den größten Vorteil bietet jedoch die hohe analytische Sensitivität der Methode (Frontzek, 2015).

Nachteile der metagenomischen Sequenzierung: Viele der identifizierten Mikroorganismen sind oft noch unbekannt. Die Datenauswertung erfordert bioinformatische Expertise (Ercolini, 2013).

9.3.2 Einzelzell-Sequenzierung

Einzelzell-Genomik (single cell genomics) bedeutet, dass die DNA einer einzigen Zelle sequenziert wird. Dazu werden die Zellen vereinzelt, lysiert und die gewonnene DNA unter Verwendung der LAMP-Polymerase sowie von random-Hexamer-Primern amplifiziert (Bayer & Hentschel, 2012). Die amplifizierten DNA-Sequenzen stehen anschließend für die Hochdurchsatz-Sequenzierung zur Verfügung.

Vorteile der Einzelzell-Sequenzierung: Die Einzelzell-Genomik ermöglicht erstmalig das Erfassen der exakten genomischen Information einer einzelnen Bakterienzelle.

Nachteile der Einzelzell-Sequenzierung: Bei der Vereinzelnung der Bakterienzellen kann es zu Verunreinigungen mit Fremd-DNA kommen. Eine Beschädigung der DNA während der Lyse kann zum Verlust genetischer Information führen.

9.3.3 DNA-Barcoding

Mit Hilfe des DNA-Barcoding können Bakterien und Viren anhand der DNA-Sequenz eines molekularen Markers bestimmt werden. Die Bezeichnung *Barcoding* stammt von der Darstellung der Basensequenz in Form eines Strichcodes. Aus den Lebensmittelproben wird zunächst die DNA extrahiert. Anschließend wird der molekulare Marker isoliert, mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Die taxonomische Bestimmung erfolgt durch Abgleich der Markersequenz mit einer

Datenbank. In der Lebensmittelindustrie wird die Methode bislang vor allem zur Herkunftsbestimmung von Fisch und Meeresfrüchten angewendet.

Vorteile des DNA-Barcoding: Die Methode ist sensitiv, schnell, kostengünstig, teils automatisierbar und bei einem breiten Spektrum von Ausgangsmaterialien einsetzbar (Galimberti et al., 2015).

Nachteile des DNA-Barcoding: Die Performance des DNA barcoding ist stark von der molekularen Variabilität der Organismen beeinflusst (Galimberti et al., 2015).

9.4 DNA-Microarray-Methoden

Die DNA-Microarray-oder DNA-Chip-Technologie basiert auf der komplementären Bindung der Proben-DNA an bekannte Nukleinsäuresequenzen (Gensonden), die auf einem Plastik- oder Glasplättchen (Microarray) immobilisiert sind. Die DNA aus den Lebensmittelproben wird zunächst extrahiert und bei der darauf folgenden Amplifikation markiert. Nach der Hybridisierung wird automatisiert detektiert, an welchen Positionen auf dem Array die markierten Amplifikate gebunden haben. Die Kombination der detektierten DNA-Fragmente gibt Aufschluss über die Art des Erregers (Schubert & Wieser, 2013). Zur Detektion von Lebensmittelerregern wie Salmonellen (Chiang et al., 2006) und Noroviren (Pagotto, Corneau, Mattison, & Bidawid, 2008) sind verschiedene DNA-Microarray-Methoden entwickelt worden.

Vorteile der DNA-Microarray-Methoden: Die Microarray-Technik erlaubt den parallelen Ablauf einer großen Zahl spezifischer Nachweisreaktionen bei relativ geringem Aufwand (Schubert & Wieser, 2013).

Nachteile der DNA-Microarray-Methoden: Die Kosten für Material und Geräte sind relativ hoch (Schubert & Wieser, 2013).

9.5 Immunologische Methoden

Der immunologisch basierte Nachweis von Infektionserregern in Lebensmittelproben macht sich die spezifische Bindung eines Antikörpers an sein Antigen zu Nutze. Die Sensitivität und Spezifität einer immunologischen Methode werden von der Bindungsstärke zwischen Antikörper und Antigen bestimmt.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Der Enzyme-linked immunosorbent assay ist die verbreitetste immunologisch basierte Methode zur Detektion von Lebensmittelkeimen. Die effektivste Variante ist der Sandwich ELISA mit zwei Antikörpern (Zhao et al., 2014). Der erste Antikörper wird in der Regel in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte immobilisiert. Bei Zugabe der Probe bindet das Zielantigen an den immobilisierten Antikörper, an das im darauf folgenden Schritt ein zweiter, Enzym-konjugierter Antikörper bindet. Der qualitative und quantitative Nachweis erfolgt durch Zugabe eines farblosen Substrates, das durch das gebundene Enzym in einen Farbstoff umgesetzt wird (G. Zhang, 2013). Für Salmonellen sind sowohl in der wissenschaftlichen Literatur, als auch von kommerziellen Anbietern ELISA-Methoden verfügbar (Mansfield & Forsythe, 2001, z.B. www.eurofins.de). Auch zur immunologischen Detektion von Noroviren ist eine Reihe von Testkits kommerziell verfügbar (z.B. www.r-biopharm.com oder www.oxid.com).

Vorteile des ELISA: Der ELISA ist schnell, robust und spezifisch. Die Methode kann nicht nur Bakterienzellen, sondern auch Sporen, Viren und Toxine nachweisen (Iqbal et al., 2000). Der Probendurchsatz ist hoch; eine Automatisierung ist technisch möglich.

Nachteile des ELISA: Immunologische Methoden sind für Bakterien weniger spezifisch und sensitiv als Nukleinsäure-basierte Nachweistechiken. Es können falsch negative und falsch positive Ergebnisse (Kreuzreaktionen mit strukturell verwandten Antigenen) vorkommen. Die Proben müssen angereichert werden (G. Zhang, 2013; Zhao et al., 2014).

Weitere spezifische Nachteile bestehen bei ELISA-Methoden zum Nachweis von Noroviren: Zum einen weisen humane Noroviren eine hohe Diversität ihrer Antigenausstattung auf. Dies erschwert die Identifikation konservierter antigener Epitope zur Antikörperentwicklung, weshalb für einen ELISA meist Antikörper-Mischungen verwendet werden. Trotzdem kommt es zu falsch negativen Ergebnissen, da damit nicht alle Genotypen erfasst werden (Kele, Lengyel, & Deak, 2011). Zum anderen können die Assays nicht zwischen infektiösen Viruspartikeln, leeren Capsiden und freiem Antigen unterscheiden (Hardy, White, Ball, & Estes, 1995). Ergebnisse von ELISA- und RT-qPCR-Methoden, die Erreger-RNA spezifisch amplifizieren und quantifizieren, stimmen daher häufig nicht überein (Costantini et al., 2010). Darüber hinaus sind ELISA-Methoden mit einer Nachweisgrenze von 10^5 Partikeln zu wenig sensitiv, um Noroviren in Lebensmittelproben ohne Aufkonzentration nachzuweisen. Daher dient die Methode nur zur vorläufigen Identifikation eines Ausbruchserregers, nicht jedoch als diagnostisches Instrument.

9.6 Biosensor-basierte Methoden

Biosensoren sind analytische Geräte, die aus zwei Hauptkomponenten aufgebaut sind: Einem Biorezeptor und einem Umwandler. Der Biorezeptor, der den Zielanalyten erkennt, kann ein biologisches Molekül (Enzym, Antikörper, Nukleinsäure oder Rezeptor), ein biologisch gewonnenes Molekül (Aptamer oder rekombinanter Antikörper) oder eine biomimetische Substanz sein (molekular geprägtes Polymer oder synthetischer Katalysator) sein. Der Umformer wandelt biologische Interaktionen zwischen Zielanalyt und Biosensor in messbare elektrische Signale um (Zhao et al., 2014).

Zum Nachweis von Lebensmittelkeimen werden heute überwiegend optische, aber auch elektrochemische Biosensoren eingesetzt (G. Zhang, 2013; Zhao et al., 2014).

9.6.1 Optische Biosensoren

Unter den optischen Biosensoren wird im Bereich der mikrobiellen Lebensmittelsicherheit vor allem der Oberflächenplasmonresonanzsensor (surface plasmon resonance, SPR) verwendet, da er eine hohe Empfindlichkeit besitzt. Bei der SPR werden die Biorezeptoren auf einer Metalloberfläche immobilisiert. Die elektromagnetische Strahlung einer bestimmten Wellenlänge interagiert mit der Elektronenwolke der Metalloberfläche und erzeugt eine starke Resonanz. Bindet ein humanpathogener Erreger an die Metalloberfläche, so ändert sich ihr Brechungsindex und somit die Wellenlänge, die für eine Elektronenresonanz erforderlich ist (G. Zhang, 2013; Zhao et al., 2014).

Vorteile optischer Biosensoren: Optische Biosensoren bieten eine hohe Sensitivität, einen Echtzeit- oder annähernden Echtzeitnachweis und einen markierungsfreien Nachweis (Mandal, Biswas, Choi, & Pal, 2011; G. Zhang, 2013).

Nachteile optischer Biosensoren: Die Kosten dieser Technik sind relativ hoch (Mandal et al., 2011; G. Zhang, 2013).

9.6.2 Elektrochemische Biosensoren

Je nach Parameter, anhand dessen die Antigen-Biorezeptor-Interaktion gemessen wird, lassen sich elektrochemische Biosensoren weiter unterscheiden in amperometrische (Strom), impedimetrische (Impedanz), potentiometrische (Spannung) und konduktometrische Biosensoren (Leitfähigkeit, Zhang, 2013).

Zum Nachweis von Lebensmittelkeimen kommt als Umwandlungstechnik vor allem die elektrochemische Impedanzspektroskopie zum Einsatz.

Für Salmonellen sind bereits verschiedene Nachweismethoden mit Hilfe elektrochemischer Biosensoren beschrieben worden (Ma et al., 2014). Hong beschreibt in seiner 2015 erschienen Publikation auch eine elektrochemische Biosensor-Methode zum Nachweis von Noroviren (Hong, Kwon, Kim, & Yang, 2015).

Vorteile elektrochemischer Biosensoren: Das automatisierte Verfahren ermöglicht einen hohen Probendurchsatz und einen markierungsfreien Erregernachweis (Mandal et al., 2011; G. Zhang, 2013).

Nachteile elektrochemischer Biosensoren: Die Methoden besitzt eine geringe Spezifität, kann von der Probenmatrix beeinträchtigt sein und beinhaltet viele Waschschrte (Mandal et al., 2011; G. Zhang, 2013).

9.7 Zusammenfassung

Die klassischen, kulturbasierten mikrobiologischen Methoden sind selektiv, aber mit einem hohen Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden. Da eine rasche Identifikation bakterieller und viraler Krankheitserreger sowohl in der medizinischen Diagnostik, als auch im Bereich der Lebensmittelsicherheit von entscheidender Bedeutung ist, wird die Neu- und Weiterentwicklung schneller Nachweismethoden laufend vorangetrieben (Tab. 7). Neben einem verminderten Zeitaufwand werden weitere Anforderungen an die neu entwickelten mikrobiologischen Nachweistechiken gestellt. Dazu zählen

1. eine höhere Spezifität,
2. ein hoher Probendurchsatz,
3. eine erhöhte Verlässlichkeit,
4. eine breite, internationale Anwendbarkeit,
5. das Vorhandensein von Protokollen, die eine Standardisierung erlauben und
6. möglichst geringe Kosten.

Nukleinsäure-basierte Methoden, wie PCR und qPCR, haben eine hohe Sensitivität und werden häufig zum Nachweis von Lebensmittelkeimen eingesetzt. Sie erfordern jedoch geschultes Personal und eine spezielle instrumentelle Ausstattung. Mit Hilfe alternativer Nukleinsäure-basierter Methoden, wie etwa NASBA und LAMP, können nicht nur die Erreger, sondern auch ihre Toxine nachgewiesen werden. Diese Methoden sind zudem relativ kostengünstig, da sie keinen Thermocycler erfordern. Die Anwendungsmöglichkeiten des High-throughput Sequencing in der

Detektion von Lebensmittelkeimen bieten den Vorteil einer hohen analytische Sensitivität und einer hohen Leistungsfähigkeit; sie erfordern gleichzeitig aber eine teure Ausstattung und geschultes Personal. Daneben sind verschiedene biosensorbasierte Methoden zum Nachweis von Humanpathogenen aus Lebensmittelproben entwickelt worden. Sie zeichnen sich vor allem durch ihre hohe Geschwindigkeit und ihre geringen Kosten aus. Biosensorbasierte Methoden sind leicht zu bedienen und erfordern kein geschultes Personal. Eine vorherige Probenanreicherung ist nicht notwendig. Die Technik ist jedoch störanfällig für Einflüsse der Lebensmittelmatrix und erfordert in diesem Bereich methodische Verbesserungen. Immunologische Methoden, wie der ELISA, werden ebenfalls zum Nachweis bakterieller Humanpathogene und ihrer Toxine eingesetzt. Die Qualität der Ergebnisse kann aber durch andere Zellen, DNA oder Proteine in der Probe beeinträchtigt werden. Zur Bestätigung von Untersuchungsergebnissen werden die Methoden vielfach kombiniert. Die Identifikation der effizientesten und präzisesten Methodenkombination erfordert jedoch weitere Untersuchungen (Law, Ab Mutalib, Chan, & Lee, 2015).

Besonderer Entwicklungsbedarf besteht bei den Methoden zum Nachweis von Noroviren, da die Standardmethoden nicht zwischen infektiösen und nicht-infektiösen Viren differenzieren können. Die Methodenentwicklung wird derzeit intensiv vorangetrieben, um die Belastung von Lebensmitteln mit infektiösen Erregern bestimmen und Methoden zur Inaktivierung von Viren auf ihre Wirksamkeit prüfen zu können (Knight et al., 2012). Verschiedene PCR-Methoden befinden sich in der Entwicklung, die unter anderem auf Zellkultur oder Vorbehandlungen basieren, z.B. durch Zusatz von DNasen und RNasen (Marti & Barardi, 2016; Marti et al., 2017; Randazzo, López-Gálvez, Allende, Aznar, & Sánchez, 2016).

Tab. 7: Charakteristika mikrobiologischer Nachweismethoden (Mandal et al., 2011)

Methode	Nachweisgrenze (KbE mL⁻¹ oder g)	Zeitaufwand	Spezifität der Methode
Klassische Methoden	1	1 - 3 Tage	gut
Impedimetrie	1	6 – 24 Std.	moderat / gut
Immunologische Methoden	10 ⁴	1 – 2 Std.	moderat / gut
Nukleinsäure-basierte Assays	10 ³	6 – 12 Std.	Sehr gut

9.8 Standardisierung von Probenahme und Probenaufbereitung

Wie in den vorangegangenen Abschnitten aufgeführt, stehen zum Nachweis der wichtigsten Lebensmittel-assoziierten Erreger etablierte, von Normungsgremien validierte und weltweit verbreitete Standardmethoden zur Verfügung. Dazu zählen sowohl klassische Kultur-basierte Verfahren als auch PCR-Methoden (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014). Neben der Standardisierung der Nachweismethoden empfiehlt das Panel on Biological Hazards der EFSA auch eine Harmonisierung der Probenahme und Probenaufbereitung (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014). Bislang fehlen international anerkannte Leitlinien zu Zeitpunkt und Methode der Probenahme von Blattgemüse sowohl für die Primärproduktion im Gewächshaus oder auf dem Feld als auch für die Weiterverarbeitung in der Frischwarenindustrie. Ebenso fehlen Leitlinien zur Probenaufbereitung

und zur Gewinnung einer für die gesamte Pflanze repräsentativen Probe. Durch Einführung international anerkannter Standards ließe sich die Vergleichbarkeit von Ergebnissen unterschiedlicher mikrobiologischer Studien deutlich verbessern (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014).

Zur Identifikation geeigneter Probenahmepunkte während der Verarbeitung von Blattgemüse in der Frischwarenindustrie haben Castro-Ibáñez et al. 2015 eine Studie publiziert (Castro-Ibáñez, López-Gálvez, Gil, & Allende, 2015). Ziel der Untersuchung war, die mikrobielle Kontamination eines Fresh-cut Produktes durch den gesamten Verarbeitungsprozess zu verfolgen, Probenahmepunkte zu identifizieren und ihren prädiktiven Wert für den Kontaminationsgrad des Endproduktes zu ermitteln. Dazu wurden in Lebensmittel-verarbeitenden Betrieben zu drei verschiedenen Tageszeiten Proben von Produkt (Babyspinat, Ausgangs- und Endprodukt), Wasser (frisches Wasser, Waschwasser, Spülwasser und Zentrifugenwasser) und Oberflächen (Handschuhe der Mitarbeiter und Oberflächen der Geräte) genommen und mikrobiologisch untersucht. *L. monocytogenes* und pathogene *E. coli* waren in keiner der Proben nachzuweisen. *Salmonella* spp. und generische *E. coli*, bestimmt als Indikator der Prozesshygiene und möglicher fäkaler Verunreinigungen (Kevin Holvoet, Sampers, Seynaeve, & Uyttendaele, 2014), wurden ausschließlich im Zentrifugenwasser detektiert. Angesichts des sporadischen Vorkommens quantitativ relevanter Kontaminationsereignisse wird eine Identifikation von Probenahmepunkten zur Bewertung von Kontaminationsquellen in der Verarbeitungskette als zielführender angesehen, als die systematische Analyse ganzer Produktchargen (Tomás-Callejas et al., 2011).

