BÖLN

Bundesprogramm Ökologischer Landbau
und andere Formen nachhaltiger
Landwirtschaft

SafeSalad - Qualität und Sicherheit in der Produktionskette biologisch produzierter Fertigsalate

SafeLettuce - Quality and safety in the production chain of organically produced ready-to-eat lettuce

FKZ: 11OE097

Projektnehmer:
Leibniz Universität Hannover
Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme
Herrenhäuser Straße 2, 30419 Hannover
Tel.: +49 511 7622634
Fax: +49 511 7623606
E-Mail: office@gem.uni-hannover.de
Internet: www.gem.uni-hannover.de

Autoren:
Stützel, Hartmut; Alsanius, Beatrix; Fricke, Andreas; Lindemann-Zutz, Karsten; Hartmann, Rahel

FKZ: 11OE121

Projektnehmer:
Universität Hohenheim
Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie
Garbenstraße 25, 70693 Stuttgart
Tel.: +49 711 459-22314
Fax: +49 711 459-24110
E-Mail: reinhold.carle@uni-hohenheim.de
Internet: www.uni-hohenheim.de

Autoren:
Carle; Reinhold; Kübler, Sabine; Hägele Florian

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft.

Dieses Dokument steht unter www.orgprints.org/32164/ zum Herunterladen zur Verfügung.

Schlussbericht

SafeSalad- Qualität und Sicherheit in der Produktionskette biologisch produzierter Fertigsalate

Zuwendungsempfänger I:	**Förderkennzeichen:**
Leibniz Universität Hannover Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme Fachgebiet Systemmodellierung Gemüsebau Herrenhäuser Str. 2 30419 Hannover	2811OE097
Zuwendungsempfänger II:	**Förderkennzeichen:**
Universität Hohenheim Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie Lehrstuhl Lebensmittel pflanzlicher Herkunft Garbenstr. 25 70599 Stuttgart	2811OE121

Vorhabensbezeichnung:

Qualität und Sicherheit in der Produktionskette biologisch produzierter Fertigsalate

Laufzeit des Vorhabens:

15.03.2012 – 30.09.2015

Beteiligte Kooperationspartner:

Prof. Dr. Beatrix Waechter Alsanius
Swedish University of Agricultural Sciences, Dept of Biosystems and Technology, Microbial Horticulture Lab, PO Box 103, SE-230 53 Alnarp, Sweden.
Email: beatrix.alsanius@slu.se

Inhaltsverzeichnis

1. Allgemeine Einführung 1
1.1 Gegenstand des Vorhabens 1
1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Gesamtprojektes 1

Teil I Leibniz Universität Hannover (2811O097)

I. 1. Einführung 3
1.1 Gegenstand des Vorhabens 3
1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projektes 3
1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens 4

I. 2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde 5

I. 3. Material und Methoden 6
3.1 Feldversuche 6
3.2 Bereitstellung von Pflanzenmaterial für die Verarbeitung von Eissalat und Eichblattsalat 9
3.3 Statistische Auswertung und Modellerstellung 9
3.4 Mikrobielle Analysen Feldversuch 11
3.5 Internalisierung von E. coli O157:H7 in Rucola und Mangoldblättern 18

I. 4. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse 19
4.1 Pflanzenwachstum Feldversuche 19
4.1.1 Mangold 19
4.1.2 Eichblattsalat 22
4.1.3 Wilde Rauke 24
4.1.4 Eissalat 27
4.2 Mikrobielle Analysen Feldversuche 50
4.3 Modellierung der Befallsdynamik *E. coli* 66
4.4 Korrelationsanalysen Wetterdaten und *E. coli* 67
4.5 Epiphytische Kolonisierung von Rucola- und Mangoldblättern durch *E. coli* O157:H7 unter Gewächshausbedingungen 68
4.6 Mikrobielle Kolonisierung von Rucola- und Mangoldblättern 72
4.7 Internalisierung von *E. coli* O157:H7 in Mangold- und Rucolablätter 76
I. 5. Diskussion der Ergebnisse 78

I. 6. Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse 83

I. 7. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen 84

I. 8. Kurzfassung 85

I. 9. Summary 87

I. 10. Literaturverzeichnis 90

I. 11. Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt, bisherige und geplante Aktivitäten zur Verbreitung der Ergebnisse 94

Teil II Universität Hohenheim (2811OE121) 96

II 1. Kurzdarstellung 96

1.1 Aufgabenstellung 96

1.2 Voraussetzung, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde 96

1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens 97

1.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde 98

1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen 101

II. 2. Eingehende Darstellung 102

2.1 Verwendung der Zuwendung und Darstellung der erzielten Ergebnisse im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele 102

2.1.1 Verwendung der Zuwendung 102

2.1.2 Darstellung der erzielten Ergebnisse 103

2.2 Wichtigsten Positionen des Zahlenmäßigen Nachweises 138

2.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit 138

2.4 Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans 138

2.5 Während der Durchführung des Vorhabens dem Zahlungsempfänger bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen 139

2.6 Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses 139

II. 3. Kurzfassung 142

II. 4. Summary 144

II. 5. Literatur 146

2. Gesamtzusammenfassung 150

3. Comprehensive summary **153**

4. Anhang **155**

4.1 Erfolgskontrollbericht Projektteil Leibniz Universität Hannover 155

4.2 Erfolgskontrollbericht Projektteil Universität Hohenheim 157

1. Allgemeine Einführung

1.1 Gegenstand des Vorhabens

In Freiland- und Gewächshausversuchen sollte geprüft werden, ob es in der biologischen Produktion von Salaten als Rohware für die Herstellung von Fertigsalaten zu einer mikrobiellen Kontamination kommen kann, und ob durch spezielle Kulturmaßnahmen Kontaminationen unterbunden bzw. zumindest reduziert werden können. Zusätzlich sollte geprüft werden, wie sich mikrobielle Kontaminationen in der Verarbeitung der Rohware zum Fertigsalat verhalten, ob durch bestimmte Verarbeitungsmaßnahmen eine Kontamination reduziert werden kann und wie sich die Keimzahlen während der Lagerung verändern.

1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projekts

Ein zentraler Anlass für die Antragstellung war die im Jahr 2011 ausgebrochene EHEC-Epidemie und die in den Diskussionen gewonnene Erkenntnis, dass es keine ausreichenden Informationen über die Gefahrenquellen und die Wege einer möglichen Infektion im Produktionsprozess gibt. Insbesondere in der biologischen Produktion von frisch verzehrtem Gemüse (z.B. Blattsalate und Fertigsalate), könnte durch den Einsatz organischer Dünger ein besonderes Gefahrenpotenzial bestehen. Eine verbesserte Kenntnis der Risiken einer mikrobiellen Kontamination und vor allem die Entwicklung von sicheren Strategien zur Vermeidung derartiger Gesundheitsrisiken sind dringend notwendig.

Dazu ist es erforderlich die gesamte Wertschöpfungskette der Fertigsalate von der Feldproduktion bis zum Verbraucher zu untersuchen, da Kontaminationen an vielen Punkten in der Produktionskette auftreten können, und sich die Keimzahlen auf den Produkten im Zeitverlauf verändern. In dem Vorhaben sollten die Zusammenhänge zwischen biologischen, produktionstechnischen und ökologischen Variablen einerseits und mikrobieller Kontamination des Produkts andererseits analysiert, sowie Risikominderungsstrategien entwickelt werden. Im Abschnitt Feldproduktion sollten insbesondere folgende Aspekte untersucht werden:

(i) die Internalisierung von *Escherichia coli* O157:H7 (E. coli, EC) durch Übertragung über Beregnungswasser und/oder organische Düngemittel

(ii) der Einfluss von Pflanzenart und Sorte auf Kontamination und Internalisierung human-pathogener Bakterien (Gewebekonsistenz)

(iii) der Einfluss nichtpathogener mikrobieller Organismen in der Phyllosphäre auf die Etablierung pathogener Organismen

(iv) Modellierung und Prognose der Befallsdynamik von *E. coli* während der Produktion in Abhängigkeit von Sorte und Umweltfaktoren.

Im Abschnitt Verarbeitung in der Produktionskette sollen innovative Verarbeitungstechnologien zur Verbesserung der Hygiene und Haltbarkeit untersucht werden:

(v) Hochdruckwasserstrahlschneiden zur Verhinderung von Kreuzkontaminationen und zur Verminderung von bakteriellem Wachstum

(vi) innovative Wasch- und Entkeimungsverfahren sowie biologische Waschwasserzusätze

(vii) Verpackungsfolien mit definierter Gasdurchlässigkeit zur Verlängerung der Haltbarkeit

(viii) Verringerung des Wasserverbrauchs und Keimreduktion in der Verarbeitung durch Wiederverwendung des Waschwassers nach Desinfektion mit UV-C.

Ziele des Projektes waren die Evaluation und die Modellierung der Gesundheitsrisiken in der biologischen Produktion von Fertigsalaten mit Hilfe von Modellierungsverfahren und Experimenten sowie die Entwicklung von Strategien hin zu einer Risikominimierung durch die Nutzung effektiver Technologien in der Feldproduktion, der Verarbeitung und der Verpackung.

Das entstehende Modell sollte die feed-forward und feed-back Effekte der verschiedenen Maßnahmen in der Produktionskette enthalten und sollte allen Beteiligten in der Produktionskette helfen, die richtigen Entscheidungen hinsichtlich einer optimierten und sicheren Produktion eines hochwertigen Produktes zu treffen.

Der Antrag wurde als Initiativantrag unabhängig von einer Ausschreibung gestellt und entspricht in seiner Ausrichtung dem Ziel des BÖLN, Wissens- und Erfahrungslücken im ökologischen Anbau zu schließen. Insbesondere der Einbeziehung der Produktverarbeitung als ein Teilziel des Programmes wird hier Beachtung geschenkt. Das Projekt wurde an die zwei Zuwendungsempfänger Leibniz Universität Hannover (LUH) und Universität Hohenheim (UHOH) vergeben. Jeder Zuwendungsempfänger bekam ein eigenes Förderkennzeichen. Daher wird der Schlussbericht im Folgenden in die Hauptabschnitte I (LUH) und II (UHOH) geteilt.

Teil I Leibniz Universität Hannover (2811OE097)

I. 1. Einführung

1.1 Gegenstand des Projektes

In Freiland- und Gewächshausversuchen sollte geprüft werden, ob und in welchem Produktionsschritt eine bakterielle Kontamination in der Produktionskette der Rohware zur Herstellung biologisch produzierter Fertigsalate auftreten kann. Zusätzlich sollte geprüft werden, ob spezielle Kulturmaßnahmen eine Kontamination reduzieren bzw. verhindern können und ob Bakterien in die Pflanze eindringen können.

1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projektes

Die ökologische Produktion von Gemüse birgt durch den Einsatz organischer Materialien aus der Tierproduktion theoretisch das Gefahrenpotenzial einer bakteriellen Kontamination des Produktes. Ob dieses Risiko wirklich besteht und wie hoch dieses Risiko ist, sollte in einer Versuchsserie in einem biologisch produzierenden Praxisbetrieb in praxisüblichen Produktionsketten geprüft werden. Beachtet werden muss, dass die Ergebnisse aus diesen Fallstudien nur sehr vorsichtig verallgemeinert werden sollten. Dies ist den vielfältigen Wechselbeziehungen und Einflussfaktoren auf die Dynamik einer mikrobiellen Kontamination geschuldet.

Da im Freiland keine künstlichen Kontaminationen mit Bakterien gesetzt werden konnten, wurden zusätzlich Kontaminationsversuche in speziell zugelassenen Gewächshäusern durchgeführt. Um die Gefahr einer möglichen Internalisierung von Bakterien in das Pflanzengewebe zu prüfen, wurde hier das Überleben von *E. coli* O157:H7 auf unterschiedlich gedüngten Blattsalaten geprüft. Eine Internalisierung hätte für die Nutzung von Frischware deutlich stärkere Konsequenzen als eine alleinige externe Anhaftung.

In diesem Teil des Gesamtprojektes sollten folgende Aspekte untersucht werden:
(i) die Internalisierung von *Escherichia coli* O157:H7 (*E. coli*, EC) durch Übertragung über Beregnungswasser und/oder organische Düngemittel
(ii) der Einfluss von Pflanzenart und Sorte auf Kontamination und Internalisierung human-pathogener Bakterien (Gewebekonsistenz)
(iii) der Einfluss nichtpathogener mikrobieller Organismen in der Phyllosphäre auf die Etablierung pathogener Organismen

(iv) Modellierung und Prognose der Befallsdynamik von *E. coli* während der Produktion in Abhängigkeit von Sorte und Umweltfaktoren.

Das Projekt sollte dem zentralen Ziel des BÖLN dienen, Forschungsergebnisse zur Schließung von Wissenslücken über spezielle Themenbereiche der ökologischen Produktion zu schließen und damit zur Förderung einer nachhaltigen Landwirtschaft beizutragen. Insbesondere die Betrachtung über die gesamte Wertschöpfungskette einschließlich der Verarbeitung (durch den Projektpartner der Universität Hohenheim, Teil II) ist ein wesentliches Teilziel des Bundesprogramms.

1.3 Planung und Ablauf des Projektes

Die Feldversuche erfolgten auf Flächen eines Bioland Gemüsebaubetriebes in der Region Hannover. Um Folgewirkungen der einzelnen Versuchsvarianten zu vermeiden, wurden dazu für jeden Anbausatz andere Teilflächen ausgesucht. Als Wasserquellen dienten ein Tiefbrunnen mit Trinkwasserqualität, ein Brunnen mit Oberflächenwasseranschluss sowie zwei in unmittelbarer Nähe befindliche Teiche. Die Jungpflanzen wurden nach Anweisung durch den Gemüsebaubetrieb angezogen. Die Zusammenarbeit mit dem Betrieb (Feldvorbereitung, Jungpflanzenanzucht, Hilfe bei der Bereitstellung des Teichwassers) klappte reibungslos. Der Hühnertrockenkot wurde jeweils kurz vor Versuchsbeginn von einem Naturlandbetrieb bei Hameln beschafft und eingearbeitet.

Bei den Zeitauswertungen wurden das Pflanzenmaterial zu Beginn der Sätze und geringem Probenumfang mit einem Expressdienst zum Projektpartner nach Schweden geschickt. Bei größeren Pflanzen wurden die Proben direkt durch die jeweiligen Mitarbeiterinnen aus Schweden genommen und in das eigene Labor transportiert. Proben für den Projektpartner in Hohenheim zur Verarbeitung wurden dreimal per Expresskurier nach Stuttgart versandt. Dies erforderte insgesamt eine gut abgestimmte Planung und Logistik.

In Schweden wurden die Proben aus den Feldversuchen entsprechend aufbereitet und der mikrobielle Besatz quantifiziert. Zusätzlich wurden in Schweden in speziell eingerichteten Gewächshauskabinen gezielt Kontaminationsversuche mit einem apathogen *E. coli* O157:H7-Stamm durchgeführt, der keine Shigatoxine produziert, aber den Adhäsionsfaktor *eae* exprimiert. Hierbei ging es speziell um die Fragestellung einer möglichen Internalisierung.

Das Gesamtkonsortium hatte ein gemeinsames Treffen in Hohenheim, zwei Treffen der beiden Gruppen LUH/SLU. Darüber hinaus gab es Treffen anlässlich des Besuches von Tagungen und

Promotionsprüfungen auf denen Informationen persönlich ausgetauscht wurden. Zusätzlich wurden zwischen der LUH und der SLU mehrere Videokonferenzen über das Deutsche Forschungsnetz (dfn) durchgeführt.

Insgesamt klappte die Zusammenarbeit zwischen den einzelnen Arbeitsgruppen sehr gut. Leider gab es im Bereich der Laborarbeit in Schweden und in der Bearbeitung der Feldversuche in Hannover je einen personellen Wechsel in der Projektbearbeitung. Die Projektpartner versuchten diese Situation durch eigenen Personaleinsatz zu kompensieren, da die Versuche/Analysen zu den entsprechenden Zeitpunkten liefen. Allerdings führte diese Situation zu Verzögerungen in der Datenauswertung.

I. 2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Gerade in komplexen Produktionsketten ist die schnelle Verderblichkeit frischer Gemüseprodukte besonders kritisch. Fertigsalate aus biologischer Produktion erfreuen sich zunehmender Beliebtheit, erfordern aber technisch ausgereifte Produktionsketten. Die Herstellung von Fertigsalaten ist schon bei konventioneller Produktion eine große Herausforderung, in der biologischen Produktion kommen jedoch zwei weitere Probleme hinzu: Die alleinige Stickstoffversorgung der Pflanzen über organische Düngemittel erhöht das Risiko einer Kontamination mit Humanpathogenen während der Produktion durch die Nutzung von Tierschlachtabfällen wie Blutmehl und tierischen Exkrementen wie Guano, Stallmist oder Gülle (Arthurson et al. 2011, CFSAN 1998). Andererseits sind die Möglichkeiten der Entfernung etwaiger Kontaminationen während der Verarbeitung begrenzt. Die Nutzung von chloriertem Waschwasser in der Produktion von biologischen Fertigsalaten ist verboten. Dies zeigt die Bedeutung einer Vermeidungsstrategie in der Vorerntephase (Erickson 2010).

Die Produktionskette von Fertigsalaten enthält eine Reihe von feed-forward und feed-back Prozessen. Dadurch bestehen z.Zt. in unzureichendem Maße quantitative Kenntnisse hinsichtlich dieser komplexen Wechselbeziehungen. Wichtige Aufgaben sind daher die Analyse des Kontaminationspotenzials, der Möglichkeiten der Kontaminationsvermeidung und -reduzierung, sowie der Beseitigung von mikrobiellen Gefahrenquellen auf den einzelnen Stufen der Produktionskette. Dazu muss der Einfluss der Produktionstechnologie hinsichtlich einer Verringerung des Potenzials einer mikrobiellen Kontamination sowie u.a. der Turgeszenz und der Gewebestabilität geprüft werden.

In Deutschland ist es im Jahre 2011 zu einem Ausbruch einer *E.coli*-Epidemie gekommen, die höchstwahrscheinlich durch infiziertes Saatgut aus Ägypten verursacht wurde. Insgesamt gab es 3842 klinisch bestätigte EHEC/HUS Krankheitsfälle in Deutschland, 53 Personen starben (RKI 2011). Ähnliche Probleme, wenn auch mit geringerer Tragweite, werden im Zusammenhang mit Fertigsalaten aus England berichtet (Little & Gillespie 2008). Erst im Juli/August 2015 kam es erneut zu einem Ausbruch in England, was die Aktualität des Problems dokumentiert (http://www.foodsafetynews.com/2015/09/38-sickened-in-uk-e-coli-outbreak-linked-to-prepackaged-salad/#.Vhy1Vm7D-_F).

Neben den organischen Düngern wurden Beregnungswasser und Waschwasser in der Verarbeitung als potenzielle Quellen der Pathogenverbreitung identifiziert (Steele et al. 2005). Obwohl die Qualität des Beregnungswassers von grundsätzlicher Bedeutung ist, kann sein Einfluss auf die Kontamination durch die Applikationstechnik verringert werden. Unterflur-Tropfbewässerung z.B. ergab eine verringerte mikrobielle Kontamination als Furchenbewässerung (Song et al. 2006). *Salmonella spp.* und *Escherichia coli* O157:H7 sind die häufigsten Ursachen für Lebensmittelvergiftungen bei Obst und Gemüse, aber auch *Listeria monocytogenes* wurde bereits häufig als Ursache für Listeriose-Ausbrüche auf Blattsalaten nachgewiesen (Taben & Halkman, 2011; Carrasco et al., 2010). *Listeria monocytogenes* sind primär Erdkeime und als Humanpathogene in der Verarbeitungskette frischer Gemüseprodukte besonders aufgrund ihrer Fähigkeit, Biofilme zu bilden sowie aufgrund ihres psychrotrophen Wachstums schon ab 0 °C gefürchtet (Krämer, 2007). An der Pflanze können vier Bereiche für eine mikrobielle Ansiedlung genannt werden: Die Wurzelzone (10^{10} Kolonien bildende Einheiten pro Gramm (KbE g^{-1})), die Blattoberfläche (105-1010 KbE g^{-1}), die Fruchtoberfläche (107 KbE g^{-1}) und das Pflanzeninnengewebe (105 KbE g^{-1}). Viele Humanpathogene können trotz Anwesenheit anderer Mikroflora auf Pflanzenoberflächen überleben und sogar in das Pflanzengewebe internalisiert werden (Danhorn & Fuqua 2007, Berg et al. 2005, Brandl 2006). Gerade die Internalisierung ist bei Anbauern und Produzenten größtenteils immer noch nicht bekannt.

I. 3. Material und Methoden

3.1 Feldversuche

Die Untersuchungen in der Feldproduktionsphase erfolgten durch das Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme, Abteilung Systemmodellierung Gemüsebau der Leibniz Universität Hannover. Es wurden Feldversuche in 2012, 2013 und in 2014 durchgeführt, in denen die Einflüsse der Produktionstechnologie auf Wachstum und mikrobielle Qualitätsparameter von Blattsalaten un-

tersucht wurden (Tab. 1). Die Versuche erfolgten im Bioland Gemüsebaubetrieb Rothenfeld in Neuwarmbüchen bei Hannover.

Die Düngung der einzelnen Parzellen erfolgte entsprechend der N_{min} – Methode (Ziel: 150 kg N/ha) nach vorheriger Bodenprobe und Analyse des vorhandenen mineralischen Stickstoffes (0-30 cm). Dabei wurde von folgenden Stickstoffgehalten der Dünger ausgegangen:

→ Haarmehlpellets: 14 % N → Hühnertrockenkot: 30 kg N/t FM

Die N-Gehaltsangabe der Haarmehlpellets basierte auf Herstellerangaben und die N-Gehaltangabe des Hühnertrockenkots erfolgte auf Basis von Analysen des Lieferanten.

Vor Pflanzung erfolgte eine betriebsübliche Bodenbearbeitung, die Jungpflanzen wurden ebenfalls nach dem Standardvorgehen des Betriebes in mit Kultursubstrat befüllten Trays in einem nicht beheizten Foliengewächshaus angezogen.

Die Aussaat-, Pflanz- und Erntetermine sind in Tabelle 2 dargestellt.

Die Bewässerung während der Versuche erfolgte nach Bedarf. Nach Möglichkeit erfolgte eine Bewässerung jeweils drei Tage vor der Probennahme. Aufgrund von zu hoher Bodenfeuchte konnte dies an folgenden Terminen nicht durchgeführt werden: Erntetermine 1-3 Satz 1 2012, Erntetermin 2 Satz 2 2012, alle 2 Termine Satz 1 2013, Erntetermin 1 Satz 2 2013, Erntetermine 1 und 2 Satz 1 2014, Erntetermin 3 Satz 2 2014.

Die Parzellen wurden mechanisch (Hacken per Hand) unkrautfrei gehalten, es fand kein weiterer Pflanzenschutz statt. Im Detail wurden folgende Messungen durchgeführt:

In jedem Versuchsjahr wurden zwei Anbausätze mit je drei Wiederholungen kultiviert (Tab. 1). Pro Satz (2012 I+II, 2013 I, 2014 I) ergeben sich 108 Parzellen (3 Kulturen * 2 organische Dünger * 3 Wasserqualitäten * 2 Mulche * 3 Wiederholungen). Zusätzlich wurden 36 Parzellen (1 Kultur * 2 organische Dünger * 3 Wasserqualitäten * 2 Mulche * 3 Wiederholungen) für die Tropfbewässerung bei Eissalat angelegt. Der Aufbau entsprach einer Spaltanlage mit 3 Wiederholungen. Als Großteilstück wird die Bewässerung angelegt, da eine kleinräumige, parzellenweise Überkopfbewässerung nicht möglich war. Die weitere Unterteilung der Großteilstücke erfolgte in Düngerart, Bewässerungsart, Bodenbedeckung (split-split-split-Plot Design). Für den Satz 2013 I ergaben sich 144 Parzellen (2 Kulturen * 2 organische Dünger * 3 Wasserqualitäten * 2 Mulche * 2 Bewässerungsarten * 3 Wiederholungen). Für den Satz 2014 II ergaben sich 48 Parzellen (1 Kultur * 2 organische Dünger * 2 Wasserqualitäten * 2 Mulche * 2 Bewässerungsarten * 3 Wiederholungen). Im Kulturverlauf wurden alle 14 Tage 2 Einzelpflanzen aus jeder Parzelle entnommen und mikrobiologisch untersucht. Zudem erfolgte die Bestimmung des Frischgewichts der Gesamtpflanze und des Trockengewichtes nach Trocknung bis zur Gewichtskonstanz bei 105 °C anhand einer vollrandomisiert entnommen Teilprobe von 2 weiteren Pflanzen pro Parzelle. Aus den Messungen wurde der prozentuale Trockenmasseanteil errech-

net. Zur Endernte wurden in 2012 II und in den Sätzen 2013 weiterhin der Nitratgehalt, der Gehalt an strukturgebenden Kohlenhydraten der Zellwand für den Eissalat und den Eichblattsalat sowie der Flavonid- und Glucosinolatgehalt der Rauke und der Flavonidgehalt des Mangolds als Qualitätsparameter im Labor bestimmt.

Zu den jeweiligen Probennahmeterminen wurden neben der Analyse der Blätter ebenfalls Bodenproben der verschiedenen Varianten von Parzellen des Eissalates sowie der Inputfaktoren Dünger und Wasser mikrobiologisch untersucht.

Tab. 1: Versuchsfaktoren Feldversuche auf der Bioland-Gärtnerei Rothenfeld in den Anbaujahren 2012, 2013 und 2014

Faktor	Versuche 2012 (2 Sätze)	Versuch 2013 (Satz 1)	Versuch 2013 (Satz 2)	Versuch 2014 (Satz 1)	Versuch 2014 (Satz 2)
Kultur	-Eissalat -Mangold -Wilde Rauke (*Diplotaxis* spp.)	-Eissalat -Eichblattsalat	-Eissalat -Mangold -Wilde Rauke (*Diplotaxis* spp.)	-Eissalat -Mangold -Wilde Rauke (*Diplotaxis* spp.)	-Eissalat
Organischer Dünger	-Haarmehlpellets -Hühnertrockenkot	-Haarmehlpellets -Hühnertrockenkot	-Haarmehlpellets -Hühnertrockenkot	-Haarmehlpellets -Hühnertrockenkot	-Haarmehlpellets -Hühnetrockenkot
Wasserqualität	-Teichwasser -Teichwasser, dekontaminiert -Brunnenwasser	-Teichwasser -Brunnenwasser -Leitungswasser	-Teichwasser -Brunnenwasser -Leitungswasser	-Teichwasser -Brunnenwasser -Leitungswasser	-Teichwasser -Brunnenwasser
Mulch	-ohne Mulch -bioabbaubarer Mulch	-ohne Mulch -Mulchfolie	-ohne Mulch -Mulchfolie	-ohne Mulch -Mulchfolie	-ohne Mulch -Mulchfolie
Beregnung	-Überkopf-Beregnung (alle Kulturen) -zusätzl. bei Eissalat Tropfbewässerung	-Überkopf-Beregnung und Tropfbewässerung	-Überkopf-Beregnung (alle Kulturen) -zusätzl. bei Eissalat Tropfbewässerung	-Überkopf-Beregnung (alle Kulturen) -zusätzl. bei Eissalat Tropfbewässerung	-Überkopf-Beregnung und Tropfbewässerung

Tab. 2: Aussaat- und Erntetermine der angebauten Sätze 2012-2014

2012	Satz 1	Satz 2
Aussaat	11.06.	03.08.
Pflanzung	05.07.	23.08.
Probennahme	21.05. / 03.06.	08.07. / 22.07. / 05.08.

2013	Satz 1	Satz 2
Aussaat	20.03.	22.05.
Pflanzung	30.04.	26.06.
Probennahme	21.05. / 03.06.	08.07. / 22.07. / 05.08.

2014	Satz 1	Satz 2
Aussaat	08.04.	29.06.
Pflanzung	06.05.	30.07
Probennahme	20.05. / 02.06. / 16.06. / 30.06. (kein Rucola)	13.08. / 26.08. / 09.09. / 23.09.

3.2 Bereitstellung von Pflanzenmaterial für die Verarbeitung von Eis- und Eichblattsalat

Zusätzlich wurden für zwei Eissalatvarianten in 2012 die entsprechenden Parzellen um 50 m² erweitert. Bei diesen ausgewählten Varianten handelte es sich um eine ‚sichere' (Haarmehlpellets, dekontaminiertes Wasser, Mulchauflage und Tropfbewässerung) sowie um eine ‚risikoreiche' Variante (Hühnertrockenkot, Teichwasser, ohne Mulchauflage und Überkopf- Beregnung) zur Produktion von Rohware für die Universität Hohenheim. Ebenso erfolgte die Kultivierung des Eichblattsalates 2013 nach Absprache mit dem Projektpartner aus Hohenheim.

3.3 Statistische Auswertung und Modellerstellung

Die Erstellung der Graphiken und Tabellen wurde mit SigmaPlot 11.0, Excel und R durchgeführt.

Die Varianzanalysen (Split-plot Anova) und anschließenden Mittelwertsvergleiche wurden mit der Software R 3.1.2 durchgeführt.

Anhand von Boxplots wurde eine graphische Überprüfung auf Normalverteilung durchgeführt (Median etwa in der Mitte des Boxplots). Anschließend wurde über einen *F-Test* ($p \leq 0,05$) eine Überprüfung auf Varianzhomogenität durchgeführt. Bei einem p-Wert > *0,05* wurde von Varianzhomogenität ausgegangen (Hoff, 2005). Entsprechend der Ergebnisse der Varianzanalysen wurde bei Normalverteilung zum statistischen Vergleich ein t-test ($p \leq 0,05$) gewählt. Bei keiner Normalverteilung erfolgte der Vergleich über einen Wilcoxon U-test, ($p \leq 0,05$) (Bärlocher, 1999, Köhler et. al. 2002). Bei den multiplen Vergleichen wurde hier zunächst ein Levene-Test durchgeführt. Anhand der Ergebnisse (*p*-Wert des Levene Tests > 0,05) wurde von Varianzhomogenität ausgegangen (Hoff, 2005). Im Anschluss wurden die Messgrößen über einen pairwise t-test ($p \leq 0,05$) miteinander verglichen. Hierbei wurde für alle Daten eine Normalverteilung angenommen.

Die Modellerstellung erfolgte in ModelMaker 4.0. Eine erste Modellstruktur wurde anhand von Literaturstudien (Liu et al., 2013, Baranyi et al., 1995, Ratkowsky et al., 1982) ausgearbeitet (Abb. 1).

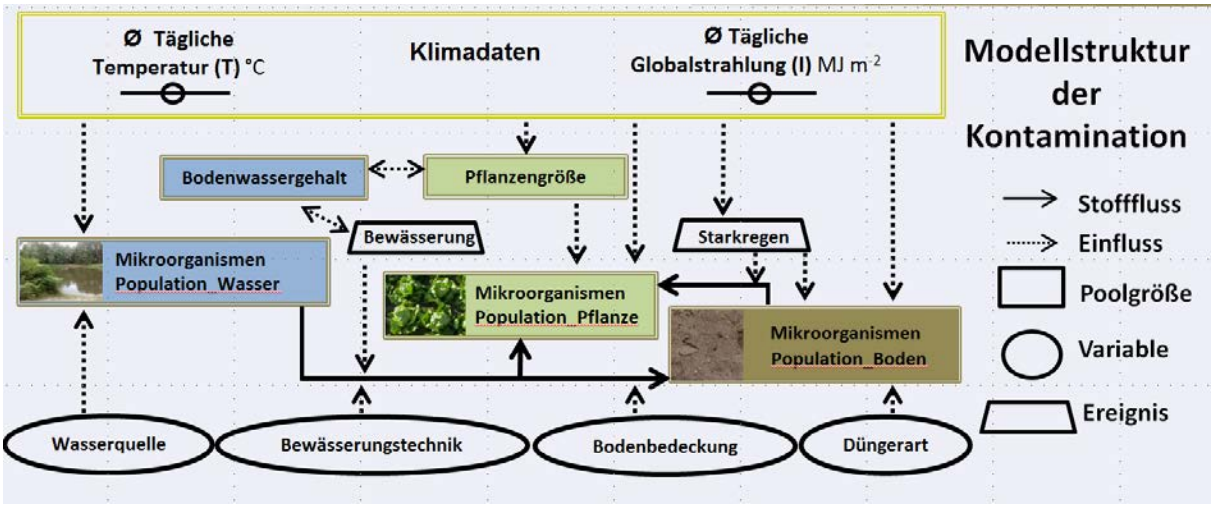


Abb. 1: Ausgearbeitete Modellstruktur zur Risikoabschätzung der Kontaminationsdynamik mit *E.coli*.

Das Modell setzt sich aus mehreren Submodellen zusammen. Einzelne Kompartimente des Systems bilden Poolgrößen für Boden, Wasser und Pflanze. Innerhalb dieser Poolgrößen findet sowohl Mikroorganismenwachstum als auch ein Absterben in Abhängigkeit von Umwelteinflüssen (Wasser, Temperatur etc.) statt. Zwischen den einzelnen Pools werden Stoffflüsse simuliert (z.B. Bewässerung, Spritzwasser) und so neben dem Mikroorganismenwachstum und -abster-

ben ein dynamisches Kontaminationsmodell gebildet. Als ein Submodell wurde das Penman-Monteith Modell (Allen et al., 1998) implementiert. Zusammen mit kultur- und entwicklungsspezifischen Steuerungswerten *k* werden hier Beregnungszeitpunkte und -mengen bestimmt sowie die aktuelle Bodenfeuchtigkeit als ein Parameter für das Mikroorganismenwachstum berechnet. Das Pflanzenwachstum der einzelnen Arten wurde durch Temperatursummenmodelle implementiert.

Zusätzlich erfolgten Korrelationsanalysen von vorhandenen Kontaminationsdaten der Blätter mit *E.coli* in Abhängigkeit von Klimadaten (Temperatur und Niederschlag; Bewässerung) in Excel. Die Klimadaten wurden durch die Wetterstation des DWD in Langenhagen erfasst und online abgerufen (www.dwd.de).

3.4 Mikrobielle Analysen Feldversuch

Mikrobielle Analysen Blätter

Geerntete Pflanzen wurden bis zur mikrobiellen Analyse gekühlt aufbewahrt. Blätter mit einem Gewicht von 10 g wurden genau eingewogen und zusammen mit 50 ml 0,1 M TRIS-Puffer in eine sterile Tüte gegeben. Anschließend wurden die Bakterien von der Blattoberfläche mit Hilfe eines Smashers (Chemunex, Bruz, Frankreich; 20 Sekunden, normale Geschwindigkeit) in Suspension gebracht. Die Suspension wurde von den Blättern getrennt und mittels kultivierungsabhängiger Methoden im Hinblick auf die aerobe mesophile Gesamtbakterienzahl (GBZ), Enterobakterien gesamt, Salmonellen, *Escherichia* (*E.*) *coli*, Coliforme, *Listeria* spp., *Listeria* (*L.*) *monocytogenes* sowie Enterokokken quantifiziert. Verwendete Medien und Inkubationsbedingungen sind in Tab. 3 aufgeführt. Suspensionen wurden, falls notwendig, mit 0,85% NaCl-Lösung seriell verdünnt. Ergebnisse sind in Koloniebildenden Einheiten (KbE) in 1 g Frischmasse (FM) angegeben.

Statistische Analysen zu den verschiedenen Anbaumethoden wurden mit Minitab (Version 16) durchgeführt.

Mikrobielle Analysen Dünger und Bodenproben

Die verwendeten Dünger (Haarmehlpellets „HMP“ und Hühnertrockenkot „HTK“) sowie Bodenproben, die im Laufe der Kultivierung im Jahr 2014 genommen wurden, wurden mikrobiologisch analysiert. Hierfür wurden 10 g der Probe in ein steriles Gefäß genau eingewogen, 100 ml 0,2% $Na_2P_2O_7$ zugegeben und das Gemisch für 30 Minuten bei 110 rpm geschüttelt. Das Gemisch wurde anschließend für 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt und nach weiteren 5 Minuten, in denen sich die schweren Partikel der Probe setzen konnten, durch ein steriles Sieb mit einer

Porengröße von 1 mm gefiltert. Die Suspension wurde dann mikrobiell auf die gleichen Bakterien wie auch die Blätter untersucht (Tab. 3).

Mikrobielle Analysen Wasser

Aliquote der verwendeten Wasserquellen wurden auf ihre mikrobiologische Qualität hin analysiert. Hierfür wurde das Colilert-18 Kit (IDEXX laboratories, Inc., Westbrook, Maine, USA) für die Bestimmung der Konzentrationen von coliformen Bakterien sowie *E. coli* im Speziellen und das Enterolert-18 Kit (IDEXX laboratories, Inc., Westbrook, Maine, USA) für die Bestimmung der Konzentration an Enterkokken nach Herstellerangaben angewandt. Ergebnisse sind als „most probable number“ (MPN) in 100 ml angegeben. Die aerobe mesophile Gesamtbakterienzahl wurde mit Hilfe von R2A Agar (Reasoner’s 2A Agar; Difco 866-979-9408) ermittelt.

Epiphytische Kolonisierung von Mangold- und wilder Raukeblättern durch *E. coli* O157:H7 unter Gewächshausbedingungen

Für die Untersuchung der epiphytischen Kolonisierung von Mangold- und wilde Raukeblättern wurde ein shigatoxin-negativer Stamm von *E. coli* O157:H7 (Stamm: E81186) als Modellorganismus gewählt. Der gewählte Wildstamm produziert jedoch den Adhäsionsfaktor *eae*. Dieser Modellorganismus war für frühere Experimente mit einem Plasmid für grünfluoreszierendes Protein und Ampizillinresistenz transformiert, was bei Anzucht auf semi-selektivem Medium mit Arabinose und Ampizillin eine selektive Reisolierung und dadurch Quantifizierung zulässt. Der Modellorganismus wurde in -80 °C gelagert. Für die Inokulation wurde eine Reinkultur aus einer Kolonie auf lysogenem Agar (LB) angezogen und nach 24 h in lysogene Boullion überführt. Nach Anzucht über Nacht bei 37 °C (110 rpm) wurden die Zellen geerntet und durch wiederholtes Zentrifugieren (Schritt 1: 45 min, 4 °C; 3000 xg; Schritt 2: 15 min, 4 °C, 3000 xg) und Resuspendieren in sterilem 0.85% NaCl gewaschen. Für die Suspension zur Inokulation wurde zuerst die Stammlösung spektrophotometrisch (Expert 96^{TM}, Asys HiTech, Eugendorf, Austria) bestimmt und entsprechend einer vorher angefertigten Kalibrierungskurve (Abbildung 2) auf OD_{620} 1,0 gestellt. Dies entspricht einer Keimzahl von 9,7 log KbE/ml. Die Stammlösung wurde danach für die Inokulationslösnung mit 0,085% NaCl auf 6.8 log KbE/ml verdünnt und die Enddichte durch eine Verdünnungsserie und Ausstrich auf LB (+ Arabinose, + Ampizillin) verifiziert.