Für die Primärproduktion im Gewächshaus oder auf dem Feld sind uns keine Studien zur Identifikation geeigneter Probenahmepunkte bekannt. Hier sind weitere Untersuchungen erforderlich. Für staatliche Kontrollen von Pestizidrückständen in und auf pflanzlichen und tierischen Erzeugnissen gibt es seit 2002 eine EU-Richtlinie zur Harmonisierung der Probenahmemethoden (Europäische Kommission, 2002).

10 Resultierende wissenschaftliche Fragestellungen und Empfehlungen

Aus dieser Literaturübersicht ergeben sich zahlreiche wissenschaftliche Fragestellungen. Diese sind im folgenden Abschnitt ohne jede Bewertung nach Kapiteln unterteilt aufgeführt. Bitte berücksichtigen Sie, dass unter jeder Frage die Textpassage zitiert wird, aus der sich die Frage ableitet. Diese stellt nicht die Antwort auf die Frage dar.

Eine Beschreibung der aus dieser Übersicht identifizierten aktuellen Forschungsthemen mit besonders hoher Relevanz für die mikrobielle Sicherheit frischer Produkte finden Sie in Abschnitt 10.2.

10.1 Resultierende wissenschaftliche Fragestellungen

10.1.1 Das pflanzliche Mikrobiom (Kapitel 3)

- **Wie beeinflusst die Zusammensetzung des bestehenden pflanzlichen Mikrobioms die Etablierung und Persistenz eingetragener humanpathogener Bakterien und Viren auf Blattgemüse?**
 - „Die Etablierung und Vermehrung eingetragener humanpathogener Krankheitserreger ist abhängig von der Dichte und Zusammensetzung des pflanzlichen Mikrobioms (Teplitski et al., 2011). Die bestehende Mikrobengesellschaft kann durch unterschiedliche Interaktionsmechanismen einen fördernden oder hemmenden Effekt auf Adhäsion, Persistenz und Vermehrung humanpathogener Erreger ausüben. Hemmend wirken z.B. die Produktion von antibiotisch wirksamen Substanzen oder Exoenzymen, die Konkurrenz um Eisen oder Makronährstoffe und die Induktion pflanzlicher Abwehrmechanismen (Whipps, 2001). Einen fördernden Einfluss können phytopathogene Mikroorganismen (einschließlich Pilze) haben, die durch pektinolytische Aktivität Nährstoffe freisetzen, die Integrität des pflanzlichen Gewebes stören, dadurch seinen pH-Wert erhöhen und pflanzeneigene Abwehrmechanismen schwächen (Wade & Beuchat, 2003). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass *Enterobacter asburiae* das Überleben des *E. coli* Serovars O157:H7 auf Salatblättern um den Faktor 20 - 30 verminderte, während *Wausteria paucula* es auf das sechsfache verlängerte (Cooley et al., 2006). Die pflanzlichen Mikrobiota stellen somit einen entscheidenden Einflussfaktor bei der Etablierung humanpathogener Mikroorganismen auf pflanzlichen Oberflächen (Brandl, 2006).“ (Abschnitt 3.5)
 - „Mit der Einführung technischer Innovationen, wie des Next-Generation Sequencing, haben sich neue Möglichkeiten der Omics-Forschung eröffnet. Eine Analyse des Metagenoms, also der gesamten genetischen Information einer mikrobiellen Gemeinschaft, erlaubt komparative ökologische Untersuchungen und gewährt neue Einblicke in die Struktur, Funktion und Variabilität des pflanzlichen Mikrobioms (Rastogi, Coaker, & Leveau, 2013).“ (Kapitel 3)
- **Wie lassen sich auf antagonistischen Mikroorganismen basierende Biokontroll-Strategien zu effizienten Maßnahmen gegen humanpathogene Erreger an Obst und Gemüse weiterentwickeln?**

- „Studien deuten auf eine potentielle Nutzbarkeit antagonistischer Mikroorganismen als Maßnahme gegen humanpathogene Erreger auf frischen Produkten hin (Goodburn & Wallace, 2013). In einer Untersuchung von Matos und Garland konnte die Salmonellenbesiedlung von Alfalfa-Sprossen sowohl durch einzelne als auch durch gemischte Bakterienstämme reduziert werden (Matos & Garland, 2005). Saldinger und Manulis-Sasson sehen in der Suche nach antagonistischen Mikroorganismen in Kombination mit High-Throughput Screening Programmen Potential zur Entwicklung von Biokontrollmaßnahmen (Sela Saldinger & Manulis-Sasson, 2015). Neben antagonistischen Bakterien werden auch lytische Phagen auf ihre Eignung als potentielle Biokontroll-Agenten untersucht (M. Jacques et al., 2015).“ (Abschnitt 7.1.11)

10.1.2 Zur Besiedlung von Pflanzen erforderliche bakterielle Fähigkeiten (Kapitel 4)

- **Welche Rolle spielt das Quorum Sensing in der Entstehung und Reifung von Biofilmen? Wie lässt sich durch Eingriff in das Quorum Sensing die Bildung von Biofilmen hemmen? Stellt dies einen möglichen Ansatzpunkt für die Entwicklung von Präventionsmaßnahmen dar?**
 - „Die Ausbildung eines Biofilms erfolgt in einem vierstufigen Prozess: [...] In dieser Phase der Biofilmbildung werden konzertierte Veränderungen der Populationsdichte und der Genexpression über das Quorum Sensing System koordiniert (Walters & Sperandio, 2006). *Quorum Sensing* bezeichnet eine Kommunikationsform, die auf der Sekretion und Erkennung von Signalmolekülen (*Autoinducern*) beruht. Die weitere wissenschaftliche Aufklärung dieses Mechanismus könnte Ansatzpunkte zur Entwicklung von Dekontaminationsmaßnahmen aufzeigen.“ (Abschnitt 4.3)
- **Welche molekularen und biochemischen Mechanismen liegen der Dispersion des Biofilms zugrunde? Wie lassen sich diese zur Entwicklung von Maßnahmen zur Beseitigung von Biofilmen in Lebensmittel-verarbeitenden Betrieben nutzen?**
 - „Die anschließende Zerstreung des Biofilms und die Verbreitung der Mikroorganismen, insbesondere die zugrunde liegenden molekularen und biochemischen Mechanismen, sind ebenfalls von großem wissenschaftlichem Interesse für die Lebensmittelsicherheit. Ein besseres Verständnis dieser Prozesse könnte die Entwicklung von Maßnahmen zur Beseitigung von Biofilmen im klinischen oder industriellen Umfeld entscheidend vorantreiben (Vogeleer et al., 2014)“ (Abschnitt 4.3)
- **Welche Dekontaminationsmethoden zeigen die höchste Wirksamkeit gegenüber Biofilmen, die humanpathogene Bakterien enthalten?**
 - „Die beste Wirkung gegen Biofilme zeigen Dekontaminationsmethoden, die humanpathogene Bakterien im Biofilm abtöten und die Matrix des Biofilms von der Oberfläche lösen. Eine Kombination aus Wasserdampf und Milchsäure zeigte diese duale Wirkung auf bakterielle Pathogene (*E. coli* O157:H7) und Matrix des Biofilms (Ban et al., 2012).“ (Abschnitt 4.3)
 - „Die genaue Wirkungsweise von *Antibiofilm*-Molekülen, wie ätherischen Ölen, auf die Dispersion von Biofilmen ist bislang wenig verstanden und sollte ebenfalls eingehender untersucht werden.“ (Abschnitt 4.3)
- **Welche pflanzlichen und mikrobiellen Eigenschaften beeinflussen das Ausmaß der Internalisierung humanpathogener Erreger durch Kulturpflanzen?**

- „Die Internalisierung stellt ein komplexes Phänomen dar, das auf spezifische Bakterienstämme beschränkt zu sein scheint. Das Ausmaß der Internalisierung ist zudem von den experimentellen oder natürlichen Umgebungsbedingungen, der Jahreszeit und dem Genotyp der Wirtspflanze abhängig (Golberg et al., 2011; Martínez-Vaz et al., 2014). So zeigte eine Studie, in der das Vorkommen von *Salmonella typhimurium* auf der Oberfläche und unter der Epidermis von Blättern verschiedener Gemüsesorten fluoreszenzmikroskopisch quantifiziert wurde, das höchste Maß an Internalisierung bei Rucolablättern ($88 \pm 16\%$) und Eisbergsalat ($81 \pm 16\%$), gefolgt von Basilikum ($46 \pm 12\%$), rotblättrigem Salat ($20 \pm 15\%$), Romanasalat ($16 \pm 16\%$), Petersilie ($1.9 \pm 3.3\%$) und Tomatenblättern ($0.56 \pm 1.36\%$, Golberg et al., 2011).“ (Abschnitt 4.4)
- **Welche Dekontaminationsmethoden sind am wirksamsten gegenüber internalisierten Mikroorganismen? Wie lassen sich diese weiterentwickeln?**
 - „Die Internalisierung humanpathogener Bakterien ist für die Lebensmittelsicherheit ein relevantes Phänomen, da internalisierte Erreger geschützt von pflanzlichem Gewebe eventuell angewandten Dekontaminationsmaßnahmen während der Verarbeitungsphase entgehen (M. C. Erickson, 2012).“ (Abschnitt 4.4)
 - „Hochdruckbehandlung wirkt auch auf internalisierte Mikroorganismen (Goodburn & Wallace, 2013; Ramos et al., 2013).“ (Tabelle 4)
- **Wie lässt sich die Internalisierung humanpathogener Erreger verhindern oder zumindest vermindern? Ist die Pflanzenzüchtung ein Ansatz?**
 - „Auch die Züchtungsforschung hat sich bereits dem Thema der mikrobiellen Sicherheit von Obst und Gemüse zugewandt. Die Wissenschaftler sehen Potential in der Erzeugung neuer Sorten, die gegen die Besiedlung durch humanpathogene Erreger resistent sind. Denkbar ist eine Kombination aus Screening besiedlungsresistenter Sorten und gezielter Züchtung im Hinblick auf sicherheitsrelevante pflanzliche Eigenschaften, wie Oberflächentextur, Blattausscheidungen, Anfälligkeit für Internalisierung von Mikroorganismen oder Aktivität des pflanzlichen Immunsystems. Dies könnte eine weitere Lösungsstrategie auf dem Weg zur mikrobiellen Sicherheit frischer Produkte sein (Sela Saldinger & Manulis-Sasson, 2015).“ (Abschnitt 7.1.9)
- **Welche externen Stressoren induzieren in der Vor- und Nacherntephase das VBNC-Stadium? Wie lassen sich diese Praktiken so verändern oder ersetzen, dass keine VBNC-Induktion mehr erfolgt? Wie lässt sich der Zustand aufheben?**
 - „Zu den externen Stressoren, die den VBNC-Zustand induzieren können, zählen nicht nur natürliche Umweltbedingungen, sondern auch antimikrobielle Substanzen und Methoden, die zur Behandlung von Infektionen und zur Desinfektion von Wasser und Oberflächen eingesetzt werden. Besonders kritisch ist die Beobachtung, dass zahlreiche Methoden der Lebensmittelsicherheit, beispielweise die UV-Behandlung von Trinkwasser und die Kühlung frischer Produkte, nachweislich das VBNC-Stadium induzieren können (Dinu & Bach, 2011; Nowakowska & Oliver, 2013; S. Zhang et al., 2015). Ist das VBNC-Stadium einmal induziert, können eventuell angewendete Dekontaminationsmaßnahmen gegenüber diesen Erregern ihre Wirksamkeit verlieren (Martínez-Vaz et al., 2014). Eine noch größere hygienische Herausforderung

stellen VBNC-Zellen als Bestandteile von Biofilmen dar (Vogeleer et al., 2014).“ (Abschnitt 4.5)

- **Woher rührt die hohe Widerstandsfähigkeit einiger humanpathogener Erreger gegenüber oxidativen Desinfektionsmitteln?**
 - „Einer Hypothese von Kyle et al. zufolge kann der Kontakt humanpathogener Bakterien mit reaktiven Sauerstoffformen aus verletztem pflanzlichem Gewebe die Erreger bereits auf eine spätere Behandlung mit oxidativen Desinfektionsmitteln (z.B. Calciumhypochlorit oder Wasserstoffperoxid) vorbereiten (zum Zulassungstatus von Desinfektionsmitteln in der Verarbeitung frischer Produkte siehe Abschnitt 7.2.3, Kyle et al., 2010). Dies würde ihre teils hohe Toleranz gegenüber oxidativen Desinfektionsmitteln erklären (Martínez-Vaz et al., 2014).“ (Abschnitt 4.6)
- **Welche Rolle spielen mobile genetische Elemente bei der Anpassung humanpathogener Bakterien an den epi- und endophytischen Lebensraum? Wie lässt sich dieses Risiko überwachen?**
 - „Mobile genetische Elemente können humanpathogenen Bakterien neben Pathogenitätseigenschaften und Antibiotikaresistenzen auch eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegen Desinfektionsmittel, Schwermetalle und UV-Strahlung sowie die Fähigkeit zur Biofilmbildung vermitteln (Fornefeld et al., 2015). Auf diese Weise trägt der horizontale Gentransfer neben der natürlichen Selektion zur Anpassung an die harschen Umweltbedingungen auf pflanzlichen Oberflächen und zur Resistenz gegenüber Dekontaminationsmaßnahmen bei (Smalla et al., 2015). Um die mikrobielle Sicherheit pflanzlicher Lebensmittel zu gewährleisten, müssen neu entstandene Krankheitserreger, die eine potentielle Bedrohung der Lebensmittelsicherheit darstellen, rasch erkannt werden. Ein engmaschiges Monitoring mit frischen Produkten assoziierter Krankheitserreger hinsichtlich neu erworbener Persistenz-, Pathogenitäts- und Resistenzeigenschaften ist daher zu empfehlen (P. Noguera et al., 2011; P. S. Noguera et al., 2011). Die Verbreitung der Hochdurchsatztechniken wird ein effizienteres Screening von Humanpathogenen ermöglichen (Van Overbeek et al., 2014).“ (Abschnitt 4.8)
- **Welchen Einfluss hat es auf die Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen bei humanpathogenen Bakterien, wenn Magen-Darm-Trakt und Rhizosphäre Hotspots des horizontalen Gentransfers darstellen? Welches Risiko birgt die Einarbeitung tierischer Düngemittel in den Boden, die humanpathogene mit bodenlebenden Bakterien in Kontakt bringt?**
 - „Auf diese Weise können humanpathogene Erreger mit gesteigerter Persistenz, Pathogenität und Resistenz entstehen (Brzuszkiewicz et al., 2011; Ghigo, 2001). Die Rhizosphäre könnte neben dem menschlichen und tierischen Magen-Darm-Trakt einen weiteren Hotspot des horizontalen Gentransfers darstellen (Stecher et al., 2012; Van Overbeek et al., 2014).“ (Abschnitt 4.8)

10.1.3 Pflanzliche Abwehrmechanismen (Kapitel 5)

- **Wie lässt sich das pflanzliche Immunsystem gegen humanpathogene Erreger nutzen?**
 - „Wie Meng 2013 zeigte, kann die PTI durch bakterielle Peptide auch künstlich induziert werden. Die ausgelöste Immunreaktion kann dann die Vermehrung humanpathogener Erreger auf der pflanzlichen Oberfläche hemmen (Meng et al.,

2013). Humanpathogene Bakterien verfügen aber auch über Strategien, pflanzliche Immunreaktionen zu unterdrücken. Ist dieser auf dem Typ-III-Sekretionssystem basierende Mechanismus defekt, kann sich der Bakterienstamm nur begrenzt ausbreiten (A. Schikora et al., 2012). Die Stimulation pflanzlicher Immunreaktionen und die Hemmung des Typ-III-Sekretionssystems bieten möglicherweise neue Ansatzpunkte, um die mikrobielle Kontamination von Obst und Gemüse mit humanpathogenen Erregern zu reduzieren (Sela Saldinger & Manulis-Sasson, 2015). Dies erfordert jedoch noch detailliertere Untersuchungen.“ (Abschnitt 7.1.10)

➤ **Welche Exsudate von Obst- und Gemüsepflanzen haben einen hemmenden Effekt auf humanpathogene Erreger?**

- „Durch Ausscheidung spezifischer Substanzen können Pflanzen die Vermehrung bestimmter Bakterienstämme auf ihrer Oberfläche fördern oder hemmen. In einer Studie von Han und Micallef wurden von verschiedenen Tomaten-Kultivaren mit unterschiedlicher Anfälligkeit für eine Salmonellen-Besiedlung Proben von Wurzel-, Sproß- und Frucht-Exsudaten genommen. Zucker, Zuckeralkohole und organische Säuren waren mit einer gesteigerten Vermehrung von *S. enterica* assoziiert. Fettsäuren hingegen zeigten einen negativen Effekt auf die Salmonellenvermehrung. Dieser Metabolomics-Ansatz stellt eine weitere Untersuchungsebene der Pflanze-Pathogen-Interaktion dar. Ein besseres Verständnis dieser Wechselwirkungen könnte die Identifikation oder Züchtung besiedlungsresistenter Kultivare ermöglichen. Dies wäre eine neue Strategie zur Verbesserung der mikrobiellen Sicherheit frischer Produkte (Han & Micallef, 2016).“ (Kapitel 5)