Tab. 3: Verwendete Medien und Inkubationsbedingungen zur Analyse der Bakterien in Phyllosphäre sowie Dünger- und Bodenproben.

Medium		Ergänzung	Selektiv für	Inkubations-temperatur	Inkubationszeit
0.1 x Tryptic soy agar	Difco 236950	1.2 % Bacto agar Difco 214010	Aerobe mesophile Gesamtbakterien-zahl	25°C	72 h
Cristal-violet neutral-red bile glucose agar	Merck 1.10275.0500	-	Enterobacteriaceae	37°C	18 h
Salmonella Chromogenic agar base	Oxoid CM1007	Salmonella selective supplement Oxoid SR0194E	*Salmonella* spp.	37°C	24 h
Brillance E. coli/coliform selective medium	Oxoid CM1046	-	Coliforme, *E. coli*	37°C	24 h
Bile aesculin agar	LAB LAB207	- -	*Enterococcus* spp.	37°C	24 h
Harlequin Listeria chromogenic agar	LAB HAL010	HAL010 Listeria selective Diagnostic supplement with cyclohexamide LAB X010; Polymyxin B, ceftazidime LAB X072	*Listeria* spp., *L. monocytogenes*	37°C	48 h

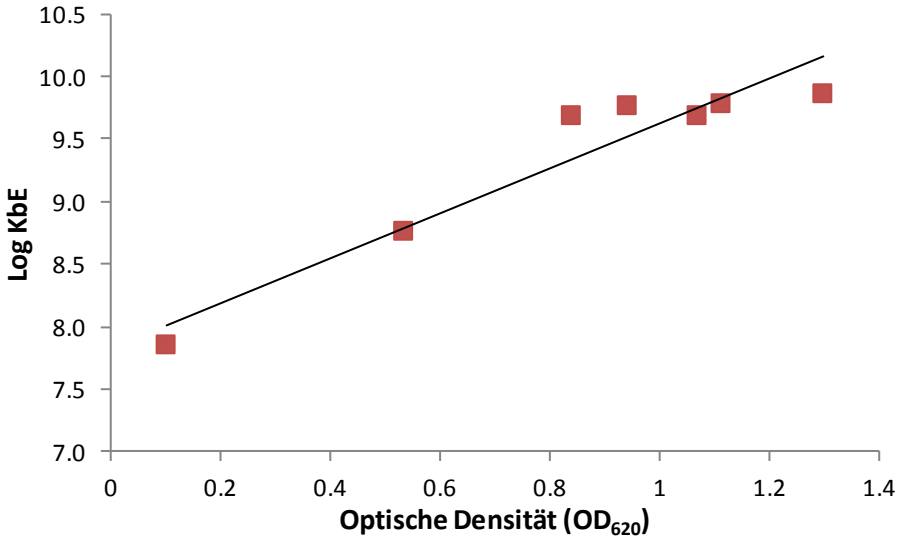


Abb. 2: Kalibrierungskurve für den im Versuch verwendeten *E. coli*-Stamm

Aus gesetzlichen Gründen wurde die Untersuchung im Gewächshaus durchgeführt. Dazu wurden Rucola (Tricia, Enzo) und Mangold (SCR 107, AdvanSeed) in zwei Wiederholungen mit sechs replikaten Trögen (350 mm*460 mm * 90 mm) angezogen. Vor der Saat wurde das Substrat mit organischem Dünger (Variante 1: Kontrolle, keine Düngergabe; Variante 2: Schweinehaarpellets; Variante 3: Hühnertrockenkot) versetzt. Die Pflanzen wurden mit dem oben beschriebenen *E. coli*-Stamm inokuliert, als die Länge der ersten echten Blätter 2 cm betrug. Die Pflanzen wurden geerntet, als die ersten echten Blätter eine Blattlänge von 9 cm erreicht hatten.
Zu Versuchsende wurden die Tröge behandlungsweise unter aseptischen Bedingungen abgeerntet, in Plastikbeutel für die Verwahrung von Lebensmitteln gesammelt und gewogen. Das Schema zur Versuchsnachbehandlung ist in Abbildung 3 dargestellt. Die verschiedenen Schritte wurden von drei Arbeitsteams mit je zwei bis vier Mitarbeitern simultan durchgeführt.

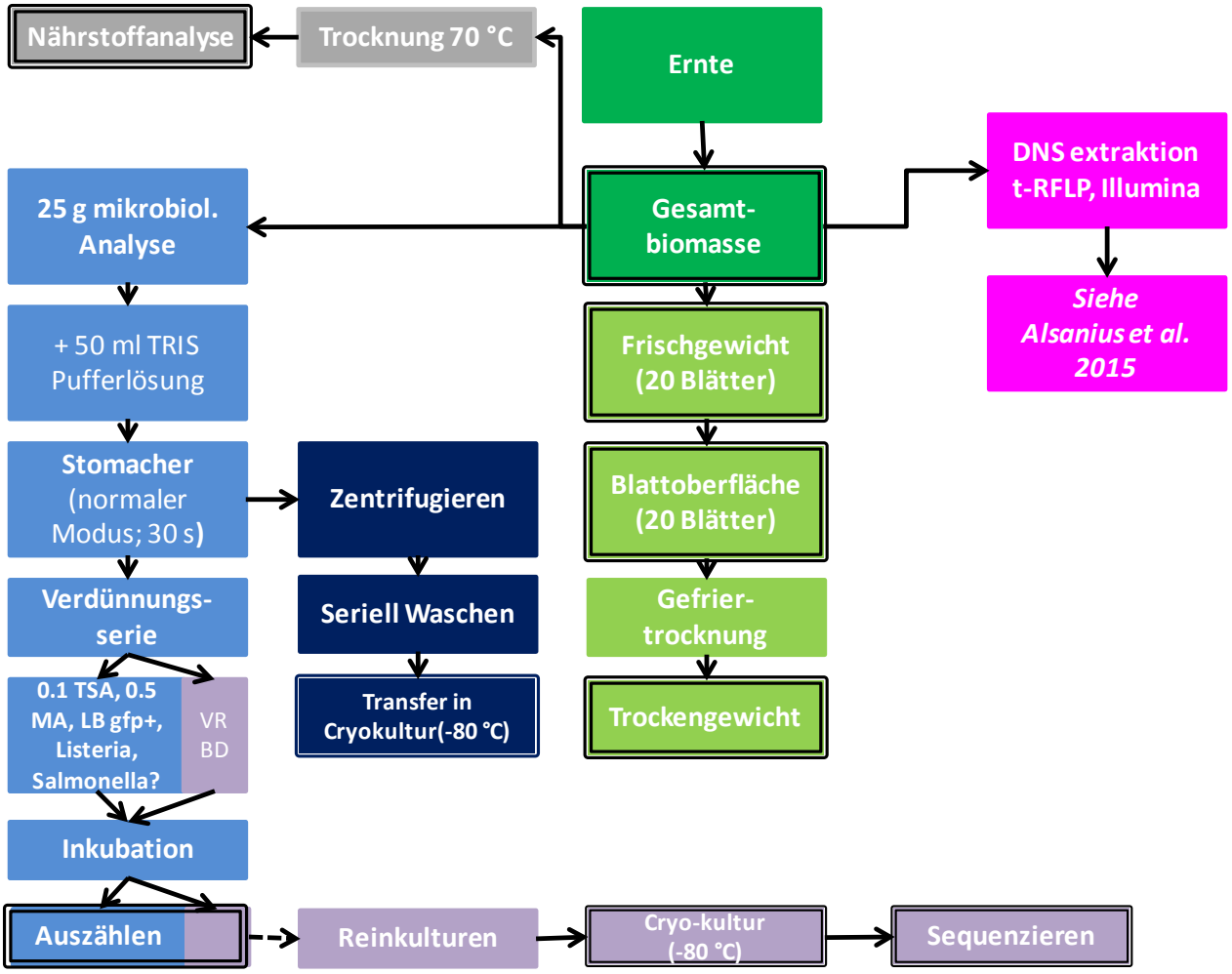


Abb. 3: Flussdiagramm zur Vorgehensweise bei Versuchsabschluss

Von jeder Behandlung wurden 100 g Blattfrischmasse in Papiertüten zur Bestimmung des Nährstoffgehaltes gelegt und bei 70 °C getrocknet. Die Blattanalyse wurde von einem kommerziellen Labor durchgeführt. Außerdem wurden randomisiert 20 Blätter entnommen und in vorgefertigte und eingewogene Aluminiumfolieumschläge überführt, um die Blattoberfläche, das Blattfrischgewicht und das Blatttrockengewicht zu bestimmen. Nach der Bestimmung des Blattfrischgewichtes wurden 20 Blätter auf Polyethylenfilm verteilt und die Blattoberfläche gemessen. Die Blätter wurden danach in die Umschläge zurückgelegt und bei -20 °C gelagert. Das Trockengewicht wurde nach Gefriertrocknung bestimmt.

Von der Blattfrischmasse wurden weitere 25 g zur Keimzahlbestimmung entnommen, in sterile Filtertüten (Porengrösse: 70 µm) überführt, mit 50 ml TRIS-pufferlösung versetzt und anschliessend Epiphyten auf der Blattoberfläche mit Hilfe eines Stomachers (Chemunex, Bruz, Frankreich) abgelöst. Die gefilterte Suspension wurde danach seriell in 0,85% NaCl verdünnt und auf

semiselektives Agar inokuliert. Die Inkubationsbedingungen der verschiedenen Agartypen sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tab. 4: Inkubationsbedingungen der verwendeten semi-selektiven Medien

Medium	Abkürzung	Inkubationsbedingungen		Anmerkung
		Länge (h)	Temperatur (°C)	
Kasein-Soja Pepton Agar	0.1xTSA	72	25	Aerobe mesophile Gesamt-bakterienzahl
Lysogen-Agar (versetzt mit 0,2% Arabi-nose und 100 µg Ampizil-lin/ml)	LB	24	37	Inokulierter *E. coli gfp*+-Stamm, unter UV-Licht ausgezählt
Cristal-violet neutral-red bile dextrose agar	VRBD	18	37	*Enterobacteriaceae*
Aesculin-Galle Agar	AES	24	37	*Enterococcus* spp.
Salmonella Chromogenic agar base	SAL	24	37	*Salmonella* spp.
Harlequin Liste-ria chromoge-nic agar	LIS	24	37	*Listeria* spp., L. *monocytogenes*

Um die konkurrierenden Enterobacteriaceaen zu bestimmen, wurden fünf Kolonien Kasein-Soja Pepton Agar (Vollmedium) überführt und durch dreimaliges Ausstreichen einer einzelnen Kolonie auf sterilem Agar im Abstand von 24 h und Anzucht bei 37 °C in Reinkultur überführt. Die Reinkulturen wurden dann über Nacht in steriler Kasein-Soja-Pepton Boullion inkubiert, in Cryokulturen überführt und bei -80 °C bis zur Sequenzierung gelagert.

Zur DNA-Extraktion wurden die Cryokulturen auf TSA rekultiviert (37°C, über Nacht). Einzelne Kolonien wurden in je 5 ml TSB überführt und unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Die

Suspension wurde bei 3000 xg und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und das Pellet mit 5 ml 0,85% NaCl gewaschen (3000 xg, 4°C, 10 Minuten). Das Pellet wurde im Anschluss in 1 ml autoklaviertem, deionisiertem Wasser resuspendiert und für 4 Minuten im Wasserbad gekocht. Die Suspension wurde bei 6000 xg zentrifugiert und ca. 750 µl des Überstandes in ein steriles Mikroreaktionsgefäß überführt. Die extrahierte DNA wurde bis zur weiteren Analyse bei 4°C verwahrt.

Polymerase Kettenreaktion (PCR): Das 16S rDNA Gen wurde mit Hilfe der universellen vorwärts bzw. rückwärts Primer ENV1 (5′-AGA GTT TGA TII TGG CTC AG-3′) und ENV2 (5′-CGG ITA CCT TGT TAC GAC TT-3′) amplifiziert. Der Mastermix enthielt 0,5 µl beider Primer sowie 0,156 µl Taq-Polymerase, 2,5 µl Taq-Puffer, 0,5 µl Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP), 1,5 µl $MgCl_2$ und 2,0 µl der extrahierten DNA Probe. Zu einem Endvolumen von 25 µl wurde Reinstwasser zugegeben. Die PCR wurde für 30 Zyklen unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 94°C - 4 min, (94°C – 1 min, 50°C – 45 sec, 72°C – 2 min) x 30, 72°C – 7 min, 4°C.

Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,5% Agarosegel durch Elektrophorese aufgetrennt (100 V), mit GelRed gefärbt und die Banden unter UV-Licht visualisiert. Proben mit einer bestätigten Länge von 1500 bp wurden zur Sequenzierung (mit Primer ENV1) zu Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) gesendet.

Isolate, welche Sequenzen ähnlich der von *E. coli* aufwiesen, wurden auf LB-Agar mit Ampizillin und Arabinose angezogen, um zwischen dem applizierten und anderen Stämmen zu unterscheiden. Isolate, welche bei den gegebenen Bedingungen Wachstum und grüne Fluoreszenz zeigten, wurden als der applizierte Stamm betrachtet. Zeigte sich kein Wachstum, wurde die DNA der Isolate mit Hilfe einer PCR auf die Anwesenheit des eae-Gens analysiert. Hierfür wurden eae-spezifische Primer (eae A-F: 5‘-GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC-3‘ und eae A-R: 5‘-CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG-3‘) verwendet. Der Mastermix war entsprechend der Amplifizierung des 16S rDNA Gens zusammengesetzt, wobei statt der Primer ENV1 und ENV2 die Primer eae A-F und eae A-R verwendet wurden. Die PCR wurde in 30 Zyklen unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 95°C - 3 min, (95°C – 1 min, 60°C – 2 min, 72°C – 1,5 min) x 30, 72°C – 7 min, 4°C.

Banden bei einer Länge von 384 bp auf 1,5% Agarosegel (Durchführung siehe Amplifizierung 16S rDNA) kennzeichnen das Vorhandensein des eae-Gens. Negative Ergebnisse wurden zweimal bestätigt.

Weitere 10 g Blattfrischmasse wurden mit 40 ml Pufferlösung in eine sterile Filtertüte gegeben und die Bakterien mit Hilfe eines Stomacher bei normaler Geschwindigkeit (2 min) in Suspension gebracht. 20 ml der Suspension wurden anschließend abpipettiert, für 15 min bei 5000 xg

und 4°C zentrifugiert und das Pellet in 2 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gelöst. Die 2 ml wurden auf zwei Mikroreaktionsgefäße aufgeteilt und bei 6000 xg für 10 min zentrifugiert. Eines der so gewonnenen Pellets diente zur Extraktion für die metagenomische Analyse, während das andere für den Notfall aufbewahrt wurde.
Die DNS-Extraktion und Vorbereitung für die metagenomische Analyse folgte der Beschreibung von Alsanius et al. (2015; submitted).

Nach Abschluss des Versuches wurden auch die Stickstoffrestgehalte im Kultursubstrat bestimmt. Dafür wurden 1L Probe von jedem Trog gesammelt, bei -20 °C bis zur Analyse gelagert. Die Bestimmung von totalem und mineralisiertem Stickstoffgehalt wurde von einem kommerziellen Labor durchgeführt.

3.5 Internalisierung von *E. coli* O157:H7 in Rucola und Mangoldblätter

Kultivierung der Mikroorganismen

Pflanzenpathogene: Xanthomonas campestris pv. *campestris* (B027 / 24-R-92 G) sowie *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* (DSM-50252) wurden auf Casein-Soja-Pepton-Agar (engl. tryptic soy agar; TSA) kultiviert (25°C). Eine einzelne Kolonie wurde von TSA in 30 ml Casein-Soja-Pepton-Bouillon (engl. Tryptic soy broth; TSB) überführt und bei 200 rpm schüttelnd unter Raumtemperatur für zwei Tage inkubiert. Anschließend wurde die Suspension bei 3000 xg und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert und das so erhaltene Pellet in 10 ml 0,85% NaCl gewaschen (3000 xg, 4°C, 15 Minuten). Das gereinigte Pellet wurde in 0,085% NaCl resuspendiert und mit Hilfe eines Spektrophtometers (Expert 96^{TM}, Asys HiTech, Eugendorf, Austria) eine Zelldichte von ca. 7 logKbE * ml^{-1} eingestellt.
E. coli O157:H7: Der *E. coli* O157:H7 Stamm E81186, welcher nicht die Virulenzfaktoren Verotoxin 1 und 2 exprimiert, jedoch ein, unter Anwesenheit von Arabinose grün fluoreszierndes Protein (gfp) und Ampizillinresistenz kodierendes Plasmid trägt, wurde auf LB (engl. lysogeny broth)-Agar kultiviert. Eine einzelne Kolonie wurde in 30 ml LB-Flüssigmedium mit 0,2% Arabinose und 100 µg/ml Ampizillin überführt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Suspension wurde anschließend bei 3000 xg und 4°C für 45 Minuten zentrifugiert, mit 10 ml 0,85% NaCl gewaschen (3000 xg, 4°C, 15 Minuten) und das gereinigte Pellet mit 0,085% NaCl resuspendiert. Die Suspension wurde mit Hilfe eines Spektrophotometers auf eine Zelldichte von ca. 10 logKbE * ml^{-1} eingestellt.

Bereitstellung des Pflanzenmaterials

Rucola (Tricia, Enzo) und Mangold (SCR 107, AdvanSeed) wurden im Gewächshaus angezogen. Eine Stickstoffdüngung erfolgte als die ersten echten Blätter eine Länge von ca. 2 cm erreicht hatten auf einem Niveau von 81 kg N /ha (Axan). Zur Herbeiführung einer biotischen Schädigung wurden Blätter von drei bis vier Wochen alten Pflanzen mit einem Pflanzenpathogen, *X. campestris* pv. *campestris* im Fall von Mangold und *P. syringae* pv. *aptata* für Rucola, infiziert. Hierfür wurde die Bakteriensuspension mit einer Spritze direkt ins Blattgewebe injiziert. Symptome zeigten sich nach fünf bis sieben Tagen. Eine abiotische Schädigung erfolgte durch Reiben der Blätter zwischen zwei Fingern unter zur Hilfenahme von Siliciumcarbid.
Unbeschädigte sowie geschädigte Blätter - bei biotischem Schaden beim Auftreten von Symptomen, bei abiotischen Schäden direkt nach der Schädigung - wurden mit einer *E. coli* O157:H7 Suspension besprüht und am folgenden Tag unterm Mikroskop analysiert.

Analyse der inokulierten Blätter

Mit *E. coli* O157:H7 kontaminierte Blätter wurden einen Tag nach der Inokulation geerntet und anschließend in 25% Natriumhypochlorit für ca. 20 Sekunden dekontaminiert. Überschüssige Lösung wurde mit sterilem, deionisiertem Wasser entfernt. Da bei der Kultur Mangold nach der Dekontamination keine Bakterien gefunden wurden, wurden auch unbehandelte Blätter unter dem Mikroskop betrachtet.
Kleine Blattausschnitte (ca. 0,5 x 0,5 cm) von nicht geschädigten, biotisch und abiotisch geschädigten Blätter wurden in die Vertiefung eines Objektträgers gelegt, mit PBS + 50% Glycerin (Reinheit: ≥ 99%) benetzt und mit einem Deckglas bedeckt. Zur Visualisierung der fluoreszierenden *E. coli* O157:H7 Bakterien diente ein Konfokalmikroskop (Zeiss LSM 510, Carl Zeiss, Jena, Deutschland), welches mit einem 40x, 1,3 DIC Objektiv ausgestattet war.

I. 4. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

4.1 Pflanzenwachstum Feldversuche

4.1.1 Mangold

Bei Mangold (*Beta vulgaris* var. *vulgaris* ‚Bright Lights') konnten für die Parameter Frisch- und Trockenmasse nur vereinzelt Düngewirkungen ermittelt werden. Lediglich zum Zeitpunkt der dritten Zwischenernte (sechs Wochen nach Pflanzung) des zweiten Satzes 2012 wurde eine signifikante Düngerwirkungen ermittelt, die mit Hühnertrockenkot gedüngten Pflanzen (13,01±6,1 g FM und 1,29 ± 0,55 g TM) zeigten im Mittel signifikant höhere Frisch- und Trockengewichte als die, die mit Haarmehlpellets (11,10 ± 5,84 g und 1,03 ±0,39 g TM) gedüngt

wurden. In 2013 wurde kein Effekt der Düngung gefunden. In 2014 wurde ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Düngevarianten nur an dem Auswertungstermin am 02.06.2014 nachgewiesen. Die mit Hühnertrockenkot gedüngten Pflanzen zeigten im Mittel 104,22 ± 31,10 g Frischgewicht und ein Trockengewicht von 10,05 ± 2,88 g während die mit Haarmehlpellets gedüngten Pflanzen im Mittel 76,41 ± 13,33 g Frischgewicht und ein mittleres Trockengewicht von 7,66 ± 1,22 g zeigten.

Ein Unterschied des prozentualen Trockenmasseanteils in Abhängigkeit von der Düngung wurde in den Anbaujahren nicht nachgewiesen. Die mit Hühnertrockenkot gedüngten Varianten zeigten die höchsten Frisch- und Trockenmassen. Am 16.06.2014 wurde eine Interaktion zwischen Düngung und Bodenabdeckung in Bezug auf den Parameter Frischmasse gefunden. Die mit Haarmehlpellets gedüngten Varianten wiesen dabei sowohl mit als auch ohne Bodenabdeckung eine höhere Frischmasse auf, wobei die Frischmasse der ohne Mulchabdeckung kultivierten Pflanzen in Abhängigkeit von der Düngung wenig schwankte (Abb. 4).

Für die Parameter Frisch- und Trockenmasse ergaben sich hier auch für den Zeitpunkt der Erndernte des ersten Satzes (fünf Wochen nach Pflanzung) mit Mulchauflage signifikant geringere mittlere Werte als mit. Das Frischgewicht der nicht abgedeckten Varianten betrug 79,87 g ± 35,58 g gegenüber einem Frischgewicht von 64,33 ± 41,63 g bei dem Mittel der nicht abgedeckten Parzellen. Das Trockenwicht der nicht abgedeckten Variante betrug am letzten Auswertungstermin Satz 1 2012 12,80 ±5,31 g gegenüber einem Trockengewicht von 10,10 ±6,25 g. Betrachtet man die Parameter Frisch- und Trockenmasse im Hinblick auf die Mulchvariante, so zeigen sich für die Pflanzen, die auf bioabbaubarer Mulchfolie in 2012 angebaut wurden, zu den Zeitpunkten der dritten Zwischenernte (sechs Wochen nach Pflanzung) sowie der Erndernte (acht Wochen nach Pflanzung) des zweiten Satzes, signifikant geringere mittlere Frisch- und Trockenmassen als bei den direkt auf dem Feldboden angebauten. Im Vergleich erreichte die unbedeckte Variante am dritten Auswertungstermin ein Frischgewicht von 98,03 ± 15,81 g und ein Trockengewicht von 7,344 ± 1,20 g während die Mulchvarianten im Mittel nur 47,27 ±27,62 g Frisch- und 3,58 ± 2,21 g Trockenmasse erreichten. Zur Erndernte wiesen die nicht mit Mulch abgedeckten Parzellen im Mittel ein Frisch- und Trockengewicht von 109,51 ± 26,89 g und 20,47 ± 4,74 g auf, währen die Mulchvarianten im Mittel ein Frisch- und Trockengewicht von 65,88 ± 51,43 und 12,78 ± 9,36 erreichten.

In 2013 wurden am zweiten Auswertungstermin ein umgekehrter Effekt und ein signifikant höheres Frischgewicht bei den mit Mulch abgedeckten Varianten gefunden (Abb. 5).

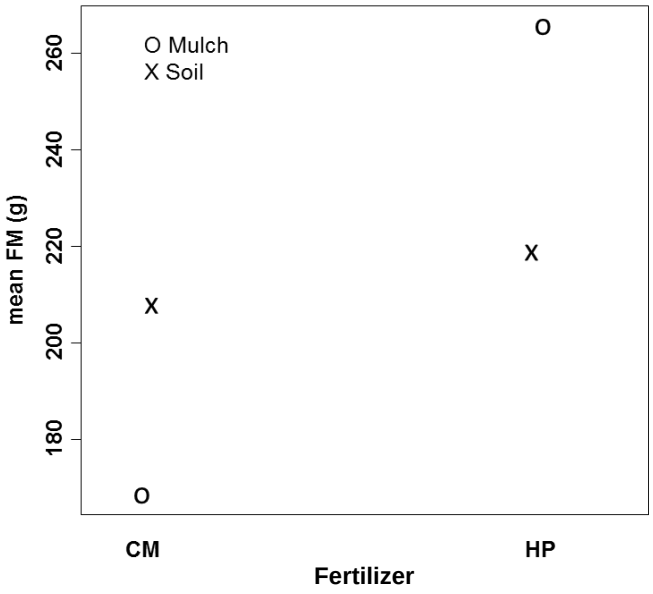


Abb. 4: Interaktionsgraphik (*signifikant*; VA, p= 0,05) bezüglich der mittleren Frischmasse des Mangolds am 16.06.2014 in Abhängigkeit von Bodenbedeckung und Düngung. CM = Hühnertrockenkot, HP = Haarmehlpellets.

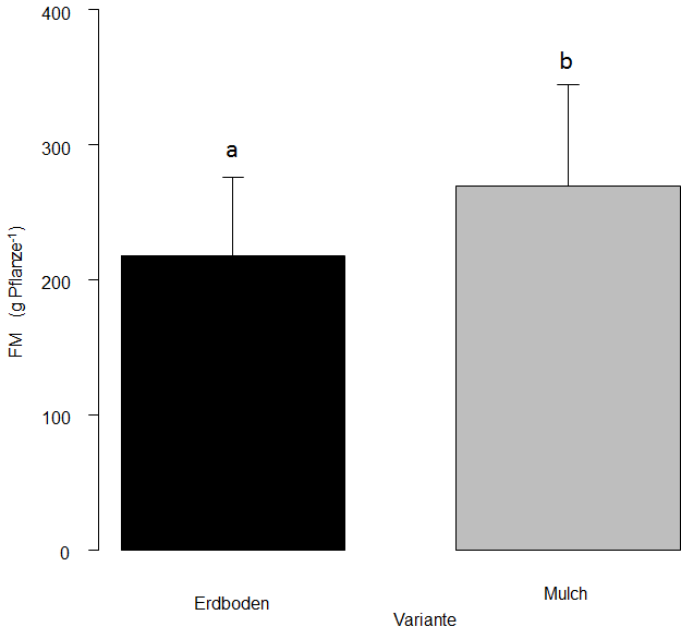


Abb. 5: Frischmasse des Mangolds an Termin 2 in Abhängigkeit von der Bodenbedeckung. Unterschiedliche Buchstaben geben Signifikanzen an (pairwise t-test, $p \leq 0{,}05$).

Pflanzenwachstum Mangold

Zur Beschreibung des Pflanzenwachstums als Submodell im entwickelten Risikoabschätzungsmodell des Mangolds wurde eine Gompertzfunktion verwendet. Als Startgewicht wurde ein Frischgewicht von 5 g Pflanze^{-1} angenommen. Als Datenbasis diente der Anbausatz 2013. Es wurde eine generelle Wachstumsfunktion für die Kultur Mangold angepasst. Die Funktionsparameter und die Modellgüte sind in Abbildung 6 dargestellt

Bezüglich der Flavonoidkonzentration des Mangolds wurden keine signifikanten Unterschiede und Einflüsse der untersuchten Faktoren ermittelt.

.

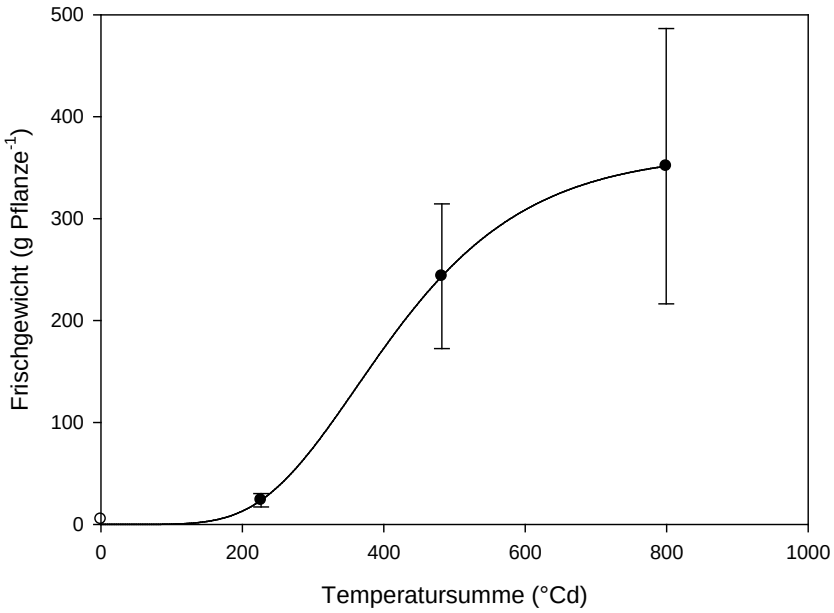


Abb. 6: Frischmassezuwachs der Kultur Mangold in Beziehung zur Temperatursumme nach Pflanzung. Die gefüllten Kreise zeigen die gemessene Frischmasse (g Pflanze^{-1}). Die Kurve zeigt die angepasste Gompertzfunktion mit folgenden Funktionsparametern f=365.07*exp(-exp(-(x-361.13)/133.87)) R^2= 0.99.

4.1.2 Eichblattsalat

Für die Auswertung des Pflanzenwachstums der Kultur Eichblattsalat stand ein Satz 2013 mit zwei Auswertungsterminen zur Verfügung. Für den pflanzenbaulichen Parameter Frischmasse ergaben sich an beiden Auswertungsterminen unterschiedliche Signifikanzen. Am ersten Auswertungstermin konnte ein Einfluss der Bodenbedeckung auf die Frischmasse nachgewiesen werden. Die mit Mulch abgedeckten Parzellen wiesen eine geringere mittlere Pflanzenfrisch-

masse im Vergleich zu den auf unbedeckten Erdboden gewachsenen Pflanzen auf (Abb.5, li.). Am zweiten Auswertungstermin konnte dieser Effekt nicht wiedergefunden werden. Dafür wurde am zweiten Auswertungstermin ein signifikant höheres Frischgewicht in Abhängigkeit des verwendeten Düngers gefunden. Die mit Hühnertrockenkot gedüngten Pflanzen zeigten ein höheres Frischgewicht im Vergleich zu den mit Haarmehlpellets gedüngten Pflanzen (Abb. 7, re.).

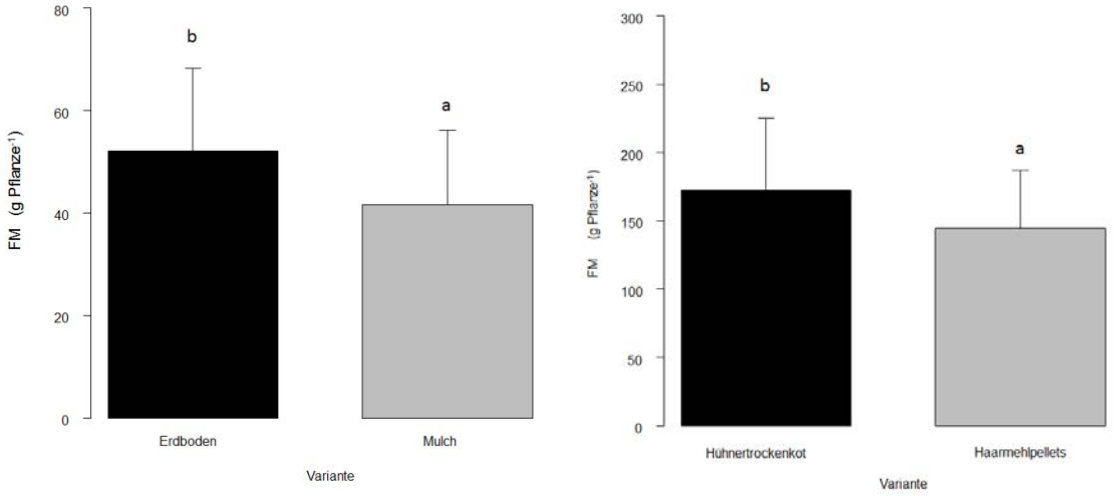


Abb. 7: Frischmasse des Eichblattsalates am ersten Auswertungstermin in Abhängigkeit von der Bodenbedeckung (links) und Frischmasse des Eichblattsalates am zweiten Auswertungstermin in Abhängigkeit von der Düngerart (rechts). Unterschiedliche Buchstaben geben Signifikanzen an (pairwise t-test, $p \leq 0.05$).

Für den Parameter Trockenmasse konnten keine Signifikanzen nachgewiesen werden.
Der Trockenmasseanteil des Eichblattsalates war signifikant von der Düngevariante beeinflusst, die mit Hühnertrockenkot gedüngten Varianten zeigten am ersten Auswertungstermin einen prozentualen Trockenmasseanteil von 6,71 % im Vergleich zu einem mittleren Trockenmasseanteil von 7,82 % der mit Haarmehlpellets gedüngten Varianten . Am zweiten Auswertungstermin lag der Trockenmasseanteil der Hühnertrockenkotvarianten im Mittel bei 6,61 % während der Trockenmasseanteil der mit Haarmehlpellets gedüngten Varianten im Mittel bei 9,20 % lag. .
Die Analyse des Nitratgehaltes zeigte einen signifikanten Effekt des verwendeten Düngers. Es konnte ein höherer Nitratgehalt in den mit Hühnertrockenkot gedüngten Versuchspflanzen nachgewiesen werden (Abb. 8).

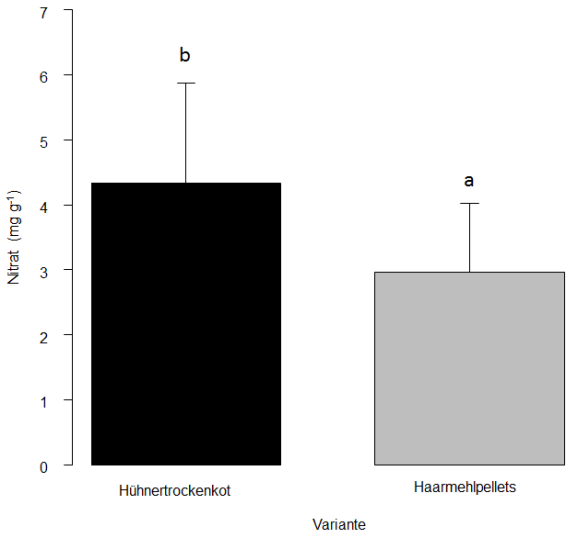


Abb. 8: Nitratgehalt des Eichblattsalates an Termin 2 in Abhängigkeit von der Düngerart. Unterschiedliche Buchstaben geben Signifikanzen an (pairwise t-test, $p \leq 0.05$)

4.1.3 Wilde Rauke

Für die Kultur Wilde Rauke (*Diplotaxis tenuifolia* ‚Grazia') wurden vereinzelte Signifikanzen ermittelt. Unterschiedliche Sätze und Jahre zeigten unterschiedliche Ergebnisse. Im Jahr 2012 konnten lediglich zum Zeitpunkt der Endernte des ersten Satzes sowohl unter der Düngung mit Haarmehlpellets im Vergleich zu der mit Hühnertrockenkot als auch unter Anbau ohne Mulchfolie signifikant höhere mittlere Frischmassen nachgewiesen werden. Die Frischmasse der Hühnertrockenkotvariante zeigte im Mittel Werte von 25,29 ±17,14 g die Trockenmasse zeigte im Mittel Werte von 5,30 ± 3,22 g, die Frischmasse der Haarmehlpelletvarianten betrug im Mittel 15,28 ± 13,49, die Trockenmasse 3,59 ± 2,77 g. Unterschiede im prozentualen Trockenmasseanteil waren statistisch nicht signifikant.

Im zweiten Satz 2012 ergaben sich keinerlei signifikante Unterschiede. Im Jahr 2013 zeigte die Wilde Rauke zum Zeitpunkt der Endernte einen Effekt von Düngerart und Wasserqualität, als auch Wechselwirkungen zwischen Bodenbedeckung und Düngerart sowie zwischen Bodenbedeckung und Düngerart sowie Wasserqualität auf die mittleren Frischmassen. Eine signifikant höhere mittlere Frischmasse wurde in der Variante Haarmehlpellets, Mulch-Abdeckung und mit Teichwasser bewässerten Variante im Vergleich zu allen anderen Versuchsvarianten mit Ausnahme der Variante mit Hühnertrockenkot gedüngt, ohne Bodenbedeckung und mit Teichwasser bewässert gefunden (Abb. 7).