10.1.4 Eintragswege und Persistenz humanpathogener Erreger (Kapitel 6)

➤ **Wie beeinflusst die Kulturart und -sorte die Adhäsion und Persistenz humanpathogener Erreger auf pflanzlichen Oberflächen? Wie lässt sich durch Veränderung dieser Eigenschaften die bakterielle und virale Adhäsion und Persistenz vermindern?**

- „Morphologie und Physiologie einer Kulturart und -sorte bestimmen maßgeblich das Kontaminationsrisiko. Blattgemüse ist aufgrund seiner morphologisch bedingten Bodennähe besonders anfällig für eine mikrobielle Kontamination (Hamilton et al., 2006). Struktur und Textur einer Blattoberfläche spielen eine große Rolle für die Adhäsion bakterieller und viraler Erreger sowie für die Wirksamkeit von Waschvorgängen oder Dekontaminationsmaßnahmen (Crawford et al., 2012; Hirneisen & Kniel, 2013; Takeuchi & Frank, 2001). Je rauer und unregelmäßiger die Oberfläche eines Produktes, umso länger können Viren daran anhaften (Hirneisen & Kniel, 2013).“ (Abschnitt 6.1.5).
- „Auch die Züchtungsforschung hat sich bereits dem Thema der mikrobiellen Sicherheit von Obst und Gemüse zugewandt. Die Wissenschaftler sehen Potential in der Erzeugung neuer Sorten, die gegen die Besiedlung durch humanpathogene Erreger resistent sind. Denkbar ist eine Kombination aus Screening besiedlungsresistenter Sorten und gezielter Züchtung im Hinblick auf sicherheitsrelevante pflanzliche Eigenschaften, wie Oberflächentextur, Blattausscheidungen, Anfälligkeit für Internalisierung von Mikroorganismen oder Aktivität des pflanzlichen Immunsystems. Dies könnte eine weitere Lösungsstrategie

auf dem Weg zur mikrobiellen Sicherheit frischer Produkte sein (Sela Saldinger & Manulis-Sasson, 2015).“ (Abschnitt 7.1.9)

- **Wie lässt sich das Kontaminationsrisiko bei der Ernte durch Veränderung der Erntepraktiken und -werkzeuge vermindern?**
 - „Sämtliche Erntewerkzeuge und -geräte, die in direkten Kontakt mit den Ernteprodukten kommen, stellen ein Übertragungsrisiko dar (Y. Yang et al., 2012). Besonders kritisch sind die ersten Weiterverarbeitungsschritte noch auf dem Feld, beispielsweise das Entfernen der äußeren Blätter. Dabei können humanpathogene Erreger durch Schneidewerkzeuge vom Boden auf Salatpflanzen übertragen werden, wie Studien von McEvoy und Yang zeigen (McEvoy et al., 2009; Y. Yang et al., 2012). Mechanische Erntemaschinen, Sammelbehälter und Förderbänder bergen das Risiko einer Kreuzkontamination (Izumi et al., 2008; Johnston et al., 2006). Ausgehend von einer oder wenigen Pflanzen können durch Kreuzkontaminationen ganze Chargen mikrobiell kontaminiert werden.“ (Abschnitt 6.1.9)
 - „Besonders kritisch für die Keimbelastung frischer Produkte sind daher Kontaminationsereignisse kurz vor der Ernte (z.B. durch Bewässerung oder Überflutung), während des Erntens (z.B. durch infizierte Erntearbeiter oder kontaminierte Geräte) oder in der frühen Nacherntephase (z.B. durch Handkontakt oder Kreuzkontamination).“ (Abschnitt 6.1.11)
- **Wie lässt sich die mikrobielle Vermehrung und Invasion an den Schnittflächen der Pflanzen während und nach der Ernte vermindern?**
 - „Die höchsten Risiken bestehen in der Nacherntephase in einer Kreuzkontamination der Ernteprodukte durch Washwasser oder Geräte und einem gesteigerten Bakterienwachstum an den Schnittflächen der Pflanzen.“ (Abschnitt 6.2)
- **Wie hoch ist der individuelle Beitrag einzelner Einflussfaktoren während der Produktionsphase zur Gesamtkontamination des Endproduktes?**
 - „Die wichtigsten Risikofaktoren für eine Kontamination von Blattgemüse mit Salmonellen in der Produktions- und Verarbeitungsphase (Abb. 8 und 9) sind
 - die Nähe der Anbaufläche zu Tierställen,
 - der direkte oder indirekte Kontakt mit Wild- oder Nutztieren,
 - die Verwendung unbehandelter oder unzureichend behandelter tierischer Düngemittel,
 - schwere Regenfälle mit Überschwemmungen,
 - die Nutzung von kontaminiertem Wasser zur Bewässerung oder Pestizidbehandlung und
 - das Handling durch Mitarbeiter und der Kontakt mit Geräten während oder unmittelbar nach der Ernte
 - der Kontakt mit Wasser, Geräten und Mitarbeitern während der Verarbeitung.
 - Die Hauptrisikofaktoren für eine Noroviren-Kontamination von Blattgemüse während des Anbaus und der Verarbeitung (Abb. 8 und 9) sind
 - schwere Regenfälle und Überschwemmungen, die den Eintrag von Noroviren aus Abwässern in Bewässerungswasser begünstigen,
 - die Bewässerung und Pestizidbehandlung mit kontaminiertem Wasser sowie

- der Kontakt mit Wasser, Geräten und Mitarbeitern.“ (Abschnitt **Fehler! V erweisquelle konnte nicht gefunden werden.**)
- **Wie lange sind humanpathogene Bakterien und Viren in verschiedenen Medien persistent? Was bedeutet dies für den Zeitpunkt der Kontamination frischer Produkte?**
 - „Grundsätzlich ist die bakterielle und virale Persistenz dort am höchsten, wo die Erreger am besten vor Umwelteinflüssen, wie UV-Strahlung und Austrocknung, geschützt sind (Choi et al., 2004). Daher sind die Krankheitserreger im Boden länger überlebensfähig als auf pflanzlichen Oberflächen (Choi et al., 2004; Islam et al., 2004). Im Boden zeigten *E. coli* O157:H7 je nach Kontaminationsquelle eine Persistenz zwischen 154 und 217 Tagen, während sie auf Salat und Petersilie bis zu 77 bzw. 177 Tage nach der Aussaat überlebensfähig waren (Islam et al., 2004). Besonders kritisch für die Keimbelastung frischer Produkte sind daher Kontaminationsereignisse kurz vor der Ernte (z.B. durch Bewässerung oder Überflutung), während des Erntens (z.B. durch infizierte Erntearbeiter oder kontaminierte Geräte) oder in der frühen Nacherntezeit (z.B. durch Handkontakt oder Kreuzkontamination). Den Zeitraum zwischen Kontamination und Ernte bzw. Verbrauch überdauern Noroviren mit größerer Wahrscheinlichkeit als enterische Bakterien, da sie auf Blattgemüse persistenter sind (Scott W Stine et al., 2005b).“ (Abschnitt 6.1.11)
- **Welchen Einfluss wird der Klimawandel auf die mikrobiologische Sicherheit von Obst und Gemüse haben?**
 - „Extreme Wetterereignisse nehmen im Zuge des globalen Klimawandels zu und werden sich nach Meinung vieler Autoren auf mikrobielle Kontaminationsquellen und -wege auswirken. So können wechselnde Phasen von Überschwemmung und Wasserknappheit zu einer erhöhten Keimlast in Böden und Gewässern führen und das mikrobielle Kontaminationsrisiko für Gemüsekulturen steigern (Liu et al., 2013; Rose et al., 2001; Tirado et al., 2010). Wie eine Untersuchung von Castro-Ibanez zeigte, wiesen Salatpflanzen nach Überschwemmungen eine erhöhte Salmonellenbelastung auf (Castro-Ibañez et al., 2013).“ (Abschnitt 6.1.2)

10.1.5 Präventions- und Dekontaminationsmaßnahmen (Kapitel 7)

- **Durch welche Maßnahmen lässt sich die Übertragung humanpathogener Noroviren von Mitarbeitern auf Obst und Gemüse vermindern? Wie lässt sich die Einhaltung der Hygienevorschriften verbessern?**
 - „Infizierte Erntearbeiter stellen insbesondere im Hinblick auf Noroviren eine der wichtigsten Kontaminationsquellen dar (Gil et al., 2013). Das Übertragungsrisiko ist dabei von der Erntemethode sowie von der Erregerausscheidung, den Hygienegewohnheiten und der rechtzeitigen Krankmeldung des Mitarbeiters abhängig (James, 2006). Noroviren gelten in dieser Hinsicht als besonders gefährlich, da sie auch von asymptomatischen Trägern, das heißt vor dem Auftreten und nach dem Abklingen der Symptome, in relevanter Dosis übertragen werden können.“
 - „Jeder Obst und Gemüse produzierende Betrieb sollte über eigene Standard Operating Procedures (SOPs) verfügen, in denen die erforderlichen Hygienevorschriften und Mitarbeiterschulungen festgelegt sind (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014).“

Sind Mitarbeiter verletzt, müssen Kontaminationsquellen wie Schnitte oder andere Wunden wasserdicht abgedeckt werden (Simonne et al., 2008). Erkrankten Mitarbeitern ist der Zutritt zu den Lebensmittel-verarbeitenden Bereichen zu untersagen (FAO Committee on Agriculture, 2003).“ (Abschnitt 7.1.8)

- **Wie lässt sich beim Waschen der Produkte die Kreuzkontamination ganzer Chargen durch einzelne Ernteprodukte verhindern?**
 - „Mikrobiell verunreinigtes Waschwasser gehört zu den wichtigsten Ursachen von Kontaminationen und Kreuzkontaminationen in der Nacherntephase. Der Erhalt der Wasserqualität durch regelmäßigen Austausch und Vermeidung von organischen Rückständen ist daher von entscheidender Bedeutung.“ (Abschnitt 7.2.2)
- **Wie lässt sich die Wirksamkeit der Dekontaminationsmethoden für frische Produkte steigern?**
 - „Wissenschaftliche Bemühungen, die Effizienz der Dekontaminationsmethoden zu steigern, müssen [Produkt-, Erreger- und Prozess-bezogene] Einflussfaktoren berücksichtigen. Zudem ist zu untersuchen, zu welchem Zeitpunkt im Verarbeitungsprozess und in welcher Kombination die Verfahren am wirksamsten gegenüber Humanpathogenen an frischen Produkten sind (Goodburn & Wallace, 2013). Darüber hinaus muss bei der Weiterentwicklung der Verfahren die industrielle Anwendbarkeit im Blick behalten werden. Für Lebensmittel-verarbeitende Betriebe relevante Parameter, wie Dauer des Verfahrens, Wasser- und Energieverbrauch, Einfluss auf die Qualität und Haltbarkeit des Produktes sowie Verbraucherakzeptanz sind in vielen bisherigen Untersuchungen nicht ausreichend berücksichtigt worden. Damit sich die neuen Verfahren künftig in Lebensmittel-verarbeitenden Betrieben durchsetzen können, ist es notwendig, diese Faktoren stärker in die Forschung und Entwicklung einzubeziehen (Goodburn & Wallace, 2013).“ (Abschnitt 7.2.3)
- **Mit Hilfe welcher Maßnahmen lässt sich der Biofilmbildung am besten vorbeugen bzw. bereits bestehende Biofilme entfernen?**
 - „Maschinen und Geräte zum Schneiden frischer Produkte, sollten in regelmäßigen Abständen gereinigt und desinfiziert werden, um der Ansammlung organischer Rückstände und der Bildung von Biofilmen vorzubeugen (Artés & Allende, 2014). Gleiches gilt für Behälter, Förderbänder und andere Kontaktflächen.“ (Abschnitt 7.2.4)
- **An welchen Punkten der Nacherntephase muss die unterschiedliche Wirkung von Lager- und Transportbedingungen sowie Dekontaminationsmaßnahmen auf humanpathogene Bakterien und Viren berücksichtigt werden?**
 - „Die Temperatur hat weitestgehend gegensätzliche Effekte auf Bakterien und Viren. Wie eine Studie an Fresh-Cut-Salat erneut bestätigte, ist die bakterielle Vermehrung unter niedrigen Temperaturen vermindert (Oliveira et al., 2010; RIVM, 2013). Humanpathogene Viren hingegen zeigen unter niedrigen Temperaturen eine erhöhte Persistenz (RIVM, 2013). Dies gilt nicht nur unter den Temperaturen der Kühlkette, sondern auch der Tiefkühlung. Auf tiefgefrorenen Zwiebeln, Spinat, Kräutern und Beeren waren enterische Viren über mehrere Monate stabil (Butot, Putallaz, & Sanchez, 2008).“ (Abschnitt 7.2.1)

10.1.6 Mikrobielle Risikobewertung in Wissenschaft und landwirtschaftlicher Praxis (Kapitel 8)

- **Wie kann eine quantitative mikrobiologische Risikobewertung zu einer gezielteren Prävention mikrobieller Verunreinigungen in der Praxis beitragen?**
 - „Ein auf Monitoringdaten von Maunula et al. und Kokkinos et al. basierendes Risikobewertungsmodell erlaubt die Quantifizierung des Beitrages verschiedener Kontaminationsquellen zur Belastung von Salat, Himbeeren und Erdbeeren mit humanen Adenoviren, Hepatitis-A-Viren und Noroviren zum Zeitpunkt des Verkaufs (Bouwknegt et al., 2015; P. Kokkinos et al., 2012; Maunula et al., 2013). In das Modell wurden sechs verschiedene Produktionsketten mit jeweils bis zu sechs potentiellen Kontaminationswegen (Bewässerung, Erntearbeiter, Verarbeiter, Abspülen und Förderband) einbezogen (A – F, Tab. 2). Die Bewertung des quantitativen Beitrages der modellierten Übertragungswege zur gesamten Erregerlast ergab, dass der Kontakt mit Händen eine größere Kontaminationsgefahr birgt als die Bewässerung. Der Handhygiene von Erntekräften und Verarbeitern sollte demnach bei der Vorbeugung viraler Kontamination von Salaten und Beeren höchste Priorität gegeben werden (siehe auch Kapitel 6 und 7). So kann eine quantitative Risikobewertung zu einer gezielteren Prävention beitragen.“ (Abschnitt 8.2)
- **Welche Kriterien eignen sich zur Risikoeinschätzung durch den Produzenten? Welche Maßnahmen können zu einer stärker Evidenz-basierten Risikobewertung in der landwirtschaftlichen Praxis beitragen?**
 - „Um während der Produktion gegebenenfalls Gegenmaßnahmen ergreifen zu können, muss auch der Produzent selbst in der Lage sein, ein erhöhtes Kontaminationsrisiko rechtzeitig zu erkennen. Im Fachgespräch 2015 war daher die Entwicklung von Kriterien zur Risikoeinschätzung durch den Produzenten gefordert worden (Jaenicke & Kriesemer, 2015). [...] Im März 2017 hat ein international zusammengesetztes Expertengremium der Frischwarenindustrie einen Ansatz zur Risikobewertung durch den Anbauer vorgestellt (Monaghan et al., 2017). Anwendungsbereich des Systems ist der Anbau frischer Produkte, insbesondere von Blattgemüse. [...] Beurteilt wird die potentielle Exposition der Produkte gegenüber humanpathogenen Erregern (vernachlässigbar, sehr gering, gering / mittel, hoch, sehr hoch) und die Wirksamkeit der Gegenmaßnahmen (teilweise wirksam / wirksam). Ein Eingreifen des Produzenten ist dann erforderlich, wenn die potentielle Exposition der Produkte als *mittel*, *hoch* oder *sehr hoch* und die Gegenmaßnahme als nur *teilweise wirksam* beurteilt wird.“ (Abschnitt 8.3)
 - „Die Risikobewertung durch den Produzenten, einschließlich des vorgestellten Systems, hat jedoch Schwächen. Der entscheidende Kritikpunkt ist, dass der Produzent seine Risikobewertung meist nur auf Annahmen statt auf Evidenz stützen kann. Dies hat verschiedene Gründe. Zum einen liegen zu den Effekten mehrerer kombinierter Gegenmaßnahmen kaum aussagekräftige Studienergebnisse vor. Zum anderen richten sich wissenschaftliche Publikationen in der Regel nicht an Risikomanager kleiner oder mittlerer Anbaubetriebe und bleiben daher ungenutzt. Die Autoren empfehlen daher, diese Forschungsergebnisse zusammenzufassen und zu übersetzen, um sie Primärproduzenten zugänglich zu machen (Monaghan et al.,

2017). Dies würde eine stärker Evidenz-basierte Risikobewertung und -beherrschung ermöglichen.

Eine aufwändigere Alternative für die Produzenten wäre die Etablierung einer breiten Überwachung mikrobieller Indikatoren. Als Indikator fäkaler Verunreinigungen empfiehlt die EFSA *E. coli*. Gleichzeitig betont sie jedoch die Notwendigkeit standardisierter Probenahmeverfahren sowie einer soliden Datengrundlage. Erst wenn diese bestehen, können Hygienekriterien für das Monitoring festgelegt werden (Monaghan et al., 2017).“ (Abschnitt 8.3)

- **Wie sollte ein Simulationsversuch aufgebaut sein, mit dem sich Eintrag und Persistenz humanpathogener Erreger im Verlauf des Produktions- und Verarbeitungsprozesses verfolgen lassen?**
 - „Der beschriebene Inokulationsversuch stellt darüber hinaus einen methodischen Ansatz dar, wie die Übertragung und Persistenz humanpathogener Erreger im Verlauf des Produktions- und Verarbeitungsprozesses verfolgt werden kann. Beim Fachgespräch *Aufkommen von humanpathogenen Keimen bei frischem Obst und Gemüse* am 30.06.2015 in Rheinbach war dies als Thema für die Ausschreibung eines Forschungsprojektes vorgeschlagen worden (Jaenicke & Kriesemer, 2015).“ (Abschnitt 8.2)
- **Wie lassen sich die Good Agricultural Practices (GAP), die Good Hygiene Practices (GHP) und andere Leitlinien validieren?**
 - „Ein wichtiges Instrument des Risikomanagements in der Lebensmittelproduktion und –verarbeitung, das hier kurz vorgestellt werden soll, sind mikrobiologische Kriterien (CAC, 2013; Europäische Kommission, 2005). Zu den mikrobiologischen Kriterien gehören Lebensmittelsicherheitskriterien, die zur Beurteilung der mikrobiologischen Sicherheit eines Endproduktes dienen, und Prozesshygienekriterien, die eine Überprüfung der Prozesshygiene ermöglichen. Die EFSA empfiehlt die Etablierung von Prozesshygienekriterien für den Produktionsprozess von Blattgemüse zur Validierung der Good Agricultural Practices (GAP) und der Good Hygiene Practices (GHP) (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014). Bislang fehlen diese in den EU-Verordnungen. Nach Definition der Codex Alimentarius Commission bestehen mikrobiologische Kriterien aus einem Grenzwert für einen festgelegten nachzuweisenden Mikroorganismus und dem Lebensmittel, Prozess oder Hygienekontrollsystem, auf das sich das mikrobiologische Kriterium bezieht (CAC, 2013). Darüber hinaus beinhaltet es aber auch einen definierten Zweck, einen (Zeit-)Punkt in der Prozesskette, einen Probenahmeplan, eine mikrobiologische Nachweismethode sowie statistische Analysemethoden ein (CAC, 2013).“ (Abschnitt 8.4)

10.1.7 Mikrobiologische Nachweismethoden (Kapitel 9)

- **Wie lässt sich bestimmen, ob ein Virus intakt und infektiös ist? Wie lassen sich ausschließlich die intakten / infektiösen Viren quantifizieren?**
 - „Besonderer Entwicklungsbedarf besteht bei den Methoden zum Nachweis von Noroviren, da die Standardmethoden nicht zwischen infektiösen und nicht-infektiösen Viren differenzieren können. Die Methodenentwicklung wird derzeit intensiv vorangetrieben, um die Belastung von Lebensmitteln mit infektiösen

Erregern bestimmen und Methoden zur Inaktivierung von Viren auf ihre Wirksamkeit prüfen zu können (Knight et al., 2012). Verschiedene PCR-Methoden befinden sich in der Entwicklung, die unter anderem auf Zellkultur oder Vorbehandlungen basieren, z.B. durch Zusatz von DNasen und RNasen (Marti & Barardi, 2016; Marti et al., 2017; Randazzo et al., 2016).“ (Abschnitt 9.7)

- **Wie lassen sich Methoden zur Detektion von Humanpathogenen hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber komplexen Probenmatrices weiterentwickeln?**
 - „Nachteile von PCR-Methoden: Die Sensitivität einer PCR-Methode kann durch die komplexe Matrix der Lebensmittelprobe, insbesondere durch sogenannte PCR-Inhibitoren, beeinträchtigt sein (Perez et al., 2003).“ (Abschnitt 9.2.2)
 - „Nachteile elektrochemischer Biosensoren: Die Methoden [...] kann von der Probenmatrix beeinträchtigt sein [...] (Mandal et al., 2011; G. Zhang, 2013).“ (Abschnitt 9.6.2)
- **Wie lassen sich Probenahme (Probenmaterial, Zeitpunkte und Methode) und Probenaufbereitung in Primärproduktion und Verarbeitung von Blattgemüse harmonisieren?**
 - „Neben der Standardisierung der Nachweismethoden empfiehlt das Panel on Biological Hazards der EFSA auch eine Harmonisierung der Probenahme und Probenaufbereitung (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014). Bislang fehlen international anerkannte Leitlinien zu Zeitpunkt und Methode der Probenahme von Blattgemüse sowohl für die Primärproduktion im Gewächshaus oder auf dem Feld als auch für die Weiterverarbeitung in der Frischwarenindustrie. Ebenso fehlen Leitlinien zur Probenaufbereitung und zur Gewinnung einer für die gesamte Pflanze repräsentativen Probe. Durch Einführung international anerkannter Standards ließe sich die Vergleichbarkeit von Ergebnissen unterschiedlicher mikrobiologischer Studien deutlich verbessern (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014).“
 - „Angesichts des sporadischen Vorkommens quantitativ relevanter Kontaminationsereignisse wird eine Identifikation von Probenahmepunkten zur Bewertung von Kontaminationsquellen in der Verarbeitungskette als zielführender angesehen, als die systematische Analyse ganzer Produktchargen (Tomás-Callejas et al., 2011).“ (Abschnitt 9.8)

10.1.8 Risikogruppen

- **Grenzwerte / Infektiöse Dosis für Risikogruppen (Säuglinge, Kleinkinder, Alte, Immunsupprimierte) ?**
- **Wie lassen die Risikogruppen sich gezielt informieren und schützen?**

10.2 Aktuelle Forschungsthemen mit hoher Relevanz für die mikrobielle Sicherheit frischer Produkte

Roh verzehrbare Blattgemüsesorten sind im Rahmen der Risikobewertungen der FAO und WHO sowie der EFSA übereinstimmend als Hochrisikoprodukte eingestuft worden (EFSA Panel on Biological Hazards, 2013; FAO/WHO, 2008). In Kombination mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, Noroviren und anderen bakteriellen und viralen Erregern zählen sie zu den häufigsten Auslösern mit pflanzlichen Lebensmitteln assoziierter Infektionsausbrüche (EFSA Panel on Biological Hazards, 2013; FAO/WHO, 2008).

Die Prävalenz von Lebensmittelkeimen wie pathogenen *E. coli* und Salmonellen auf Blattgemüse ist mit <1% aber relativ gering (EFSA Panel on Biological Hazards, 2013; Kevin Holvoet et al., 2015, 2014). Ein systematisches Pathogen-Screening von Produkten wird angesichts des sporadischen Vorkommens als ineffektiv angesehen (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014). Als zielführender gilt es, den hygienisch einwandfreien Ablauf des Produktionsprozesses sicherzustellen (CAC, 2013). Die Gewährleistung der Prozesshygiene erfordert jedoch zwei Voraussetzungen:

- a) Eine verbesserte Datenbasis, die sowohl die gute Hygienepraxis in Leitfäden und Verordnungen, als auch die Risikoeinschätzung durch den Produzenten auf die Basis wissenschaftlicher Evidenz stellt.
- b) Optimierte und standardisierte Methoden zur Überprüfung der Prozesshygiene.

In vielen Bereichen der Lebensmittelproduktion und -verarbeitung werden zur Überprüfung der Prozesshygiene mikrobiologische Kriterien herangezogen (CAC, 2013; Europäische Kommission, 2005). Es gibt zwei Arten von mikrobiologischen Kriterien: Lebensmittelsicherheitskriterien dienen zur Beurteilung der mikrobiologischen Sicherheit des Endproduktes, Prozesshygienekriterien zur Kontrolle der hygienischen Funktionsweise eines Produktions- oder Verarbeitungsprozesses. Die EFSA empfiehlt die Entwicklung von Prozesshygienekriterien für Produktion, Ernte und erste Verarbeitungsschritte von Blattgemüse, da diese im aktuellen gesetzlichen Rahmen nicht verankert sind (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014). Die EFSA bezeichnet diese Kriterien abweichend als *Hygienekriterien*, um sie sprachlich von den im Verarbeitungsprozess geltenden Prozesshygienekriterien zu unterscheiden; wir bleiben im Folgenden jedoch bei der üblichen Bezeichnung *Prozesshygienekriterien*. Mikrobiologische Kriterien bestehen nach Definition der Codex Alimentarius Commission in erster Linie aus einem Grenzwert für einen festgelegten nachzuweisenden Mikroorganismus und dem Lebensmittel, Prozess oder Hygienekontrollsystem, auf das sich das mikrobiologische Kriterium bezieht (CAC, 2013). Darüber hinaus schließt es aber auch einen definierten Zweck, einen (Zeit-)Punkt in der Prozesskette, einen Probenahmeplan, eine mikrobiologische Nachweismethode sowie statistische Analysemethoden ein (CAC, 2013).

Als *definierten Zweck* der Prozesshygienekriterien nennt die EFSA die Validierung und Verifizierung der Good Agricultural Practices (GAP) und der Good Hygiene Practices (GHP) (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014). Prinzipiell lassen sich anhand von Prozesshygienekriterien aber jegliche Richtlinien validieren, einschließlich europäischer und nationaler Verordnungen sowie brancheneigener Leitfäden, wie z.B. des QS-Leitfadens. Darüber hinaus erlauben Prozesshygienekriterien auch die Überprüfung betrieblicher Hygienekontrollsysteme (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014).

Als geeigneter Indikatororganismus für Prozesshygienekriterien in der Primärproduktion von Blattgemüse wird von verschiedenen Autoren *E. coli* genannt (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014; Kevin Holvoet et al., 2015, 2014). Das Vorkommen von *E. coli* in Düngemitteln, Wasser und auf pflanzlichen Produkten kann einen allgemeinen Hinweis auf fäkale Verunreinigungen geben, auch wenn es nicht direkt mit dem Vorkommen spezifischer Lebensmittelerreger korreliert (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014).

Mikrobiologische Kriterien können auf unterschiedliche Art und Weise entwickelt werden. Je nach Datenverfügbarkeit können sie basierend auf empirischem Wissen, wissenschaftlichen Ergebnissen oder einer quantitativen mikrobiellen Risikobewertung etabliert werden (CAC, 2013). Die Codex Alimentarius Commission empfiehlt, die Entwicklung mikrobiologischer Kriterien auf wissenschaftlich erhobene Daten zum Vorkommen und Verhalten des Mikroorganismus entlang der Produktionskette zu stützen (CAC, 2013). Zur Generierung dieser Datenbasis ist aus unserer Sicht die Etablierung standardisierter Inokulationsversuche an definierten Modellkulturarten in verschiedenen Anbausystemen zu empfehlen. Dies beinhaltet auch die von der EFSA empfohlene Standardisierung von Probenahme- und Aufbereitungsmethoden (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014).

Die im Rahmen der standardisierten Inokulationsversuche gewonnenen Übertragungsraten und Persistenzdaten (Vermehrungs-/Absterberate) können im nächsten Schritt in ein quantitatives mikrobielles Risikobewertungsmodell einfließen. Anhand solcher Modelle können Risiko-basierte mikrobiologische Kriterien berechnet werden (CAC, 2013). Quantitative mikrobielle Risikobewertungsmodelle können aber auch zur Ermittlung des quantitativen Beitrages einzelner Kontaminationsquellen zur Gesamtbelastung des Endproduktes sowie der Wirksamkeit von Präventions- und Dekontaminationsmethoden dienen (Bouwknegt et al., 2015; Pang, Lambertini, Buchanan, Schaffner, & Pradhan, 2017). Die EFSA empfiehlt daher die Durchführung von Risikobewertungen, um das erforderliche Maß an Risikokontrolle in verschiedenen Phasen der Produktion zu ermitteln (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014). Durch Modellierung unterschiedlicher Szenarien kann darüber hinaus der Einfluss von Klimabedingungen, Anbaupraktiken und bakterieller Persistenz auf die Keimbelastung frischer Produkte evaluiert werden (Allende et al., 2017).

Die beschriebenen Maßnahmen, also die Entwicklung von standardisierten Inokulationsversuchen, quantitativen mikrobiellen Risikobewertungsmodellen und Prozesshygienekriterien für die Primärproduktion, können auf verschiedenen Ebenen zu einer Gewährleistung der Prozesshygiene in der Produktion und Verarbeitung von Blattgemüse beitragen:

- a) Es entsteht eine aussagekräftige Datenbasis, die eine Evidenz-basierte Risikoeinschätzung durch den Produzenten ermöglicht. Diese Datenbasis beinhaltet
 - anhand von Prozesshygienekriterien validierte und überarbeitete Verordnungen und Leitfäden sowie
 - die Kenntnis des Kontaminationsrisikos verschiedener Anbaupraktiken und der Wirksamkeit unterschiedlicher Präventions- und Dekontaminationsmaßnahmen als Ergebnis der standardisierten Inokulationsversuche und der quantitativen Risikobewertung.
- b) Die neu etablierten Prozesshygienekriterien stellen eine optimierte und standardisierte Methode zur Überprüfung der Prozesshygiene dar. Diese Methode ermöglicht eine

- regelmäßige Überprüfung des Hygienekontrollsystems eines Betriebes und
- Kontrolle der Prozesshygiene bei konkret begründetem Verdacht auf eine erhöhte mikrobielle Belastung des Wassers, Düngemittels oder Produktes.

Wann von einer erhöhten mikrobiellen Belastung des Wassers, Düngemittels oder Produktes auszugehen ist, ergibt sich beispielsweise aus den Risikobewertungsmatrices der EFSA oder aus dem Modell von Monaghan et al. (Europäische Kommission, 2017; Monaghan et al., 2017). In diesem Fall kann der Produzent die Einhaltung der Hygienestandards anhand der Prozesshygienekriterien überprüfen. Bei Überschreitung des im Prozesshygienekriterium definierten Grenzwertes sind die festgelegten Kontrollmaßnahmen zu ergreifen.

Das vorgestellte Forschungsthema gliedert sich in fünf aufeinander aufbauende Arbeitspakete, die in Abbildung 13 am Beispiel von landwirtschaftlichem Betriebswasser und organischen Düngemitteln dargestellt sind:

1. Identifikation geeigneter bakterieller und viraler Indikatoren. (Dieser Schritt kann entfallen, wenn mit *E. coli* als allgemeinem Indikator fäkaler Verunreinigungen gearbeitet wird.)
2. Entwicklung standardisierter Inokulationsversuche an Modellkulturarten in verschiedenen Anbausystemen zur Ermittlung der Übertragungsraten und Persistenz von humanpathogenen Erregern, einschließlich Standardisierung der Probenahme und -aufbereitung.
3. Quantitative Risikobewertung auf Basis der Übertragungs- und Persistenzdaten sowie Modellierung unterschiedlicher Szenarien.
4. Entwicklung von Prozesshygienekriterien.
5. Validierung der EU-Verordnungen bzw. des QS-Leitfadens anhand der Prozesshygienekriterien.

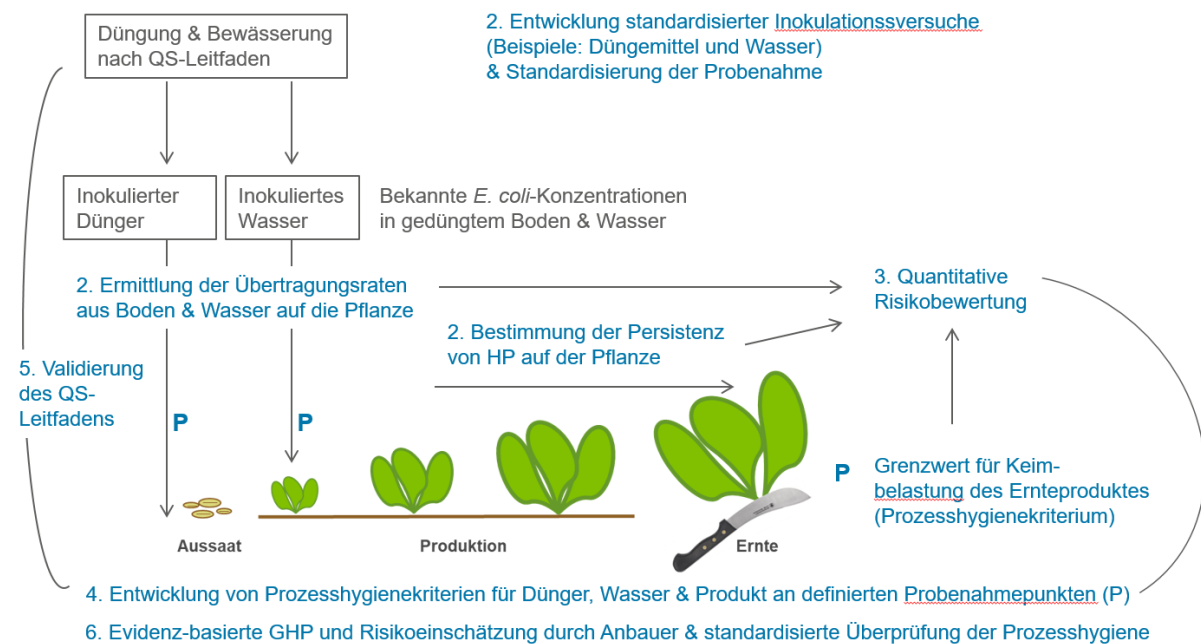


Abb. 13: Aufeinander aufbauende Arbeitspakete des vorgestellten Themenkomplexes. Ziel ist eine stärker Evidenz-basierte gute Hygienepraxis und Risikoeinschätzung durch den Anbauer sowie eine standardisierte

Überprüfung der Prozesshygiene im Obst- und Gemüseanbau. Dargestellt am Beispiel von landwirtschaftlichem Betriebswasser und tierischen Düngemitteln.