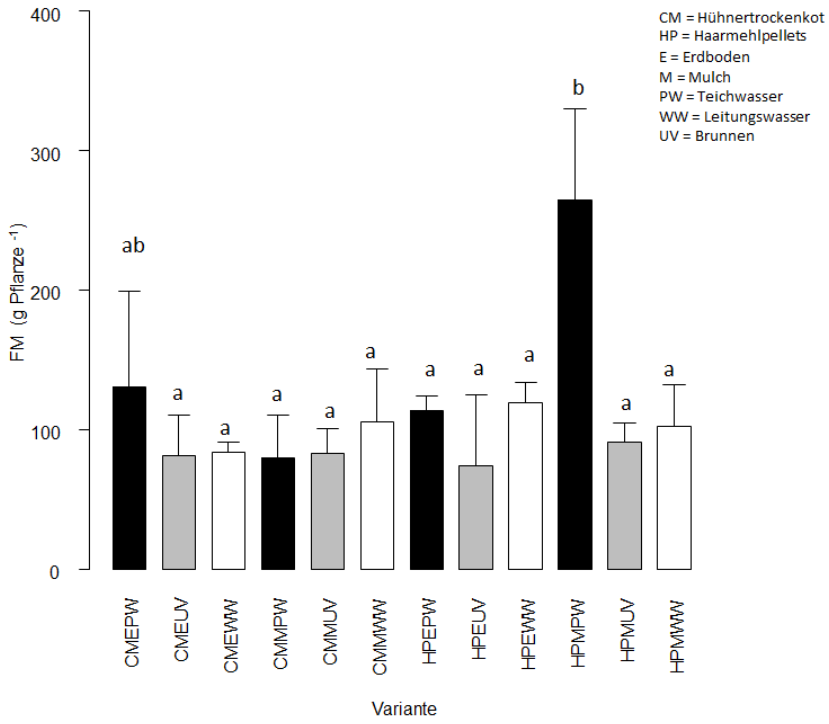


Abb. 9: Frischmasse der Wilden Rauke an Termin 3 in Abhängigkeit von der Versuchsvariante. Unterschiedliche Buchstaben geben Signifikanzen an (pairwise t-test, $p \leq 0{,}05$).

Im Jahr 2014 zeigte die wilde Rauke (*Diplotaxis tenuifolia* ‚Grazia') an keinem der Messtermine signifikante Unterschiede bezüglich der Trocken- und Frischmasse oder des Trockenmasseanteils.

Bezüglich der Glucosinolatgehalte wurden keine signifikanten Unterschiede ermittelt.

Bezüglich der Flavonoidkonzentration der Rauke wurde lediglich zur Endernte in 2013 ein signifikanter Unterschied ermittelt. Die mit Mulchabdeckung kultivierte Wilde Rauke wies eine signifikant höhere Flavonidkonzentration auf (Abb. 10).

Pflanzenwachstum Wilde Rauke

Zur Beschreibung des Pflanzenwachstums als ein Submodell im entwickelten Risikoabschätzungsmodell der Wilden Rauke wurde eine Gompertzfunktion verwendet. Als Startgewicht wurden ein Frischgewicht von 5 g Pflanze^{-1} angenommen. Wie beim Mangold wurde eine generelle Wachstumsfunktion für die Kultur Wilde Rauke angepasst (Abb. 11) und die gefunden Wechselwirkungen bei der Endernte nicht berücksichtigt.

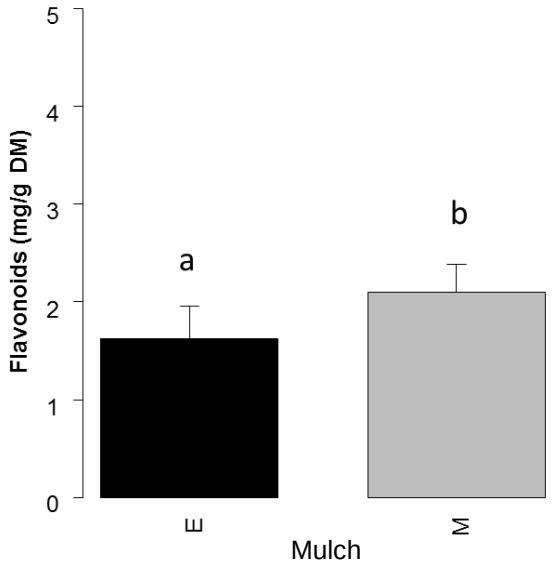


Abb. 10: Flavonoide (µmol/g DM) der Wilden Rauke am 05.08.2013 in Abhängigkeit von der Bodenbedeckung, E = Erdboden, M = Mulchabdeckung. Unterschiedliche Buchstaben geben Signifikanzen an (*pairwise t-test*, $p \leq 0{,}05$).

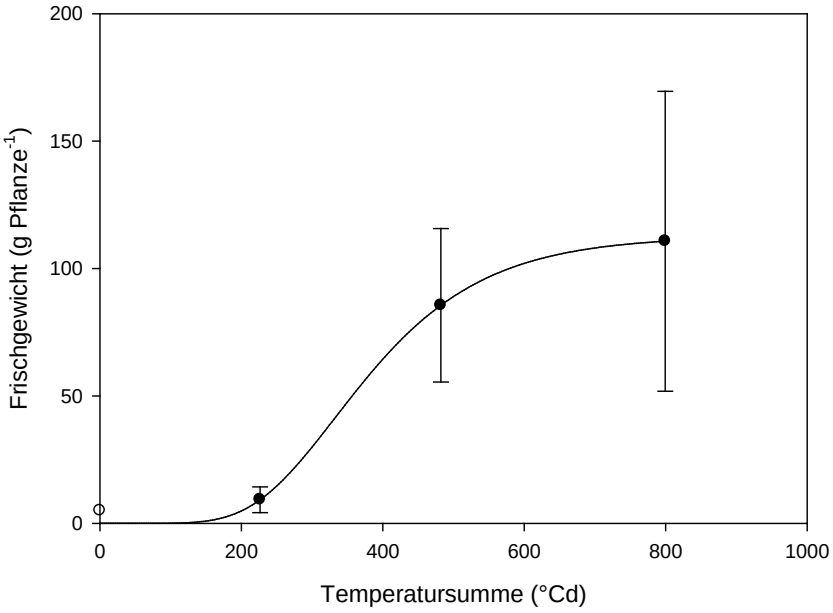


Abb. 11: Frischmassezuwachs der Kultur Wilde Rauke in Beziehung zur Temperatursumme nach Pflanzung. Die gefüllten Kreise zeigen die gemessenen Frischmasse (g Pflanze^{-1}). Die Kurve zeigt die angepasste Gompertzfunktion mit folgenden Funktionsparametern f=112.69*exp(-exp(-(x-332.67)/115.93)) R^2=0,99.

4.1.4 Eissalat

Für die Parameter Frisch- und Trockenmasse ergaben sich beim Eissalat (*Lactuca sativa* L. ‚Diamantinas') in Abhängigkeit von der Düngervariante jeweils ähnliche Signifikanzen.

In 2012 wurden zu den Zeitpunkten der dritten Zwischenernte (sechs Wochen nach Pflanzung) sowie der Endernte (acht Wochen nach Pflanzung) des zweiten Satzes höhere Frisch- und Trockengewichte bei den mit Hühnertrockenkot gedüngten Pflanzen im Vergleich zu den mit Haarmehlpellets gedüngt Pflanzen gefunden. Die mit Hühnertrockenkot gedüngten Pflanzen zeigten 6 Wochen nach Pflanzung im Mittel ein Frischgewicht von 65,28 ± 27,26 g und ein Trockengewicht von 5,94 ± 2,27 g, während die mittleren Frisch- und Trockengewichte der mit Haarmehlpellets gedüngten Varianten bei 50,63 ± 26,11 g und 4,88 ± 2,71 g lagen. 8 Wochen nach Pflanzung zeigten die mit Hühnertrockenkot gedüngten Pflanzen im Mittel ein Frischgewicht von 120,38 ± 55,48 und ein Trockengewicht von 17,58 ± 6,54, während die jeweiligen Frisch- und Trockengewichte der mit Haarmehlpellets gedüngten Varianten bei 84,04 ± 36,32 g und 13,29 ± 5,14 g lagen. Für die Endernte des ersten Satzes ergaben sich diesbezüglich keine Signifikanzen. Der prozentuale Trockenmasseanteil der Varianten unterschied sich in 2012 nicht. Betrachtet man die Parameter Frisch- und Trockenmasse im Hinblick auf die Mulchvariante, so zeigen sich für die Pflanzen, die auf bioabbaubarer Mulchfolie angebaut wurden, zum Zeitpunkt der Endernte des ersten Satzes (fünf Wochen nach Pflanzung) sowie zum Zeitpunkt der dritten Zwischenernte des zweiten Satzes (sechs Wochen nach Pflanzung), signifikant geringere mittlere Frisch- und Trockenmassen als bei den direkt auf dem Feldboden angebauten. Für den Zeitpunkt der Endernte des zweiten Satzes konnten hier keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Es wurde eine signifikante Wechselwirkung von Dünger- und Mulchvariante bezogen auf den Parameter Frischmasse für den Eissalat zum Zeitpunkt der Endernte des ersten Satzes 2012 nachgewiesen. Ohne Mulchauflage wurde bei Verwendung von Haarmehlpellets als Dünger eine höhere mittlere Frischmasse erzielt, mit Mulchauflage war dies jedoch in Kombination mit Hühnertrockenkot der Fall. Eine ähnliche und ebenfalls signifikante Interaktion ergab sich auch für den Parameter Trockenmasse. Insgesamt führte der Einsatz von bioabbaubarer Mulchfolie hier, wie bereits erwähnt, zu geringeren mittleren Frisch- und Trockenmassen als beim mulch-freien Anbau. Weiter wurde eine Wechselwirkung von Dünger- und Mulchvariante bezogen auf den Parameter Nitratgehalt zum Zeitpunkt der Endernte des ersten Satzes nachgewiesen (Abb. 12). Es wird deutlich, dass bei Verwendung von Haarmehlpellets als Dünger ohne Mulchauflage höhere mittlere Nitratgehalte erzielt wurden als in Kombination mit Mulch. Dem hingegen wurden für die Pflanzen, welche mit Hühnertrockenkot gedüngt wurden, ohne Mulchauflage geringere mittlere Nitratgehalte ermittelt als mit.

Die strukturgebenden Kohlenhydrate unterschieden sich in Satz 1 2012 nicht.
Im 2. Satz zeigten die Mulch abdeckten Parzellen einen signifikant erhöhten Anteil strukturgebender Kohlenhydrate von 6,01 % gegenüber 5,15 % für die unbedeckten Varianten.

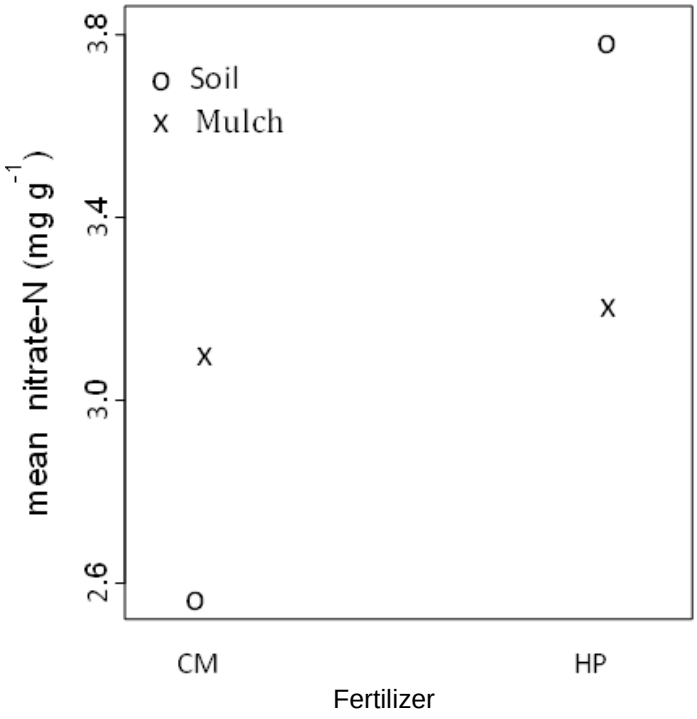


Abb. 12: Interaktionsgraphik (*signifikant*; VA, p= 0,05) bezüglich des mittleren Nitratgehalts des Eissalats in Abhängigkeit von Bodenbedeckung und Düngung, CM = Hühnertrockenkot, HP = Haarmehlpellets.

In 2013 standen zwei Anbausätze mit insgesamt fünf Auswertungsterminen zur Verfügung. Auch hier konnten jeweils vergleichbare Signifikanzen der Parameter Frisch- und Trockenmasse gefunden werden. Die Ergebnisse zeigen in Bezug auf die nachgewiesen Effekte der verwendeten Dünger und der Bodenbedeckung eine gute Reproduzierbarkeit und vergleichbare Effekte, die schon in den Eissalatsätzen 2012 nachgewiesen werden konnten. Es wurden zusätzlich an Termin 1 in Anbausatz 1 Effekte der verwendeten Wasserqualität auf die Parameter Frisch- und Trockensubstanz nachgewiesen.
Bezogen auf den Parameter Trockenmasse zum Zeitpunkt der ersten Ernte des ersten Satzes wurde eine signifikante Wechselwirkung von Dünger- und Mulchvariante gefunden (Abb. 13 B). Sowohl bei Verwendung von Haarmehlpellets als auch bei der Verwendung von Hühnertrockenkot als Dünger ohne Mulchauflage wurden höhere mittlere Trockenmassen erzielt als in

Kombination mit Mulch. Dieser Effekt ist besonders stark bei der Variante mit Haarmehlpellets ausgeprägt. Zudem wurde eine signifikante Wechselwirkung von Bodenbedeckung und Wasserqualität bezogen auf den Parameter Trockenmasse zum Zeitpunkt der ersten Ernte des ersten Satzes gefunden.

Es zeigt sich, dass die Mulchauflage in Kombination mit dem Brunnenwasser höhere mittlere Trockenmassen erzielt als in Kombination ohne Mulch. Für die beiden anderen Wasserqualitäten wirkt die Mulchauflage dagegen reduzierend auf die Trockenmasse. Die Interaktion Bodenbedeckung und Bewässerung zeigt eine Reduzierung der Trockenmasse bei Mulchauflage gegenüber den auf Erdboden gewachsenen Pflanzen. Die Interaktion mit der Bewässerung reduziert bei Überkopfberegnung im Vergleich zur Tropfbewässerung die Trockenmasse in der Mulchvariante stärker. Bei dem Parameter Frischmasse wurde eine gleiche Wechselwirkung der Bodenbedeckung mit der Düngerart und der Wasserqualität nachgewiesen (Abb. 13 A).

Am ersten Auswertungstermin wiesen die mit Tropfbewässerung bewässerten und mit Hühnertrockenkot gedüngten Varianten ohne Mulchabdeckung in den Wasserqualitäten Teichwasser und Leitungswasser signifikant höhere Frisch- und Trockenmassen im Vergleich zu den mit Haarmehlpellets gedüngten Mulchvarianten bei sonst gleicher Versuchsbehandlung auf. Ebenso zeigten diese Varianten eine signifikant höhere Frisch- und Trockenmasse im Vergleich zu den überkopfbewässerten Varianten der Düngung mit Haarmehlpellets und Mulchauflage. Die Versuchsvariante Haarmehlpellets und Mulchauflage mit der Wasserqualität Teichwasser wies eine im Vergleich mit allen anderen Varianten signifikant geringere Trockenmasse auf.

Am zweiten Auswertungstermin wurden diese Wechselwirkungen nicht wieder gefunden. Es wurden aber jeweils gleiche Signifikanzen und Einflüsse von Mulch, Düngerart und Wasserqualität auf die Parameter Frisch- und Trockenmasse gefunden (Abb.14 AB).

Die Abbildungen 13 und 14 zeigen die signifikanten Unterschiede der einzelnen Versuchsvarianten. Vier Versuchsvarianten mit Hühnertrockenkot als Dünger wiesen sowohl mit, als auch ohne Bodenbedeckung bei den Wasserqualitäten Leitungswasser und Brunnenwasser signifikant höhere Frischmassen auf, als die mit Haarmehlpellets gedüngte Variante mit Mulchabdeckung und Teichwasser als Wasserquelle. Zwischen allen anderen Varianten konnten keine Unterschiede ermittelt werden.

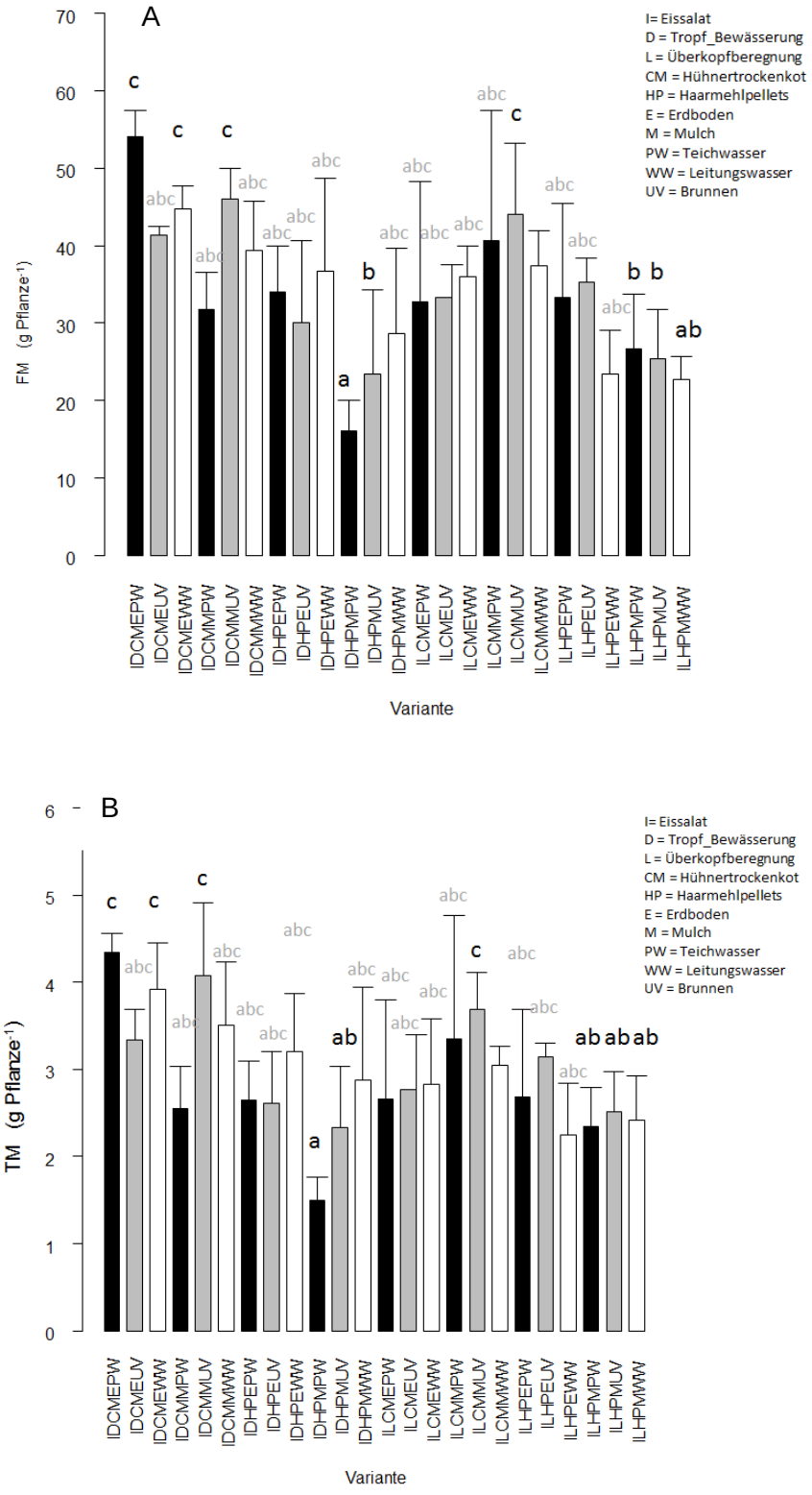


Abb. 13: (A) Frischmasse und (B) Trockenmasse des Eissalates an Termin 1 in Abhängigkeit von der Versuchsvariante. Unterschiedliche Buchstaben geben Signifikanzen an (pairwise t-test, $p \leq 0,05$).

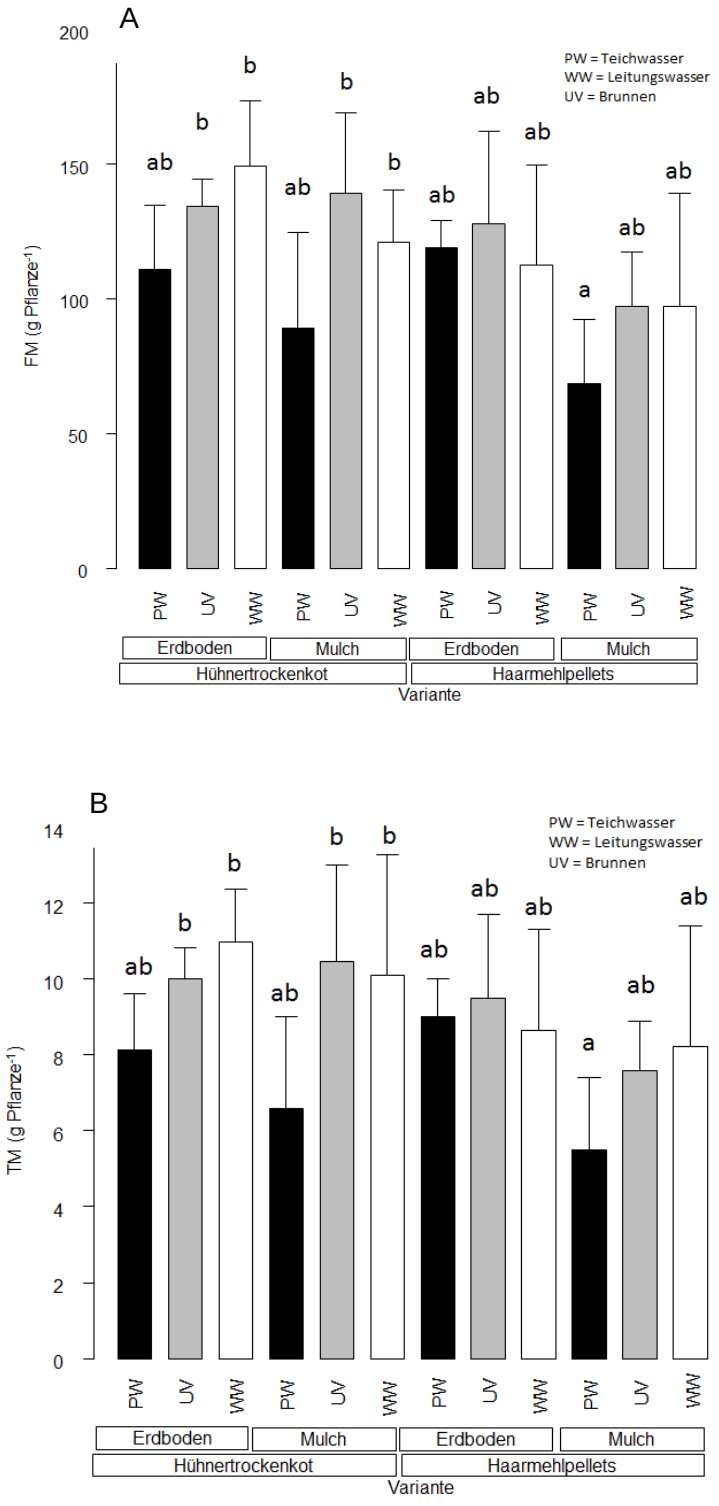


Abb. 14: (A) Frischmasse und (B) Trockenmasse des Eissalates an Termin 2 in Abhängigkeit von Bodenbedeckung Düngerart und Wasserqualität. Unterschiedliche Buchstaben geben Signifikanzen an (pairwise t-test, $p \leq 0{,}05$).

Der Nitratgehalt des Salates zur Endernte des ersten Satzes zeigte einen signifikant höheren Nitratgehalt in den mit Hühnertrockenkot gedüngten und mit Mulch abgedeckten Versuchsvarianten. Es wurde eine Interaktion von Bodenbedeckung und Düngung nachgewiesen (Abb. 15).

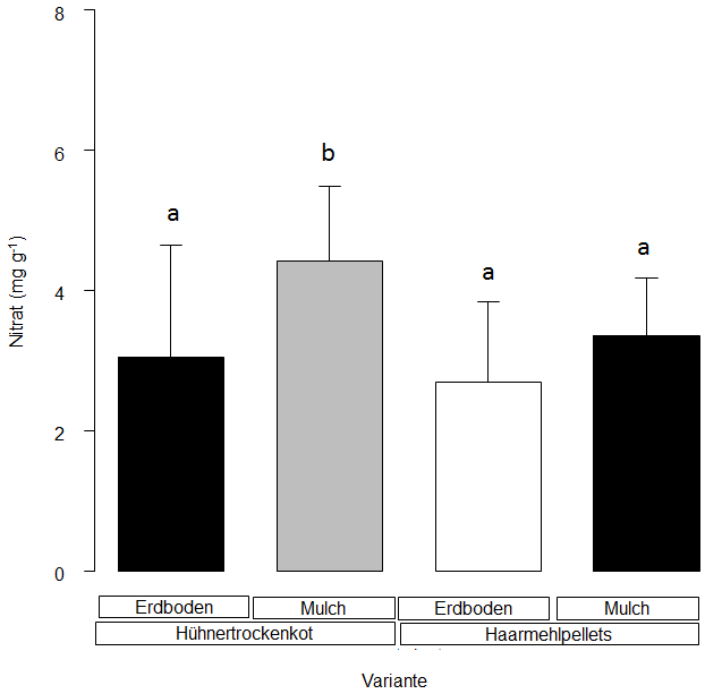


Abbildung 15: Nitratgehalt des Eissalates Satz 1 an Termin 2 in Abhängigkeit von der Düngerart und Bodenbedeckung. Unterschiedliche Buchstaben geben Signifikanzen an (pairwise t-test, $p \leq 0{,}05$)

Die Auswertung des zweiten Anbausatzes Eissalat 2013 zeigte jeweils vergleichbare Signifikanzen der Parameter Frisch- und Trockenmasse. Die Ergebnisse zeigen in Bezug auf die nachgewiesen Effekte der verwendeten Dünger und der Bodenbedeckung eine gute Reproduzierbarkeit und vergleichbare Effekte, die schon in den Eissalatsätzen 2012 und Anbausatz 1 2013 nachgewiesen werden konnten. Es wurden zusätzlich an Termin eins in Anbausatz zwei Wechselwirkungen zwischen Bodenbedeckung und Düngerart sowie zwischen Bodenbedeckung, Düngerart und Wasserqualität gefunden.

Bezogen auf den Parameter Trockenmasse zum Zeitpunkt der ersten Ernte des zweiten Anbausatzes war bei Verwendung von Haarmehlpellets die mittlere Trockenmasse unabhängig von der Bodenbedeckung etwa gleich, während bei der Verwendung von Hühnertrockenkot als Dünger die Trockenmasse der Pflanzen stark von der Bodenbedeckung beeinflusst ist. Ohne Mulchauflage werden in dieser Variante höhere mittlere Trockenmassen erzielt als in Kombination mit Mulchauflage.

Die Wechselwirkung von Bodenbedeckung und Wasserqualität bezogen auf den Parameter Trockenmasse zum Zeitpunkt der ersten Ernte des zweiten Satzes zeigt, dass die Mulchauflage in Kombination mit dem Brunnenwasser geringere mittlere Trockenmassen erzielt als ohne Mulch (Abb. 16 B). Dies ist ein Widerspruch zu den im ersten Anbausatz gefundenen Wechselwirkungen. Die beiden anderen Wasserqualitäten zeigen ebenfalls eine reduzierte Trockenmasse in Kombination mit einer Mulchabdeckung. Dieser Interaktionseffekt ist am deutlichsten bei den mit Teichwasser bewässerten Varianten ausgeprägt. Die Wechselwirkungen zwischen Düngerart und Wasserquelle zeigen ein stärker reduziertes Trockengewicht bei der Kombination Haarmehlpellets mit Leitungswasser bzw. Teichwasser im Vergleich zu der Kombination Haarmehlpellets und Brunnenwasser. Signifikante Unterschiede wurden bei den Frisch- und Trockenmassen zwischen 3 Versuchsvarianten gefunden. So wiesen die Varianten, die mit Hühnertrockenkot gedüngt ohne Bodenbedeckung und mit Brunnen- sowie mit Teichwasser bewässert wurden signifikant höhere Trocken- und Frischgewichte auf, als die Variante die mit Haarmehlpellets gedüngt wurde und ohne Bodenbedeckung kultiviert wurden und mit Brunnenwasser bewässert wurde. Zwischen allen anderen Versuchsvarianten konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. An beiden der letzten Auswertungstermine des zweiten Anbausatzes Eissalat wurden keine Wechselwirkungen in Bezug auf die Frisch- und Trockenmassen gefunden. Zudem waren am zweiten Termin die gefundenen Signifikanzen der Frisch- und Trockenmassen unterschiedlich. An dem Parameter Frischmasse ließ sich am zweiten Auswertungstermin lediglich ein Unterschied zwischen den Düngerarten feststellen (Abb. 17 A). Die mit Hühnertrockenkot gedüngten Varianten zeigten eine signifikant höhere Frischmasse. Bei dem Parameter Trockenmasse wurde zusätzlich ein Effekt der Bewässerung nachgewiesen. Die Variante mit Überkopfberegnung ohne Mulchabdeckung wies eine signifikant höhere Trockenmasse als die Versuchsvarianten mit Tropfbewässerung mit und ohne Bodenbedeckung und als die Versuchsvariante mit Überkopfbewässerung und Mulch Abdeckung auf (Abb. 17 B). An diesem Termin wurde zudem ein Unterschied in dem prozentualen Trockemasseanteil nachgewiesen. Die mit Hühnertrockenkot gedüngten Varianten hatten hier einen geringen Trockenmasseanteil von 9,3 % im Vergleich zu den mit Pellets gedüngten Pflanzen mit 11,47 %.

Die Frischmasse zur Endernte war signifikant von der Bodenbedeckung und der Düngerart beeinflusst. Die Versuchsvariante Hühnertrockenkot mit Bodenbedeckung zeigte die signifikant höchste Frischmasse (Abb. 16). In Bezug auf den Nitratgehalt zur Endernte wurde ein signifikanter Effekt von Bodenbedeckung und Düngerart festgestellt (Abb.19.) Zudem wurden Wechselwirkungen zwischen Bodenbedeckung und Bewässerung gefunden (Abb. 20).

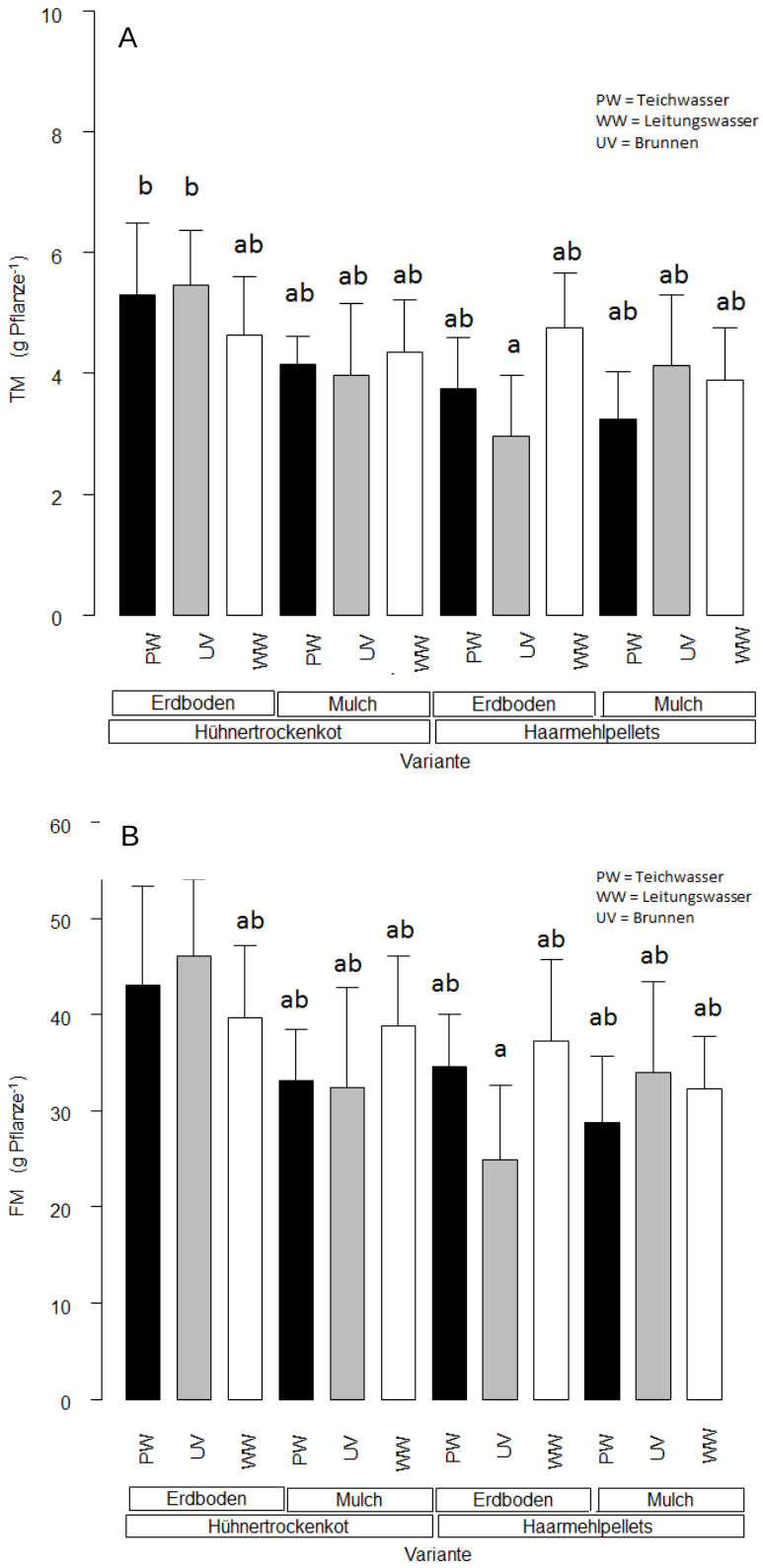


Abb. 16: (A) Frischmasse und (B) Trockenmasse des Eissalates an Termin 1 2013 in Abhängigkeit von Bodenbedeckung Düngerart und Wasserqualität. Unterschiedliche Buchstaben geben Signifikanzen an (pairwise t-test, $p \leq 0{,}05$).

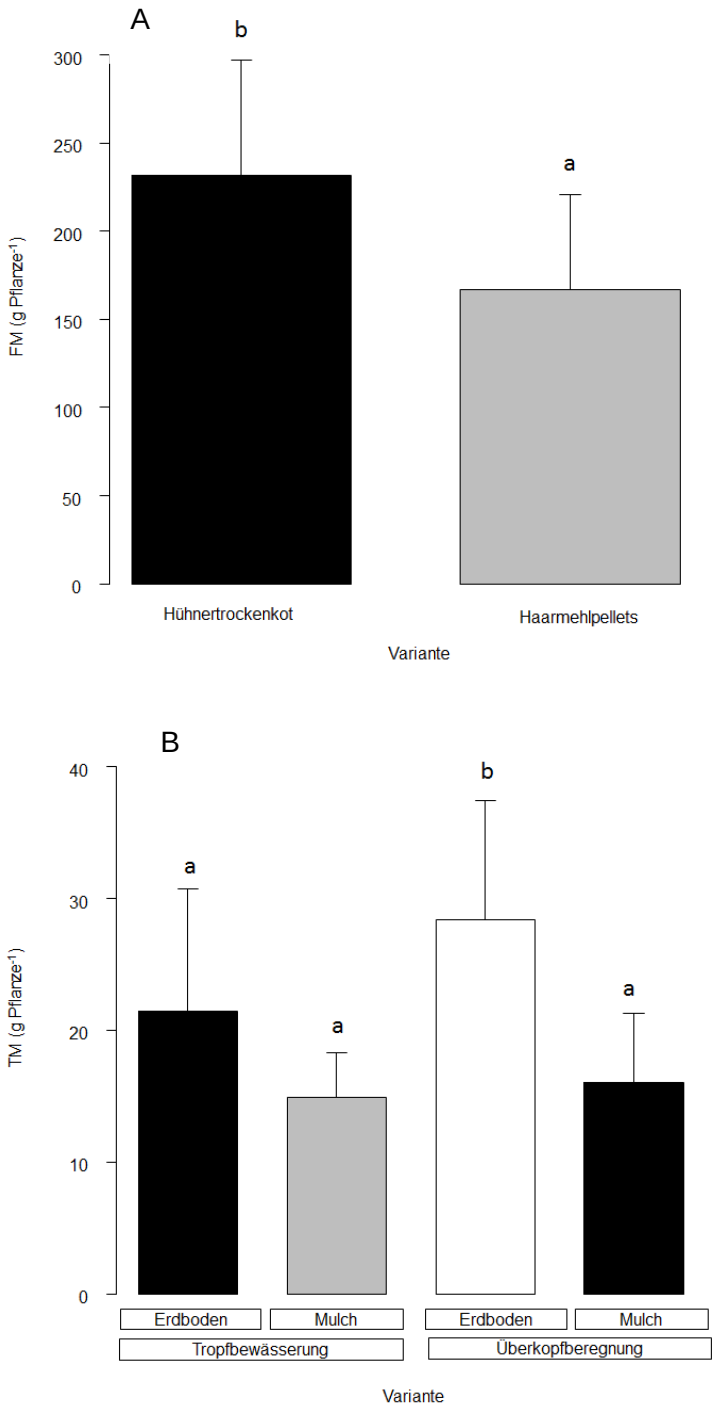


Abb. 17: (A) Frischmasse und (B) Trockenmasse des Eissalates an Termin 2 2013 in Abhängigkeit von der Düngerart. Unterschiedliche Buchstaben geben Signifikanzen an (pairwise t-test, $p \leq 0,05$).