Der vorgestellte Ansatz entspricht dem internationalen Trend des letzten Jahrzehnts, die Lebensmittelsicherheit im Kontext der öffentlichen Gesundheit zu bewerten und das Risikomanagement stärker auf Prävention als auf Endproduktkontrollen zu stützen. Amtliche Lebensmittelkontrollen allein können den Schutz der Verbraucher nicht ausreichend gewährleisten. Eine auf Risikoanalysen gestützte Prävention kann Endproduktkontrollen sinnvoll ergänzen und so zu einer höheren mikrobiologischen Sicherheit von Obst und Gemüse beitragen (Koutsoumanis & Aspidou, 2016). Diese Risiko-basierte Prävention muss aus unserer Sicht in der Primärproduktion ansetzen.

11 Literatur

- Allende, A., Castro-Ibáñez, I., Lindqvist, R., Gil, M. I., Uyttendaele, M., & Jacxsens, L. (2017). Quantitative contamination assessment of *Escherichia coli* in baby spinach primary production in Spain: Effects of weather conditions and agricultural practices. *International Journal of Food Microbiology*, 257(May 2015), 238–246. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.027>
- Artés, F., & Allende, A. (2014). Minimal Processing of Fresh Fruit, Vegetables, and Juices. *Emerging Technologies for Food Processing*, 583–597. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411479-1.00031-0>
- Arthurson, V., Sessitsch, A., & Jäderlund, L. (2011). Persistence and spread of *Salmonella enterica* serovar Weltevreden in soil and on spinach plants. *FEMS Microbiology Letters*, 314(1), 67–74. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02140.x>
- Aw, T. G., Wengert, S., & Rose, J. B. (2016). Metagenomic analysis of viruses associated with field-grown and retail lettuce identify human and animal viruses. *International Journal of Food Microbiology*, 223, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.008>
- Ban, G.-H., Park, S.-H., Kim, S.-O., Ryu, S., & Kang, D.-H. (2012). Synergistic effect of steam and lactic acid against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* biofilms on polyvinyl chloride and stainless steel. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 218–223. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.006>
- Barak, J. D., Jahn, C. E., Gibson, D. L., & Charkowski, A. O. (2007). The role of cellulose and O-antigen capsule in the colonization of plants by *Salmonella enterica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI*, 20(9), 1083–1091. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-9-1083>
- Bayer, K., & Hentschel, U. (2012). Einzelzell-Genomik: das Bakterium als Individuum. *BioSpektrum*, 18(6), 596–598. <https://doi.org/10.1007/s12268-012-0234-4>
- Berger, C. N., Shaw, R. K., Brown, D. J., Mather, H., Clare, S., Dougan, G., ... Frankel, G. (2009). Interaction of *Salmonella enterica* with basil and other salad leaves. *The ISME Journal*, 3(2), 261–5. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.95>
- Beutin, L., & Martin, A. (2012). Outbreak of Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* (STEC) O104:H4 Infection in Germany Causes a Paradigm Shift with Regard to Human Pathogenicity of STEC Strains. *Journal of Food Protection*, 75(2), 408–418. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-452>
- BfR Stellungnahme Nr. 022/2013. (2013). Gesundheitliche Bewertung von Perchloratfunden in Lebensmitteln, (22), 1–13.
- Bidawid, S., Farber, J. M., & Sattar, S. a. (2000). Contamination of Foods by Food Handlers : Experiments on Hepatitis A Virus Transfer to Food and Its Interruption Contamination of Foods by Food Handlers : Experiments on Hepatitis A Virus Transfer to Food and Its Interruption, 66(7), 2759–2763. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.7.2759-2763.2000.Updated>
- Blaiotta, G., Di Cerbo, A., Murru, N., Coppola, R., & Aponte, M. (2016). Persistence of bacterial indicators and zoonotic pathogens in contaminated cattle wastes. *BMC Microbiology*, 16(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0705-8>
- BMEL. (2017). Verordnung zur Neuordnung der guten fachlichen Praxis beim Düngen, (148/17).
- Bosch, A., Pintó, R. M., & Abad, F. X. (2003). Survival and Transport of Enteric Viruses in the

- Environment. *Viruses in Foods*, (Springer US), 151–187. https://doi.org/10.1007/0-387-29251-9_6
- Bouwknegt, M., Verhaelen, K., Rzesutka, A., Kozyra, I., Maunula, L., von Bonsdorff, C. H., ... de Roda Husman, A. M. (2015). Quantitative farm-to-fork risk assessment model for norovirus and hepatitis A virus in European leafy green vegetable and berry fruit supply chains. *International Journal of Food Microbiology*, *198*, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.013>
- Brandl, M. T. (2006). Fitness of Human Enteric Pathogens on Plants and Implications for Food Safety. *Annual Review of Phytopathology*, *44*(1), 367–392. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143359>
- Brandl, M. T. (2008). Plant lesions promote the rapid multiplication of *Escherichia coli* O157:H7 on postharvest lettuce. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(17), 5285–5289. <https://doi.org/10.1128/AEM.01073-08>
- Brzuszkiewicz, E., Thürmer, A., Schuldes, J., Leimbach, A., Liesegang, H., Meyer, F. D., ... Daniel, R. (2011). Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Entero-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Archives of Microbiology*, *193*(12), 883–891. <https://doi.org/10.1007/s00203-011-0725-6>
- Buchholz, A. L., Davidson, G. R., Marks, B. P., Todd, E. C. D., & Ryser, E. T. (2012). Quantitative transfer of *Escherichia coli* O157:H7 to equipment during small-scale production of fresh-cut leafy greens. *Journal of Food Protection*, *75*(7), 1184–1197. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-489>
- Buée, M., de Boer, W., Martin, F., van Overbeek, L., & Jurkevitch, E. (2009). The rhizosphere zoo: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant and Soil*, *321*(1–2), 189–212. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9991-3>
- Bulgarelli, D., Rott, M., Schlaeppli, K., Ver Loren van Themaat, E., Ahmadinejad, N., Assenza, F., ... Schulze-Lefert, P. (2012). Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature*, *488*(7409), 91–95. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature11336>
- Bulgarelli, D., Schlaeppli, K., Spaepen, S., Ver Loren van Themaat, E., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology*, *64*, 807–38. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106>
- Bundesinstitut für Risikobewertung. (2005). Fragen und Antworten zum Hazard Analysis and Critical Control Point-Konzept. Was ist HACCP ?, 1–6. Retrieved from http://www.bfr.bund.de/cm/350/fragen_und_antworten_zum_hazard_analysis_and_critical_control_point_haccp_konzept.pdf
- Bundesministerium für Gesundheit. (2000). Verordnung über die Behandlung von Lebensmitteln mit Elektronen-, Gamma- und Röntgenstrahlen, Neutronen oder ultravioletten Strahlen (Lebensmittelbestrahlungsverordnung - LMBestV).
- Bundesregierung. (1992). *Klärschlammverordnung (AbfKlärV)*. Retrieved from www.juris.de
- Bundesregierung. (2007). Verordnung über Anforderungen an die Hygiene beim Herstellen, Behandeln und Inverkehrbringen von Lebensmitteln (Lebensmittelhygiene- Verordnung,

- LMHV), (853), 1–11.
- CAC. (2003). Code of Hygienic Practice for Fresh Fruits and Vegetables. *Alinorm*, 3(1), 45–70.
- CAC. (2013). Principles and Guidelines for the Establishment and Application of Microbiological Criteria Related To Foods. Revision 2013. *CAC/GL 21 - 1997*, 1–6. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:PRINCIPLES+FOR+THE+ESTABLISHMENT+AND+APPLICATION+OF+MICROBIOLOGICAL+CRITERIA+FOR+FOODS#1>
- Castro-Ibañez, I., Gil, M., & Allende, A. (2013). Impact of extreme climatic events on microbial safety of leafy greens: flooding. In *IAFP Annual Meeting*.
- Castro-Ibañez, I., Gil, M. I., & Allende, A. (2016). Ready-to-eat vegetables: Current problems and potential solutions to reduce microbial risk in the production chain. *LWT - Food Science and Technology*, 1–9. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.073>
- Castro-Ibañez, I., López-Gálvez, F., Gil, M. I., & Allende, A. (2015). Identification of Sampling Points Suitable for the Detection of Microbial Contamination in Fresh-cut Processing Lines. *Food Control*, 59, 841–848. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.004>
- Cerf, O., Donnat, E., & Working, H. (2011). Application of hazard analysis & Critical control point (HACCP) principles to primary production: What is feasible and desirable ?, 22, 1839–1843. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.04.023>
- Cevallos-Cevallos, J. M., Danyluk, M. D., Gu, G., Vallad, G. E., & van Bruggen, A. H. C. (2012). Dispersal of Salmonella Typhimurium by rain splash onto tomato plants. *Journal of Food Protection*, 75(3), 472–479. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-399>
- Chiang, Y.-C., Yang, C.-Y., Li, C., Ho, Y.-C., Lin, C.-K., & Tsen, H.-Y. (2006). Identification of Bacillus spp., Escherichia coli, Salmonella spp., Staphylococcus spp. and Vibrio spp. with 16S ribosomal DNA-based oligonucleotide array hybridization. *International Journal of Food Microbiology*, 107(2), 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.04.028>
- Choi, C., Song, I., Stine, S., Pimentel, J., & Gerba, C. (2004). Role of irrigation and wastewater reuse: Comparison of subsurface irrigation and furrow irrigation. *Water Science and Technology*, 50(2), 61–68. <https://doi.org/10.13031/2013.14042>
- Colas de la Noue, A., Estienney, M., Aho, S., Perrier-Cornet, J. M., de Rougemont, A., Pothier, P., ... Belliot, G. (2014). Absolute humidity influences the seasonal persistence and infectivity of human norovirus. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(23), 7196–7205. <https://doi.org/10.1128/AEM.01871-14>
- Cooley, M. B., Chao, D., & Mandrell, R. E. (2006). Escherichia coli O157:H7 survival and growth on lettuce is altered by the presence of epiphytic bacteria. *J Food Prot*, 69(10), 2329–2335.
- Cooley, M. B., Miller, W. G., & Mandrell, R. E. (2003). Colonization of Arabidopsis thaliana with Salmonella enterica and enterohemorrhagic Escherichia coli O157 : H7 and competition by Enterobacter asburiae. *Appl Environ Microbiol*, 69(8), 4915–4926. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4915>
- Costantini, V., Grenz, L. D., Fritzing, A., Lewis, D., Biggs, C., Hale, A., & Vinjé, J. (2010). Diagnostic accuracy and analytical sensitivity of IDEIA norovirus assay for routine screening of human norovirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(8), 2770–2778. <https://doi.org/10.1128/JCM.00654-10>

- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science (New York, N.Y.)*, *284*(5418), 1318–22. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- Crawford, R. J., Webb, H. K., Truong, V. K., Hasan, J., & Ivanova, E. P. (2012). Surface topographical factors influencing bacterial attachment. *Advances in Colloid and Interface Science*, *179–182*, 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2012.06.015>
- Davis, H., Taylor, J. P., Perdue, J. N., Stelma, G. N. J., Humphreys, J. M. J., Rowntree, R. 3rd, & Greene, K. D. (1988). A shigellosis outbreak traced to commercially distributed shredded lettuce. *American Journal of Epidemiology*, *128*(6), 1312–1321.
- Day, A. P., & Oliver, J. D. (2004). Changes in membrane fatty acid composition during entry of *Vibrio vulnificus* into the viable but nonculturable state. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, *42*(2), 69–73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15357297>
- De Boer, R. F., Ott, A., Kesztyüs, B., & Kooistra-Smid, A. M. D. (2010). Improved detection of five major gastrointestinal pathogens by use of a molecular screening approach. *Journal of Clinical Microbiology*, *48*(11), 4140–4146. <https://doi.org/10.1128/JCM.01124-10>
- Deering, A. J., Mauer, L. J., & Pruitt, R. E. (2012). Internalization of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in plants: A review. *Food Research International*, *45*(2), 567–575. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.058>
- Delmotte, N., Knief, C., Chaffron, S., Innerebner, G., Roschitzki, B., Schlapbach, R., ... Vorholt, J. a. (2009). Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(38), 16428–16433. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905240106>
- Demoling, F., Figueroa, D., & Bååth, E. (2007). Comparison of factors limiting bacterial growth in different soils. *Soil Biology and Biochemistry*, *39*(10), 2485–2495. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.05.002>
- Deutscher Bundestag. (2017). Verordnung zur Neuordnung der Klärschlammverwertung, *18/12495*. Retrieved from www.juris.de
- Ding, H., Fu, T. J., & Smith, M. A. (2013). Microbial Contamination in Sprouts: How Effective Is Seed Disinfection Treatment? *Journal of Food Science*, *78*(4). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12064>
- Dinu, L.-D., & Bach, S. (2011). Induction of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 in the phyllosphere of lettuce: a food safety risk factor. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(23), 8295–302. <https://doi.org/10.1128/AEM.05020-11>
- Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, *11*(8), 539–548. <https://doi.org/10.1038/nrg2812>
- Dorner, S. M., Anderson, W. B., Gaulin, T., Candon, H. L., Slawson, R. M., Payment, P., & Huck, P. M. (2007). Pathogen and indicator variability in a heavily impacted watershed. *Journal of Water and Health*, *5*(2), 241–257. <https://doi.org/10.2166/wh.2007.010>
- Doyle, M. P., & Erickson, M. C. (2008). Summer meeting 2007 - The problems with fresh produce: An overview. *Journal of Applied Microbiology*, *105*(2), 317–330. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03746.x>

- Du, M., Chen, J., Zhang, X., Li, A., Li, Y., & Wang, Y. (2007). Retention of virulence in a viable but nonculturable *Edwardsiella tarda* isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(4), 1349–1354. <https://doi.org/10.1128/AEM.02243-06>
- EFSA. (2007). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006. *EFSA Journal*, (December).
- EFSA. (2009). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. *EFSA Journal*, 223(January), 1–320.
- EFSA. (2010). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA Journal*, (April).
- EFSA. (2011). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. *EFSA Journal*, 9(3), 1–378. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2090>.
- EFSA. (2012). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses , Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal*, 10(3), 1–442. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2597>.
- EFSA. (2013). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal*, 11(4). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3129>. Available
- EFSA. (2014). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal*, 10(3)(1003), 2597. <https://doi.org/doi:10.2903/j.efsa.2012.2597>
- EFSA. (2015a). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, 18(15), 20449. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3991>
- EFSA. (2015b). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal*, 13(12), 4329. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4329>
- EFSA. (2016). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, 13(November). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4329>
- EFSA Panel on Biological Hazards. (2011). Scientific Opinion on the risk posed by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and other pathogenic bacteria in seeds and sprouted seeds. *EFSA Journal* 2011;9(11):2424, 9(11), 1–101. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2424>.
- EFSA Panel on Biological Hazards. (2013). Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin . Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations). *EFSA Journal*, 11(1), 3025. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3025>.
- EFSA Panel on Biological Hazards. (2014). Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 2 (Salmonella and Norovirus in leafy greens eaten raw as salad). *EFSA Journal*, 12(3), 1–118. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3600>
- Ercolini, D. (2013). High-Throughput Sequencing and Metagenomics : Moving Forward in the Culture-

- Independent Analysis of Food Microbial Ecology, 79(10), 3148–3155.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00256-13>
- Erickson, M. C. (2012). Internalization of Fresh Produce by Foodborne Pathogens. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 283–310.
- Erickson, M., Critzer, F., & Doyle, M. (2004). Composting Criteria for Animal Manure. *Science*.
- Escudero, B. I., Rawsthorne, H., Gensel, C., & Jaykus, L. a. (2012). Persistence and Transferability of Noroviruses on and between Common Surfaces and Foods. *Journal of Food Protection*, 75(5), 927–935. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-460>
- Europäische Kommission. (2002). RICHTLINIE 2002/63/EG DER KOMMISSION vom 11. Juli 2002 zur Festlegung gemeinschaftlicher Probenahmemethoden zur amtlichen Kontrolle von Pestizidrückständen in und auf Erzeugnissen pflanzlichen und tierischen Ursprungs und zur Aufhebung der Richtlinie 79, 2014(April), 30–43.
- Europäische Kommission. (2003). *Risk assessment of food borne bacterial pathogens : Quantitative methodology relevant for human exposure assessment*.
- Europäische Kommission. (2005). VERORDNUNG (EG) Nr. 2073/2005 DER KOMMISSION vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel, L338/1, 1–26.
- Europäische Kommission. (2013). VERORDNUNG (EU) Nr. 209/2013 DER KOMMISSION vom 11. März 2013 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 im Hinblick auf mikrobiologische Kriterien für Sprossen und Probenahmeverfahren für Geflügelschlachtkörper und frisches Geflügelfleisch, L68/22, 19–23.
- Europäische Kommission. (2017). Bekanntmachung der Kommission mit dem Leitfaden zur Eindämmung mikrobiologischer Risiken durch gute Hygiene bei der Primärproduktion von frischem Obst und Gemüse (2017/C 163/01). *Amtsblatt Der Europäischen Union*.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4329/pdf>
- Europäisches Parlament / Rat. (2004). Verordnung (EG) Nr. 852/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über Lebensmittelhygiene. *Amtsblatt Der Europäischen Union*, (L 139/1), 1–54. Retrieved from <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32004R0852&from=DE>
- EWG. (1986). Richtlinie 86/278/EWG des Rates vom 12. Juni 1986 über den Schutz der Umwelt und insbesondere der Böden bei der Verwendung von Klärschlamm in der Landwirtschaft.
- FAO. (1999). Principles and Guidelines for the Conduct of Microbiological Risk Assessment. *FAO: Agriculture and Consumer Protection, CAC/GL 63-*, 68. [https://doi.org/10.1016/S0015-6264\(66\)80695-8](https://doi.org/10.1016/S0015-6264(66)80695-8)
- FAO/WHO. (2008). Microbiological hazards in fresh fruits and vegetables. *Microbiological Risk Assessment Series. Meeting Report.*, 1–38. <https://doi.org/987-92-5-106118-3>
- FAO /WHO. (1996). Codex Alimentarius.
- FAO Committee on Agriculture. (2003). Development of a Framework for Good Agricultural Practices. *Coag*, 6(March), 1–12. Retrieved from http://www.fao.org/prods/GAP/home/principles_en.htm
- FDA. (2008). Guidance for Industry: Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards of Fresh-cut Fruits and Vegetables. Retrieved July 27, 2017, from

<https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ProducePlantProducts/ucm064458.htm>

- Fett, W. F. (2000). Naturally occurring biofilms on alfalfa and other types of sprouts. *Journal of Food Protection*, 625–632(5), 563–863.
- Fink, R. C., Black, E. P., Hou, Z., Sugawara, M., Sadowsky, M. J., & Diez-Gonzalez, F. (2012). Transcriptional responses of *Escherichia coli* K-12 and O157: H7 associated with lettuce leaves. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6), 1752–1764. <https://doi.org/10.1128/AEM.07454-11>
- Fonseca, J. M., Fallon, S. D., Sanchez, C. A., & Nolte, K. D. (2011). *Escherichia coli* survival in lettuce fields following its introduction through different irrigation systems, 893–902. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04942.x>
- Fornefeld, E., Schierstaedt, J., Grosch, R., Schikora, A., Grosch, R., Smalla, K., & Schikora, A. (2017). Interaction between *Salmonella* and Plants: Potential Hosts and Vectors for Human Infection. In *Current Topics in Salmonella and Salmonellosis*.
- Fornefeld, E., Schikora, A., Berg, G., Grosch, R., Erlacher, A., Kühne, T., & Smalla, K. (2015). Humanpathogene Bakterien auf Pflanzen. *Journal of Cultivated Plants*, 66(11), 189–202. <https://doi.org/10.5073/J>
- Francis, G. A., Gallone, A., Nychas, G. J., Sofos, J. N., Colelli, G., Amodio, M. L., & Spano, G. (2012). Factors Affecting Quality and Safety of Fresh-Cut Produce. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(7), 595–610. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.503685>
- Franklin, A. B., & VerCauteren, K. C. (2016). Keeping Wildlife Out of Your Food: Mitigation and Control Strategies to Reduce the Transmission Risk of Food-Borne Pathogens. In M. Jay-Russell & M. P. Doyle (Eds.), *Food Safety Risks from Wildlife* (pp. 183–199). Springer-Verlag.
- Frontzek, A. (2015). Die Sequenz im Bier. *Labor&More*, 1970, 44–47.
- Fukuda, S., Sasaki, Y., & Seno, M. (2008). Rapid and sensitive detection of norovirus genomes in oysters by a two-step isothermal amplification assay system combining nucleic acid sequence-based amplification and reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3912–3914. <https://doi.org/10.1128/AEM.00127-08>
- Galimberti, A., Bruno, A., Mezzasalma, V., Mattia, F. De, Bruni, I., & Labra, M. (2015). Emerging DNA-based technologies to characterize food ecosystems, 69, 424–433.
- Gerstel, U., & Römling, U. (2003). The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella typhimurium*. *Research in Microbiology*, 154(10), 659–667. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2003.08.005>
- Ghigo, J. M. (2001). Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*, 412(6845), 442–445. <https://doi.org/10.1038/35086581>
- Gil, M. I., Selma, M. V., Suslow, T., Jacxsens, L., Uyttendaele, M., & Allende, A. (2013). Pre- and Post-harvest Preventive Measures and Intervention Strategies to Control Microbial Food Safety Hazards of Fresh Leafy Vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 8398(June 2014), 37–41. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.657808>
- Girones, R., Ferrús, M. A., Alonso, J. L., Rodriguez-Manzano, J., Calgua, B., de Abreu Corrêa, A., ...

- Bofill-Mas, S. (2010). Molecular detection of pathogens in water - The pros and cons of molecular techniques. *Water Research*, 44(15), 4325–4339. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.030>
- Golberg, D., Kroupitski, Y., Belausov, E., Pinto, R., & Sela, S. (2011). Salmonella Typhimurium internalization is variable in leafy vegetables and fresh herbs. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 250–257. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.031>
- Goodburn, C., & Wallace, C. A. (2013). The microbiological efficacy of decontamination methodologies for fresh produce: A review. *Food Control*, 32(2), 418–427. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.012>
- Gu, G., Hu, J., Cevallos-Cevallos, J. M., Richardson, S. M., Bartz, J. A., & van Bruggen, A. H. C. (2011). Internal colonization of Salmonella enterica serovar Typhimurium in tomato plants. *PLoS ONE*, 6(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027340>
- Gu, Y., Zavaliev, R., & Dong, X. (2017). Membrane Trafficking in Plant Immunity. *Molecular Plant*, 10(8), 1026–1034. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.07.001>
- Hahn, T., & Botzenhart, K. (1991). Virologische Untersuchungen. Untersuchungen zur Keimreduktion im gereinigten Abwasser durch UV-Bestrahlung. *Bayrisches Landesamt Für Wasserwirtschaft, Informationsberichte.*, 3, 91.
- Hamilton, A. J., Stagnitti, F., Premier, R., Boland, A. M., & Hale, G. (2006). Quantitative Microbial Risk Assessment Models for Consumption of Raw Vegetables Irrigated with Reclaimed Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3284–3290. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3284>
- Han, S., & Micallef, S. A. (2016). Environmental metabolomics of the plant surface provides insights on Salmonella enterica colonization of tomato. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(10), AEM.00435-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.00435-16>
- Hardy, M. E., White, L. J., Ball, J. M., & Estes, M. K. (1995). Specific proteolytic cleavage of recombinant Norwalk virus capsid protein. *J. Virol.*, 69(3), 1693–1698. Retrieved from <http://jvi.asm.org/content/69/3/1693.full.pdf>
- Heffron, F. (2011). Salmonella-secreted Virulence Factors. In S. Porwollik (Ed.), *Salmonella: From Genome to Function*.
- Herman, K. M., Hall, A. J., & Gould, L. H. (2015). Outbreaks attributed to fresh leafy vegetables, United States, 1973-2012. *Epidemiology and Infection*, 143(14). <https://doi.org/10.1017/S0950268815000047>
- Hijnen, W. A. M., Brouwer-Hanzens, A. J., Charles, K. J., & Medema, G. (2005). Transport of MS2 Phage, Escherichia coli, Clostridium perfringens, Cryptosporidium parvum, and Giardia intestinalis in a Gravel and a Sandy Soil. *Environmental Science & Technology*, 40(4), 1371–1371. <https://doi.org/10.1021/es0580237>
- Hinsinger, P., Bengough, A. G., Vetterlein, D., & Young, I. M. (2009). Rhizosphere: Biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil*, 321(1–2), 117–152. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9885-9>
- Hirneisen, K. A., & Kniel, K. E. (2013). Norovirus Surrogate Survival on Spinach During Preharvest Growth. *Phytopathology*, 103(4), 389–394. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-12-0231-FI>

- Hoelzer, K., Switt, A. I. M., & Wiedmann, M. (2011). Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. *Veterinary Research*, 42(1), 1–28. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-34>
- Holvoet, K., De Keuckelaere, A., Sampers, I., Van Haute, S., Stals, A., & Uyttendaele, M. (2014). Quantitative study of cross-contamination with *Escherichia coli*, *E. coli* O157, MS2 phage and murine norovirus in a simulated fresh-cut lettuce wash process. *Food Control*, 37(1), 218–227. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.051>
- Holvoet, K., Sampers, I., Seynnaeve, M., Jacxsens, L., & Uyttendaele, M. (2015). Agricultural and management practices and bacterial contamination in greenhouse versus open field lettuce production. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(1), 32–63. <https://doi.org/10.3390/ijerph120100032>
- Holvoet, K., Sampers, I., Seynnaeve, M., & Uyttendaele, M. (2014). Relationships among hygiene indicators and enteric pathogens in irrigation water, soil and lettuce and the impact of climatic conditions on contamination in the lettuce primary production. *International Journal of Food Microbiology*, 171, 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.009>
- Hong, S. A., Kwon, J., Kim, D., & Yang, S. (2015). A rapid, sensitive and selective electrochemical biosensor with concanavalin A for the preemptive detection of norovirus. *Biosensors and Bioelectronics*, 64, 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.025>
- Hou, Z., Fink, R. C., Sugawara, M., Diez-Gonzalez, F., & Sadowsky, M. J. (2013). Transcriptional and functional responses of *Escherichia coli* O157:H7 growing in the lettuce rhizosphere. *Food Microbiology*, 35(2), 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.03.002>
- Hughes, M. S., Coyle, P. V., & Connolly, J. H. (1992). Enteroviruses in recreational waters of Northern Ireland. *Epidemiology and Infection*, 108(3), 529–36. <https://doi.org/10.1017/S0950268800050020>
- Hunter, P. J., Hand, P., Pink, D., Whipps, J. M., Bending, G. D., Al, H. E. T., & Icrobiol, A. P. P. L. E. N. M. (2010). Both Leaf Properties and Microbe-Microbe Interactions Influence Within-Species Variation in Bacterial Population Diversity and Structure in the Lettuce (*Lactuca* Species) Phyllosphere, 76(24), 8117–8125. <https://doi.org/10.1128/AEM.01321-10>
- Hutchison, M. L., Walters, L. D., Avery, S. M., Synge, B. A., & Moore, A. (2004). Levels of zoonotic agents in British livestock manures. *Letters in Applied Microbiology*, 39(2), 207–214. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01564.x>
- IfSG. Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz–IfSG), 2000 Verlag Reckinger & Co., Siegburg § (2000). Retrieved from <http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/ifsg/gesamt.pdf> [http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Gesetz+zur+Verh?tung+und+Bek?mpfung+von+Infektionskrankheiten+beim+Menschen+\(+Infektionsschutzgesetz++IfSG+\)#1](http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Gesetz+zur+Verh?tung+und+Bek?mpfung+von+Infektionskrankheiten+beim+Menschen+(+Infektionsschutzgesetz++IfSG+)#1)
- Iqbal, S. S., Mayo, M. W., Bruno, J. G., Bronk, B. V., Batt, C. A., & Chambers, J. P. (2000). A review of molecular recognition technologies for detection of biological threat agents. *Biosensors and Bioelectronics*, 15(11–12), 549–578. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(00\)00108-1](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(00)00108-1)
- Islam, M., Doyle, M. P., Phatak, S. C., Millner, P., & Jiang, X. (2004). Persistence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 in Soil and on Leaf Lettuce and Parsley Grown in Fields Treated with Contaminated Manure Composts or Irrigation Water, 67(7), 1365–1370.

- Izumi, H., Tsukada, Y., Poubol, J., & Hisa, K. (2008). On-farm sources of microbial contamination of persimmon fruit in Japan. *Journal of Food Protection*, 71(1), 52–9. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.1.52>
- Jacques, M., Aragon, V., & Tremblay, Y. D. N. (2010). Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. *Animal Health Research Reviews*, 11(2), 97–121. <https://doi.org/10.1017/S1466252310000149>
- Jacques, M., Grenier, D., & Labrie, J. (2015). Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 in bacterial biofilms, 8521(June), 132–136.
- Jacxsens, L., Devlieghere, F., Ragaert, P., Vanneste, E., & Debevere, J. (2003). Relation between microbiological quality, metabolite production and sensory quality of equilibrium modified atmosphere packaged fresh-cut produce. *International Journal of Food Microbiology*, 83(3), 263–280. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00376-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00376-8)
- Jacxsens, L., Uyttendaele, M., Luning, P., & Allende, A. (2017). Food safety management and risk assessment in the fresh produce supply chain. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 193, 12020. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/193/1/012020>
- Jaenicke, H., & Kriesemer, S. (2015). *Bericht über das Fachgespräch "Aufkommen von humanpathogenen Keimen bei frischem Obst und Gemüse."* Kompetenzzentrum Gartenbau. Unveröffentlicht.
- James, J. (2006). Overview of Microbial Hazards in Fresh Fruit and Vegetables Operations. *Microbial Hazard Identification in Fresh Fruit and Vegetables*, 1–36. <https://doi.org/10.1002/0470007761.ch1>
- Jay, M. T., Cooley, M., Carychao, D., Wiscomb, G. W., Sweitzer, R. A., Crawford-Miksza, L., ... Mandrell, R. E. (2007). Escherichia coli O157:H7 in feral swine near spinach fields and cattle, central California coast. *Emerging Infectious Diseases*, 13(12), 1908–1911. <https://doi.org/10.3201/eid1312.070763>
- Johl, M., Kerkmann, M. L., Kramer, U., & Walter, R. (1991). Virological investigation of the river Elbe. *Water Science and Technology*, 24(2), 205–208.
- Johnston, L. M., Jaykus, L. A., Moll, D., Anciso, J., Mora, B., & Moe, C. L. (2006). A field study of the microbiological quality of fresh produce of domestic and Mexican origin. *International Journal of Food Microbiology*, 112(2), 83–95. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.05.002>
- Jones, D. L., Nguyen, C., & Finlay, R. D. (2009). Carbon flow in the rhizosphere: Carbon trading at the soil-root interface. *Plant and Soil*, 321(1–2), 5–33. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9925-0>
- Jones, T. F., & Gerner-Smidt, P. (2012). Nonculture diagnostic tests for enteric diseases. *Emerging Infectious Diseases*, 18(3), 513–514. <https://doi.org/10.3201/eid1803.111914>
- Jung, Y., Jang, H., & Matthews, K. R. (2014). Effect of the food production chain from farm practices to vegetable processing on outbreak incidence. *Microbial Biotechnology*, 7(6), 517–527. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12178>
- Kele, B., Lengyel, G., & Deak, J. (2011). Comparison of an ELISA and two reverse transcription polymerase chain reaction methods for norovirus detection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70(4), 475–478. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.04.002>
- Klerks, M. M., Franz, E., Gent-pelzer, M. Van, & Zijlstra, C. (2007). Differential interaction of