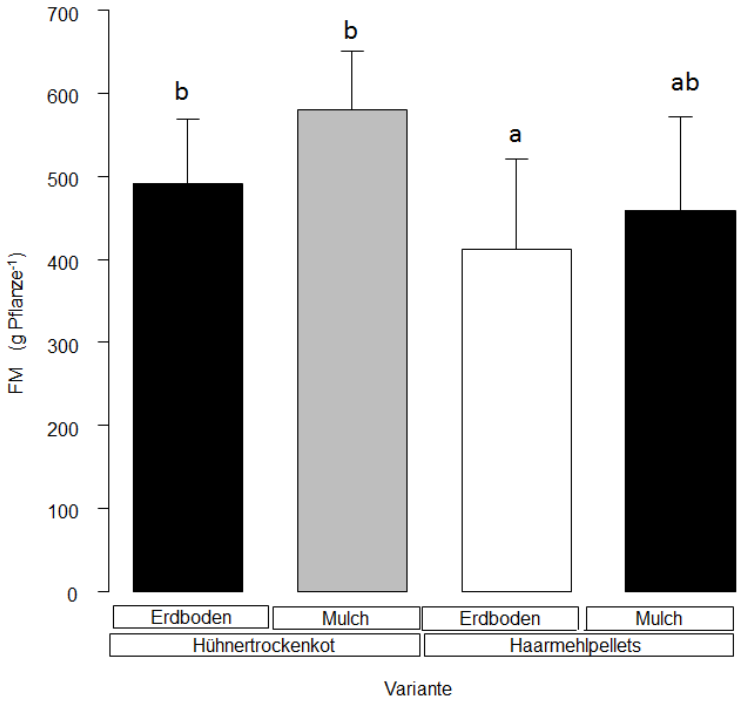


Abb. 18: Frischmasse des Eissalates an Termin 3 2013 in Abhängigkeit von der Düngerart und Bodenbedeckung. Unterschiedliche Buchstaben geben Signifikanzen an (pairwise t-test, $p \leq 0{,}05$).

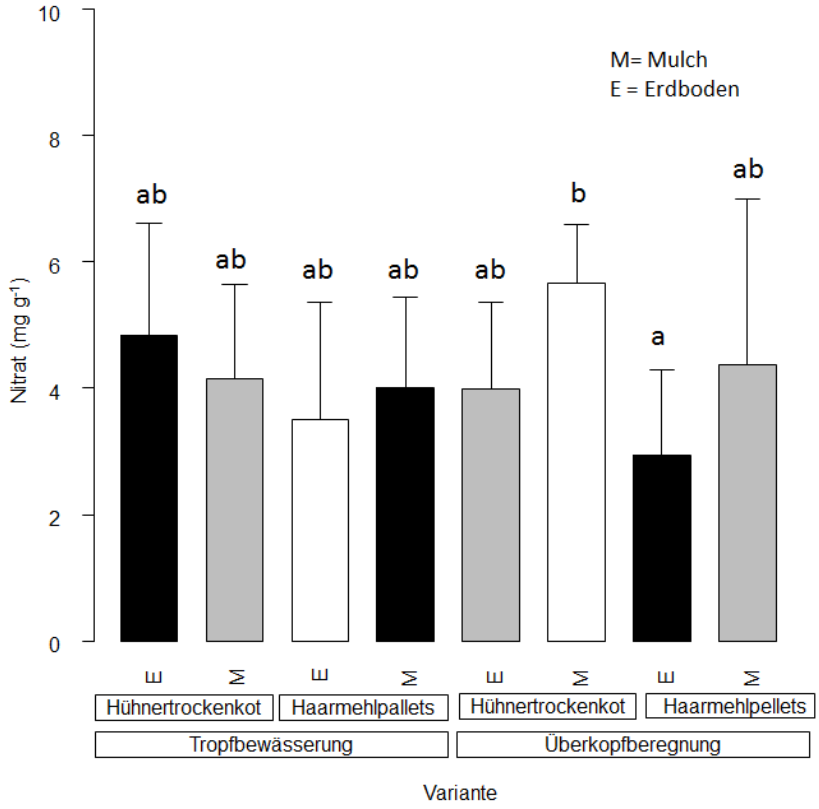


Abb. 19: Nitratgehalt des Eissalates an Termin 3 2013 in Abhängigkeit von der Düngerart und Bodenbedeckung. Unterschiedliche Buchstaben geben Signifikanzen an (pairwise t-test, $p \leq 0,05$).

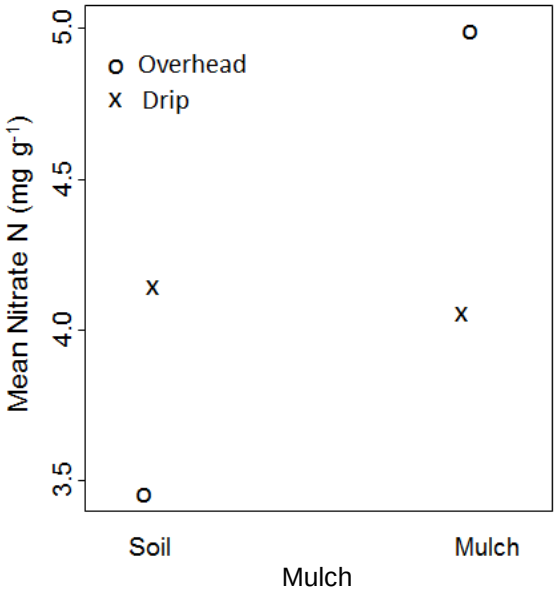


Abb. 20: Interaktionsgraphik (*signifikant*; VA, p= 0,05) bezüglich des mittleren Nitrat- N Gehalts des Eissalates in Abhängigkeit von Bodenbedeckung und Bewässerungsart. Soil = Erdboden, Mulch = Mulchabdeckung, o = Überkopfberegnung , x = Tropfbewässerung.

Pflanzenwachstum Eissalat

Zur Beschreibung des Pflanzenwachstums als ein Submodell in dem entwickelten Risikoabschätzungsmodell des Eisalates wurde eine Gompertzfunktion verwendet und an die Daten 2013 angepasst. Als Startgewicht wurde ein Frischgewicht von 5 g Pflanze^{-1} angenommen. Zunächst wurde eine generelle Wachstumsfunktion für die Kultur Eissalat angepasst (Abb. 21) und die gefundenen Wechselwirkungen nicht berücksichtig, da es nicht praktikabel erschien viele individuelle Wachstumskurven anzupassen und die Modellgüte hierdurch nicht entscheidend gesteigert wurde. Zudem konnten die gefundenen Wechselwirkungen nicht über die Anbausätze und Auswertungstermine hinweg reproduziert werden.

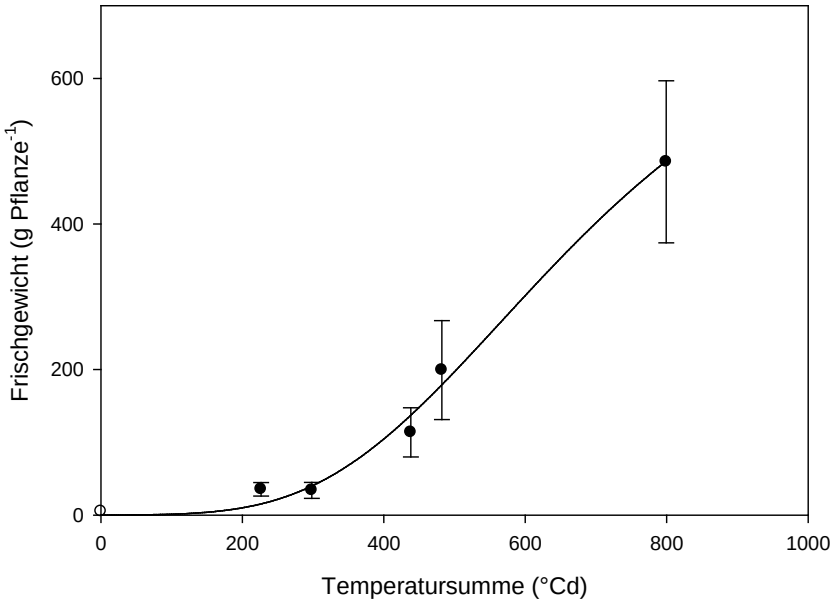


Abb. 21: Frischmassezuwachs der Kultur Eissalat beider Anbausätze in Beziehung zur Temperatursumme nach Pflanzung. Die gefüllten Kreise zeigen die gemessene Frischmasse (g Pflanze^{-1}). Die Kurve zeigt die angepasste Gompertzfunktion mit folgenden Funktionsparametern f=722.49*exp(-exp(-(x-565.96)/251.8)); R^2= 0,99.

Für die Auswertung des Pflanzenwachstums der Kultur Eissalat standen zwei Anbausätze 2014 mit insgesamt zehn Auswertungsterminen (davon 2 Starttermine mit Jungpflanzenmessung) zur Verfügung. Die Daten zeigen eine verringerte Frisch- und Trockenmasse zu Kulturbeginn des ersten Satzes durch Mulchabdeckung (Abb. 22 AB; 23 AC) durch erschwertes Anwachsen der Pflanzen durch die Abdeckung. In der Folge verwächst sich dieser Effekt und ein reduziertes Gewicht in den Mulchparzellen ist nicht weiter auffindbar.

Es wurde eine größere Pflanzenmasse in den mit Hühnertrockenkot gedüngten Parzellen im Vergleich zu den mit Haarmehlpellets gedüngten Varianten mit Ausnahme des ersten Auswertungstermins Satz 1 gefunden (Abb. 23 BD; Abb. 24 BD; Abb. 25 AB; Abb. 26 BD; Abb. 27 AB; Abb. 28 AB). Am 16.06. wurde zudem eine Interaktion zwischen Düngung und Bewässerung nachgewiesen. Die Ergebnisse der Frischmasse zeigen Effekte der verwendeten Dünger und der Bodenbedeckung und eine gute Reproduzierbarkeit mit vergleichbare Effekten, die schon in den Eissalatsätzen 2012 / 2013 nachgewiesen werden konnten (siehe Zwischenbericht 1 und 2). Es wurden Unterschiede im Trockenmasseanteil (%) abhängig von der Düngung und Bodenbedeckung ermittelt (Abb. 22CD; Abb. 23E; Abb. 24D; 26CD; Abb. 27C).

Während eine Mulchabdeckung den Trockenmasseanteil an dem ersten Auswertungstermin Satz 1 erhöht, zeigte ich an den anderen Terminen in beiden Sätzen ein erniedrigter Trockenmasseanteil der Pflanzen bei der Kultivierung auf Mulch. Eine mögliche Ursache wäre eine bessere Wasserversorgung durch die geringere Evaporation der Mulchparzellen im Vergleich zum nicht abgedeckten Erdboden. Es war aber nicht in allen Auswertungsterminen ein Unterschied im prozentualen Anteil der Trockenmasse der Versuchsvarianten auffindbar.

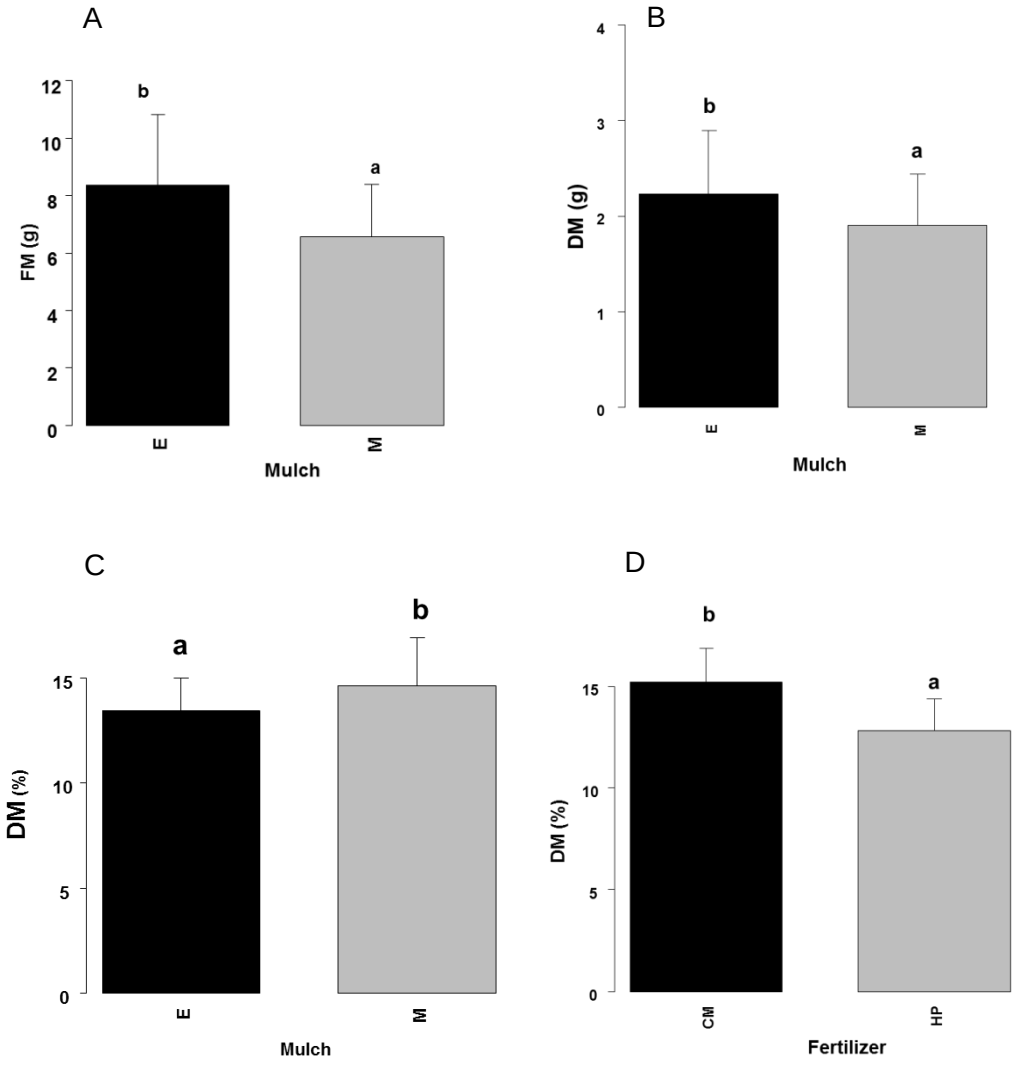


Abb. 22: (A) Frischmasse, (B) Trockenmasse und (C) Trockenmassegehalt (%) des Eissalates am 20.05.2014 in Abhängigkeit von der Bodenbedeckung, E= Erdboden, M= Mulchabdeckung. (D) Trockenmassegehalt (%) des Eissalates am 20.05.2014 in Abhängigkeit von der Düngung, CM= Hühnertrockenkot, HP= Haarmehlpellets. Unterschiedliche Buchstaben geben Signifikanzen an (*pairwise t-test*, $p \leq 0{,}05$).

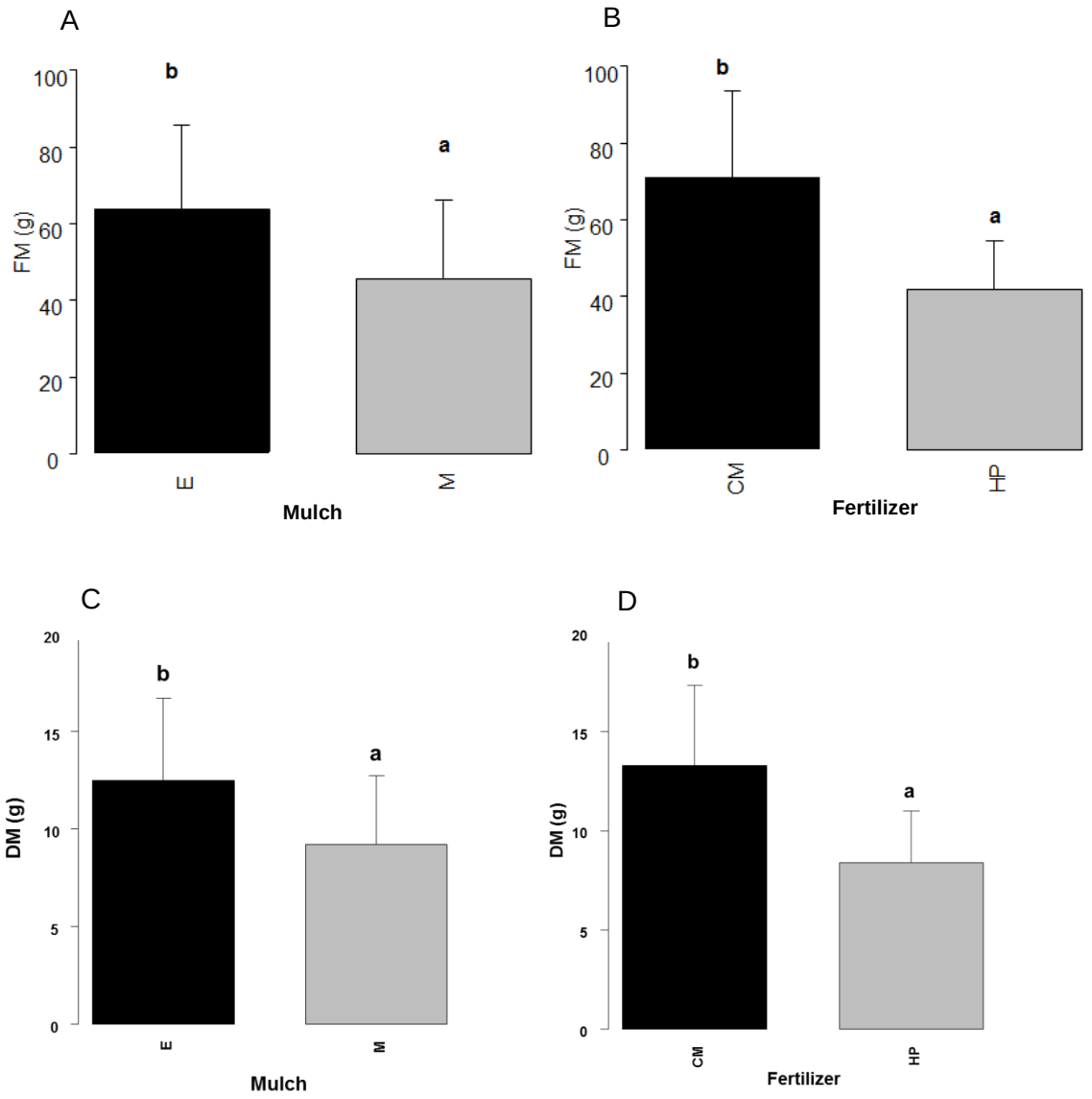
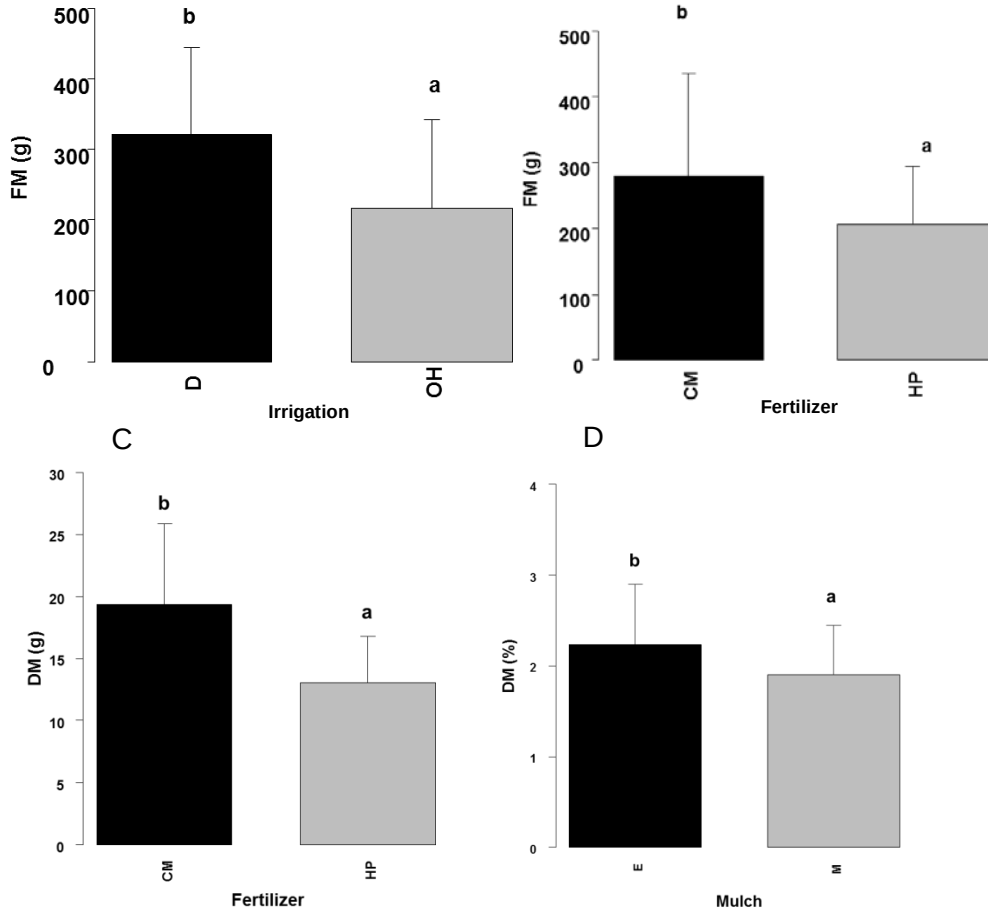


Abb. 23: (A) Frischmasse und (C) Trockenmasse des Eissalates am 02.06.2014 in Abhängigkeit von der Bodenbedeckung,
E= Erdboden, M= Mulchabdeckung.
(B) Frischmasse, (D) Trockenmasse und (E) Trockenmassegehalt (%) des Eissalates am 02.06.2014 in Abhängigkeit von der Düngung, CM= Hühnertrockenkot, HP= Haarmehlpellets. Unterschiedliche Buchstaben geben Signifikanzen an (*pairwise t-test*, $p \leq 0{,}05$).



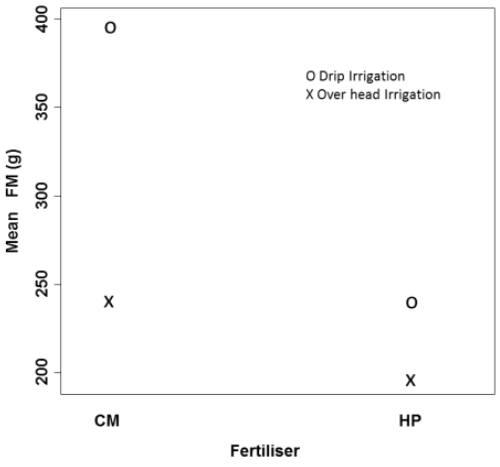


Abb. 24: (A) Frischmasse des Eissalates am 16.06.2014 in Abhängigkeit von der Bewässerungstechnik, D= Tropfbewässerung, OH= Überkopfberegnung, (B) Frischmasse und (C) Trockenmasse des Eissalates am 16.06.2014 in Abhängigkeit von der Düngung CM= Hühnertrockenkot, HP= Haarmehlpellets. (D) Trockenmassegehalt (%) des Eissalates am 02.06.2014 in Abhängigkeit von der Bodenbedeckung, E= Erdboden, M= Mulchabdeckung, Unterschiedliche Buchstaben geben Signifikanzen an (*pairwise t-test*, $p \leq 0{,}05$). (E) Interaktionsgraphik (*signifikant*; VA, p= 0,05) bzgl. der mittleren Frischmasse in Abhängigkeit von Bewässerungstechnik und Düngung.

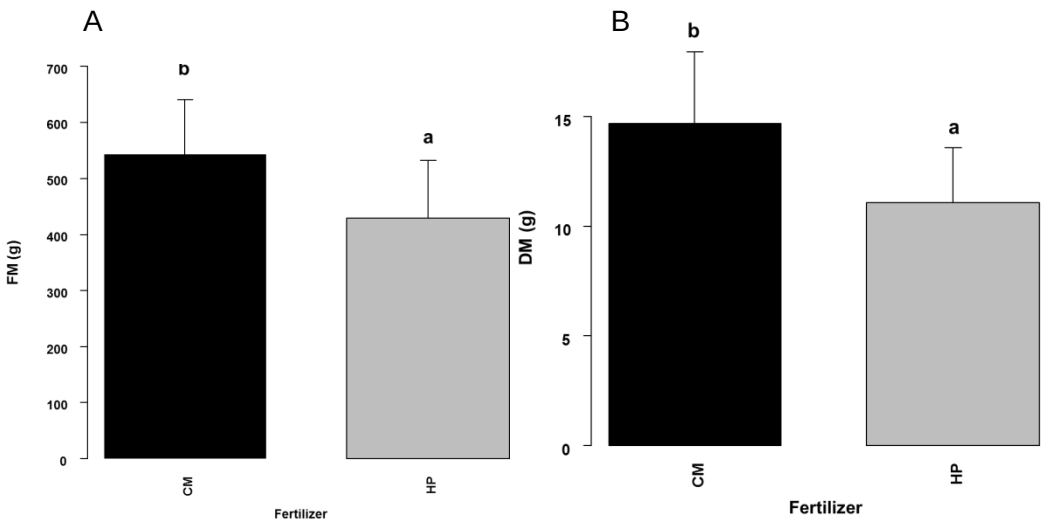


Abb. 25: (A) Frischmasse und (B) Trockenmasse des Eissalates am 30.06.2014 in Abhängigkeit von der Düngung, CM= Hühnertrockenkot, HP= Haarmehlpellets. Unterschiedliche Buchstaben geben Signifikanzen an (*pairwise t-test*, $p \leq 0{,}05$).

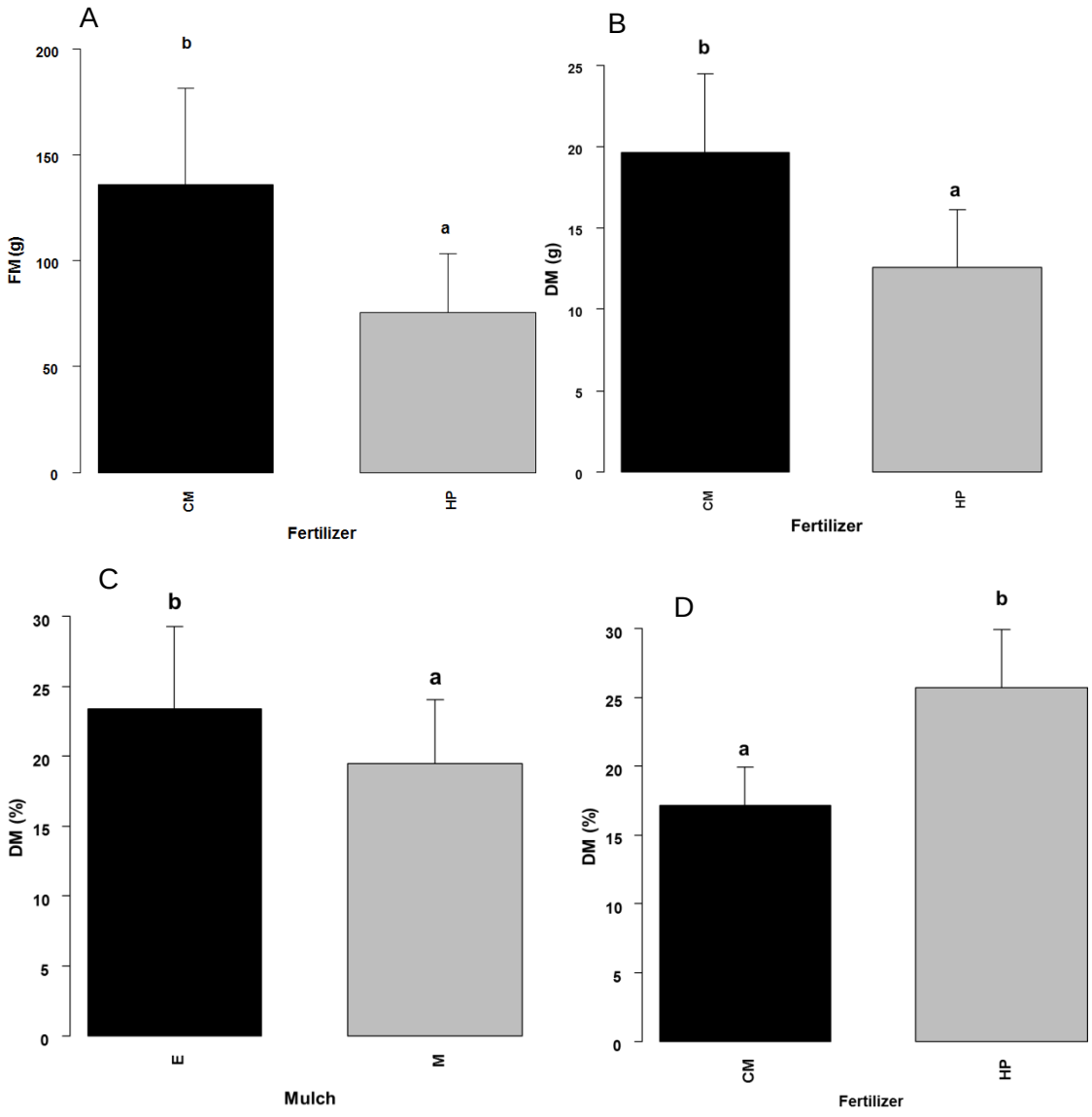


Abb. 26: (A) Frischmasse, (B) Trockenmasse und (D) Trockenmassegehalt (%) des Eissalates am 13.08.2014 in Abhängigkeit von der Düngung, CM= Hühnertrockenkot, HP= Haarmehlpellets. (C) Trockenmasse des Eissalates am 13.08.2014 in Abhängigkeit von der Bodenbedeckung E= Erdboden, M= Mulchabdeckung. Unterschiedliche Buchstaben geben Signifikanzen an (*pairwise t-test*, $p \leq 0{,}05$).

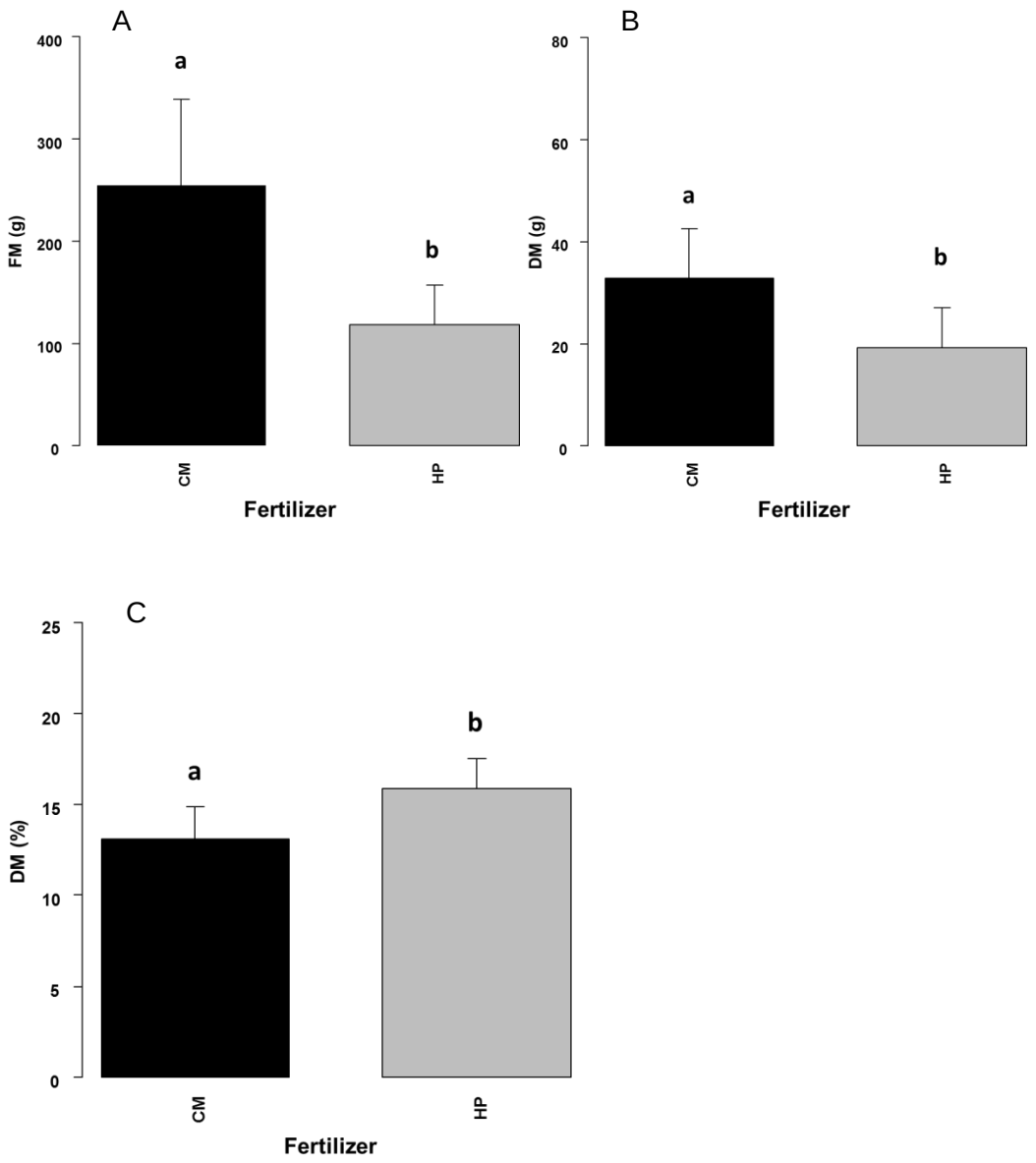


Abb. 27: (A) Frischmasse, (B) Trockenmasse) und (C) Trockenmassegehalt (%) des Eissalates am 26.08.2014 in Abhängigkeit von der Düngung, CM = Hühnertrockenkot, HP = Haarmehlpellets. Unterschiedliche Buchstaben geben Signifikanzen an (*pairwise t-test*, $p \leq 0{,}05$).

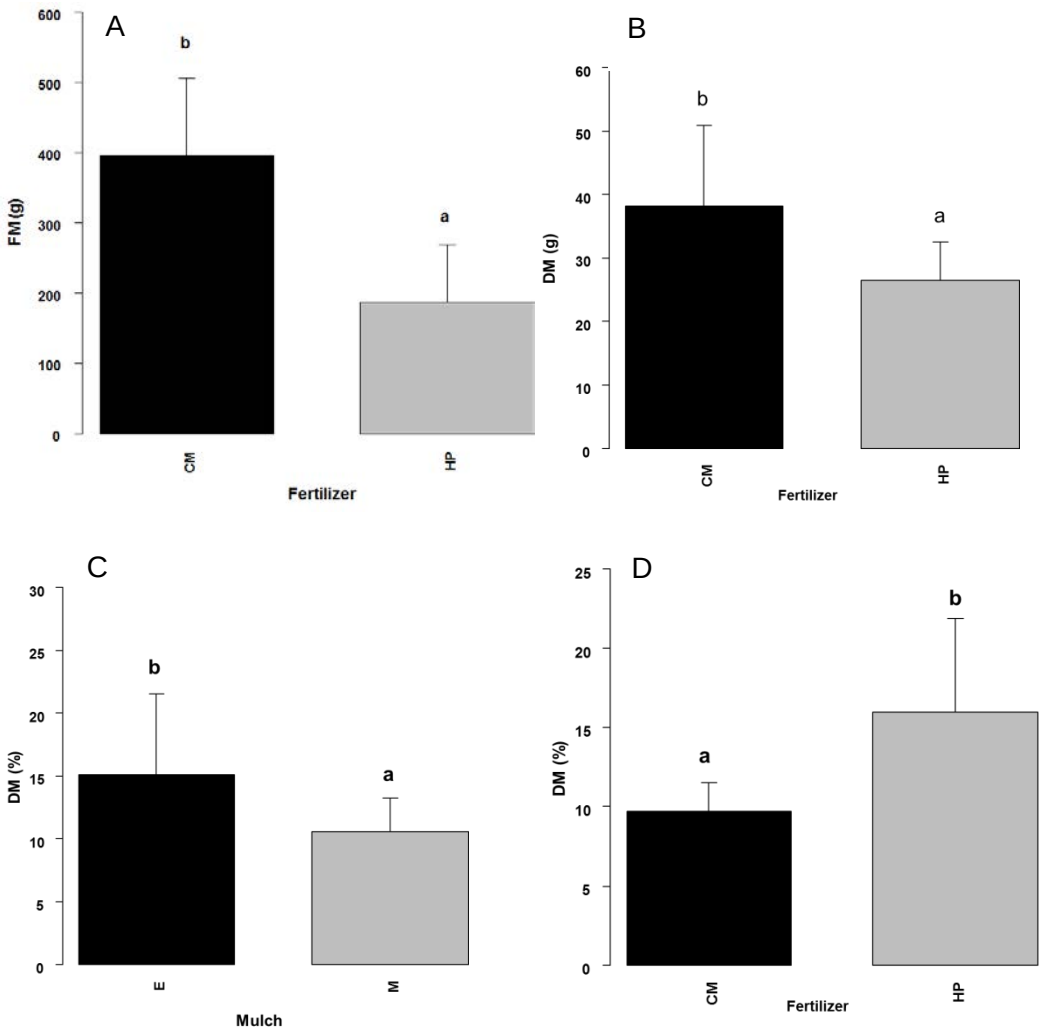


Abb. 28: (A) Frischmasse, (B) Trockenmasse und (C) Trockenmassegehalt (%) des Eissalates am 08.09.2014 in Abhängigkeit von der Düngung, CM= Hühnertrockenkot, HP= Haarmehlpellets. (D) Trockenmassegehalt (%) des Eissalates am 08.09.2014 in Abhängigkeit von der Bodenbedeckung E= Erdboden, M= Mulchabdeckung. Unterschiedliche Buchstaben geben Signifikanzen an (*pairwise t-test*, $p \leq 0{,}05$).

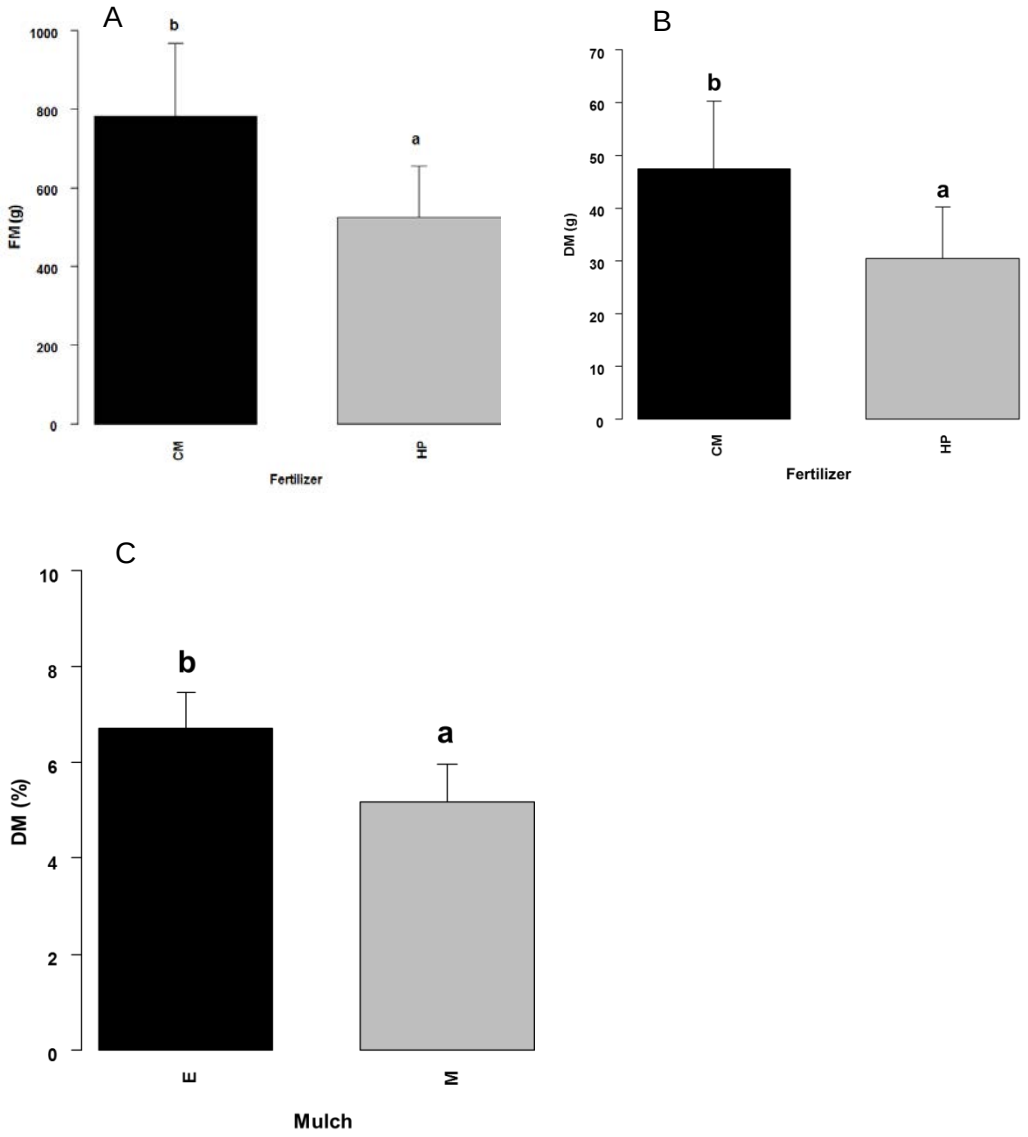


Abb. 29: (A) Frischmasse und (B) Trockenmasse des Eissalates am 23.09.2014 in Abhängigkeit von der Düngung, CM= Hühnertrockenkot, HP= Haarmehlpellets. (C) Trockenmassegehalt (%) des Eissalates am 23.09.2014 in Abhängigkeit von der Bodenbedeckung, E= Erdboden, M= Mulchabdeckung. Unterschiedliche Buchstaben geben Signifikanzen an (*pairwise t-test*, $p \leq 0{,}05$).

Der Gehalt an strukturgebenden Kohlenhydraten in Satz 1 2013 zeigte bei der Kultur Eichblattsalat einen erhöhten Gehalt bei Kultivierung ohne Bodenbedeckung (Abb.30A). Für die Kultur Eissalat wurde für den gleichen Versuchszeitraum kein Unterschied ermittelt (Abb. 31 AB). Beim zweiten Anbausatz 2013 wurde ein Dünger- und Bodenabdeckungseffekt gefunden. Ein erhöhter Gehalt an strukturgebenden Kohlenhydraten (%) wurde hier bei den mit Hühnertrockenkot gedüngten Varianten und den ohne Mulchabdeckung kultivierten Pflanzen nachgewiesen. An diesem Termin wurde zusätzlich eine Interaktion mit der gegebenen Wasserqualität ermittelt, wobei in der Kombination Teichwasser die jeweils höchsten Gehalte nachgewiesen wurden (Abb. 32).

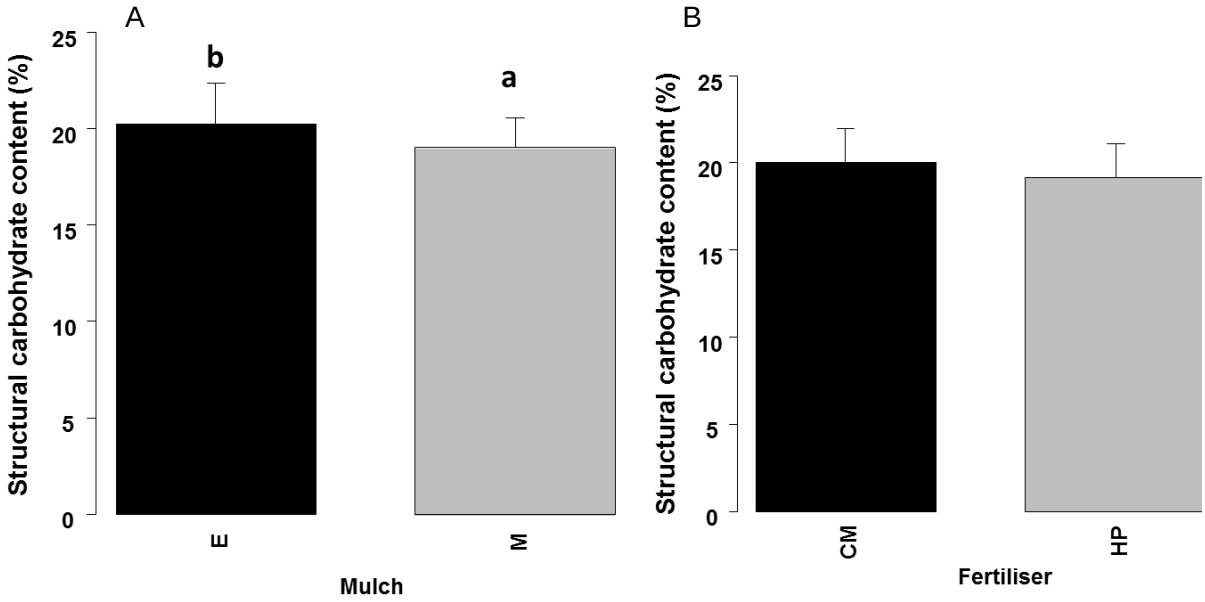


Abb. 30: Gehalt an strukturgebenden Kohlenhydraten (%) des Eichblattsalates am 03.06.2013 in Abhängigkeit von der (A) Bodenbedeckung, E= Erdboden, M= Mulchabdeckung sowie (B) der Düngung, CM= Hühnertrockenkot, HP= Haarmehlpellets. Unterschiedliche Buchstaben geben Signifikanzen an (*pairwise t-test*, $p \leq 0{,}05$).

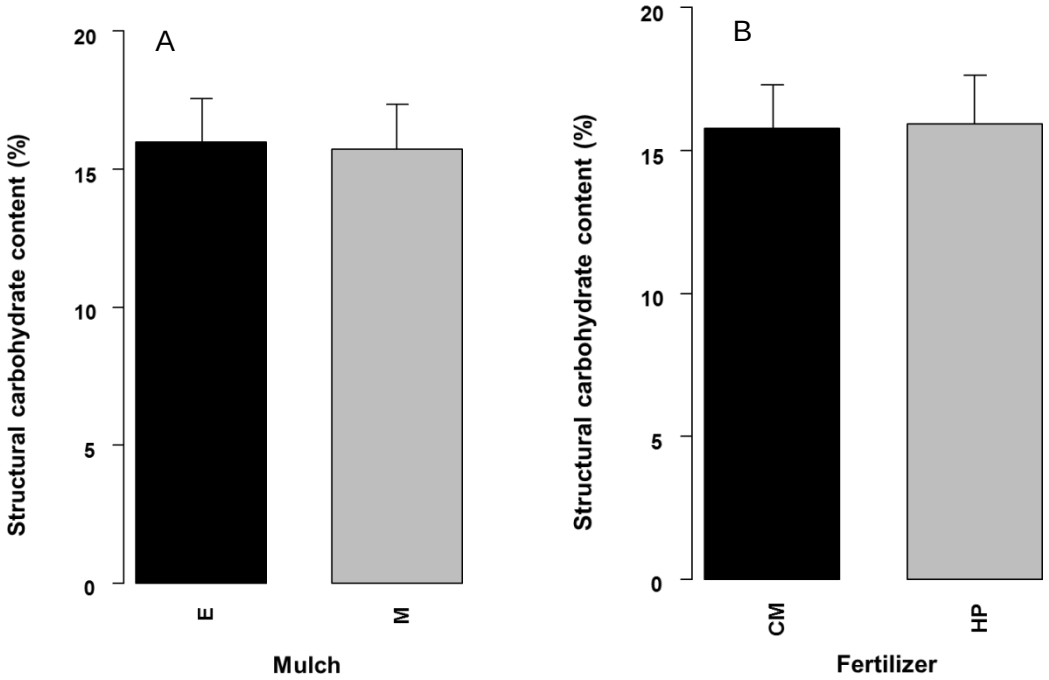


Abb. 31: Gehalt an strukturgeben Kohlenhydraten (%) des Eissalates am 03.06.2013 in Abhängigkeit von der (A) Bodenbedeckung, E= Erdboden, M= Mulchabdeckung sowie (B) der Düngung, CM= Hühnertrockenkot, HP= Haarmehlpellets. Es wurden keine Signifikanzen gefunden (*pairwise t-test*, $p \leq 0{,}05$).

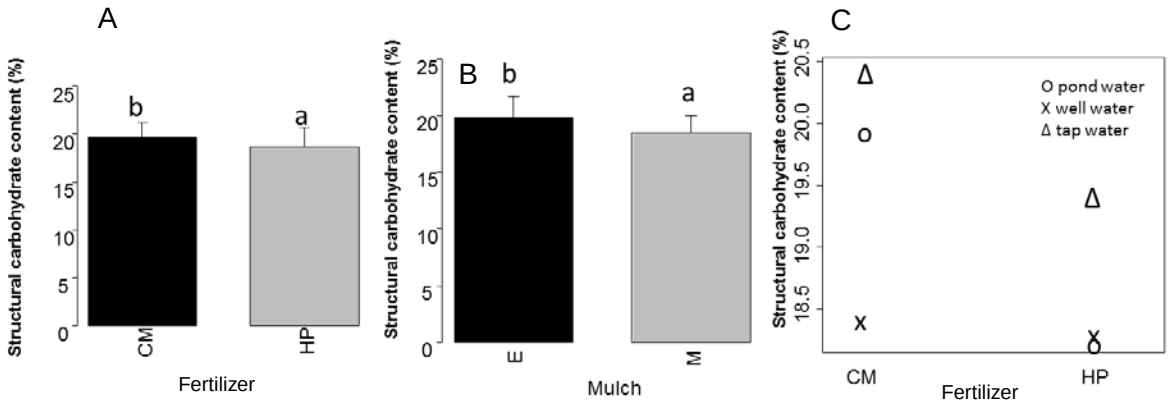


Abb. 32: Gehalt an strukturgeben Kohlenhydraten (%) des Eissalates am 05.08.2013 in Abhängigkeit von (A) der Düngung, CM= Hühnertrockenkot, HP= Haarmehlpellets sowie (B) der Bodenbedeckung, E= Erdboden, M = Mulchabdeckung. Unterschiedliche Buchstaben geben Signifikanzen an (*pairwise t-test*, $p \leq 0{,}05$). (C) Interaktionsgraphik (*signifikant*; VA, p= 0,05) bzgl. des Gehaltes an strukturgeben Kohlenhydraten (%) am 05.08.2013 in Abhängigkeit von der Düngung und der Wasserqualität, CM = Hühnertrockenkot, HP = Haarmehlpellets.

4.2 Mikrobielle Analysen Feldversuche

Aerobe mesophile Gesamtbakterienzahl

Untersuchte Wasserquellen für die Bewässerung 2012 wiesen GBZ von 4,1 logKbE * ml^{-1} für Oberflächenwasser, 3,7 logKbE * ml^{-1} für dekontaminiertes Oberflächenwasser, 4,8 logKbE * ml^{-1} für Brunnenwasser und 4,3 logKbE * ml^{-1} für Teichwasser auf. Die Analyse der Wasserproben der folgenden Jahre zeigte relativ konstante Werte für Leitungs- und Brunnenwasser mit 5,1±0,1 logKbE ml^{-1} bzw. 5,4±0,1 logKbE ml^{-1} in den Sätzen 2 2013 und 1 2014. Brunnenwasser, welches für den 2. Satz 2014 zur Bewässerung verwendet wurde, zeigte größere Schwankungen und gemessene Werte lagen zwischen 4,3 (26.08.) und 5,5 logKbE ml^{-1} (12.08.). Die ermittelten Werte für die Bewässerung verwendeten Teichwassers (2013 und 2014) zeigte Unterschiede zwischen beiden Jahren und lag bei GBZ von 5,4 und 5,7 logKbE ml^{-1} im Jahr 2013 und 3,8 bis 4,8 logKbE ml^{-1} im Jahr 2014.

Ermittlung der GBZ der verwendeten Düngern zeigte Werte von ca. 3 logKbE * g^{-1} für HMP und ca. 8 logKbE * g^{-1} für HTK.

Die Analyse der Bodenproben im Jahr 2014 ergab beim ersten Satz Werte zwischen 6,0 und 6,5 logKbE * $(g\ FM)^{-1}$ und lag im zweiten Satz mit Werten zwischen 7,2 und 8,4 logKbE * $(g\ FM)^{-1}$, wobei hier ein zunehmender Trend über die Anbauphase zu erkennen war.

Die GBZ auf Eisbergsalat lag im Jahr 2013 über alle Probennahmen hinweg im Durchschnitt zwischen 5,5 und 5,7 logCU * $(g\ FM)^{-1}$ und zeigte sich im folgenden Jahr mit Schwankungen zwischen 5,0 bis 8,1 logKbE *$(g\ FM)^{-1}$ als weniger konstant, wobei die hohen Werte in den letzten Probennahmen des zweiten Satzes ermittelt wurden. Im Jahr 2013 sowie im ersten Satz 2014 ist ein abfallender Trend der GBZ auf Eisbergsalat über die Kultivierungsphase zu erkennen, nicht jedoch im zweiten Satz 2014.
Die mittlere GBZ der anderen untersuchten Kulturen lag mit 6,7 logKbE * $(g\ FM)^{-1}$ für Eichblattsalat (Satz 1 2013), 6,2 bis 7,8 logKbE * $(g\ FM)^{-1}$ für Rucola und 6,2 bis 7,9 logKbE * $(g\ FM)^{-1}$ für Mangold über denen von Eisbergsalat. Statistische Analysen für die Kulturen Eisbergsalat, Rucola und Mangold für die Jahre 2013/2014 zeigten dass diese Unterschiede signifikant waren, ausgenommen Satz 1, 2014 bei Rucola. Anders als für Eisbergsalat ist ein abnehmender Trend der GBZ auf Rucola während der Kultivierungsphase zu erkennen.

Die GBZ auf Setzlingen von Eisbergsalat, Rucola und Mangold (Satz 2 2013, Satz 1 2014) lag im Jahr 2013 bei 5,0±0,2 logKbE * (g FM)$^{-1}$ und im Jahr 2014 bei 6,4±0,2 logKbE * (g FM)$^{-1}$ und zeigt somit eine geringere Varianz wischen den Kulturen verglichen mit den Probennahmen im Feld, aber Unterschiede zwischen den Jahren, die sich auch bei den ersten Probennahmen im Feld wiederfinden ließen.

Bei Betrachtung der Effekte der unterschiedlichen Anbauvarianten auf die Kolonisation von Bakterien konnten keine wiederkehrenden Trends erkannt werden. Während im Jahr 2012 auf Eisbergsalat- und Mangoldblättern ein Einfluss des Düngers und der Mulchauflage auf die GBZ sowie der Wasserquelle auf Rucola in einer frühen Anbauphase festgestellt wurde, konnten diese Effekte in den kommenden Anbauphasen nicht mehr gefunden werden. Einzelne, statistisch signifikante Unterschiede in den Anbauphasen 2013/2014 traten ohne erkennbare Gesetzmäßigkeit auf und waren nicht reproduzierbar (Tab. 7 und Tab. 8).

Tab. 7: Vergleich verschiedener Anbaumethoden bezüglich der aeroben mesophilen Gesamtbakterienzahl als logKbE * (g FM)$^{-1}$ von Blattgemüse während zwei Anbausätzen im Jahr 2013. Gleiche Buchstaben einer Anbaumethode und einer Kulturart (innerhalb der Spalte) unterscheiden sich nicht signifikant (ANOVA, Tukey-Test, p<0,05). Für den ersten Satz sowie die erste Probennahmen des zweiten Satzes erfolgte keine Bewässerung. Rucola und Mangold wurden ausschließlich durch Überkopfbewässerung bewässert.

		Satz 1_13				Satz 2_13							
		21.05.		03.06.		08.07.			22.07.			05.08.	
		Eisberg	Eichblatt	Eisberg	Eichblatt	Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Mangold
Dünger	HMP	5,7 A	6,7 A	5,5 A	6,6 A	5,7 A	6,1 A	6,2 A	5,5 A	6,9 A	7,0 A	5,5 A	6,8 A
	HTK	5,7 A	6,7 A	5,5 A	6,6 A	5,7 A	6,2 A	6,1 A	5,5 A	7,1 A	6,9 A	5,5 A	6,9 A
Mulch	nein	5,6 B	6,8 B	5,4 A	6,7 A	5,7 A	6,0 A	6,1 A	5,5 A	7,1 A	6,9 A	5,5 A	6,9 A
	ja	5,8 A	6,6 A	5,6 A	6,6 A	5,7 A	6,4 B	6,2 A	5,5 A	6,9 A	6,9 A	5,5 A	6,9 A
Qualität H_2O	Teich								5,6 A	6,8 A	6,9 A	5,5 A	7,0 A
	Brunnen								5,8 A	7,1 A	7,0 A	5,5 A	6,8 A
	Leitung								5,8 A	7,1 A	6,9 A	5,5 A	6,8 A
Beregnung	Überkopf								5,7 A			5,5 A	
	Tropf								5,7 A			5,5 A	

Tab.8: Vergleich verschiedener Anbaumethoden bezüglich der aeroben mesophilen Gesamtbakterienzahl als logKbE * (g FM)$^{-1}$ von Blattgemüse während zwei Anbausätzen im Jahr 2014. Gleiche Buchstaben einer Anbaumethode und einer Kulturart (innerhalb der Spalte) unterscheiden sich nicht signifikant (ANOVA, Tukey-Test, p<0,05). Für die ersten beiden Probennahmen des ersten Satz erfolgte keine Bewässerung. Rucola und Mangold wurden ausschließlich durch Überkopfbewässerung bewässert, im zweiten Satz wurde nicht mit Leitungswasser bewässert.

		Satz 1_14											Satz 2_14			
		20.05.			02.06.			16.06.			30.06.		13.08.	26.08.	09.09.	23.09.
		Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Mangold	Eisberg	Eisberg	Eisberg	Eisberg
Dünger	HMP	7,1 A	7,1 A	7,9 A	5,9 A	7,7 A	7,3 A	5,6 A	7,9 A	7,5 A	5,4 A	7,7 A	4,9 B	8,0 A	8,1 A	7,7 B
	HTK	6,9 B	7,0 A	7,8 A	6,0 A	7,2 B	7,2 A	5,5 A	7,7 A	7,1 A	5,5 A	7,4 A	5,1 A	7,9 A	8,1 A	8,1 A
Mulch	nein	6,9 A	7,1 A	7,9 A	5,9 A	7,6 A	7,5 A	5,6 A	7,9 A	7,3 A	5,5 A	7,6 A	5,0 A	8,0 A	8,1 A	7,9 A
	ja	7,0 A	7,0 A	7,8 A	6,0 A	7,3 A	7,0 B	5,5 A	7,7 A	7,3 A	5,5 A	7,5 A	5,0 A	7,9 B	8,1 A	7,9 A
Qualität H_2O	Teich							5,6 A	7,9 A	7,0 A	5,4 A	7,3 A	5,0 A	8,0 A	8,1 A	8,0 A
	Brunnen							5,6 A	7,8 A	7,3 A	5,6 A	7,6 A	5,0 A	7,9 A	8,1 A	7,8 A
	Leitung							5,5 A	7,7 A	7,5 A	5,5 A	7,8 A				
Bewässerung	Überkopf							5,5 B			5,5 A		5,0 A	8,0 A	8,1 A	8,0 A
	Tropf							5,6 A			5,5 A		5,0 A	7,9 A	8,1 A	7,8 A

Enterobactericeae

Ermittelte Werte für Enterobakterien in den verwendeten Düngern lagen unter der Nachweisgrenze von 2 logKbE * g^{-1} für HMP und bei ca. 5 logKbE * g^{-1} für HTK. Trotz der deutlichen Kontaminationsunterschiede der beiden Dünger, zeigte die Anzahl an ermittelten Enterobakterien im Boden keinen Unterschied in den verschiedenen Behandlungen. Durchschnittswerte lagen im ersten Satz 2014 zwischen 2,9 und 3,6 logKbE * g^{-1} und im zweiten Satz 2014 etwas höher bei 3,9 bis 4,3 logKbE * g^{-1}.

In den Jahren 2013 und 2014 schwankte die Anzahl an Enterobakterien auf Eisbergsalatblättern zwischen im Schnitt 3,8 und 5,3 logKbE * $(g\ FM)^{-1}$, wobei die Werte im zweiten Satz 2013 am höchsten lagen und die niedrigste Kontamination im zweiten Satz 2014 ermittelt wurde. Durchschnittswerte auf Eichblattsalat (Satz 1 2013) waren vergleichbar mit denen auf Eisbergsalat an den entsprechenden Ernteterminen und lagen bei 4,4±0,1 logKbE * $(g\ FM)^{-1}$. Ermittelte Durchschnittswerte auf Blättern von Rucola und Mangold lagen zwischen 4,4 und 5,7 bzw. 4,2 und 5,7 logKbE * $(g\ FM)^{-1}$. Sowohl im Jahr 2013 als auch 2014 war ein ansteigender Trend der Besiedelung mit Enterobakterien auf Rucolablättern im Verlauf der Anbauphase zu erkennen.

Bei Betrachtung der unterschiedlichen Anbauvarianten ließ sich im Jahr 2012 ein Einfluss der Mulchauflage auf die Enterobakterienzahl auf Rucola erkennen, wobei dieser Effekt in den folgenden Anbauphasen nicht mehr evident war. Im ersten Anbausatz 2014 konnten signifikante Unterschiede der Enterobakterienzahl auf Eisbergsalatblättern in Abhängigkeit der Düngung festgestellt werden, wobei die Applikation von HMP die Kontamination gegenüber HTK erhöhte. Andere, wiederkehrende signifikante Unterschiede der Varianten in Bezug auf die Enterobakterienzahl konnten nicht gefunden werden (Tab. 9 und Tab. 10).

Von den unterschiedlichen zur Bewässerung benutzten Wasserquellen zeigten das Oberflächenwasser sowie das Teichwasser an allen Bewässerungsterminen eine Kontamination mit *E. coli*. Werte lagen für Teichwasser in den Jahren 2013/2014 bei 1,7 bis 2,7 logMPN * $(100\ ml)^{-1}$. Brunnenwasser wurde an allen, bis auf die letzte Bewässerung des zweiten Satzes 2014 (2,7 logMPN * $(100\ ml)^{-1}$) negativ auf *E. coli* getestet. Im Leitungswasser wurde an keinem Bewässerungstermin eine Kontamination mit *E. coli* festgestellt.

HMP waren nicht mit *E. coli* belastet (Nachweisgrenze 2 logKbE * g^{-1}), wohingegen HTK Kontaminationen mit bis zu 4,5 logKbE * g^{-1} aufwies. Die Unterschiede der beiden Dünger spiegelten sich in den Bodenproben wider. Während in mit HMP gedüngten Parzellen kein Proben oberhalb der Nachweisgrenze gefunden wurden, zeigten mit HTK gedüngte Parzellen Kontaminationen mit bis zu 3,5 logKbE * g^{-1}. Diese Unterschiede konnten allerdings nicht auf den beprobten Pflanzenblättern wiedergefunden werden. Hier zeigten sich vereinzelt positive Proben, unabhängig von der Behandlung (Tab. 11 und Tab. 12Tab.). Die Kontaminationen lagen meist nahe

der Nachweisgrenze von 2 logKbE * (g FM)$^{-1}$, auf vier Proben konnten Werte über 3 logKbE * (g FM)$^{-1}$ gefunden werden. Setzlinge des zweiten Satzes 2013 zeigten Kontaminationen mit *E. coli* knapp über der Nachweisgrenze, wohingegen auf Setzlingen der anderen Sätze keine *E. coli* Bakterien nachgewiesen werden konnten.

Kolonien die der Beschreibung für Salmonellen entsprechen wurden in fast allen Bodenproben sowie auf Blattproben mit beachtlichen Mengen von bis zu über 4,0 logKbE * (g FM)$^{-1}$ gefunden.

Tab. 9: Vergleich verschiedener Anbaumethoden bezüglich *Enterobactericeae* als logKbE * (g FM)$^{-1}$ von Blattgemüse während zwei Anbausätzen im Jahr 2013. Gleiche Buchstaben einer Anbaumethode und einer Kulturart (innerhalb der Spalte) unterscheiden sich nicht signifikant (ANOVA, Tukey-Test, p<0,05). Für den ersten Satz sowie die erste Probennahmen des zweiten Satzes erfolgte keine Bewässerung. Rucola und Mangold wurden ausschließlich durch Überkopfbewässerung bewässert.

		Satz 1_13				Satz 2_13							
		21.05.		03.06.		08.07.			22.07.			05.08.	
		Eisberg	Eichblatt	Eisberg	Eichblatt	Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Mangold
Dünger	HMP	4,7 A	4,6 A	4,0 A	4,0 A	4,1 A	4,6 A	4,9 A	5,4 A	5,7 A	5,7 A	4,9 A	5,1 A
	HTK	4,7 A	4,4 A	3,9 A	4,6 A	4,5 A	4,1 A	4,9 A	5,4 A	5,7 A	5,7 A	5,0 A	5,2 A
Mulch	nein	4,6 A	4,6 A	3,9 A	4,5 A	4,6 A	4,2 A	4,9 A	5,4 A	5,7 A	5,7 A	5,1 A	5,1 A
	ja	4,7 A	4,4 A	4,0 A	4,1 A	4,0 B	4,5 A	5,0 A	5,4 A	5,7 A	5,7 A	4,9A	5,2 A
Qualität H_2O	Teich								5,3 A	5,7A	5,6 A	5,0 A	5,2 A
	Brunnen								5,4 A	5,7 A	5,7 A	5,0 A	5,1 A
	Leitung								5,5 A	5,6 A	5,7 A	4,9 A	5,0 A
Beregnung	Überkopf								5,3 A			4,9 A	
	Tropf								5,5 A			5,0 A	

Tab. 10: Vergleich verschiedener Anbaumethoden bezüglich *Enterobactericeae* als logKbE * (g FM)$^{-1}$ von Blattgemüse während zwei Anbausätzen im Jahr 2014. Gleiche Buchstaben einer Anbaumethode und einer Kulturart (innerhalb der Spalte) unterscheiden sich nicht signifikant (ANOVA, Tukey-Test, p<0,05). Für die ersten beiden Probennahmen des ersten Satz erfolgte keine Bewässerung. Rucola und Mangold wurden ausschließlich durch Überkopfbewässerung bewässert, im zweiten Satz wurde nicht mit Leitungswasser bewässert.

		Satz 1_14											Satz 2_14			
		20.05.			02.06.			16.06.			30.06.		13.08.	26.08.	09.09.	23.09.
		Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Mangold	Eisberg	Eisberg	Eisberg	Eisberg
Dünger	HMP	4,7 A	3,7 A	4,5 A	4,6 A	4,7 A	4,6 A	4,1 A	5,1 A	4,7 A	3,7 A	4,4 A	4,8 A	3,8 A	4,1 A	3,6 A
	HTK	4,0 B	3,4 A	4,3 A	4,2 B	4,2 B	4,5 A	4,2 A	5,1 A	4,6 A	3,6 A	3,9 A	5,0 A	3,8 A	4,1 A	4,1 A
Mulch	nein	4,5 A	3,5 A	4,5 A	4,3 A	4,4 A	4,6 A	4,2 A	5,1 A	4,5 A	3,6 A	4,0 A	5,0 A	3,8 A	4,1 A	4,0 A
	ja	4,3 A	3,6 A	4,3 A	4,5 A	4,5 A	4,5 A	4,1 A	5,0 A	4,7 A	3,7 A	4,3 A	4,9 A	3,8 A	4,1 A	3,7 A
Qualität H_2O	Teich							4,0 A	5,1 A	4,6 A	3,4 B	4,0 A	4,8 B	3,8 A	4,0 B	3,9 A
	Brunnen							4,3 A	5,1 A	4,5 A	4,2 A	4,1 A	5,0 A	3,8 A	4,1 A	3,8 A
	Leitung							4,1 A	5,0 A	4,8 A	3,4 B	4,5 A				
Bewässerung	Überkopf							4,2 A			3,4 B		4,9 A	3,9 A	4,1 A	3,9 A
	Tropf							4,0 A			3,9 A		4,9 A	3,7 A	4,1 A	3,8 A

Tab. 11: Vergleich verschiedener Anbaumethoden bezüglich der Anteile mit *E. coli*-positiver Proben von Blattgemüse während zwei Anbausätzen im Jahr 2013. Für den ersten Satz sowie die erste Probennahmen des zweiten Satzes erfolgte keine Bewässerung. Rucola und Mangold wurden ausschließlich durch Überkopfbewässerung bewässert.

		Satz 1_13				Satz 2_13							
		21.05.		03.06.		08.07.			22.07.			05.08.	
		Eisberg	Eichblatt	Eisberg	Eichblatt	Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Mangold
Dünger	HMP	0%	3%	3%	3%	3%	0%	0%	6%	39%	33%	11%	6%
	HTK	0%	3%	3%	6%	6%	0%	0%	17%	61%	39%	8%	11%
Mulch	nein	0%	3%	0%	6%	3%	0%	0%	19%	56%	44%	8%	11%
	ja	0%	3%	6%	3%	6%	0%	0%	3%	44%	28%	11%	6%
Qualität H_20	Teich								8%	50%	33%	13%	17%
	Brunnen								13%	58%	33%	8%	0%
	Leitung								13%	42%	33%	8%	8%
Beregnung	Überkopf								19%			11%	
	Tropf								3%			8%	

Tab. 12: Vergleich verschiedener Anbaumethoden bezüglich der Anteile mit *E. coli*-positiver Proben von Blattgemüse während zwei Anbausätzen im Jahr 2014. Für die ersten beiden Probennahmen des ersten Satz erfolgte keine Bewässerung. Rucola und Mangold wurden ausschließlich durch Überkopfbewässerung bewässert, im zweiten Satz wurde nicht mit Leitungswasser bewässert.

		Satz 1_14											Satz 2_14			
		20.05.			02.06.			16.06.			30.06.		13.08.	26.08.	09.09.	23.09.
		Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Mangold	Eisberg	Eisberg	Eisberg	Eisberg
Dünger	HMP	8%	6%	6%	0%	6%	6%	0%	6%	0%	0%	17%	21%	4%	8%	0%
	HTK	6%	6%	6%	3%	6%	0%	8%	6%	0%	0%	28%	17%	4%	4%	4%
Mulch	nein	6%	6%	11%	3%	11%	6%	3%	6%	0%	0%	22%	33%	4%	8%	4%
	ja	8%	6%	0%	0%	0%	0%	6%	6%	0%	0%	22%	4%	4%	4%	0%
Qualität H_2O	Teich							3%	0%	0%	0%	11%	13%	8%	8%	0%
	Brunnen							0%	6%	0%	0%	11%	25%	0%	4%	4%
	Leitung							6%	6%	0%	0%	22%				
Bewässerung	Überkopf							3%			0%		8%	4%	8%	0%
	Tropf							6%			0%		29%	4%	4%	4%

Coliforme Bakterien

Das analysierte Beregnungswasser zeigte deutliche Schwankungen in der Anzahl coliformer Bakterien in Bezug auf die Herkunft als auch den Zeitpunkt. Während Teichwasser bei allen Untersuchungen Kontaminationen oberhalb der oberen Nachweisgrenze von 3,4 logKbE * (100 ml)$^{-1}$ aufwies, schwankte der Wert in Leitungs- sowie Brunnenwasser zwischen unterhalb der unteren Nachweisgrenze und oberhalb der oberen Nachweisgrenze. In beiden Wasserquellen wurde die höchste Kontamination an der letzten Probennahme des zweiten Satzes 2014 ermittelt, Brunnenwasser zeigte keine Kontamination am ersten Bewässerungstermin 2013 und Leitungswasser an beiden Bewässerungsterminen des ersten Satzes 2014. Oberflächenwasser, welches im Jahr 2012 zur Bewässerung verwendet wurde, wurde positiv auf coliforme Bakterien getestet.

In den HMP konnten keine messbaren Kontaminationen mit coliformen Bakterien festgestellt werden, wohingegen in HTK Werte über 4,5 logKbE * g^{-1} gefunden wurden. In den Bodenproben wurden, unabhängig von der Düngung, im ersten Satz 2014 Werte um ca. 3 logKbE * g^{-1} ermittlet, im zweiten Satz 2014 lag die Kontamination um eine log-Stufe höher.

Analysen der Blattbesiedelung mit coliformen Bakterien zeigten Mittelwerte von 3,5 und 3,8 logKbE * (g FM)$^{-1}$ auf Eichblattsalat, 3,7 bis 4,1 logKbE * (g FM)$^{-1}$ auf Eisbergsalat, 3,6 bis 4,2 logKbE * (g FM)$^{-1}$ auf Rucola und 3,9 bis 4,3 logKbE * (g FM)$^{-1}$ auf Mangold in den Jahren 2013/2014. Trotz der geringen Schwankungen ist ein leicht ansteigender Trend in der Kontamination auf Rucola während der Anbauphase zu erkennen. Vergleiche zwischen Eisbergsalat, Rucola und Mangold in den Jahren 2013/2014 zeigten an allen Auswertungsterminen eine höhere Besiedelung auf Mangold im Vergleich zu Eisbergsalat, wobei diese Unterschiede bis auf eine Ausnahme (Satz 1 2014, 2. Auswertung) statistisch signifikant waren.

Vereinzelt auftretende, statistisch signifikante Unterschiede zwischen Behandlungen zeigten keine Konsistenz (Tab. 13 und Tab. 14).

Tab. 13: Vergleich verschiedener Anbaumethoden bezüglich der Besiedelung mit coliformen Bakterien als logKbE * (g FM)$^{-1}$ von Blattgemüse während zwei Anbausätzen im Jahr 2013. Gleiche Buchstaben einer Anbaumethode und einer Kulturart (innerhalb der Spalte) unterscheiden sich nicht signifikant (ANOVA, Tukey-Test, p<0,05). Für den ersten Satz sowie die erste Probennahmen des zweiten Satzes erfolgte keine Bewässerung. Rucola und Mangold wurden ausschließlich durch Überkopfbewässerung bewässert.

		Satz 1_13				Satz 2_13							
		21.05.		03.06.		08.07.			22.07.			05.08.	
		Eisberg	Eichblatt	Eisberg	Eichblatt	Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Mangold
Dünger	HMP	3,7 A	3,9 A	3,3 A	3,3 B	3,9 A	3,8 A	4,0 A	4,1 A	4,2 A	4,2 A	3,9 B	4,1 A
	HTK	3,7 A	3,7 A	3,2 A	3,8 A	3,7 A	3,5 A	4,1 A	4,0 A	4,2 A	4,2 A	4,0 A	4,1 A
Mulch	nein	3,7 A	3,8 A	3,5 A	3,6 A	3,7 A	3,5 A	4,1 A	4,1 A	4,2 A	4,1 A	4,2 A	4,1 A
	ja	3,7 A	3,8 A	3,4 A	3,4 B	3,9 A	3,8 A	4,1 A	4,0 A	4,2 A	4,2 A	3,7 B	4,1 A
Qualität H_2O	Teich								4,1 A	4,2 A	4,2 A	3,8 A	4,1 A
	Brunnen								4,0 A	4,2 A	4,2 A	3,7 A	4,1 A
	Leitung								4,1 A	3,9 A	4,1 A	3,7 A	4,1 A
Beregnung	Überkopf								4,0 A			3,8 A	
	Tropf								4,1 A			3,7 A	

Tab. 14: Vergleich verschiedener Anbaumethoden bezüglich der Besiedelung mit coliformen Bakterien als logKbE * (g FM)$^{-1}$ von Blattgemüse während zwei Anbausätzen im Jahr 2014. Gleiche Buchstaben einer Anbaumethode und einer Kulturart (innerhalb der Spalte) unterscheiden sich nicht signifikant (ANOVA, Tukey-Test, p<0,05). Für die ersten beiden Probennahmen des ersten Satz erfolgte keine Bewässerung. Rucola und Mangold wurden ausschließlich durch Überkopfbewässerung bewässert, im zweiten Satz wurde nicht mit Leitungswasser bewässert.