- Salmonella enterica serovars with lettuce cultivars and plant-microbe factors influencing the colonization efficiency, 620–631. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.82>
- Knight, A., Li, D., Uyttendaele, M., & Jaykus, L. (2012). Critical review of methods for detecting human noroviruses and predicting their infectivity, (July), 1–15. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.709820>
- Kokkinos, P. (2017). Virological Quality of Irrigation Water in Leafy Green Vegetables and Berry Fruits Production Chains. *Food Environ Virol*, 72–78. <https://doi.org/10.1007/s12560-016-9264-2>
- Kokkinos, P., Kozyra, I., Lazic, S., Bouwknegt, M., Rutjes, S., Willems, K., ... Vantarakis, A. (2012). Harmonised Investigation of the Occurrence of Human Enteric Viruses in the Leafy Green Vegetable Supply Chain in Three European Countries. *Food and Environmental Virology*, 4(4), 179–191. <https://doi.org/10.1007/s12560-012-9087-8>
- Koutsoumanis, K. P., & Aspidou, Z. (2016). Moving towards a risk-based food safety management. *Current Opinion in Food Science*, 12, 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.06.008>
- Kroupitski, Y., Pinto, R., Belausov, E., & Sela, S. (2011). Distribution of Salmonella typhimurium in romaine lettuce leaves. *Food Microbiology*, 28(5), 990–997. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.01.007>
- Kruse, H., Kirkemo, A. M., & Handeland, K. (2004). Wildlife as source of zoonotic infections. *Emerging Infectious Diseases*, 10(12), 2067–2072. <https://doi.org/10.3201/eid1012.040707>
- Kyle, J. L., Parker, C. T., Goudeau, D., & Brandl, M. T. (2010). Transcriptome analysis of escherichia coli O157:H7 exposed to lysates of lettuce leaves. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5), 1375–1387. <https://doi.org/10.1128/AEM.02461-09>
- Lambers, H., Mougel, C., Jaillard, B., & Hinsinger, P. (2009). Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: An evolutionary perspective. *Plant and Soil*, 321(1–2), 83–115. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0042-x>
- Lamhoujeb, S., Charest, H., Fliss, I., Ngazoa, S., & Jean, J. (2009). Real-time molecular beacon NASBA for rapid and sensitive detection of norovirus GII in clinical samples. *Canadian Journal of Microbiology*, 55(12), 1375–1380. <https://doi.org/doi:10.1139/W09-105>
- Lammerding, A. M., & Fazil, A. (2000). Hazard identification and exposure assessment for microbial food safety risk assessment. *International Journal of Food Microbiology*, 58(3), 147–157. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00269-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00269-5)
- Lapuz, R., Tani, H., Sasai, K., Shiota, K., Katoh, H., & Baba, E. (2008). The role of roof rats (*Rattus rattus*) in the spread of Salmonella Enteritidis and S. Infantis contamination in layer farms in eastern Japan. *Epidemiology and Infection*, 136(9), 1235–1243. <https://doi.org/10.1017/S095026880700948X>
- Law, J. W.-F., Ab Mutalib, N.-S., Chan, K.-G., & Lee, L.-H. (2015). Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology*, 5(January), 770. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00770>
- Lawson, B., Howard, T., Kirkwood, J. K., Macgregor, S. K., Perkins, M., Robinson, R. A., ... Cunningham, A. A. (2010). Epidemiology of salmonellosis in garden birds in England and Wales, 1993 to 2003. *EcoHealth*, 7(3), 294–306. <https://doi.org/10.1007/s10393-010-0349-3>
- León-Félix, J., Martínez-Bustillos, R. A., Báez-Sañudo, M., Peraza-Garay, F., & Chaidez, C. (2010).

- Norovirus Contamination of Bell Pepper from Handling During Harvesting and Packing. *Food and Environmental Virology*, 2(4), 211–217. <https://doi.org/10.1007/s12560-010-9048-z>
- Leveau, J. H. J. (2006). Microbial communities in the phyllosphere. In C. M. M Riederer (Ed.), *Biology of the plant cuticle* (pp. 334–367).
- Li, D., De Keuckelaere, A., & Uyttendaele, M. (2015). Fate of Foodborne Viruses in the “Farm to Fork” Chain of Fresh Produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(6), 755–770. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12163>
- Li, H., Tajkarimi, M., & Osburn, B. I. (2008). Impact of vacuum cooling on Escherichia coli O157:H7 infiltration into lettuce tissue. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(10), 3138–3142. <https://doi.org/10.1128/AEM.02811-07>
- Liebana, E., Garcia-Migura, L., Clouting, C., Clifton-Hadley, F. A., Breslin, M., & Davies, R. H. (2003). Molecular fingerprinting evidence of the contribution of wildlife vectors in the maintenance of Salmonella Enteritidis infection in layer farms. *Journal of Applied Microbiology*, 94(6), 1024–1029. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01924.x>
- Lima, P. M., São José, J. F. B., Andrade, N. J., Pires, A. C. S., & Ferreira, S. O. (2013). Interaction between natural microbiota and physicochemical characteristics of lettuce surfaces can influence the attachment of Salmonella Enteritidis. *Food Control*, 30(1), 157–161. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.039>
- Liu, C., Hofstra, N., & Franz, E. (2013). Impacts of climate change on the microbial safety of pre-harvest leafy green vegetables as indicated by Escherichia coli O157 and Salmonella spp. *International Journal of Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.026>
- López-Gálvez, F., Truchado, P., Sánchez, G., Aznar, R., Gil, M. I., & Allende, A. (2016). Occurrence of enteric viruses in reclaimed and surface irrigation water: relationship with microbiological and physicochemical indicators. *Journal of Applied Microbiology*, 121(4), 1180–1188. <https://doi.org/10.1111/jam.13224>
- Lundberg, D. S., Lebeis, S. L., Paredes, S. H., Yourstone, S., Gehring, J., Malfatti, S., ... Dangl, J. L. (2012). Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature*, 488(7409), 86–90. <https://doi.org/10.1038/nature11237>
- Luo, Y., Nou, X., Yang, Y., Alegre, I., Turner, E., Feng, H., ... Conway, W. S. (2011). Determination of Free Chlorine Concentrations Needed To Prevent Escherichia coli O157:H7 Cross-Contamination during Fresh-Cut Produce Wash. *Journal of Food Protection*, 74(3), 352–358. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-429>
- Ma, K., Deng, Y., Bai, Y., Xu, D., Chen, E., Wu, H., ... Gao, L. (2014). Rapid and simultaneous detection of Salmonella, Shigella, and Staphylococcus aureus in fresh pork using a multiplex real-time PCR assay based on immunomagnetic separation. *Food Control*, 42, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.042>
- Maalej, S., Denis, M., & Dukan, S. (2004). Temperature and growth-phase effects on Aeromonas hydrophila survival in natural seawater microcosms: Role of protein synthesis and nucleic acid content on viable but temporarily nonculturable response. *Microbiology*, 150(1), 181–187. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26639-0>
- Maatouk, K., Zaafrane, S., Gauthier, J. M., & Bakhrouf, A. (2004). Influence des conditions de culture préalables et de la présence du gène rpoS pour la survie de Salmonella typhimurium en eau de

- mer exposée à la lumière solaire. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(5), 341–350.
- Macarasin, D., Patel, J., Bauchan, G., Giron, J. a, & Sharma, V. K. (2012). Role of curli and cellulose expression in adherence of Escherichia coli O157:H7 to spinach leaves. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(2), 160–7. <https://doi.org/10.1089/fpd.2011.1020>
- Mandal, P. K., Biswas, A. K., Choi, K., & Pal, U. K. (2011). Methods for rapid detection of foodborne pathogens. *American Journal of Food Technology*, 6(2), 87–102.
- Mansfield, L. P., & Forsythe, S. J. (2001). The detection of Salmonella serovars from animal feed and raw chicken using a combined immunomagnetic separation and ELISA method. *Food Microbiology*, 18(4), 361–366. <https://doi.org/10.1006/fmic.2001.0416>
- Marti, E., & Barardi, C. R. M. (2016). Detection of human adenoviruses in organic fresh produce using molecular and cell culture-based methods. *International Journal of Food Microbiology*, 230, 40–44. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.018>
- Marti, E., Ferrary-Américo, M., & Barardi, C. R. M. (2017). Detection of Potential Infectious Enteric Viruses in Fresh Produce by (RT)-qPCR Preceded by Nuclease Treatment. *Food and Environmental Virology*. <https://doi.org/10.1007/s12560-017-9300-x>
- Martínez-Vaz, B. M., Fink, R. C., Diez-Gonzalez, F., & Sadowsky, M. J. (2014). Enteric pathogen-plant interactions: molecular connections leading to colonization and growth and implications for food safety. *Microbes and Environments / JSME*, 29(2), 123–35. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME13139>
- Matos, A., & Garland, J. L. (2005). Effects of community versus single strain inoculants on the biocontrol of Salmonella and microbial community dynamics in alfalfa sprouts. *Journal of Food Protection*, 68(1), 40–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15690802>
- Maunula, L., Kaupke, A., Vasickova, P., S??derberg, K., Kozyra, I., Lazic, S., ... Cook, N. (2013). Tracing enteric viruses in the European berry fruit supply chain. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2), 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.003>
- Mazurkiewicz, P., Thomas, J., Thompson, J. A., Liu, M., Arbibe, L., Sansonetti, P., & Holden, D. W. (2008). SpvC is a Salmonella effector with phosphothreonine lyase activity on host mitogen-activated protein kinases. *Molecular Microbiology*, 67(6), 1371–1383. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06134.x>
- McEvoy, J. L., Luo, Y., Conway, W., Zhou, B., & Feng, H. (2009). Potential of Escherichia coli O157:H7 to grow on field-cored lettuce as impacted by postharvest storage time and temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 128(3), 506–509. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.008>
- Melotto, M. (2014). Plant innate immunity against human bacterial pathogens, (September 2015). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00411>
- Membre, J. M., & Guillou, S. (2016). Latest developments in foodborne pathogen risk assessment. *Current Opinion in Food Science*, 8, 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.04.011>
- Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 634–663. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028>
- Meng, F., Altier, C., & Martin, G. B. (2013). Salmonella colonization activates the plant immune

- system and benefits from association with plant pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology*, 15(9), 2418–2430. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12113>
- Méric, G., Kemsley, E. K., Falush, D., Siggers, E. J., & Lucchini, S. (2013). Phylogenetic distribution of traits associated with plant colonization in *Escherichia coli*, 15, 487–501. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02852.x>
- Mitra, R., Cuesta-Alonso, E., Wayadande, a, Talley, J., Gilliland, S., & Fletcher, J. (2009). Effect of route of introduction and host cultivar on the colonization, internalization, and movement of the human pathogen *Escherichia coli* O157:H7 in spinach. *Journal of Food Protection*, 72(7), 1521–1530.
- Monaghan, J. M., Augustin, J. C., Bassett, J., Betts, R., Pourkomialian, B., & Zwietering, M. H. (2017). Risk Assessment or Assessment of Risk? Developing an Evidence-Based Approach for Primary Producers of Leafy Vegetables To Assess and Manage Microbial Risks. *Journal of Food Protection*, 80(5), 725–733. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-237>
- Monier, J. M., & Lindow, S. E. (2004). Frequency, Size, and Localization of Bacterial Aggregates on Bean Leaf Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 346–355. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.346-355.2004>
- Montville, R., & Schaffner, D. (2005). Monte Carlo Simulation of Pathogen Behavior during the Sprout Production Process Monte Carlo Simulation of Pathogen Behavior during the Sprout Production Process, 71(2), 746–753. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.746>
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. <https://doi.org/10.1101/SQB.1986.051.01.032>
- Neilson, E. H., Goodger, J. Q. D., Woodrow, I. E., & Møller, B. L. (2013). Plant chemical defense: At what cost? *Trends in Plant Science*, 18(5), 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.01.001>
- Noguera, P., Posthuma-Trumpie, G. A., Van Tuil, M., Van Der Wal, F. J., De Boer, A., Moers, A. P. H. A., & Van Amerongen, A. (2011). Carbon nanoparticles in lateral flow methods to detect genes encoding virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(2), 831–838. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4334-z>
- Noguera, P. S., Posthuma-Trumpie, G. A., van Tuil, M., van der Wal, F. J., Boer, A. de, Moers, A. P. H. A., & van Amerongen, A. (2011). Carbon Nanoparticles as Detection Labels in Antibody Microarrays. Detection of Genes Encoding Virulence Factors in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Analytical Chemistry*, 83(22), 8531–8536. <https://doi.org/10.1021/ac201823v>
- Nou, X., & Luo, Y. (2010). Whole-leaf wash improves chlorine efficacy for microbial reduction and prevents pathogen cross-contamination during fresh-cut lettuce processing. *Journal of Food Science*, 75(5). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01630.x>
- Nowakowska, J., & Oliver, J. D. (2013). Resistance to environmental stresses by *Vibrio vulnificus* in the viable but nonculturable state. *FEMS Microbiology Ecology*, 84(1), 213–222. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12052>
- Nürnberg, T., & Lipka, V. (2005). Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular Plant Pathology*, 6(3), 1–11. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2004.00279.X>

- Nyberg, K. A., Vinnerås, B., Ottoson, J. R., Aronsson, P., & Albiñ, A. (2010). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium in manure-amended soils studied in outdoor lysimeters. *Applied Soil Ecology*, 46(3), 398–404. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.10.004>
- Okabayashi, T., Yokota, S. I., Ohkoshi, Y., Ohuchi, H., Yoshida, Y., Kikuchi, M., ... Fujii, N. (2008). Occurrence of norovirus infections unrelated to norovirus outbreaks in an asymptomatic food handler population. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(6), 1985–1988. <https://doi.org/10.1128/JCM.00305-08>
- Oliveira, M., Usall, J., Solsona, C., Alegre, I., Viñas, I., & Abadias, M. (2010). Effects of packaging type and storage temperature on the growth of foodborne pathogens on shredded “Romaine” lettuce. *Food Microbiology*, 27(3), 375–380. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.11.014>
- Oliver, J. D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 43 Spec No(February), 93–100. <https://doi.org/2134> [pii]
- Pachepsky, Y., Shelton, D. R., McLain, J. E., Patel, J., & Mandrell, E. R. (2011). Irrigation Waters as a Source of Pathogenic Microorganisms in Produce: A Review. *Advances in Agronomy*, 113(7).
- Pagotto, F., Corneau, N., Mattison, K., & Bidawid, S. (2008). Development of a DNA microarray for the simultaneous detection and genotyping of noroviruses. *J Food Prot*, 71(7), 1434–1441. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18680944>
- Painter, J. A., Hoekstra, R. M., Ayers, T., Tauxe, R. V., Braden, C. R., Angulo, F. J., & Griffin, P. M. (2013). Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998–2008. *Emerging Infectious Diseases*, 19(3), 407–415. <https://doi.org/10.3201/eid1903.111866>
- Pang, Lambertini, Buchanan, Schaffner, & Pradhan. (2017). Quantitative microbial risk assessment for *E. coli* O157:H7 in fresh-cut lettuce. *Journal of Food Protection*, 80(2), 302–311.
- Park, S., Szonyi, B., Gautam, R., Nightingale, K., Anciso, J., & Ivanek, R. (2012). Risk factors for microbial contamination in fruits and vegetables at the preharvest level: a systematic review. *Journal of Food Protection*, 75(11), 2055–2081. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-160>
- Patel, J., Sharma, M., & Ravishakar, S. (2011). Effect of curli expression and hydrophobicity of *Escherichia coli* O157:H7 on attachment to fresh produce surfaces. *Journal of Applied Microbiology*, 110(3), 737–745. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04933.x>
- Patterson, S. S., Smith, M. W., Casper, E. T., Huffman, D., Stark, L., Fries, D., & Paul, J. H. (2006). A nucleic acid sequence-based amplification assay for real-time detection of norovirus genogroup II. *Journal of Applied Microbiology*, 101(4), 956–963. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02934.x>
- Pava-Ripoll, M., Pearson, R. E. G., Miller, A. K., & Ziobro, G. C. (2012). Prevalence and relative risk of *Cronobacter* spp., *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* associated with the body surfaces and guts of individual filth flies. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(22), 7891–7902. <https://doi.org/10.1128/AEM.02195-12>
- Perez, J. M., Cavalli, P., Roure, C., Renac, R., Gille, Y., & Freydiere, A. M. (2003). Comparison of four chromogenic media and Hektoen agar for detection and presumptive identification of *Salmonella* strains in human stools. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(3), 1130–1134. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.3.1130-1134.2003>
- Poza-Carrion, C., Suslow, T., & Lindow, S. (2013). Resident bacteria on leaves enhance survival of