		Satz 1_14											Satz 2_14			
		20.05.			02.06.			16.06.			30.06.		13.08.	26.08.	09.09.	23.09.
		Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Mangold	Eisberg	Eisberg	Eisberg	Eisberg
Dünger	HMP	4,2 A	3,9 A	4,4 A	4,0 A	3,9 A	4,0 A	3,6 B	4,1 A	4,1 A	3,7 A	4,0 A	4,2 A	3,8 A	4,0 A	3,9 A
	HTK	3,7 B	3,3 B	4,3 A	3,8 B	3,6 B	3,8 A	3,9 A	4,2 A	4,1 A	3,7 A	4,0 A	4,1 A	3,9 A	3,9 A	4,0 A
Mulch	nein	3,9 A	3,6 A	4,3 A	3,9 B	3,8 A	4,0 A	3,7 A	4,2 A	4,1 A	3,7 A	4,1 A	4,2 A	3,8 A	3,9 A	4,0 A
	ja	4,0 A	3,6 A	4,3 A	4,0 A	3,7 A	3,9 A	3,8 A	4,1 A	4,1 A	3,7 A	4,0 A	4,1 A	4,0 A	4,0 A	4,0 A
Qualität H_2O	Teich							3,8 A	4,2 A	4,1 A	3,6 A	4,0 A	4,2 A	3,8 B	3,8 B	3,9 A
	Brunnen							3,8 A	4,2 A	3,9 A	3,7 A	4,1 A	4,1 A	4,0 A	4,1 A	4,0 A
	Leitung							3,7 A	4,1 A	4,1 A	3,8 A	4,0 A				
Bewässerung	Überkopf							3,9 A			3,6 A		4,1 A	3,9 A	4,0 A	3,9 A
	Tropf							3,7 A			3,8 A		4,2 A	3,8 A	3,9 A	4,0 A

Listeria spp.

Analysen der Bodenproben der verschiedenen Auswertungstermine 2014 ergaben Mittelwerte von ca. 5 logKbE * g^{-1} für *Listeria* spp. in beiden Sätzen. Dieser hohe Besatz führte dazu, dass ein eventuelles Vorkommen von *L. monocytogenes* nicht detektiert werden konnte. (Spezifizierung einer Kolonie auf Agar als *L. monocytogenes* erfolgt beim gewählten Medium über, neben der für *Listeria* spp. typischen Farbe, einen Hof um die Kolonie, welcher bei großer Koloniezahl nicht mehr erkennbar ist.)

Bei den verwendeten Düngern zeigte sich ein Besatz ähnlich der Bodenproben mit ca. 5 logKbE * g^{-1} für HTK, aber auch auf den HMP waren Listerien, wenn auch nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze von 2 logKbE * g^{-1} zu finden.

Blattanalysen in den Jahren 2013/2014 wiesen durchschnittliche Werte von 3,8 und 3,5 logKbE * (g FM)$^{-1}$ für Eichblattsalat, zwischen 3,4 und 3,9 logKbE * (g FM)$^{-1}$ für Eisbergsalat, zwischen 3,5 und 4,1 logKbE * (g FM)$^{-1}$ für Rucola und zwischen 3,1 und 4,1 logKbE * (g FM)$^{-1}$ für Mangold auf. Vergleiche der Kulturen Rucola und Mangold in den Anbausätzen 2013/2014 zeigten statistisch signifikant höhere Kontaminationen für Rucola mit Ausnahme eines Auswertungstermins (Satz 1 2014, 2. Auswertung).

Vergleiche der unterschiedlichen Anbauvarianten zeigten einen reduzierenden Effekt der Mulchabdeckung auf die Besiedelung von *Listeria* spp. auf Mangoldblättern in den Anbausätzen 2013/2014 (Tab. 15 und Tab. 16). Andere, wiederkehrende Effekte wurden nicht gefunden.

Kontaminationen der analysierten Blätter mit *L. monocytogenes* wurden, nahe der Nachweisgrenze von 2 logKbE (g FM)$^{-1}$ festgestellt. Bis zu 62% der Mangoldproben zeigten sich an einzelnen Probennahmeterminen als positiv. Der höchste Anteil an positiven Proben für Eisbergsalat und Rucola lag mit jeweils 31% etwas niedriger (Tab. 17 und Tab. 18). Ein vermindertes Auftreten von *L. monocytogenes* aufgrund einer Anbaumethode wurde nicht gefunden.

Tab. 15: Vergleich verschiedener Anbaumethoden bezüglich der Besiedelung mit *Listeria* spp. als logKbE * (g FM)$^{-1}$ von Blattgemüse während zwei Anbausätzen im Jahr 2013. Gleiche Buchstaben einer Anbaumethode und einer Kulturart (innerhalb der Spalte) unterscheiden sich nicht signifikant (ANOVA, Tukey-Test, p<0,05). Für den ersten Satz sowie die erste Probennahmen des zweiten Satzes erfolgte keine Bewässerung. Rucola und Mangold wurden ausschließlich durch Überkopfbewässerung bewässert.

		Satz 1_13				Satz 2_13							
		21.05.		03.06.		08.07.			22.07.			05.08.	
		Eisberg	Eichblatt	Eisberg	Eichblatt	Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Mangold
Dünger	HMP	3,0 A	3,5 A	3,1 A	3,0 A	3,5 A	3,5 A	3,3 A	3,8 B	4,1 A	3,6 A	3,8 A	4,1 A
	HTK	2,9 A	3,3 B	2,8 B	3,1 A	3,4 A	3,5 A	3,2 A	4,0 A	4,1 A	3,7 A	3,7 B	4,1 A
Mulch	nein	3,3 A	3,4 A	3,0 A	3,2 A	3,3 B	3,5 A	3,3 A	4,0 A	4,1 A	3,9 A	3,8 A	4,1 A
	ja	2,6 B	3,3 B	2,9 A	3,0 B	3,6 A	3,5 A	3,2 A	3,8 B	4,1 A	3,4 B	3,7 B	4,1 A
Qualität H_2O	Teich								3,8 A	4,1 A	3,7 A	3,8 A	4,0 A
	Brunnen								3,9 A	4,1 A	3,5 A	3,6 A	4,1 A
	Leitung								4,0 A	4,0 A	3,8 A	3,7 A	4,1 A
Beregnung	Überkopf								3,9 A			3,8 A	
	Tropf								3,9 A			3,7 A	

Tab. 16: Vergleich verschiedener Anbaumethoden bezüglich der Besiedelung mit *Listeria* spp. als logKbE * (g FM)$^{-1}$ von Blattgemüse während zwei Anbausätzen im Jahr 2014. Gleiche Buchstaben einer Anbaumethode und einer Kulturart (innerhalb der Spalte) unterscheiden sich nicht signifikant (ANOVA, Tukey-Test, p<0,05). Für die ersten beiden Probennahmen des ersten Satz erfolgte keine Bewässerung. Rucola und Mangold wurden ausschließlich durch Überkopfbewässerung bewässert, im zweiten Satz wurde nicht mit Leitungswasser bewässert.

		Satz 1_14											Satz 2_14			
		20.05.			02.06.			16.06.			30.06.		13.08.	26.08.	09.09.	23.09.
		Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Mangold	Eisberg	Eisberg	Eisberg	Eisberg
Dünger	HMP	4,0 A	4,0A	3,6 A	3,8 A	3,6 A	3,4 A	3,6 A	3,5 A	3,2 A	3,7 A	3,1 A	3,9 A	3,9 A	3,4 B	3,3 B
	HTK	3,7 B	3,8 A	3,6 A	3,7 A	3,4 B	3,4 A	3,2 B	3,6 A	3,1 A	3,3 A	3,1 A	4,0 A	4,0 A	3,7 A	3,8 A
Mulch	nein	3,8 A	4,0 A	3,9 A	3,7 A	3,6 A	3,6 A	3,2 B	3,6 A	3,3 A	3,4 A	3,2 A	4,0 A	4,0 A	3,6 A	3,2 B
	ja	3,9 A	3,7 A	3,3 B	3,8 A	3,3 B	3,2 B	3,6 A	3,5 A	3,1 B	3,6 A	3,0 A	3,9 B	3,9 B	3,4 B	3,9 A
Qualität H_2O	Teich							3,5 A	3,4 A	3,2 A	3,5 A	3,1 A	3,9 B	3,9 B	3,6 A	3,9 A
	Brunnen							3,3 A	3,5 A	3,3 A	3,3 A	3,0 A	4,0 A	4,0 A	3,5 A	3,5 A
	Leitung							3,4 A	3,7 A	3,1 A	3,7 A	3,3 A				
Bewässerung	Überkopf							3,4 A			3,5 A		3,9 A	3,9 A	3,5 A	3,6 A
	Tropf							3,5 A			3,5 A		4,0 A	4,0 A	3,6 A	3,5 A

Tab. 17: Vergleich verschiedener Anbaumethoden bezüglich der Anteile mit *L. monocytogenes*-positiver Proben von Blattgemüse während zwei Anbausätzen im Jahr 2013. Für den ersten Satz sowie die erste Probennahmen des zweiten Satzes erfolgte keine Bewässerung. Rucola und Mangold wurden ausschließlich durch Überkopfbewässerung bewässert.

		Satz 1_13				Satz 2_13							
		21.05.		03.06.		08.07.			22.07.			05.08.	
		Eisberg	Eichblatt	Eisberg	Eichblatt	Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Mangold
Dünger	HMP	3%	3%	0%	3%	14%	17%	17%	19%	11%	6%	25%	56%
	HTK	0%	3%	0%	0%	0%	0%	17%	22%	11%	6%	14%	67%
Mulch	nein	3%	6%	0%	3%	14%	11%	28%	14%	11%	6%	33%	67%
	ja	0%	0%	0%	0%	0%	6%	6%	28%	11%	6%	6%	56%
Qualität H_2O	Teich								25%	8%	0%	25%	75%
	Brunnen								25%	17%	8%	17%	58%
	Leitung								13%	8%	8%	17%	50%
Beregnung	Überkopf								19%			11%	
	Tropf								22%			28%	

Tab. 18: Vergleich verschiedener Anbaumethoden bezüglich der Anteile mit *L. monocytogenes*-positiver Proben von Blattgemüse während zwei Anbausätzen im Jahr 2014. Für die ersten beiden Probennahmen des ersten Satz erfolgte keine Bewässerung. Rucola und Mangold wurden ausschließlich durch Überkopfbewässerung bewässert, im zweiten Satz wurde nicht mit Leitungswasser bewässert.

		Satz 1_14											Satz 2_14			
		20.05.			02.06.			16.06.			30.06.		13.08.	26.08.	09.09.	23.09.
		Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Mangold	Eisberg	Eisberg	Eisberg	Eisberg
Dünger	HMP	28%	33%	44%	31%	39%	11%	14%	28%	50%	6%	17%	25%	4%	0%	0%
	HTK	31%	28%	17%	19%	17%	11%	8%	33%	61%	6%	33%	8%	29%	0%	0%
Mulch	nein	33%	22%	39%	11%	33%	17%	14%	33%	50%	8%	22%	13%	17%	0%	0%
	ja	25%	39%	22%	39%	22%	6%	8%	28%	61%	3%	28%	21%	17%	0%	0%
Qualität H_2O	Teich							17%	33%	58%	0%	17%	17%	13%	0%	0%
	Brunnen							13%	33%	58%	8%	17%	17%	21%	0%	0%
	Leitung							4%	25%	50%	8%	42%				
Bewässerung	Überkopf							25%			6%		13%	25%	0%	0%
	Tropf							6%			6%		21%	8%	0%	0%

Enterococcus spp.

Von den im Jahr 2012 verwendeten Wasserquellen wiesen Oberflächenwasser sowie Teichwasser messbare Konzentrationen mit Enterokokken auf, wohingegen das Brunnenwasser keine Enterokokken oberhalb der unteren Nachweisgrenze enthielt. Auch in den Jahren 2013/2014 wurde Teichwasser positiv auf Enterokokken getestet, Werte lagen zwischen 1,0 und 1,8 logMPN * $(100\ ml)^{-1}$. Während Brunnenwasser im Jahr 2013 an beiden Bewässerungsdaten negativ auf Enterokokken getestet wurde, lagen Werte im ersten Satz 2014 knapp über der Nachweisgrenze und im zweiten Satz 2014 bewegten sich die Werte von unterhalb der Nachweisgrenze bis zu 2,0 logMPN * $(100\ ml)^{-1}$. In Leitungswasser wurde im Jahr 2013 an beiden Bewässerungsterminen eine Enterokokkenkontamination festgestellt (3,0 und 0,2 logMPN * $(100\ ml)^{-1}$), nicht jedoch im Jahr 2014.

Analysen der Düngerproben ergab Kontaminationen nahe oder unterhalb der Nachweisgrenze für HMP und Werte bis zu über 7 logKbE * g^{-1} für HTK. Bodenproben wiesen über beide Sätze hinweg Werte um die 5,5 logKbE * g^{-1} für Enterokokken auf.

Eichsalatblätter zeigten Mittelwerte für Enterokokken von 4,0 und 4,4 logKbE * $(g\ FM)^{-1}$. Auf Eisbergsalat schwankten die Mittelwerte teils beträchtlich zwischen den Probennahmen. In den Jahren 2013/2014 wurde im ersten Satz 2013 der niedrigste Mittelwert mit 2,0 logKbE * $(g\ FM)^{-1}$ gefunden, gefolgt von 3,0 logKbE * $(g\ FM)^{-1}$ am letzten Probennahmedatum 2014. Bis auf einen höheren Wert von 5,0 logKbE * $(g\ FM)^{-1}$ (erste Probennahme, 2. Satz 2014) bewegten sich die Besiedlungen mit Enterokokken ansonsten zwischen 4,1 und 4,7 logKbE * $(g\ FM)^{-1}$. Ein abnehmender Trend auf Eisbergsalatblättern im Laufe der Anbauphase war in allen Sätzen 2013/2014 zu erkennen. Auf Rucolablättern wurden Mittelwerte zwischen 4,5 und 5,2 logKbE * $(g\ FM)^{-1}$ gefunden, auf Mangoldblättern schwankte der Besatz wieder etwas mehr und nahm Werte zwischen 3,6 und 5,2 logKbE * $(g\ FM)^{-1}$ ein.

Geringe Unterschiede zwischen den verschiedenen Anbauvarianten waren nur vereinzelt statistisch signifikant und folgten keinem erkennbaren Muster (Tab. 19Tab. und Tab. 20).

Tab. 19: Vergleich verschiedener Anbaumethoden bezüglich der Besiedelung mit *Enterococcus* spp. als logKbE * (g FM)$^{-1}$ von Blattgemüse während zwei Anbausätzen im Jahr 2013. Gleiche Buchstaben einer Anbaumethode und einer Kulturart (innerhalb der Spalte) unterscheiden sich nicht signifikant (ANOVA, Tukey-Test, p<0,05). Für den ersten Satz sowie die erste Probennahmen des zweiten Satzes erfolgte keine Bewässerung. Rucola und Mangold wurden ausschließlich durch Überkopfbewässerung bewässert.

		Satz 1_13				Satz 2_13							
		21.05.		03.06.		08.07.			22.07.			05.08.	
		Eisberg	Eichblatt	Eisberg	Eichblatt	Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Mangold
Dünger	HMP	3,7 A	4,0 B	1,8 A	3,8 A	4,7 A	4,7 A	4,6 A	4,8 A	5,2 A	5,2 A	4,2 A	4,4 A
	HTK	3,7 A	4,1 A	2,2 A	3,8 A	4,7 A	4,3 A	4,8 A	4,5 B	5,2 A	5,2 A	3,9 A	4,1 A
Mulch	nein	3,8 A	4,0 B	1,6 A	3,8 A	4,8 A	4,3 A	4,8 A	4,7 A	5,2 A	5,1 A	4,1 A	4,2 A
	ja	3,7 A	4,1 A	2,4 A	3,7 A	4,6 B	4,7 A	4,6 A	4,6 A	5,2 A	5,2 A	4,0 A	4,3 A
Qualität H_2O	Teich								4,8 A	5,2 A	5,2 A	4,2 A	4,3 A
	Brunnen								4,6 A	5,2 A	5,2 A	4,0 A	4,4 A
	Leitung								4,6 A	5,2 A	5,1 A	4,0 A	4,0 A
Beregnung	Überkopf								4,6 A			4,1 A	
	Tropf								4,7 A			4,0 A	

Tab. 20: Vergleich verschiedener Anbaumethoden bezüglich der Besiedelung mit *Enterococcus* spp. als logKbE * (g FM)$^{-1}$ von Blattgemüse während zwei Anbausätzen im Jahr 2014. Gleiche Buchstaben einer Anbaumethode und einer Kulturart (innerhalb der Spalte) unterscheiden sich nicht signifikant (ANOVA, Tukey-Test, p<0,05). Für die ersten beiden Probennahmen des ersten Satz erfolgte keine Bewässerung. Rucola und Mangold wurden ausschließlich durch Überkopfbewässerung bewässert, im zweiten Satz wurde nicht mit Leitungswasser bewässert.

		Satz 1_14											Satz 2_14			
		20.05.			02.06.			16.06.			30.06.		13.08.	26.08.	09.09.	23.09.
		Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Rucola	Mangold	Eisberg	Mangold	Eisberg	Eisberg	Eisberg	Eisberg
Dünger	HMP	4,7 A	4,8 A	4,7 A	4,6 A	4,9 A	4,3 A	4,1 A	4,9 A	3,9 A	3,7 A	3,5 A	4,8 B	4,1 A	4,0 A	2,9 A
	HTK	4,0 B	4,8 A	4,6 A	4,2 B	4,3 B	4,0 A	4,2 A	5,0 A	4,0 A	3,6 A	3,7 A	5,1 A	4,0 A	4,1 A	3,1 A
Mulch	nein	4,5 A	4,8 A	4,8 A	4,3 A	4,6 A	4,3 A	4,2 A	5,0 A	4,0 A	3,6 A	3,7 A	5,0 A	4,3 A	4,2 A	3,0 A
	ja	4,3 A	4,8 A	4,5 A	4,5 A	4,6 A	4,1 A	4,1 A	5,0 A	3,9 A	3,7 A	3,5 A	4,9 A	3,8 B	3,9 B	2,9 A
Qualität H_2O	Teich							4,0 A	5,0 A	3,8 A	3,4 B	3,3 A	4,9 A	4,0 A	4,0 A	3,1 A
	Brunnen							4,3 A	4,9 A	3,9 A	4,2 A	3,8 A	5,0 A	4,0 A	4,1 A	2,8 A
	Leitung							4,1 A	4,9 A	4,1 A	3,4 B	3,7 A				
Bewässerung	Überkopf							4,2 A			3,4 B		4,9 A	4,2 A	4,1 A	3,0 A
	Tropf							4,0 A			3,9 A		5,0 A	3,9 B	4,0 A	3,0 A

4.3 Modellierung der Befallsdynamik *E.coli*

Im letzten Quartal 2013 wurde eine erste Modellstruktur anhand von Literaturstudien (u.a. Liu et al., 2013; Baranyi et al., 1995; Ratkowsky et al., 1982) ausgearbeitet. Anhand der vorhandenen Daten war keine Modellparametrisierung der Submodelle Boden-, Wasser- und Pflanzenkontamination möglich, da die gefundenen Kontaminationen mit *E.coli* keinem in den Daten erkennbarem Muster folgten und nicht auf einzelne Faktorkombinationen rückführbar waren. Die Gründe hierfür sind zum einem die insgesamt sehr niedrigen Kontaminationswerte (nahe der Nachweisgrenze, siehe Mikrobiologie) zum anderen die starke Streuung der Werte. In den meisten Fällen wurde eine zufällige Kontamination in einer Einzelwiederholung gefunden, diese war jedoch nicht zwischen Wiederholungen oder Anbausätzen reproduzierbar. In den Anbausätzen 2014 konnte kein signifikanter Einfluss einzelner Versuchsfaktoren oder Faktorkombinationen im Feldversuch auf den Befall mit *E.coli* ermittelt werden. Die Betrachtung von kritischen Einzelwerten (CFU/g >1000) zeigt besonders kritische Faktorkombinationen (Tabelle 21). Hierbei ist auffällig, dass alle kritischen Proben in Parzellen gefunden wurden, die mit Mulch abgedeckt und mit Hühnertrockenkot gedüngt wurden. Eine mögliche Erklärung liefern Feldbeobachtungen, die zum einem einen geringeren Wildverbiss auf Parzellen mit Haarmehlpellets zeigen, sowie Berichte des Praxispartners demzufolge Haarmehlpellets eine abschreckende Wirkung auf Wild haben. Beobachtungen zeigten deutliche Präferenzen der Wildtiere in Richtung Mulchabdeckung und Hühnertrockenkot. Hier wurden zudem in allen Versuchsjahren vermehrt Kotspuren gefunden (Foto 1 und 2).

Tab. 21: Faktorkombination mit einer *E.coli* Belastung oberhalb des Warnwertes der Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (CFU/g >1000).

Datum	Satz	Düngung	Mulch	Waterqualität	Bewässerungstechnik	CFU / g	Log CFU/g
08.07.2012	2_12	Hühnertrockenkot	Ja	Brunnen	Überkopf	2882	3.5
08.07.2013	2_13	Hühnertrockenkot	Ja	Brunnen	Überkopf	1145	3.1
16.06.2014	1_14	Hühnertrockenkot	Ja	Teich	Tropf	2132	3.3
13.08.2014	2_14	Hühnertrockenkot	Ja	Teich	Tropf	19695	4.3

Foto 1 und 2: Vermehrter Wildverbiss und Kotspuren auf den mit Mulch abgedeckten und mit Hühnertrockenkot gedüngten Parzellen.

4.4 Korrelationsanalysen Wetterdaten und *E.coli*

Zur weiteren Analyse und zur Ableitung von Zusammenhängen für die Modellparametrisierung in Bezug auf wetterabhängiges Bakterienwachstum und -absterben erfolgte eine Korrelationsanalyse zwischen der gefundenen *E .coli* Keimzahlen (Log CFU g^{-1}) und der Temperatursumme seit Pflanzung, der Maximaltemperatur der letzten Woche, der mittleren Temperatur der letzten Woche, der Niederschlagssumme, der mittleren Temperatur und des Niederschlags zwischen einzelnen Auswertungsterminen sowie der Fracht an *E.coli* die sich aus gefunden Keimzahlen in den Wasserproben und der Beregnungsmenge ergab.

Dabei wurden hauptsächlich negative Korrelationen gefunden und ein guter Zusammenhang nur für ein wetterabhängiges Absterben der Keime bei zuvor relativ hoher Kontamination zu Kulturbeginn gefunden (Tabelle 22).

Tab. 22: Korrelationsmatrix im Bezug der gefunden *E .coli* Keimzahlen (Log CFU g^{-1})

Kultur		*Temp Sum*	*Tmax 7 days*	*Tmean 7 days*	*Rain Sum 7 days*	*Tmean date-date*	*Rain date_date*	*E coli Water*
Eissalat	Satz 2 2013	0.06	0.07	0.06	-0.06	0.05	-0.04	-0.07
Eissalat	Satz 1 2013	0.12	-0.12	-0.12	-0.12	-0.12	0.12	/
Eichblatt	Satz 1 2013	0.05	-0.05	-0.05	-0.05	-0.05	0.05	/
Rauke	Satz 2 2013	-0.79	-0.81	-0.79	-0.14	-0.76	-0.30	0.07
Mangold	Satz 2 2013	0.04	0.08	0.04	-0.38	-0.01	-0.32	-0.04
Eisssalat	Satz 1 2014	-0.15	0.15	0.15	-0.15	-0.15	-0.15	0.12
Mangold	Satz 1 2014	-0.14	0.11	-0.04	-0.09	-0.14	0.00	-0.09
Rauke	Satz 1 2014	-0.13	0.07	-0.08	-0.04	-0.13	0.06	0.02
Eisssalat	Satz 2 2014	-0.19	0.21	0.22	0.02	0.23	0.23	0.02
Eissalat	alle Sätze	-0.03	-0.42	0.09	0.18	-0.14	-0.11	
Rauke	alle Sätze	0.03	0.03	-0.04	-0.03	0.05	0.01	
Mangold	alle Sätze	-0.05	-0.42	0.04	0.20	-0.23	-0.08	

4.5 Epiphytische Kolonisierung von Rucola- und Mangoldblättern durch *E. coli* O157:H7 unter Gewächshausbedingungen

Einfluss der verschiedenen Düngestrategien auf Rucola und Mangold

Die gesamte Blattbiomasse (g m^{-2}) (Abb. 33) als auch das Frisch- und Trockengewicht (Tabelle 23) und die Blattoberfläche (Abb. 34) variierte zwischen den drei Behandlungen. Wie erwartetet wurden sämtliche Parameter durch die Düngerzufuhr gefördert. Die höchsten Werte wurden für die Behandlungen mit Hühnertrockenkot erzielt. Signifikante Unterschiede kamen zwischen den zwei Versuchsgängen bei sowohl Rucola als auch Mangold vor, allerdings waren die Tendenzen ähnlich.

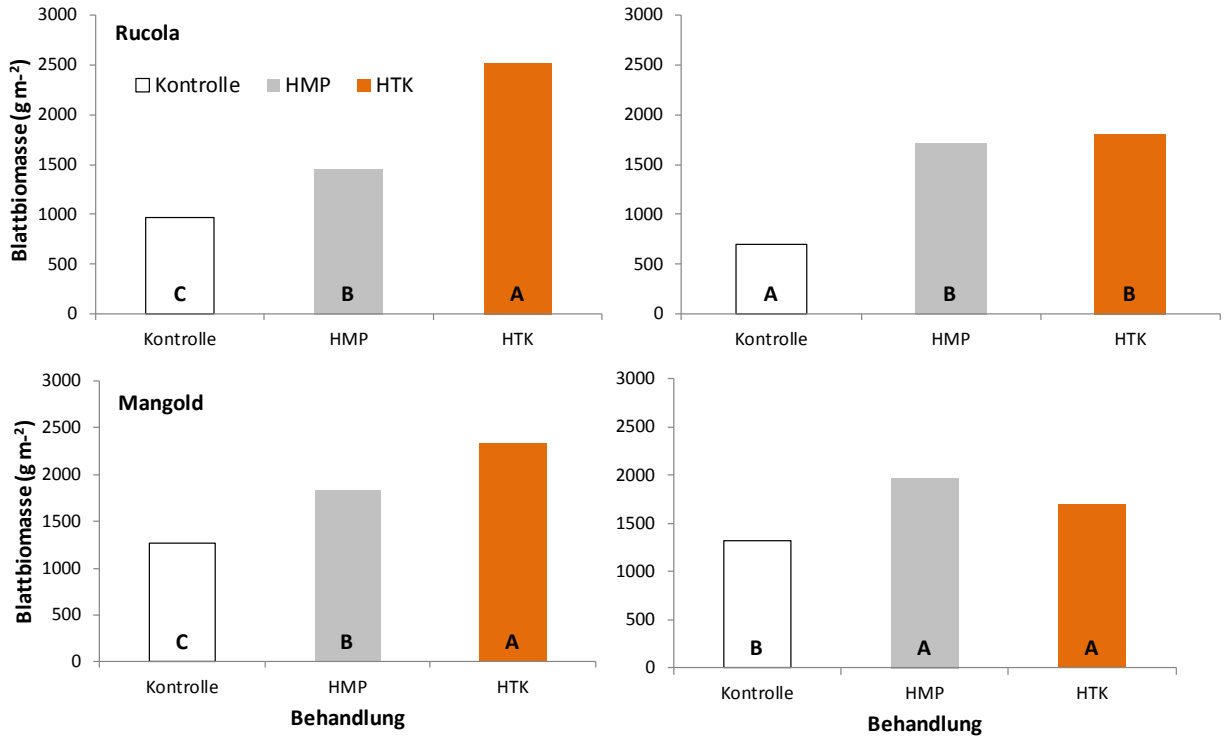


Abb. 33: Einfluss auf Düngerwahl und Düngestrategie auf die Blattbiomasse von Rucola und Mangold unter Gewächshausbedingungen. Schweinehaarpellets (HMP) bzw. Hühnertrockenkot (HTK) wurden vor der Saat in das Kultursubstrat gemischt. Die Kontrolle verblieb unbehandelt. Die Diagramme links und rechts beinhalten die Ergebnisse für die zwei Versuchsgänge. Unterschiedliche Buchstaben in den Stapeln innerhalb des Einzeldiagramms zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Stapeln an (Tukey-test; $p<0.05$); n=6.

Tab. 23: Einfluss unterschiedlicher Düngerstrategien (Kontrolle, keine Düngergabe; HMP: Haarmehlpellets; HTK: Hühnertrockenkot) auf Blattfrisch- und -trockengewicht, Trockensubstanz- und Wassergehalt von Rucola und Mangold. Die beiden Kulturen wurden geerntet, als das erste echte Blatt eine Blattlänge von 9 cm erreicht hatte. Mittelwerte sind dargestellt.

	Rucola						Mangold					
	Versuch 1			Versuch 2			Versuch 1			Versuch 2		
	Kontrolle	HMP	HTK	Kontrolle	HMP	HTK	Kontrolle	HMP	HTK	Kontrolle	HMP	HTK
Blattfrischgewicht (g)	0.20c[1]	0.25b	0.47a	0.14c	0.27b	0.33a	0.23b	0.29b	0.5a	0.25b	0.35a	0.42a
Blatttrockengewicht (g)	0.0204b	0.0219b	0.0291a	0.0135b	0.019a	0.0212a	0.0188b	0.0194b	0.0261a	0.0139b	0.0181ab	0.0206a
Trockensubstanz-gehalt (%)	10.47a	8.98b	6.19c	10.05a	6.9b	6.48b	8.06a	6.83b	5.32c	5.6a	5.21a	4.89a
Wassergehalt (%)	89.53c	91.02b	93.81a	89.95b	93.1a	93.52a	91.94c	93.17b	94.68a	94.4a	94.79a	95.11a

[1] Signifikante Unterschiede innerhalb des Versuches und Parameters (Tukey-Test; $p<0.05$) werden durch unterschiedliche Buchstaben hinter dem Mittelwert gekennzeichnet.

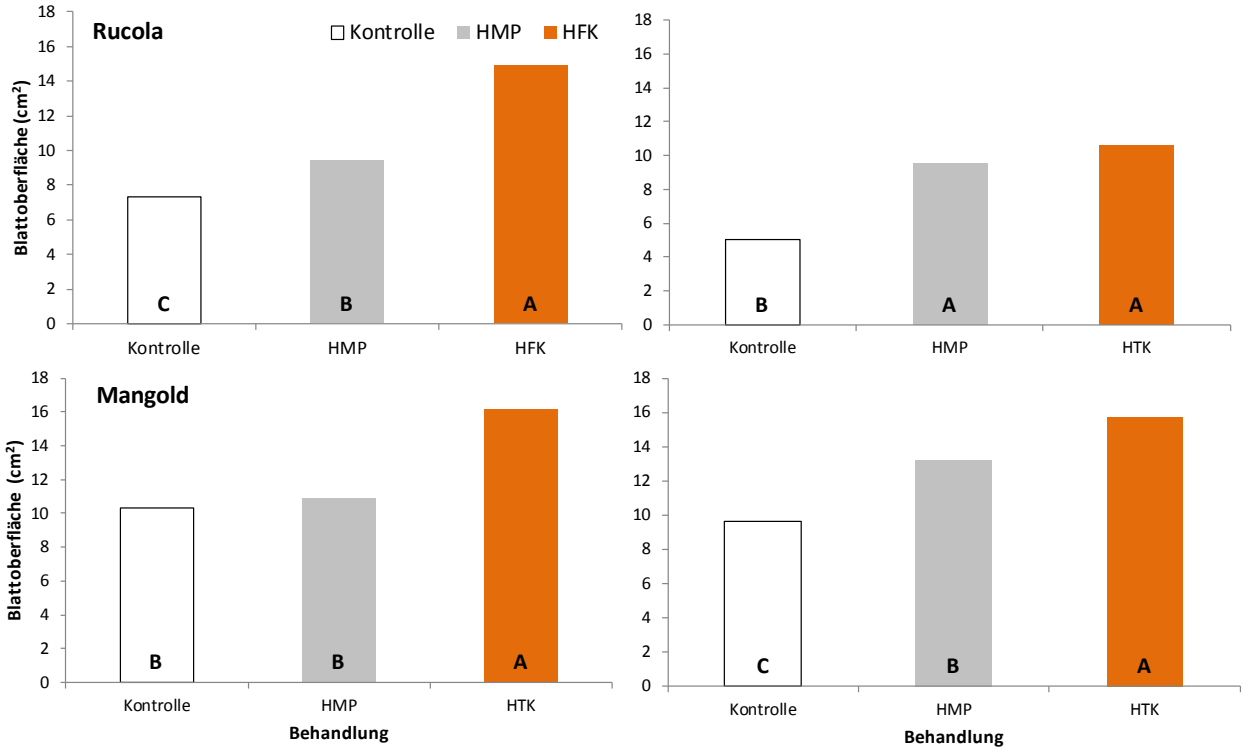


Abb. 34: Einfluss auf Düngerwahl und Düngestrategie auf die Blattoberfläche (cm^2) von Rucola und Mangold unter Gewächshausbedingungen. Schweinehaarpellets (HMP) bzw. Hühnertrockenkot (HTK) wurden vor der Saat in das Kultursubstrat gemischt. Die Kontrolle verblieb unbehandelt. Die Diagramme links und rechts beinhalten die Ergebnisse für die zwei Versuchsgänge. Unterschiedliche Buchstaben in den Stapeln innerhalb des Einzeldiagramms zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Stapeln an (Tukey-test; $p<0.05$); n=6.

Die maximale und durchschnittliche Blatttemperatur von Rucola unterschied sich nicht zwischen den Varianten. Hingegen unterschieden sich die minimale Blattemperaturen von ungedüngten Rucolablättern (16,0 °C) und Rucolablättern, die mit Haarmehlpellets gedüngt (15,3 °C) waren. Signifikante Unterschiede wurden auch nicht für die maximale Blatttemperatur von Mangoldblättern festgestellt; hingegen war die minimale Temperatur von Rucolablättern der ungedüngten Variante 0,5-0,6 °C geringer als die der zwei gedüngten Varianten. Dieser Unterschiede waren signifikant ($p<0.001$). Das gleiche gilt auch für die durchschnittliche Blatttemperatur ($p<0.001$), (Kontrolle: 17,4 °C ; HMP:18,1 °C ; HFK:18,2 °C).
Diese Unterschiede spiegelten sich jedoch nicht in den Chlorophyllfluoreszenzmessungen wieder.

4.6 Mikrobielle Kolonisierung von Rucola- und Mangoldblättern

Die Resultate für die mikrobielle Besiedlung von Rucolablättern nach Inokulation mit *E. coli* O157:H7 gfp+ sind in Abbildung 35 dargestellt. Die Ergebnisse zur Besiedlung von Rucola in Anwesenheit von *E. coli* O157:H7 unterschieden sich signifikant für die meisten untersuchten Parameter. Die Ausnahme stellt dabei die aerobe mesophile Gesamtbakterienzahl dar. Ähnliche Besiedlungsdichten mit aeroben mesophilen Bakterien wurden für alle drei Behandlungen (Variante 1: ungedüngte Kontrolle, Variante 2; gedüngt mit Schweinehaarpellets, Variante 3: gedüngt mit Hühnertrockenkot) von Rucolablättern ermittelt (4,7-5,1 logKbE g^{-1}). Auch für Enterobacteriaceen (3,4-3,6 logKbE g^{-1}), analysiert auf VRBD, und Enterokokken (1,5-1,8 logKbE g^{-1}) gab es keine Unterschiede in der Besiedlungsdichte. Interessanterweise waren die Keimdichten tendenziell höher auf Rucolablättern, die in Substrat mit Haarmehlpellets angezogen waren. Der inokulierte *E. coli* O157:H7-Stamm überlebte signifikant besser auf Rucolablättern der Haarmehlpelletvariante (Kontrolle: 3,4 logKbE g^{-1}; HMP 3,9 logKbE g^{-1}; HFM: 3,3 logKbE g^{-1}) und entsprach den Werten, die für Enterobacteriaceen gefunden wurden. Die Variation in *E. coli* O157:H7gfp+ konnte zu 76% ($p<0.001$) durch die Enterobacteriaceen erklärt werden. Auch die Zahl presumptiver Listerien und Salmonellen war am höchsten auf Rucolablättern, die in haarmehlpelletgedüngtem Substrat kultiviert waren. Signifikante Unterschiede wurden für Listerien zwischen der ungedüngten und der mit Haarmehlpellet gedüngten Variante gefunden, während die Zahl presumptiver Salmonellen überraschenderweise signifikant niedriger auf Rucolablättern war, die mit Hühnertrockenkot gedüngt waren, verglichen mit den zwei anderen Behandlungen. Auch die Unterschiede zwischen den zwei Versuchsdurchläufen waren bemerkenswert für Enterokokken sowie presumptive Listerien und Salmonellen. Während diese Keime im ersten Versuchsdurchlauf in sämtlichen Replikaten gefunden wurden, wurden Enterokokken nur sporadisch, presumptive Listerien in 12 von 18 Proben (ungedüngte Kontrolle: 3 positive Replikate; HMP: 4 positive Replikate; HTK: 5 positive Replikate) und presumptive Salmonellen in 10 von 18 Proben (ungedüngte Kontrolle: 3 positive Replikate; HMP: 5 positive Replikate; HTK: 2 positive Replikate) notiert.

Selbst wenn sämtliche Parameter über beide Versuchsgänge in die Analyse eingefügt wurden, war der Besatz von *E. coli* O157:H7*gfp+* am stärksten durch die Besiedlung mit Enterobacteriaceen korreliert.

Prinzipalkomponentenanalyse über alle gemessenen Faktoren für Rucolablätter zeigte eine deutliche Klusterbildung (Abb. 36), die in Hinblick auf Versuchsgang und Behandlung diskriminiert werden konnte. Für den zweiten Versuchsdurchlauf konnte nur zwischen der unge-

düngten und den zwei Behandlungen mit organischem Dünger unterschieden werden. In Komponente 1 kam der Blattoberfläche und dem Blatttrockengewicht und in Komponente 2 der Minimumtemperatur des Blattes und dem Trockenmassegehalt/Wassergehalt des Blattes das größte Gewicht zu.

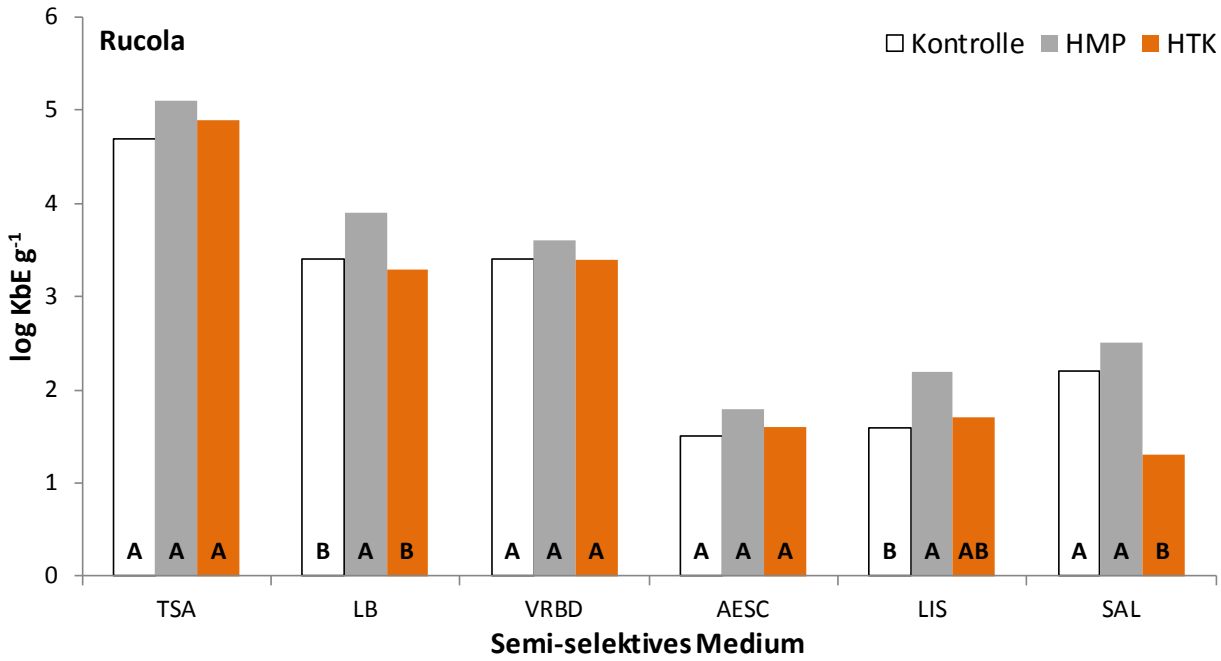


Abb. 35: Mikrobielle Besiedlung von Rucolablättern in Anwesenheit von *E. coli* O157:H7. Die Rucolapflanzen waren in mit Haarmehlpellets (HMK) bzw. Hühnertrockenkot (HTK) gedüngtem Kultursubstrat angezogen. Die Rucolapflanzen in der Kontrolle verblieben ungedüngt. Die mikrobielle Besiedlung wurde in Hinblick auf aerobe mesophile Gesamtzahl (TSA), Enterobakteriaceen (VRBD), Enterokocken (AESC) und presumptive Listerien (LIS) und Salmonellen (SAL) auf semi-selektivem Medien analysiert. Der inokulierte *E. coli* O157:H7 gfp+-Stamm wurde auf LB, das mit Ampicillin und Arabinose versetzt war, selektiv reisoliert. Stapel, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant innerhalb des jeweiligen Mediums (Tukey-test; $p<0,05$). Daten von zwei Versuchsgängen sind dargestellt.

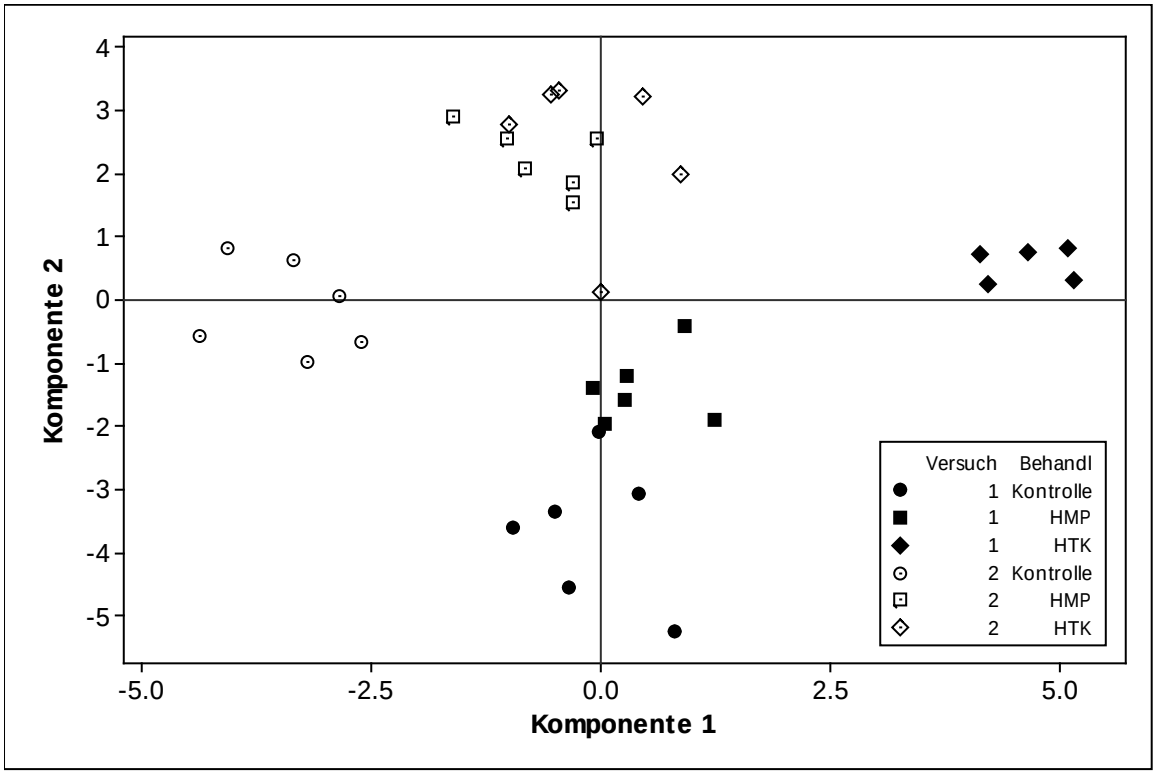


Abb. 36: Prinzipalkomponentenanalyse über sämtlichen Messdaten an Rucolablättern

Reinisolate Rucola

15 der 27 Isolate, welche auf VRBD von Rucola gewonnen wurden, gruppierten sich zusammen mit Bakterien der Spezies *Enterobacter*. Hiervon wurden sechs von Pflanzen welche mit Haarmehlpellets und neun von Pflanzen welche mit Hühnertrockenkot gedüngt wurden, isoliert. Eine andere Kolonie, welche ebenfalls von einer mit Haarmehlpellets gedüngten Pflanze stammte, zeigte Ähnlichkeit mit *Lelliottia* und komplettiert die Gruppe mit *Enterobacteriaceae*. Eine weitere große Gruppe zeigte Übereinstimmung mit der Gattung *Pseudomonas*. Diese schließt vier Isolate von nicht gedüngten, zwei von mit Haarmehlpellets gedüngten und eine von mit Hühnertrockenkot gedüngten Pflanzen ein. Ein weiteres Isolat einer mit Hühnertrockenkot gedüngten Pflanze gruppierte sich mit *Pseudomonas hibiscicola* und *Stenotrophomonas maltophilia.* Drei Isolate paarten sich mit *Acinetobacter,* wovon eines von mit Hühnertrockenkot und zwei von mit Haarmehlpellets gedüngten Pflanzen stammten.

Die Resultate für die mikrobielle Besiedlung von Mangoldblättern nach Inokulation mit *E. coli* O157:H7 gfp+ sind in Abbildung 37 dargestellt. Im Vergleich zu Rucolablättern war die der Mangoldblätter in Anwesenheit von *E. coli* O157:H7 in Hinblick auf sämtliche Parameter höher. Die Ergebnisse zwischen den zwei Versuchsdurchgängen waren lediglich in Hinblick auf die aerobe mesophile Gesamtbakterienzahl und Zahl der presumptiven Listerien unter-

schiedlich. Die Wahl des Düngers und der Düngestrategie hatte im Gegensatz zu Rucola bei Mangold keinen Einfluss auf die Besiedlungsdichte auf Blättern. Signifikante Unterschiede wurden zwar bezüglich der aeroben mesophilen Gesamtbakterienzahl festgestellt; die mit Hühnertrockenkot Variante hatte eine signifikant niedrigere Dichte als die ungedüngten Variante und der mit Haarmehlpellets gedüngte Variante. Selbst wenn diese Unterschiede signifkant sind, sind Unterschiede zwischen den absoluten Werten gering und nur von technischem Interesse. Die Besiedlung von Mangoldblättern mit presumptiven Salmonellen und Listerien unterschied sich nicht nur nominell, sondern auch in Hinblick auf die Häufigkeit. Von sämtlichen Proben waren acht Stück negativ für presumptive Listerien und zwei für presumptive Salmonellen. Wie im Fall der Rucolablätter, erklärte die logKbE von Enterobacteriaceen die Variation des inokulierten Stammes.

Prinzipalkomponentenanalyse über alle Messdaten für Mangold diskriminierten nicht zwischen den drei Behandlungen.

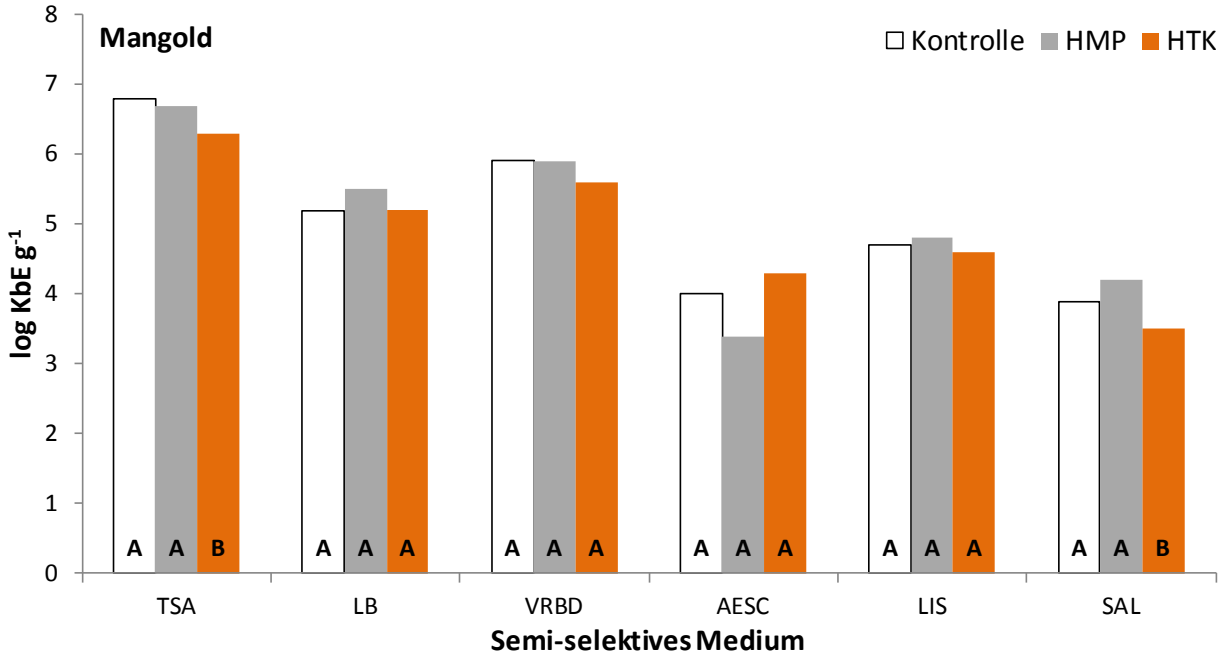


Abb. 37: Mikrobielle Besiedlung von Mangoldblättern in Anwesenheit von *E. coli* O157:H7. Die Mangoldpflanzen waren in mit Haarmehlpellets (HMP) bzw. Hühnertrockenkot (HTK) gedüngtem Kultursubstrat angezogen. Die Mangoldpflanzen in der Kontrolle verblieben ungedüngt. Die mikrobielle Besiedlung wurde in Hinblick auf aerobe mesophile Gesamtzahl (TSA), Enterobakteriaceen (VRBD), Enterokocken (AESC) und presumptive Listerien (LIS) und Salmonellen (SAL) auf semi-selektivem Medien analysiert. Der inokulierte *E. coli* O157:H7 *gfp*+-Stamm wurde auf LB, das mit Ampicillin und Arabinose versetzt war, selektiv reisoliert. Stapel, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant innerhalb des jeweiligen Mediums (Tukey-test; $p<0,05$). Daten von zwei Versuchsgängen sind dargestellt.

Reinisolate Mangold

Kolonien, welche von Mangoldblättern auf VRBD isoliert wurden, konnten - bis auf eine Ausnahme - alle der Familie der *Enterobacteriaceae* zugeordnet werden. Hierbei gruppierte sich eine Großzahl der Isolate in zwei Gruppen, welche Spezies der Gattung *Pantoea* oder *Enterobacter* enthielten. Sieben Isolate von nicht gedüngten Pflanzen, zwei von mit Haarmehlpellets und fünf von mit Hühnertrockenkot gedüngten Pflanzen finden sich in ersterer wieder. Letztere beinhaltet drei Isolate von nicht gedüngten und neun von mit Hühnertrockenkot gedüngten Pflanzen. Eine Kolonie, welche von einer mit Hühnertrockenkot gedüngten Pflanze isoliert wurde, gruppierte sich zusammen mit *Citrobacter* spp. Eine andere Kolonie, isoliert von einer nicht gedüngten Pflanze, zeigte Sequenzierungsmuster, welche denen von *E. coli* ähneln. Das Isolat, welches nicht der Familie der *Enterobactericeae* zugeordnet werden konnte, zeigte hohe Übereinstimmungen mit *Achromobacter spanius,* eine Spezies welche zur Familie der *Alcaligenceae* gehört.

4.7 Internalisierung von *E. coli* O157:H7 in Mangold- und Rucolablätter

Mangold

Eine der Mikroskopie vorangestellt Dekontaminierung der Blattoberfläche resultierte in einer Reduktion der Blattbesiedelung mit *E. coli* O157:H7, die trotz mehrstündiger Suche ein Auffinden der fluoreszierenden Bakterien nicht zuließ. Die in Abbildung 38 1 dargestellten Bilder wurden demnach ohne vorherige Behandlung der Mangoldblätter aufgenommen. In nicht geschädigten Blättern wurden Bakterien in interzellulären Räumen und Vakuolen in einer Tiefe bis zu 35 µm gefunden. In abiotisch geschädigten Blättern wurden Mikrokolonien visualisiert, welche sich in Kavitäten in Tiefen bis zu 40 µm befanden. Biotisch geschädigte Blätter zeigten *E. coli* O157:H7 Bakterien, welche sich entlang interzellulärer Kavitäten befanden.

Rucola

Im Gegensatz zu Mangold konnte *E. coli* O157:H7 auch mit einer der Mikroskopie vorangegangener Oberflächendekontaminierung visualisiert werden (Abb. 38). In nicht geschädigten Blättern wurden einzelne Bakterien in Tiefen bis zu 20 µm gefunden. Abiotisch geschädigte Blätter zeigten Kavitäten, in denen sich Kolonien mit bis zu über 100 Bakterien in einer Tiefe bis zu 20 µm aufhielten. In biotisch geschädigten Blättern wurden Bakterien in inter- und intrazellulären Räumen in Tiefen bis zu 25 µm gefunden.

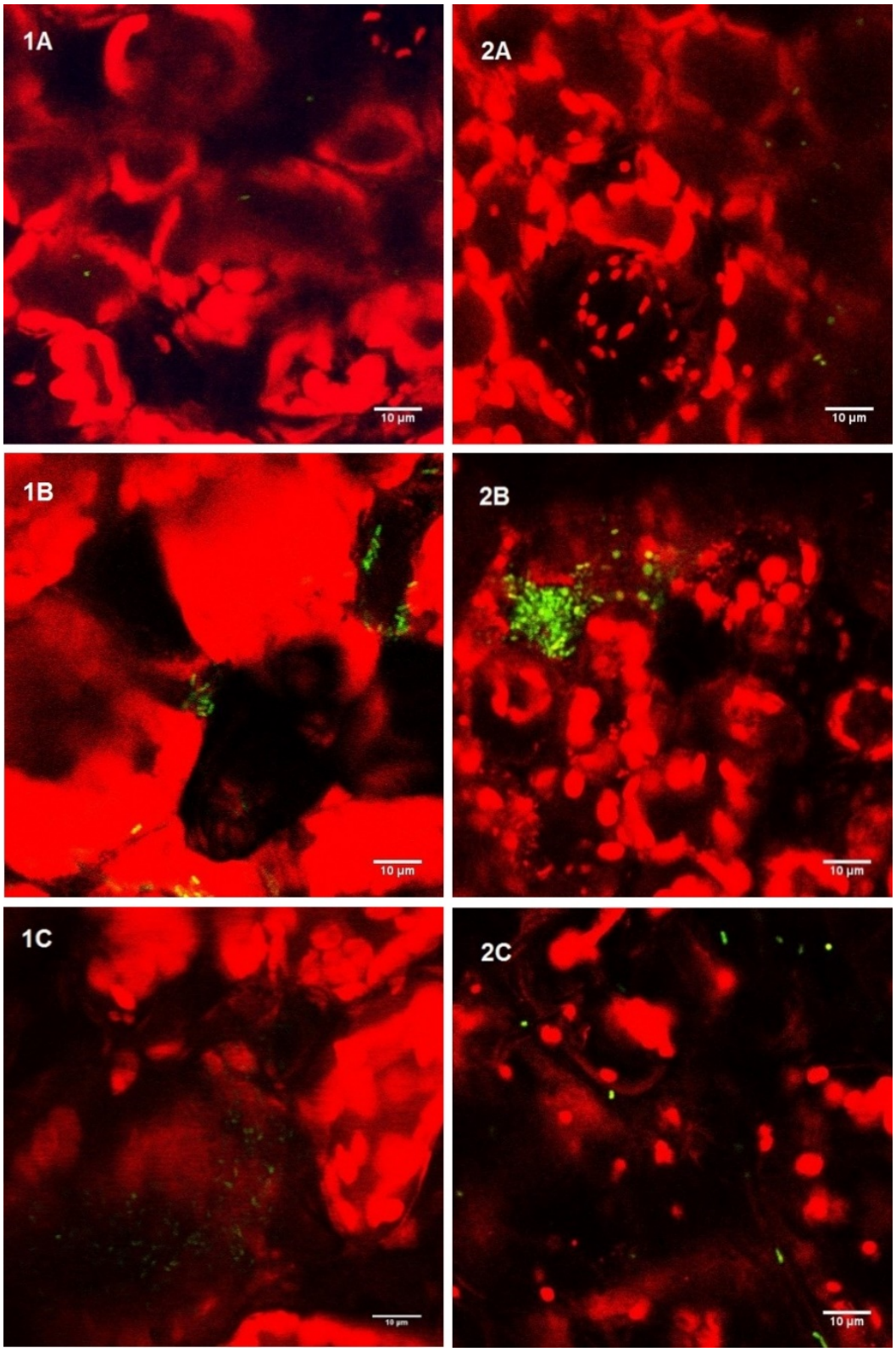


Abb. 38: Visualisierung von *E. coli* O157:H7 (grün) in der Phyllosphäre (rot) von Mangold (1) und Rucola (2) bei gesunden (A), abiotisch (B) und biotisch (C) geschädigten Blättern. Bilder 2B und 2C entstanden nach vorangegangener Oberflächendesinfektion, Bilder 1A-C, 2A wurden ohne keimreduzierende Behandlung aufgenommen.

I. 5. Diskussion der Ergebnisse

Feldversuche

Als reproduzierbares Ergebnis der Feldversuche ist erhöhtes Pflanzenwachstum bei Düngung mit Hühnertrockenkot im Vergleich zu Haarmehlpellets, insbesondere beim Eis- und Eichblattsalat festzuhalten. Ursache könnte hier eine bessere Stickstoffverfügbarkeit des Hühnertrockenkots im Vergleich zu den Haarmehlpellets sein, wobei an keiner der Versuchspflanzen Mangelsymptome festgestellt wurden. Die erhöhten Nitrat-N Gehalte der mit Hühnertrockenkots gedüngten Salate sowie der reduzierte Anteil an Trockenmasse bei den mit Hühnertrockenkot gedüngten Pflanzen deuten ebenfalls eine höhere Stickstoffversorgung dieser Pflanzen an, da durch die osmotische Wirkung des Nitrats der Wassergehalt erhöht ist. Für Mangold und Rauke ergaben sich hier zum Teil die gleichen Tendenzen. Es wurden bei diesen Kulturen jedoch wenige Signifikanzen gefunden. Insgesamt zeigen die Daten eine hohe Streuung.

Die Effekte auf strukturgebende Kohlenhydrate widersprechen sich zwischen den Jahren. In 2013 wurde an einem Termin in der Kombination mit Teichwasser die jeweils höchsten Gehalte an strukturgebenden Kohlenhydraten nachgewiesen. In 2012 konnte ein umgekehrter Effekt nachgewiesen werden. Denkbar ist hier eine mögliche Beeinflussung des Messwertes durch im Wasser befindliche Schwebteilchen. Weiter ist der geringere Anteil an strukturgebenden Kohlenhydraten in den unabgedeckten Parzellen in 2013 zum Teil durch unvermeidbare Feinsandanteile in den Pflanzenproben erklärbar, die durch die Mulchabdeckung reduziert gewesen sein könnten. Allerdings wäre auch eine schnellere Entwicklung bzw. Alterung der Salatköpfe auf den Mulchparzellen durch eine höhere Bodentemperatur im Vergleich zum unbedeckten Boden eine plausible Ursache.

Die in 2012 eingesetzte Mulchfolie hatte einen durchweg schlechten Einfluss auf das Pflanzenwachstum, was auf mechanische Beschädigungen an den Pflanzen durch die Folie zurückzuführen ist. Die Folie war sehr rissanfällig und die Fixierung im Boden daher nicht effizient durchzuführen. Der in den weiteren Jahren mit leichterem Material aus Vlies gefundene Mulcheffekt in früher Wachstumsphase ist ebenfalls durch mechanische Beschädigungen und Temperaturwirkungen des Mulchs erklärbar.

Die Ergebnisse hinsichtlich der Befallsdynamiken mit *E.coli* deuten an, dass die Hauptursache für eine bedeutende Kontamination (die sehr selten auftrat) nicht auf die im Versuch kontrollierten Faktoren rückführbar ist.

Die Korrelationsanalysen im Zusammenhang mit Wetterdaten zeigten einen klaren Effekt nur in Bezug auf ein einen Rückgang der Keimzahlen bei relativ hoher Anfangskontamination. Die Quelle dieser gesundheitlich unbedenklichen Kontamination ist nicht bekannt.

Mikrobiolgische Untersuchungen

In Deutschland ist zur Gewährleistung einer guten mikrobiologischen Qualität von Gemüse die Einhaltung bestimmter Kriterien von Inputfaktoren bei der Lebensmittelproduktion gegeben. Der sichere Gebrauch von organischem Dünger ist in der Biostoffverordnung (BioStoffV) geregelt. Bevor Mist auf Felder ausgebracht werden darf, muss er einer Behandlung zur Keimreduzierung unterzogen werden. Der in dieser Studie verwendete HTK stammt von einer Broilermastanlage, welche die Ausscheidungen der Tiere auf dem Hof lagert, bevor diese in einer Biogasanlage fermentiert werden. In dieser Studie verwendeter HTK wurde dem Haufen vor der Fermentation entnommen, was die hohen KBE an *E. coli* und den anderen analysierten Mikroorganismen erklärt.
Anforderungen an Beregnungswasser sind in der DIN 19650 geregelt, u. a. wird die Kontamination mit *E. coli* als Indikator herangezogen. Ein Wert von ≤200 KBE * $(100\ ml)^{-1}$ gilt als unbedenklich, Wasser das mit 200 bis 2000 KBE * $(100\ ml)^{-1}$ belastet ist darf zwar zur Bewässerung von zum Rohverzehr angebauten Produkten verwendet werden, es muss jedoch eine Karenzzeit von zwei Wochen vor der Ernte eingehalten werden. Das in dieser Studie verwendete Brunnenwasser wies zu allen Probennahmen keine nachweisbaren Kontaminationen mit *E. coli* auf und war somit nach der DIN 19650 (in Bezug auf *E. coli*) zur Bewässerung geeignet. Auch das Leitungswasser war - mit Ausnahme der letzten Bewässerung des 2. Satzes 2014 - unter der Nachweisgrenze, hätte jedoch zu einer nicht mehr verkehrsfähigen Charge des besagten Anbausatzes geführt. Die gefundenen Kontamination im Teichwasser lagen teilweise im Bereich unterhalb des Warnwerts von 200 KBE * $(100\ ml)^{-1}$ aber auch im Bereich darüber, womit ein nur eingeschränkter Gebrauch geboten wäre.
Allgemein hohe aerobe mesophile Keimzahlen aller Wasserquellen könnten aus Verunreinigung der Bewässerungssysteme resultieren.

Die deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) gibt zur Beurteilung der mikrobiologischen Qualität verschiedener Lebensmittel Richt- und Warnwerte für bestimmte Bakterien (-Gruppen) heraus. Für Salate liegt der Richtwert für die aerobe mesophile Koloniezahl bei $5x10^7$ KBE * g^{-1}, für *E. coli* liegt der Richtwert bei 10^2, der Warnwert bei 10^3 KBE * g^{-1} und für *L. monocytogenes* befindet sich der Warnwert bei 10^2 KBE * g^{-1}. Salmonellen sollten in 25 g Probenmaterial nicht nachweisbar sein (DGHM, 2011).
Die GBZ lag an manchen Probennahmen für die Kulturen Eisbergsalat, Rucola und Mangold im Bereich des Richtwertes. Wie auf Eichblattsalat, befanden sich die Werte ansonsten unterhalb des besagten Schwellenwertes. Beim Vergleich mit anderen Studien zeigt sich, dass sie GBZ für Eisbergsalat bei 6 logKbE * g^{-1} (Fischer-Arndt et al., 2008 und Wießner et al., 2009) und somit im Bereich eines Großteils der ermittelten Werte in dieser Studie liegt. Ausnahme stellt der zweite Satz 2014 dar, hier überstieg die GBZ diesen Wert um zwei log-Stu-

fen. Da in diesem Satz ausschließlich eine Kultur angebaut wurde, lässt sich nicht nachvollziehen, ob intrinsische oder extrinsische Faktoren hierfür wahrscheinlicher sind. GKZ von > 7 logKbE * g^{-1} auf Rucola wurden, wie in dieser Studie, ebenfalls von Alam et al. (2014) gefunden. Die GBZ auf Mangold zeigte vergleichbare Werte wie in einer Studie von Agüero et al. (2005), überstieg jedoch die von Ponce et al. (2003) analysierten Zahlen um bis zu zwei log-Stufen. Da der limitierende Faktor für mikrobielles Wachstum auf Blättern die Nährstoffverfügbarkeit ist (Wilson und Lindow, 1994), deutet eine erhöhte GBZ demnach zunächst auf eine höhere Verfügbarkeit von Nährstoffen hin und muss nicht zwingend mit einer größeren Gefahr der humanpathogenen Kontamination einhergehen.
Während die vereinzelt gefundenen positiven Proben für *L. monocytogenes* immer nahe dem Warnwert lagen (die Nachweisgrenze entspricht in etwa dem Warnwert), wurde für *E. coli* nur auf insgesamt vier Proben eine Kontamination gleich oder höher dem Warnwert gefunden. Die in dieser Studie ermittelten hohen Kontaminationen mit *Salmonella* spp. wurden nicht weiter verifiziert, da dies im Projekt nicht vorgesehen war und mit einem Kostenmehraufwand verbunden ist. Diese Ergebnisse sollten daher mit größter Vorsicht und nur als vorläufig betrachtet werden.

Verschiedene Anbaumethoden im Feldversuch wurden kombiniert um eine, in mikrobiologischer Hinsicht risikoarme Variante zu ermitteln. Jedoch blieb ein erwarteter Effekt unter den gegebenen Bedingungen, d.h. im Freiland ohne die zusätzliche Applikationen eines im Labor kultivierten Bakterienstamms, aus. Auch andere Studien, die den Effekt von Düngern mit unterschiedlichen mikrobiellen Ausgangsbelastungen auf Salatblättern untersuchten, konnten mit kultivierungsabhängigen Methoden keinen signifikanten Unterschied in der mikrobiellen Besiedelung feststellen (Wießner et al., 2009; Johannessen et al., 2004). Gründe hierfür können multifaktoriell bedingt sein und sind schwer nachvollziehbar, eine gesicherte Erklärung kann anhand der in dieser Studie analysierten Parameter nicht gefunden werden.
Ausbleibende Unterschiede auf dem Level der Gattung und höheren hierarchischen Stufen könnte der Tatsache geschuldet sein, dass diese Vertreter beinhalten, die ein natürliches Vorkommen auf Pflanzen oder in der Umwelt haben. So werden einige Gattungen, die zur Gruppe der coliformen Bakterien zählen und auch der Familie der Enterobacteriaceae zugehörig sind, dem natürlichen Mikrobiom der Phyllosphäre zugeordnet. Hierzu gehören zum Beispiel *Klebsiella* spp. *Enterobacter* spp. und *Citrobacter* spp. (Tortorello, 2003). Auch Enterokokken werden regelmäßig von Blättern isoliert (Švec et al., 2012). Listerien sind bekannt für ihr ubiquitäres Vorkommen und sind in großer Anzahl im Boden vorhanden (MacGowan et al., 1994).

Ferner können eventuelle Effekte der verschiedenen Beregnungsmethoden durch Erdspritzer, verursacht durch auf den Boden treffende Regentropfen, maskiert werden (Whipps et al., 2008). Verschiedene Studien legen ebenfalls nahe, dass Bakterien über die Wurzeln aus dem Boden aufgenommen werden und dann in Blätter wandern können (Solomon et al., 2002). Somit können Pathogene aus dem Boden in essbare Teile der Pflanze gelangen, ohne direkten Kontakt zur Erde, was in dieser Studie durch eine Mulchabdeckung gewährleistet werden sollte.
Ein anderer möglicher Vektor für Fäkalbakterien sind wilde sowie domestizierte Tiere (Beuchat und Ryu, 1997). Ein Zaun um die bewirtschafteten Felder kann Abhilfe schaffen (LGMA, 2012) und sollte auch in diesem Versuch Tiere fernhalten. Gegen Vögel und auch kleinere Säugetiere stellt solch eine Barrikade jedoch kein probates Mittel dar. So wurde in dieser Studie regelmäßig Kot von Hasen oder Kaninchen zwischen den angebauten Pflanzen gefunden, welche neben dem Düngen mit HTK und dem Teichwasser als zusätzliche potenzielle Quelle für *E. coli* und andere Fäkalkontaminationen dienen konnte.

Um das Überleben von *E. coli* O157:H7, dem shigatoxinproduzierenden Stamm, der am häufigsten hinter lebensmittelrelatierten Ausbrüchen steht und mit einem erhöhten Vorkommen von HUS verbunden ist, in Abhängigkeit der Düngerwahl zu untersuchen, wurden Provokationen unter Gewächshausbedingungen durchgeführt. Die vorliegenden Daten bestätigen, dass der Stamm ein effektiver epiphytischer Besiedler von sowohl Rucola- und Mangoldblättern ist und nach mehrmaliger Inokulation die Enterobacteriaceen dominiert. Die vorliegende Untersuchung bestätigt frühere Studien von Islam et al. (2004, 2005), die an Petersilie, Möhren, Zwiebeln und Salat mit *E. coli* inokuliertem Geflügel- und Rinderdüngerkompost als Düngerquelle durchgeführt wurden.

Die vorliegende Studie gibt einen ersten Hinweis auf den Effekt von animalischem Dünger auf Keratinbasis. Dieses Material muss aus seuchenhygienischen Maßnahmen pasteurisiert (Exposition: 1 h; Temperatur: > 70 °C) werden, bevor er in den Verkehr gebraucht wird. Der Produktionsprozess umfasst auch einen Trocknungsschritt bei > 80° C (Möller und Schultheiss, 2014). Dies bedeutet, dass dieser Düngestoff aus produkthygienischer Sicht als wesentlich weniger riskant als unkompositierter Hühnertrockenkot anzusehen ist. Die vorliegenden Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass die Form der organischen Stickstoffquelle keinen Einfluss auf die Kolonisierung von *E. coli* O157:H7 hat, wenn die Düngerquelle nicht als Vektor zur Keimübertragung dient – was im Übrigen zu erwarten ist. Die Besiedlungsdichten des inokulierten Stammes waren in beiden Kulturen höher in den HMP-Varianten; die Besiedlungsdichte auf den Blättern an sich war jedoch in sämtlichen Fällen so hoch, dass sie zu massiven Ausbrüchen geführt hätten, unabhängig davon ob und wie gedüngt wurde (Infektiöse Dosis: < 100 Zellen; Rheinbaben, 2011).

Die vorliegende Untersuchung wurde mit zwei nicht-kopfbildenden Blattsalaten durchgeführt, die mit einer Blattlänge von 9 cm geerntet wurden. Besiedlungsdichten unterschieden sich mit 1-2 Zehnerpotenzen zwischen den zwei gewählten Kulturen, während die durch die Behandlungen induzierten Unterschiede bedeutend geringer waren. Daraus könnte gefolgert werden, dass die Besiedlung der Phyllosphäre hauptsächlich von der Pflanze und weniger von den Anbaubedingungen diktiert wird.

Die im vorliegenden Inokulationsversuch vorgesehenen Bedingungen stellen einige Begrenzungen zur Interpretation dar.

- Wahl des Stammes
  Teils drückt der verwendete Stamm nicht die Virulenzfaktor vtx1 und vtx2 aus. Ausserdem war der Stamm mit einem *gfp*-Plasmiden modifiziert. Diese Maßnahmen waren a) zum Schutz der Angestellten und b) aus versuchstechnischen Gründen zur Reisolierung der Inokulante notwendig. Der Stamm ist in früheren Versuchen in Hinblick auf Überleben gescreent worden. Dabei wurde festgestellt, dass der nicht induzierte Stamm gut unter Gewächshausbedingungen überlebt (Burleigh und Alsanius, unveröffentlicht). In der Literatur liegen keine Vergleiche über das Überleben von shigatoxinpositiven mit shigatoxinnegativen Stämmen auf Blattoberflächen vor. Da die Phyllosphäre ein sehr karges und aus mikrobiologischer Sicht ein sehr konkurrenzbetontes Milieu darstellt, ist davon auszugehen, dass die erhaltenen Daten die Überlebensraten von shigatoxinpositiven Stämmen eher unter- als überschätzen.
- Gewächshausbedingungen
  Für den vorliegenden Stamm lag keine Genehmigung für die Ausbringung im Freiland, sondern nur unter Gewächshausbedingungen vor und das Genehmigungsverfahren für die Verwendung im Freiland hätte den Zeitrahmen des vorliegenden Projektes weit überschritten. Deswegen wurden die Provokationen im Gewächshaus durchgeführt. Die Umweltbedingungen im Gewächshaus weichen in mehrerer Hinsicht von denen im Freiland ab. Teils sind die Fluktuationen in Temperatur und relativer Feuchtigkeit im Gewächshaus bedeutend geringer, was sowohl auf die Physiologie der angebauten Kultur, deren Exsudation über die Blattoberfläche und damit die mikrobielle Besiedlung der Blätter einwirkt. Teils filtern Gewächshausbeläge das einfallende Licht, was zu einer Veränderung des Spektrums und insbesondere zum Herausfiltern von UV-Strahlen führt (Krizek et al., 2005). Dies beeinflusst die Besiedlungsdynamik auf der Blattoberfläche.
- Inokulationsdichte
  Die Dichte des inokulierten Stammes war hoch und bedeutend höher als sie unter natürlichen Bedingungen zu erwarten wäre. Um eine Reisolation unter begrenzten Gewächshausflächen zu ermöglichen, ist eine hohe Inokulationsdichte notwendig. In einem früheren Versuch wurde der hier applizierte *E. coli*-Stamm in verschiedenen Dichten im Zusammenhang mit Bewässerung ausgebracht (Alam et al., 2014). Um eine Reisolierung sicherzustellen, wählten wir die mittlere Inokulationsdichte dieses früheren Versuches. Es soll jedoch in diesem Zusammenhang auch unterstrichen werden, dass selbst wenn die unter natürlichen Bedingungen festgestellten Keimzahlen bedeutend niedriger sind, so kommen humanpathogene Darmkeime wie shigato-

xinproduzierende *E. coli*, *Salmonella* spp. oder *Yersinia* spp. häufig partikelgebunden vor. Innerhalb des Partikels sind die Keimzahlen hoch.

Neben dem Freilandversuch wurden Analysen im Gewächshaus zur Abschätzung eines eventuell erhöhten Risikos einer Internalisierung von *E. coli* O157:H7 in geschädigte gegenüber nicht geschädigten Blättern von Rucola und Mangold durchgeführt. Die Invasion humanpathogener Mikroorganismen in zum rohen Verzehr gedachter Pflanzenteile stellt eine besondere Gefahr dar, da die Pathogene hier vor einer keimreduzierenden Behandlungen geschützt sind (Yaron, 2014). In dieser Studie wurden sowohl in nicht geschädigten als auch in geschädigten Mangold- und Rucolablättern invasive *E. coli* O157:H7 Bakterien gefunden. In Abhängigkeit von der Kulturart waren sowohl die Tiefe ins Blattgewebe als auch die Anzahl an internalisierten Bakterien in biotisch oder abiotisch geschädigtem Gewebe höher. Schädigung von Pflanzengewebe stellt zunächst einmal eine Eintrittspforte für Bakterien dar. *E. coli* können Pektin, ein essentieller Bestandteil von Pflanzenzellen nicht abbauen (Teplitski et al., 2012), sodass sie auf natürliche Öffnungen (z.B. Stomata) oder Läsionen im Gewebe angewiesen sind, um ins Blattinnere zu gelangen (Deering et al., 2012). Des Weiteren treten durch Schädigung Nährstoffe aus dem Zellinneren aus, von welchen Mikroorganismen in der nährstoffarmen Phyllosphäre profitieren können (Beuchat, 2002; Monier und Lindow, 2005). Verschiedene Studien haben einen positiven Effekt von Blattschädigung auf die Etablierung von *E. coli* O157:H7 auf Salat gefunden (Aruscavage et al., 2008; Brandl, 2008b). Jedoch antwortet die Pflanze auch mit Änderungen im Metabolismus, welche zum einen die Wundheilung fördern, zum anderen aber auch Abwehrmechanismen (León et al., 2000), einschließlich antimikrobieller Substanzen, beinhalten (Orozco-Cardenar und Ryan, 1999). Ob Bakterien sich an einer verwundeten Blattstelle etablieren und von den Vorzügen profitieren können, hängt davon ab wie diese mit den geänderten physiochemischen Bedingungen zurechtkommen (Kyle et al., 2010).