- immigrant cells of *Salmonella enterica*. *Phytopathology*, 103(4), 341–51. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-12-0221-FI>
- QS. (2017). Leitfaden Bearbeitung / Verarbeitung Obst, Gemüse, Kartoffeln, 1–53.
- QS-GAP. (2017). Leitfaden Erzeugung Obst, Gemüse, Kartoffeln, *Version 4.*, 1–42.
- Ramos, B., Miller, F. A., Brandão, T. R. S., Teixeira, P., & Silva, C. L. M. (2013). Fresh fruits and vegetables - An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 20, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.07.002>
- Randazzo, W., López-Gálvez, F., Allende, A., Aznar, R., & Sánchez, G. (2016). International Journal of Food Microbiology Evaluation of viability PCR performance for assessing norovirus infectivity in fresh-cut vegetables and irrigation water. *International Journal of Food Microbiology*, 229, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.010>
- Ranjbaran, M., & Datta, A. K. (2017). Mechanistic understanding of internalization of bacteria into leafy greens during a vacuum cooling process. *2017 ASABE Annual International Meeting*. St. Joseph, MI.: ASABE. <https://doi.org/https://doi.org/10.13031/aim.201700152>
- Rastogi, G., Coaker, G. L., & Leveau, J. H. J. (2013). New insights into the structure and function of phyllosphere microbiota through high-throughput molecular approaches. *FEMS Microbiology Letters*, 348(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12225>
- Rastogi, G., Sbodio, A., Tech, J. J., Suslow, T. V., Coaker, G. L., & Leveau, J. H. J. (2012). Leaf microbiota in an agroecosystem: spatiotemporal variation in bacterial community composition on field-grown lettuce. *The ISME Journal*, 6(10), 1812–22. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.32>
- RIVM. (2013). Efficacy of applied processing measures on virus reduction in food. Retrieved from http://www.rivm.nl/dsresource?objectid=rivmp:201574&type=org&disposition=inline&ns_nc=1
- Roberts, B. N., Bailey, R. H., McLaughlin, M. R., & Brooks, J. P. (2016). Decay rates of zoonotic pathogens and viral surrogates in soils amended with biosolids and manures and comparison of qPCR and culture derived rates. *Science of the Total Environment*, 573, 671–679. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.088>
- Roesch, L. F. W., Fulthorpe, R. R., Riva, A., Casella, G., Km, A., Kent, A. D., ... Triplett, E. W. (2007). Pyrosequencing Enumerates and Contracts Soil Microbial Diversity. *ISME Journal*, 1(4), 283–290. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.53.Pyrosequencing>
- Romanova, N. A., Gawande, P. V., Brovko, L. Y., & Griffiths, M. W. (2007). Rapid methods to assess sanitizing efficacy of benzalkonium chloride to *Listeria monocytogenes* biofilms. *Journal of Microbiological Methods*, 71(3), 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.09.002>
- Sagoo, S. K., Little, C. L., Ward, L., Gillespie, I. a., & Mitchell, R. T. (2003). Microbiological Study of Ready-to-Eat Salad Vegetables from. *Journal of Food Protection*, 66(3), 403–409.
- Sant’Ana, A. S., Barbosa, M. S., Destro, M. T., Landgraf, M., & Franco, B. D. G. M. (2012). Growth potential of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelf-life. *International Journal of Food Microbiology*, 157(1), 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.011>
- Schikora, A., Garcia, A. V., & Hirt, H. (2012). Plants as alternative hosts for *Salmonella*. *Trends in Plant Science*, 17(5), 245–249. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.03.007>

- Schikora, A., Virlogeux-Payant, I., Bueso, E., Garcia, A. V., Nilau, T., Charrier, A., ... Hirt, H. (2011). Conservation of Salmonella infection mechanisms in plants and animals. *PLoS ONE*, *6*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024112>
- Schikora, M., Neupane, B., Madhogaria, S., Koch, W., Cremers, D., Hirt, H., ... Schikora, A. (2012). An image classification approach to analyze the suppression of plant immunity by the human pathogen Salmonella Typhimurium. *BMC Bioinformatics*, *13*, 171. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-171>
- Schilling, K. E., Zhang, Y.-K., Hill, D. R., Jones, C. S., & Wolter, C. F. (2009). Temporal variations of Escherichia coli concentrations in a large Midwestern river. *Journal of Hydrology*, *365*(1–2), 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2008.11.029>
- Schubert, S., & Wieser, A. (2013). Molekulare Methoden in der mikrobiologischen Diagnostik. *BioSpektrum*, *19*(7), 743–747. <https://doi.org/10.1007/s12268-013-0386-x>
- Schwartzbrod, L., Lucena, F., & Finance, C. (1979). Etude quantitative de la population virale dans l’affluent et l’effluent d’une station d’épuration d’eaux résiduaires. *Journal Français D’hydrologie*, *10*(1), 7–19.
- Sela Saldinger, S., & Manulis-Sasson, S. (2015). What else can we do to mitigate contamination of fresh produce by foodborne pathogens? *Microbial Biotechnology*, *8*(1), 29–31. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12231>
- Selma, M. V., Luna, M. C., Martinez-Sanchez, A., Tudela, J. A., Beltran, D., Baixauli, C., & Gil, M. I. (2012). Sensory quality, bioactive constituents and microbiological quality of green and red fresh-cut lettuces (*Lactuca sativa* L.) are influenced by soil and soilless agricultural production systems. *Postharvest Biology and Technology*, *63*(1), 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.08.002>
- Sharma, M., Ingram, D. T., Patel, J. R., Millner, P. D., Wang, X., Hull, A. E., & Donnenberg, M. S. (2009). A novel approach to investigate the uptake and internalization of Escherichia coli O157:H7 in spinach cultivated in soil and hydroponic medium. *Journal of Food Protection*, *72*(7), 1513–1520. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.7.1513>
- Signoretto C., Lleo M., Tafi M.C., C. P. (2000). Cell wall chemicals composition of Enterococcus faecalis in the viable but noncuturable state. *Appl. Environ. Microbiol*, *66*(66), 1953–1959. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.1953-1959.2000>
- Silva, C., Calva, E., & Maloy, S. (2014). One Health and Food-Borne Disease: Salmonella Transmission between Humans, Animals, and Plants. *Microbiology Spectrum*, *2*(1), OH-0020-2013. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.OH-0020-2013>
- Simonne, A., Brecht, J., Sargent, S., Ritenour, M., & Schneider, K. R. (2008). Good Worker Health and Hygiene Practices : Training Manual for Produce Handlers 1, 1–11.
- Simpkins, S. A., Chan, A. B., Hays, J., Popping, B., & Cook, N. (2000). Erratum: An RNA transcription-based amplification technique (NASBA) for the detection of viable Salmonella enterica (Letters in Applied Microbiology (2000) 30 (75-79)). *Letters in Applied Microbiology*, *31*(2), 186. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00794.x>
- Sirsat, S., & Neal, J. (2013). Microbial Profile of Soil-Free versus In-Soil Grown Lettuce and Intervention Methodologies to Combat Pathogen Surrogates and Spoilage Microorganisms on Lettuce. *Foods*, *2*(4), 488–498. <https://doi.org/10.3390/foods2040488>

- Sivapalasingam, S., Friedman, C. R., Cohen, L., & Tauxe, R. V. (2004). Fresh Produce: A Growing Cause of Outbreaks of Foodborne Illness in the United States, 1973 through 1997. *Journal of Food Protection*, 67(10), 2342–2353. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.10.2342>
- Slade, J. S. (1982). Virus removal by a modern sewage treatment works. *Viruses and Disinfection of Mater and Wastewater*, 190-197, M. Butler, AR.
- Smalla, K., Jechalke, S., & Top, E. M. (2015). Plasmid detection, characterization and ecology. *Cancer*, 121(8), 1265–1272. <https://doi.org/10.1002/cncr.29075>.Familial
- Soderstrom, A., Osterberg, P., Lindqvist, A., Johsson, B., Lindberg, A., Ulander, S. B., ... Andersson, Y. (2008). A Large Escherichia coli O157 Outbreak in Sweden Associated with Locally Produced Lettuce. *Foodborne Pathogens And Disease*, 5(3), 339–349.
- Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Alley, R., Berntsen, T., & Bindoff, N. (2007). Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (pp. 19–91). Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press.
- Stafford, R. J., McCall, B. J., Neill, A. S., Leon, D. S., Dorricott, G. J., Towner, C. D., & Micalizzi, G. R. (2002). A statewide outbreak of Salmonella bovisorbificans phage type 32 infection in Queensland. *Communicable Diseases Intelligence*, 26(4), 568–573.
- Stals, A., Jacxsens, L., Baert, L., Van Coillie, E., & Uyttendaele, M. (2015). A quantitative exposure model simulating human norovirus transmission during preparation of deli sandwiches. *International Journal of Food Microbiology*, 196, 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.004>
- Stecher, B., Denzler, R., Maier, L., Bernet, F., Sanders, M. J., Pickard, D. J., ... Hardt, W.-D. (2012). Gut inflammation can boost horizontal gene transfer between pathogenic and commensal Enterobacteriaceae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(4), 1269–74. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113246109>
- Stine, S. W., Song, I., Choi, C. Y., & Gerba, C. P. (2005a). Application of Microbial Risk Assessment to the Development of Standards for Enteric Pathogens in Water Used to Irrigate Fresh Produce. *Journal of Food Protection*, 68(5), 913–918.
- Stine, S. W., Song, I., Choi, C. Y., & Gerba, C. P. (2005b). Effect of Relative Humidity on Preharvest Survival of Bacterial and Viral Pathogens on the Surface of Cantaloupe, Lettuce, and Bell Peppers. *Journal of Food Protection*, 68(7), 1352–1358.
- Stine, S. W., Song, I., Choi, C. Y., & Gerba, C. P. (2011). Application of Pesticide Sprays to Fresh Produce: A Risk Assessment for Hepatitis A and Salmonella. *Food and Environmental Virology*, 3(2), 86–91.
- Suslow, T. V., Oria, M. P., Beuchat, L. R., Garrett, E. H., Parish, M. E., Harris, L. J., ... Busta, F. F. (2003). Production Practices as risk factors in microbial safety of fresh and fresh-cut produce, 2. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00030.x>
- Takeuchi, K., & Frank, J. F. (2001). Quantitative determination of the role of lettuce leaf structures in protecting Escherichia coli O157:H7 from chlorine disinfection. *Journal of Food Protection*, 64(2), 147–151.
- Tan, M. S. F., Rahman, S., & Dykes, G. A. (2016). Pectin and xyloglucan influence the attachment of Salmonella enterica and Listeria monocytogenes to bacterial cellulose-derived plant cell wall

- models. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(2), 680–688.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02609-15>
- Tani, N., Shimamoto, K., Ichimura, K., Nishii, Y., Tomita, S., & Oda, Y. (1992). Enteric virus levels in river water. *Water Research*, 26(1), 45–48.
- Teplitski, M., Warriner, K., Bartz, J., & Schneider, K. R. (2011). Untangling metabolic and communication networks: Interactions of enterics with phytobacteria and their implications in produce safety. *Trends in Microbiology*, 19(3), 121–127.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.11.007>
- Tirado, M. C., Clarke, R., Jaykus, L. A., McQuatters-Gollop, A., & Frank, J. M. (2010). Climate change and food safety: A review. *Food Research International*, 43(7), 1745–1765.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.07.003>
- Tomás-Callejas, A., López-Velasco, G., Camacho, A. B., Artés, F., Artés-Hernández, F., & Suslow, T. V. (2011). Survival and distribution of *Escherichia coli* on diverse fresh-cut baby leafy greens under preharvest through postharvest conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 151(2), 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.027>
- Turner, T. R., James, E. K., & Poole, P. S. (2013). The plant microbiome, 1–10. <https://doi.org/10.1186>
- U. S. Food and Drug Administration. (2010). *Secondary Direct Food Additives Permitted in Food for Human Consumption. 21 CFR. Sec. 173. 300 Chlorine Dioxide*. Silver Spring.
- Uyttendaele, M., Jaykus, L. A., Amoah, P., Chiodini, A., Cunliffe, D., Jacxsens, L., ... Rao Jasti, P. (2015). Microbial Hazards in Irrigation Water: Standards, Norms, and Testing to Manage Use of Water in Fresh Produce Primary Production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(4), 336–356. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12133>
- Van der Linden, I., Cottyn, B., Uyttendaele, M., Vlaemynck, G., Maes, M., & Heyndrickx, M. (2013). Long-term survival of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* on butterhead lettuce seeds, and their subsequent survival and growth on the seedlings. *International Journal of Food Microbiology*, 161(3), 214–219. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.015>
- Van Overbeek, L. S., Van Doorn, J., Wichers, J. H., Van Amerongen, A., Van Roermund, H. J. W., & Willemsen, P. T. J. (2014). The arable ecosystem as battleground for emergence of new human pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 5(MAR), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00104>
- Verhaelen, K., Bouwknecht, M., Lodder-Verschoor, F., Rutjes, S. A., & de Roda Husman, A. M. (2012). Persistence of human norovirus GII.4 and GI.4, murine norovirus, and human adenovirus on soft berries as compared with PBS at commonly applied storage conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 160(2), 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.008>
- Verhaelen, K., Bouwknecht, M., Rutjes, S. A., & de Roda Husman, A. M. (2013). Persistence of human norovirus in reconstituted pesticides — Pesticide application as a possible source of viruses in fresh produce chains. *International Journal of Food Microbiology*, 160(3), 323–328.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.007>
- Vieira-Pinto, M., Morais, L., Caleja, C., Themudo, P., Torres, C., Igrejas, G., ... Martins, C. (2011). *Salmonella* sp. in game (*Sus scrofa* and *Oryctolagus cuniculus*). *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(6), 739–740. <https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0742>
- Vogeleer, P., Tremblay, Y. D. N., Mafu, A. A., Jacques, M., & Harel, J. (2014). Life on the outside: Role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Frontiers in*

- Microbiology*, 5(JULY), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00317>
- Vorholt, J. A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nat Rev Micro*, 10(12), 828–840. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2910>
- Wade, W. N., & Beuchat, L. R. (2003). Proteolytic fungi isolated from decayed and damaged raw tomatoes and implications associated with changes in pericarp pH favorable for survival and growth of foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 66(6), 911–917. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12800988
- Walter, R. (Hrsg. . (2000). *Umweltvirologie. Viren in Wasser und Boden*. Wien: Springer-Verlag.
- Walters, M., & Sperandio, V. (2006). Quorum sensing in Escherichia coli and Salmonella. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(2–3), 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.01.041>
- Wang, Q., Hirneisen, K. A., Markland, S. M., & Kniel, K. E. (2013). Survival of murine norovirus, tulane virus, and hepatitis a virus on alfalfa seeds and sprouts during storage and germination. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(22), 7021–7027. <https://doi.org/10.1128/AEM.01704-13>
- Wei, J., Jin, Y., Sims, T., & Kniel, K. E. (2010). Manure- and biosolids-resident murine norovirus 1 attachment to and internalization by romaine lettuce. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(2), 578–583. <https://doi.org/10.1128/AEM.02088-09>
- Weinert, N., Piceno, Y., Ding, G. C., Meincke, R., Heuer, H., Berg, G., ... Smalla, K. (2011). PhyloChip hybridization uncovered an enormous bacterial diversity in the rhizosphere of different potato cultivars: Many common and few cultivar-dependent taxa. *FEMS Microbiology Ecology*, 75(3), 497–506. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01025.x>
- Whipps, J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52(Spec Issue), 487–511.
- WHO. (2007). *Working Principles for Risk Analysis for Food Safety for Application by Governments*.
- WHO / FAO. (2008). *Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs*.
- Williams, T. R., Moyne, A., Harris, L. J., & Marco, M. L. (2013). Season, Irrigation, Leaf Age, and Escherichia coli Inoculation Influence the Bacterial Diversity in the Lettuce Phyllosphere, 8(7), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068642>
- Yadav, R. K. P., Karamanoli, K., & Vokou, D. (2005). Bacterial colonization of the phyllosphere of mediterranean perennial species as influenced by leaf structural and chemical features. *Microbial Ecology*, 50(2), 185–196. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0171-y>
- Yang, S., Lin, S., Kelen, G. D., Quinn, T. C., Dick, J. D., Gaydos, C. A., & Rothman, R. E. (2002). Quantitative multiprobe PCR assay for simultaneous detection and identification to species level of bacterial pathogens. *J Clin Microbiol*, 40(9), 3449–3454. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.9.3449>
- Yang, Y., Luo, Y., Millner, P., Turner, E., & Feng, H. (2012). Assessment of Escherichia coli O157:H7 transference from soil to iceberg lettuce via a contaminated field coring harvesting knife. *International Journal of Food Microbiology*, 153(3), 345–350. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.024>

- Ye, Y., Wang, B., Huang, F., Song, Y., Yan, H., Alam, M. J., ... Shi, L. (2011). Application of in situ loop-mediated isothermal amplification method for detection of Salmonella in foods. *Food Control*, 22(3–4), 438–444. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.09.023>
- Yeni, F., Acar, S., Polat, Ö. G., Soyer, Y., & Alpas, H. (2014). Rapid and standardized methods for detection of foodborne pathogens and mycotoxins on fresh produce. *Food Control*, 40(1), 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.12.020>
- Yeni, F., Alpas, H., & Soyer, Y. (2016). Most Common Foodborne Pathogens and Mycotoxins on Fresh Produce : A Review of Recent Outbreaks. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 8398(April 2017). <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.777021>
- Zhang, G. (2013). Foodborne Pathogenic Bacteria Detection: An Evaluation of Current and Developing Methods. *McMaster University's Undergraduate Health Sciences Journal*, 1(24), 27–30. Retrieved from <https://journals.mcmaster.ca/meducator/article/view/835>
- Zhang, S., Ye, C., Lin, H., Lv, L., & Yu, X. (2015). UV Disinfection Induces a Vbnc State in Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. *Environmental Science & Technology*, 49(3), 1721–1728. <https://doi.org/10.1021/es505211e>
- Zhao, X., Lin, C. W., Wang, J., & Oh, D. H. (2014). Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(3), 297–312. <https://doi.org/10.4014/jmb.1310.10013> [pii]
- Zottola, T., Montagnaro, S., Magnapera, C., Sasso, S., De Martino, L., Bragagnolo, A., ... Pagnini, U. (2013). Prevalence and antimicrobial susceptibility of Salmonella in European wild boar (*Sus scrofa*); Latium Region - Italy. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 36(2), 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2012.11.004>