I. 6. Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse

Bei der Interpretation der Ergebnisse aus den Feldversuchen muss beachtet werden, dass diese Versuche bewusst in einem Praxisbetrieb unter den dort herrschenden Produktionsbedingungen (Boden-, Wasserqualität, Düngung, Klima, Anzuchtsystem, usw.) durchgeführt wurden. Eine Generalisierung der Ergebnisse auf sämtliche biologischen Produktionsverfahren und mögliche Umweltbedingungen verbietet sich.

Die sechs durchgeführten Sätze haben allerdings bei den unterschiedlichen Kulturen gezeigt, dass es in keinem der Sätze zum Erntetermin zu einer Kontamination oberhalb des

Warnwertes der Dt. Gesellschaft für Hygiene (DGHM, 2011) kam. Es zeigte sich auch, dass zwar zu verschiedenen Zeitpunkten in der Produktionskette vereinzelnd ein bakterieller Befall messbar war, dieser aber nicht systematisch einzelnen Kulturmaßnahmen zuzuordnen war.
Für die Praxis des biologischen Anbaus von Rohware für die Produktion von Fertigsalaten bedeutet dies, dass kein generelles Gefahrenpotenzial für eine bakterielle Kontamination der Rohware zu erkennen ist.
Gleichzeitig konnte aber festgestellt werden, dass *E. coli* O157:H7 sehr gut auf den getesteten Blattsalaten überlebt hat. Dies bedeutet, dass selbst wenn die Provokationen unter Freilandbedingungen gering waren, ein grundsätzliches Risiko besteht, wenn shigatoxinproduzierende *E. coli* während der Produktion im Feld verbreitet werden. Dies bedeutet, dass Vorsichtsmaßnahmen eine wichtige Rolle für die Verhinderung der Verbreitung und Kontamination von rohen Blattsalaten spielen und dass das Risiko umso grösser ist, je näher sich Tier und Produkt sind.
Für *E. coli* O157:H7 zeigte sich eine mögliche Internalisierung. Falls sich diese Ergebnisse unter Feldbedingungen bestätigten, müsste dies Konsequenzen auf die Warnhinweise im Falle einer Epidemie haben. Eine Vernichtung der Ware müsste angeordnet werden.
Insgesamt geben die Ergebnisse erstmals die gewünschten und für alle Interessensgruppen dringend notwendigen Einblicke in die mikrobielle Situation im biologischen Anbau von Blattsalaten.

I. 7. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlichen erreichten Zielen; Hinweise auf weiterführende Fragestellungen

Die geplanten Freilandversuche im Bioland-Versuchsbetrieb 'Rothenfeld' konnten im geplanten Umfang 6 Sätze durchgeführt werden. Auf Grund des späten Projektbeginns gab es allerdings kleine Verschiebungen innerhalb der Projektlaufzeit. Die zwei geplanten Freilandsätze auf den Flächen der Versuchsstation der LUH in Ruthe zur Internalisierung wurden nicht durchgeführt und durch Gewächshauskammerversuche in Schweden ersetzt. Für Freilandversuche mit gfp-markierten Bakterien wäre ein Antrag auf Freisetzung gentechnisch veränderter Organismen notwendig gewesen. Laut Beratung von Frau Dr. Smalla (JKI, Braunschweig) hätte dieser Antrag keine Chance auf Zulassung gehabt. Daher wurde der Projektteil zur Internalisierung von Bakterien in entsprechend zugelassenen Gewächshauskammern des schwedischen Partners durchgeführt.

Das Ziel einer Quantifizierung der bakteriellen Kontamination und Kolonisation in der Rohwaren-Produktionskette von Salaten für die Herstellung von Bio-Fertigsalaten ist erreicht wor-

den. Es muss bei der Interpretation beachtet werden, dass diese Ergebnisse nur die Situation in dem Biolandbetrieb widerspiegeln, in dem die Versuche stattfanden (Boden-, Wasserqualität, Düngung, Klima, Anzuchtsystem, usw.). Diese Einschränkung wurde schon bei der Projektplanung bewusst in Kauf genommen, da in diesem ersten Ansatz zunächst geprüft werden sollte, wie sich die Infektionslage in einem Beispielsbetrieb unter realistischen Produktionsbedingungen darstellt.

Auf Grund der geringen bzw. in einigen Sätzen fehlenden Kontamination, war eine Modellierung der Zusammenhänge zwischen Kontaminationsquelle, -zeitpunkt und Umweltdaten leider nicht möglich. Um dies abschließend zu prüfen, müssten Versuche unter systematisch kontrollierten und variierten Umweltbedingungen durchgeführt werden. Dabei ist bei der Umsetzung darauf zu achten, dass die Wachstumsbedingungen möglichst realitätsnah gehalten werden. Die Grundstruktur eines Modells wurde allerdings entwickelt (s. Abb. 1).

Hinsichtlich der Fragestellung einer möglichen Internalisierung konnten zwar keine Freilandversuche durchgeführt werden (Zulassungsproblem). In Gewächshausversuchen konnte aber die Möglichkeit einer Internalisierung von *E.coli* nachgewiesen werden.

Im Projekt konnte nur ein Teil der Kulturarten untersucht werden, die zu Fertigsalaten verarbeitet werden. Hier wären weitere Untersuchungen mit anderen Arten sinnvoll, da auf Grund unterschiedlicher Blattoberflächen und -strukturen unterschiedliche Ergebnisse denkbar sind.

I. 8. Kurzfassung

SafeSalad - Qualität und Sicherheit in der Produktionskette biologisch produzierter Fertigsalate

Hartmut Stützel[1)], Beatrix Alsanius[2)], Andreas Fricke[1)], Rahel Hartmann[2)], Karsten Lindemann-Zutz[1)]

[1)] Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme, Abteilung Systemmodellierung Gemüsebau, Herrenhäuser Str. 2, 30419 Hannover, Email: stuetzel@gem.uni-hannover.de

[2)] Swedish University of Agricultural Sciences, Dept. of Biosystems and Technology, Microbial Horticulture Lab, PO Box 103, SE-230 53 Alnarp, Sweden, Email: beatrix.alsanius@slu.se

Zur Analyse unterschiedlicher Wege einer mikrobiologischen Kontamination mit potenziellem Gesundheitsrisiko wurde die Primärproduktion von verschiedenen Blattsalatarten (Eissa-

lat, Eichblattsalat, Rucola, Mangold) in einem kommerziellen, biologisch produzierenden Betrieb in Norddeutschland in den Jahren 2012, 2013 und 2014 untersucht. Pro Jahr erfolgten jeweils zwei Pflanzungen zu verschiedenen Terminen. Die Pflanzen wurden mit verschiedenen Anbautechniken kultiviert, welche unterschiedliche Gefährdungspotenziale für mögliche Kontaminationen abbilden sollten. Variiert wurden Dünger (Haarmehlpellets, Hühnertrockenkot), Bewässerungssystem (Über-Kopfbewässerung, Tropfbewässerung), Bodenbedeckung (unbedeckter Boden, Mulcheinsatz) sowie genutzte Wasserqualität (Leitungswasser, Brunnenwasser, Teichwasser). Zusätzlich zu den mikrobiologischen Untersuchungen wurden die Auswirkungen der verschiedenen Anbautechniken in Bezug auf das Pflanzenwachstum analysiert. In den Feldversuchen wurden die Wasserqualität als Großteilstück und Düngung, Bewässerung und Bodenbedeckung als Kleinteilstücke in einem Spalt-Spalt-Spaltanlage mit drei Wiederholungen als Blöcke angeordnet. Stichproben von zwei Pflanzen pro Wiederholung und Auswertungstermin wurden zur Charakterisierung der mikrobiologischen Kontamination und des Pflanzenwachstums in einem zweiwöchigen Intervall geerntet und im Anschluss im Labor untersucht. Außerdem wurden Probenahmen und Analysen von Saatgut, Jungpflanzen, Substrat, Düngemittel, Bewässerungswasser, Boden und Blättern durchgeführt.

Pflanzenwachstum

Die Daten des Pflanzenwachstums zeigten eine signifikante Wirkung der Düngung auf die Frisch- und Trockenmasse. Parzellen die mit Hühnertrockenkot gedüngt wurden zeigten besseres Wachstum und eine höhere Biomasse, während gleichzeitig der Anteil der Trockenmasse bei den Kulturen Eis- und Eichblattsalat reduziert wurde. Für Rucola und Mangold wurden nur wenige signifikante Unterschiede zwischen den Varianten gefunden.

Zu Beginn des Wachstums zeigten die Auswertungen einen negativen Mulcheffekt auf die gebildete Frisch- und Trockenmasse. Während der späteren Auswertungen wurden diese Effekte nicht nachgewiesen.

Eine Analyse der Qualitätsparameter Nitratgehalt und Strukturkomponenten der Zellwand, die ein Indikator für die Knackigkeit des Produkts sind, zeigte einen Einfluss des Düngers und der Bodenabdeckung. Eissalat, der auf Mulchabdeckung wuchs, zeigte höhere Nitratgehalte und weniger strukturelle Zellwandkohlenhydraten in 2013, wobei der Effekt auf die strukturgebenden Kohlenhydrate 2012 umgekehrt war. Der Einsatz von Hühnertrockenkot zeigte höhere Nitrat-N-Gehalte im Produkt. Insgesamt waren die Unterschiede klein und die Auswirkungen auf die Produktqualität zu vernachlässigen.

Mikrobiologie/Modellierung

Die risikofreudigeren Anbaumethoden im Freilandversuch (Hühnertrockenkot, Überkopfbewässerung mit Teichwasser, keine Mulchabdeckung) resultierten in keiner messbaren Ände-

rung der mikrobiellen Besiedelung. Dies sollte jedoch nicht die Gefahr, welche von Input mit schlechter mikrobiologischer Qualität ausgeht, verharmlosen. Manche Krankheitserreger wie z.B. humanpathogene *E. coli* haben eine niedrige Infektionsdosis von unter 100 Bakterien (Rheinbaben, 2011). Folglich können auch schon geringe Mengen an Bakterien, welche unter dem Detektionslimit der hier angewandten Analysemethoden liegen und somit nicht erfasst würden, zu schweren Krankheitsausbrüchen führen.

In Gewächshausversuchen konnte gezeigt werden, dass *E. coli* O157:H7 gut auf Blättern überlebt, und dass die Kolonisierung unabhängig von der N-Quelle vorkommt, wenn *E. coli* O157:H7 auf anderem Wege als durch Dünger eingebracht wird. Von Bedeutung ist weiterhin die Möglichkeit einer Internalisierung von *E. coli* O157:H7. Dabei ist die Unversehrtheit der Salatblätter entscheidend, da festgestellt werden konnte, dass eine Schädigung die Invasion von *E. coli* O157:H7 begünstigen und somit zu einem erhöhten Risiko beitragen kann. Zur Verminderung des Kontaminationsrisikos müssen schon während der Produktion im Freiland oder Gewächshaus Maßnahmen (z.B. durch Anwendung des HACCP-Konzeptes) ergriffen werden.

In keinem der angebauten Freilandsätze traten allerdings zum Erntetermin Kontaminationen oberhalb der Warnwerte der Dt. Gesellschaft für Hygiene (DGHM, 2011) auf.

Eine Modellierung der Zusammenhänge zwischen Kontaminationsquelle, -zeitpunkt, Befallsdynamik und Umweltdaten war leider nicht möglich, da es im Versuchszeitraum nur zu geringer bzw. in einigen Sätzen zu keiner Kontamination kam. Dessen ungeachtet wurde zumindest die Grundstruktur eines Modells entwickelt.

I. 9. Summary

SafeSalad - Qualität und Sicherheit in der Produktionskette biologisch produzierter Fertigsalate

Hartmut Stützel[1)], Beatrix Alsanius[2)], Andreas Fricke[1)], Rahel Hartmann[2)], Karsten Lindemann-Zutz[1)]

[1)] Prof. Dr. Hartmut Stützel, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme, Abteilung Systemmodellierung Gemüsebau, Herrenhäuser Str. 2, 30419 Hannover, Email: stuetzel@gem.uni-hannover.de

[2)] Prof. Dr. Beatrix Waechter Alsanius, Swedish University of Agricultural Sciences, Dept of Biosystems and Technology, Microbial Horticulture Lab, PO Box 103, SE-230 53 Alnarp, Sweden, Email: beatrix.alsanius@slu.se

To analyze roots of transmission for microorganisms with potential health risk during primary production, the production of different leafy vegetables (iceberg lettuce, red oak leaf lettuce, rocket, Swiss chard) was studied on a commercial organically producing farm in North Germany in the years of 2012, 2013 and 2014. Per year two sets were planted at different dates. The plants were cultivated applying the following different production techniques, which mimicked different scenarios of conducive or non-conducive strategies: different fertilizers (pig hair pellets, dry chicken manure), irrigation systems (overhead irrigation, drip irrigation), soil covers (uncovered, mulch), and different water qualities (tap water, well water, pond water). In addition to the microbial analyses the effects of these different techniques on plant growth were investigated. In the field experiments the water quality was the main plot and fertilization, irrigation system and soil cover were defined as sub plots in a split-split-split plot block design with three replications. Samples of two plants per replication and time harvest were taken to characterize the microbial contamination and the plant growth in a two week interval. Additionally samples of seeds, transplants, growing medium, fertilizers, irrigation water, soil and leaves were taken and analyzed.

Plant development

A significant effect of the fertilizer treatment was found on fresh and dry matter production. Plants fertilized with dry chicken manure showed a better growth and a higher biomass, whereas the dry matter percentage of iceberg lettuce and red oak leaf lettuce was reduced in these treatments. For rocket and Swiss chard only a few significant differences were found.

During the starting period of the crop the mulch treatment showed a negative effect on fresh and dry mass development. In the later phase of production these effects could not be found anymore.

The quality parameters nitrate content and structural components, which are an indicator of the firmness of the produce, were influenced by the fertilizer and the soil coverage. Iceberg lettuce grown over mulch had a higher nitrate content and lower structural cell wall carbohydrates in 2013, whereas the effect on the structural carbohydrates in 2012 was the opposite. The use of dry chicken manure resulted in higher nitrate content in the produce.

In total the effects of the different production treatments were small and the impact on the product quality negligible.

Microbiology/Modelling

The production measures with a higher infection risk (dry chicken manure, overhead irrigation with pond water, no mulch) resulted in no gaugeable change in microbial contamination. This statement should not trivialize the danger which is associated with the input of material of low microbial quality into the production process. Some pathogens like e.g. human patho-

genic *E.coli* have an infective dose of lower than 100 bacteria (Rheinbaben, 2011). Consequently only low amounts of bacteria, which lie below the detection limit of the analytic methods used and would not be detected here, can result in a serious disease outbreak.

Greenhouse experiments showed high survival rates of *E.coli* O157:H7 on leaves, and colonization occurs independently from the nitrogen source, if *E.coli* O157:H7 is introduced by a non-fertilizer source. Of high importance is the finding that *E. coli* O157:H7 can enter the plant tissue. In this respect the intactness of the lettuce leaves is of importance, because it could be detected that a damage promotes the invasion of *E. coli* O157:H7 into the leaf and causes a higher risk.

To reduce the risk of contamination in open field or in greenhouse production already during growth adequate measures (e.g. application of the HACCP concept) have to be applied.

However, in none of the sets in the open field experiments a contamination above the threshold values published by the Deutschen Gesellschaft für Hygiene (DGHM, 2011) occurred on final harvest.

Caused by the low, and in some sets missing, infection modelling of the interactions between possible infection sources, point in time and development of infection and climate data was not possible. Nevertheless a structure of a model was developed.

I. 10. Literaturverzeichnis

AGÜERO, M.; PEREDA, J.; ROURA, S.; MOREIRA, M.; DEL VALLE, C. (2005). Sensory and biochemical changes in Swiss chard (*Beta vulgaris*) during blanching. *LWT-Food Science and Technology,* **38**(7), 772-778.

ALAM, M.; AHLSTRÖM, C.; BURLEIGH, S.; OLSSON, C.; AHRNÉ, S.; EL-MOGY, M.M.; MOLIN, G.; JENSÉN, P.; HULTBERG, M.; ALSANIUS, B.W. (2014). Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 on spinach and rocket as affected by inoculum and time to harvest. *Scientia Horticulturae*, **165**, 235-241.

ALLEN, R.G.;PEREIRA, L.S.; RAES, D.; SMITH,M. (1998). Crop evapotranspiration: guidelines for computing crop water requirements Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

ALSANIUS, B.W.; BERGSTRAND, K.J.; HARTMANN, R.; GHARAIE, S.; WOHANKA, W.; DORAIS, M.; ROSBERG, A.K. (2015). Ornamental flowers in new light: Artificial lighting shapes the microbial phyllosphere community structure of greenhouse grown sunflowers (*Helianthus annuus* L.). submitted.

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**, 67-74.

ARUSCAVAGE, D.; MILLER, S.A.; LEWIS IVEY, M.L.; LEE, K.; LEJEUNE, J.T. (2008). Survival and dissemination of *Escherichia coli* O157: H7 on physically and biologically damaged lettuce plants. *Journal of Food Protection®,* **71**(12), 2384-2388.

BÄRLOCHER, F. (1999). Biostatistik: Praktische Einführung in Konzepte und Methoden.1. Aufl., Thieme-Verlag, Stuttgart (ISBN 3131162716).

BARANYI, J.; ROBERTS, T.A. (1995). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int J Food Microbiol.* **23,** 277-294.

BERG, G.; EBERL, L.; HARTMANN, A. (2005). The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology*, **7**, 1673-1685.

BEUCHAT, L.R. (2002). Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection,* **4**(4), 413-423. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01555-1.

BEUCHAT, L. R.; RYU, J.-H. (1997). Produce handling and processing practices. *Emerging infectious diseases*, **3**(4), 459.

BIOSTOFFVERORDNUNG - BIOSTOFFV (2013). Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei Tätigkeiten mit Biologischen Arbeitsstoffen. Stand: Juli 2013. http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/biostoffv_2013/gesamt.pdf (Abgerufen: 17.09.2015)

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. doi: 10.1128/AEM.01073-08.

BRANDL. M.T. (2006). Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Ann. Rev. Phytopath*., **44**, 367-392.

CARRASCO, E.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; VALERO, A.; GARCÍA-GIMENO, R.M.; ZURERA, G. (2010). Risk assessment and management of Listeria monocytogenes in ready-to-eat lettuce salads. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **9**, 498-512.

CFSAN (1998). Guide to minimize microbial food safety hazards for fresh fruits and vegetables. [http://www.foodsafety.gov/~acrobat/prodguid.pdf]

DANHORN, T.; FUQUA, C. (2007). Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Ann. Rev. Microbiol*., **61**, 401-422.

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. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.058.

DGHM – DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR HYGIENE UND MIKROBIOLOGIE (2011). Veröffentlichte mikrobiologische Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von Lebensmitteln. Stand: November 2011. http://www.dghm.org/m_275 (Abgerufen: 17.09.2015).

DIN19650 (1999). Bewässerung. Hygienische Belange von Bewässerungswasser. Beuth, Berlin.

ERICKSON, M.C. (2010). Microbial risks associated with cabbage, carrots, celery, onions, and deli salads made with these produce items. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **9**, 602-619.

HOFF, C. (2005). R-Handbuch für Biostatistik. Eine Einführung für Studierende der Gartenbauwissenschaften und Pflanzenbiotechnologie. 2005 als Bachelor-Arbeit an der Universität Hannover eingereicht. 2008 an der Georg-August-Universität Göttingen zur Anpassung an neue R-Funktionen zu multiplen Vergleichen modifiziert.

http://www.biostat.uni-hannover.de/teaching/Hoff/RHandbuch.pdf.

FISCHER-ARNDT, M., D. NEUHOFF AND U. KÖPKE (2008). Effects of weed management strategies on quality and enteric pathogen contamination of organic lettuce.

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. *Journal of Food Protection*, **67**, 1365-1370.

ISLAM, M.; DOYLE, M.P.; PHATAK, S. P.; MILLNER, P.; JIANG, X. (2005). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on carrots and onions grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Food microbiology*, **60**, 63–70.

JOHANNESSEN, G.; FRØSETH, R.; SOLEMDAL, L.; JARP, J.; WASTESON, Y.; RØRVIK, L.M. (2004). Influence of bovine manure as fertilizer on the bacteriological quality of organic iceberg lettuce. *Journal of Applied Microbiology,* **96**(4), 787-794.

KÖHLER, W.; SCHACHTEL , G.; VOLESKE, P. (2002). Biostatistik. Eine Einführung für Biologen und Agrarwissenschaftler. Springer-Verlag, Berlin (ISBN: 3540429476).

KRÄMER, J. (2007). Lebensmittelvergiftungen. In: Lebensmittel-Mikrobiologie (Hrsg. Krämer, J.), Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 23-128.

KRIZEK, D.T.; CLARK, H.D.; MIRECKI, R.M. (2005). Spectral properties of selected UV-blocking and UV-transmitting covering materials with application for production of high-value crops in high tunnels. Photochemistry and Photobiology, **81**, 1047-1051.

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.

LEÓN, J.; ROJO, E.; SÁNCHEZ-SERRANO, J.J. (2001). Wound signalling in plants. *Journal of Experimental Botany,* **52**(354), 1-9.

LGMA - LEAFY GREENS MARKETING AGREEMENT (2012). Commodity specific food safety guidelines for the production and harvest of lettuce and leafy greens. Stand: August 2013.https://www.wga.com/sites/wga.com/files/AZ%20-%20LGMA%20Metrics%20(Vers%207)%2008-01-2013.pdf (Abgerufen: 17.09.2015)

LITTLE, C.L.; GILLSEPIE, I.A. (2008). Prepared salads and public health. *Journal of Applied Microbiology*, **105**, 1729-1743.

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. Int J Food Microbiol.,* **163**, 119-128.

MACGOWAN, A.P.; BOWKER, K.; MCLAUCHLIN, J.; BENNETT, P.M.; REEVES, D.S. (1994). The occurrence and seasonal changes in the isolation of Listeria spp. in shop bought food stuffs, human faeces, sewage and soil from urban sources. *International journal of food microbiology,* **21**(4), 325-334.

MÖLLER, K.; SCHULTHEISS, U. (2014). Organische Handelsdüngemittel im ökologischen Landbau. KTBL-Schrift 439. 392 Seiten.

MONIER, J.-M.; LINDOW, S. (2005). Aggregates of resident bacteria facilitate survival of immigrant bacteria on leaf surfaces. *Microbial ecology,* **49**(3), 343-352.

OROZCO-CARDENAS, M.; RYAN, C.A. (1999). Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* **96**(11), 6553-6557.

PONCE, A.G.; ROURA, S.I.; D. VALLE, C.E.; FRITZ, R. (2003). Characterization of native microbial populations on Swiss chard (*Beta vulgaris*, type cicla) cultivated by organic methods. *LWT - Food Science and Technology* **36**(2)*,* 183-188.

RATKOWSKY, D.A.; OLLEY, J.; MCMEEKIN, T.A.; BALL, A., (1982). Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *Journal of Bacteriology* **149**, 1–5.

RHEINBABEN, F.V. (2011). Enterohämorrhagische *Escherichia coli*. *Krankenhaus-Hygiene + Infektionsverhütung,* **33**(4), 85-90. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.khinf.2011.07.013.

RKI ROBERT KOCH-INSTITUT (2011). Abschließende Darstellung und Bewertung der epidemiologischen Erkenntnisse im EHEC O104:H4 Ausbruch, Berlin.

SAPERS, G.M.; GERBA, C.P.,Hrsg. (2014). The produce contamination problem: causes and solutions. Zweite Auflage, Academic Press.

SOLOMON, E.B., YARON, S.; MATTHEWS, K.R. (2002). Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Applied and Environmental Microbiology***, 68**(1), 397-400.

SONG, I.; STINE, S.W.; CHOI, C.Y., GERBA, C.P. (2006). Comparison of crop contamination by microorganisms during surface drip and furrow irrigation. *Journal of Environmental engineering*, **132**, 1243-1248.

STEELE, M; MAHDI, A.; ODUMERU, J. (2005). Microbial assessment of irrigation water used for production of fruit and vegetables in Ontario, Canada. *Journal of Food Protection*, **68**, 1388-1392.

ŠVEC, P.; VANDAMME, P.; BRYNDOVÁ, H.; HOLOCHOVÁ, P.; KOSINA, M.; MAŠLAŇOVÁ, I.; SEDLÁČEK, I. (2012). *Enterococcus plantarum* sp. *nov.*, isolated from plants. *International journal of systematic and evolutionary microbiology,* **62**(Pt 7), 1499-1505.

TABAN, B. M.; HALKMAN, A.K. (2011). Do leafy green vegetables and their ready-to-eat (RTE) salads carry a risk of foodborne pathogens? *Anaerobe*, **17**, 286-287.

TEPLITSKI, M.; NOEL, J.T.; ALAGELY, A.; DANYLUK, M.D. (2012). Functional genomics studies shed light on the nutrition and gene expression of non-typhoidal *Salmonella* and enterovirulent *E. coli* in produce. *Food Research International,* **45**(2), 576-586. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.020.

TORTORELLO, M. L. (2003). Indicator organisms for safety and quality—uses and methods for detection: minireview. *Journal of AOAC International,* **86**(6), 1208-1217.

WHIPPS, J.; HAND, P.; PINK, D.; BENDING, G.D. (2008). Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *Journal of Applied Microbiology,* **105**(6), 1744-1755.

WILSON, M.; LINDOW, S.E. (1994). Coexistence among epiphytic bacterial populations mediated through nutritional resource partitioning. *Applied and Environmental Microbiology,* **60(**12), 4468-4477.

WIEßNER, S.; THIEL, B.; KRÄMER, J.; KÖPKE, U. (2009). Hygienic quality of head lettuce: Effects of organic and mineral fertilizers. *Food Control,* **20**(10), 881-886. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.11.009.

YARON, S. (2014). Microbial Attachment and Persistence on Plants. In: MATTHEWS, K. R.; Sapers, G.M.; Gerba, C.P., Hrsg. The produce contamination problem: causes and solutions. Zweite Auflage, Academic Press.

Internetquellen

http://www.dwd.de/bvbw/generator/DWDWWW/Content/Oeffentlichkeit/KU/KU2/KU21/klimadaten/german/download/tageswerte/kl__10338__hist__txt,templateId=raw,property=publicationFile.zip/kl_10338_hist_txt.zip.

I. 11. Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt

Auf Grund der in der Öffentlichkeit sehr sensibel diskutierten Thematik wurden bis Ende des Projektes und insbesondere der Versuche in den Gewächshauskammern keine Ergebnisse veröffentlicht.

Folgende Veröffentlichungen in wissenschaftlichen Zeitschriften sind geplant:

- Microbial colonization of field grown leafy vegetables is governed by the plant species and age, but not by treatment"
- Internalization of *Escherichia coli* O157:H7 gfp in rocket and Swiss chard as affected by abiotic and biotic damage
- Microbial colonization of vegetable seeds
- Impact of organic fertilizers on prevalence of *E. coli* O157:H7gfp+ and *Listeria spp*. in rocket (*Diplotaxis tenuifolia*) and Swiss chard (*Beta vulgaris cicla*)
- Impact of organic nitrogen fertilizers on the microbial community structure and prevalence of *E. coli* O157:H7 on leafy vegetables
- Zutz

Poster auf der 40. Gartenbauwissenschaftlichen Jahrestagung in Dreden:
Zutz K, Fricke A, Stützel H (2014). Modellbasierte Risikoabschätzung im Anbau biologisch produzierter Salate. BHGL-Schriftenreihe, Band 30, ISSN 1613-088X, Eigenverlag. S. 107.

Vom 17.01.14-26.01.14 wurde das Projekt im Rahmen der Sonderausstellung des BMEL auf der Grünen Woche in Berlin der Öffentlichkeit vorgestellt.

Teil II Universität Hohenheim (2811OE121)

I.1. Kurzdarstellung

1.1 Aufgabenstellung

Ziel des vorliegenden Projektes war es, mittels geeigneter technologischer Maßnahmen und Strategien die mikrobielle Kontamination und damit verbundene Gesundheitsrisiken bei biologisch erzeugten Blattsalaten über die gesamte Wertschöpfungskette vom Feldanbau bis zum gewonnen Fertigprodukt zu minimieren. Zur Verbesserung der Hygiene und Haltbarkeit der verzehrfertigen Blattsalate sollten verschiedene innovative Verarbeitungstechnologien untersucht werden:

- Hochdruckwasserstrahlschneiden zur Verhinderung von Kreuzkontaminationen
- innovative Wasch- und Entkeimungsverfahren sowie biologische Waschwasserzusätze
- Verpackungsfolien mit definierter Gasdurchlässigkeit zur Verlängerung der Haltbarkeit
- Verringerung des Wasserverbrauchs und Keimreduktion in der Verarbeitung durch Rezyklierung des Waschwassers nach Desinfektion mit UV-C Strahlung.

1.2 Voraussetzung, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die Mikrobiota minimalverarbeiteter Gemüse spiegelt grundsätzlich den Zustand ihrer Umgebung wider. Als Hauptvertreter der Mikrobiota auf frischem Gemüse wurden dabei gramnegative Stäbchen wie z.B. Pseudomonaden identifiziert (King et al., 1991). Bei konventionell angebauten Salaten liegen die Keimgehalte zwischen 10^4 – 10^6 Kolonien bildenden Einheiten (KbE)/g (King et al., 1991). Bei Studien mit biologisch kultivierten Salaten wurden auch höhere Belastungen mit aeroben mesophilen Keimen nachgewiesen (Oliveira et al., 2010; Wießner et al., 2009). Darüber hinaus kann es durch den Einsatz organischer Dünger (Stallmist, Gülle) oder durch Bewässerung mit Oberflächenwasser, das mit humanen oder tierischen Fäzes kontaminiert ist, zur Kontamination und Besiedelung der Rohware mit humanpathogenen Mikroorganismen kommen (De Roever, 1998; Steele et al., 2005). Besonders problematisch sind Kontaminationen mit Salmonellen und enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) (Francis et al., 1999). Da bei der Herstellung minimal verarbeiteter Gemüseprodukte lediglich solche Verarbeitungsschritte angewandt werden können, die ohne thermische Haltbarmachung auskommen (Putzen, Schneiden, Waschen, Zentrifugieren und

Verpacken) und somit keine Inaktivierung von Mikroorganismen und Enzymen erfolgt (Rolle and Chism, 1987), sind besonders hohe hygienische Anforderungen an den gesamten Herstellungsprozess zu stellen. Dennoch können verzehrfertige Blattsalate ein potentielles Gesundheitsrisiko darstellen und als Auslöser schwerer Krankheiten, wie bei der in 2011 ausgebrochenen EHEC Epidemie mit 3842 klinischen Erkrankungen und 53 Todesfällen, fungieren. Die Verarbeitung von Salaten zu verzehrfertigen Produkten verursacht zudem unweigerlich eine Verwundung des Pflanzengewebes durch Schnitte und Frakturen. Dies induziert zahlreiche Wundstressreaktionen wie z.B. die vermehrte Synthese der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL), die Erhöhung der Atmungsaktivität oder die Bildung von Ethylen, welche den Verderb minimal verarbeiteter Gemüseprodukte zusätzlich beschleunigen (Saltveit, 1997). Nach Empfehlung der deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) sollten verzehrfertige Salatprodukte am Ende der Haltbarkeitsdauer (6 Tage) nicht mehr als 5×10^7 KbE pro Gramm Produkt an aeroben, mesophilen Mikroorganismen enthalten (DGHM, 2011). Um diese Vorgabe zu erfüllen, werden in zahlreichen Ländern chlorhaltige Desinfizientien angewendet (Francis und O'Beirne, 2002). Da bei biologischen Produkten keine derartigen chemischen Desinfektionsmittel angewendet werden dürfen und auch bei herkömmlicher Produktion zunehmend Bedenken hinsichtlich der Bildung toxischer Nebenprodukte bei der Behandlung mit Chlor bestehen, sind Untersuchungen zu industriell geeigneten, alternativen Behandlungsmethoden von großer Bedeutung für die Gewährleistung der Sicherheit und Qualität (Rico et al., 2007).

1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Die Untersuchungen innovativer Prozesstechnologien bei der Herstellung verzehrfertiger Salatprodukte erfolgten durch das Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie (Zuwendungsempfänger II). Nach Optimierung der einzelnen Verfahren im Labormaßstab wurden im Technikumsmaßstab pro Verarbeitungsvariante Chargengrößen von etwa 50 kg Rohware verarbeitet. Dies sollte einerseits die Probenhomogenität gewährleisten und andererseits die Durchführbarkeit der Methoden im vorindustriellen Maßstab demonstrieren. Für die Verarbeitung der Salate wurden dazu von einem Industriepartner (Kronen, Kehl am Rhein) eine industrielle Verarbeitungslinie sowie eine innovative VORTEX-Waschlinie zur Verfügung gestellt. In separaten Versuchsansätzen sollten folgende Prozesstechnologien auf ihre Tauglichkeit zur Herstellung qualitativ hochwertiger, sicher Salatprodukte untersucht und systematisch optimiert werden:

- Anwendung eines Ultrahochdruck Wasserstrahlschneiders zur Vermeidung von Kreuzkontamintation
- Anwendung von warmem Wasser

- Anwendung von Waschwasseradditiven (pflanzliche Detergenzien, Calciumlactat, phenolische Extrakte, Molkenproteinkonzentrate)
- Entkeimung des Waschwassers mit UV-C Strahlung

Die Bewertung der innovativen Technologien erfolgte im Vergleich zu bereits etablierten, konventionellen Verarbeitungsprozessen. Im Anschluss an die Verarbeitung wurden die verzehrfertigen Salate in handelsüblichen Folienbeuteln gelagert. Das Folienmaterial wurde entsprechend den physiologischen Anforderungen der Salate ausgewählt. Um die Auswirkungen der angewandten Prozesse auf die Qualität der verzehrfertigen Salate beurteilen zu können, wurden auf verschieden Ebenen der Verarbeitung und im Verlauf der Lagerung verschiedene Analysen durchgeführt. Dabei sollte unteranderem eine Bestimmung der Gaszusammensetzung in den modifizierten Atmosphären, die Bewertung der mikrobiologischen Qualität (mesophile, aerobe Gesamtkeimzahlen, Pseudomonaden, *Enterobacteriaceae*) sowie die Bestimmung phenolischer Verbindungen, pflanzlicher Pigmente (Chlorophylle, Carotinoide) und relevanter Enzymaktivitäten (Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL), Polyphenoloxidase (PPO), Lipoxygenase (LOX), Chlorophyllase (CL)) erfolgen. Außerdem sollte die sensorische Qualität und die antioxidative Kapazitäten der Rohwaren sowie der Produkte bestimmt werden (Folin-Ciocalteu; Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) und Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)). Um die Prozesstechnologien hinsichtlich ihres Potentials zur Ablösung von Biofilmen beurteilen zu können, sollten die Biofilme vor und nach der Verarbeitung sowie während der Lagerung auf den Salatoberflächen mittels Transmissionselektronenmikroskopie visualisiert werden.

1.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

In der Literatur wurden bereits diverse Verfahren untersucht, die mit den EG-Rechtsvorschriften für den ökologischen Landbau konforme Dekontaminationsverfahren bei der Herstellung von frisch geschnittenen Salaten darstellen. Unter anderem erfolgte die Anwendung organischer Säuren wie Propionsäure, Essigsäure, Milchsäure, Malonsäure oder Zitronensäure als entkeimende Waschwasserzusätze (Park et al., 2011), die Untersuchung des Entkeimungspotentials mittels Ultraschall (Seymour et al., 2002) sowie die Anwendung organischer Säuren in Kombination mit Ultraschall (Sagong et al., 2011), die Ozonierung des Waschwassers (Baur et al., 2004a; Klaiber et al., 2004) sowie die Reduktion der Keimzahlen mittels oszillatorischer Verfahren (Kim et al., 2011). Zum jetzigen Zeitpunkt ist die industrielle Umsetzbarkeit der meisten Verfahren fraglich, da beispielsweise die Anwendung organischer Säuren bei Salaten zu Veränderungen der sensorischen Eigenschaften führen kann (Park et al., 2011) oder bei Versuchen im Technikumsmaßstab gezeigt wurde, dass durch organische

Substanzen im Waschwasser eine starke Ozonzehrung stattfindet und daher die Effektivität des Verfahrens stark eingeschränkt war (Baur et al., 2004a). Im vorliegenden Forschungsvorhaben sollten daher die im Folgenden beschriebenen neuartigen Verarbeitungsmethoden untersucht werden, die eine direkte Umsetzung in der Industrie ermöglichen könnten:

Anwendung von warmem Wasser und Calciumlaktat

In vorangegangenen Untersuchungen des Zuwendungsempfängers II wurde gezeigt, dass ein Vorwaschschritt mit warmem Wasser (50 °C, 60 s) bei ungeschnittenem Eisbergsalat eine Keimreduktion von bis zu 1,6 $\log_{10}$ KbE/g bewirken kann, ohne die sensorische Qualität der Salate während der Lagerzeit negativ zu beeinflussen (Baur et al., 2005). Zum einen werden durch die Anwendung von warmem Wasser Biofilme besser von der Blattoberfläche abgelöst, zum anderen induziert warmes Wasser einen Hitzeschock im Pflanzengewebe, welcher die Expression der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) stark reduziert. Somit kann der mikrobielle Status der Produkte verbessert und die Bildung brauner Pigmente an den Schnittkanten reduziert werden (Saltveit, 2000). Ferner bewirken erhöhte Temperaturen die Aktivierung pflanzeneigener Pektinmethylesterasen. Durch Zugabe von Calciumlaktat zum Waschwasser könnte Calcium in das Pflanzengewebe diffundieren und somit mit dem entesterten Pektin stabile Chelatkomplexe bilden, wodurch die Festigkeit des Gewebes erhöht werden würde (Carle et al., 2001).

Zugabe von pflanzliche Detergenzien zum Waschwasser

Bis zu 80% aller Bakterien auf der Blattoberfläche sind in Biofilmen beheimatet (Morris und Monier, 2003). Im Gegensatz zu „freien“ Mikroorganismen sind Mikroorganismen in Biofilmen gut vor äußeren Umwelteinflüssen geschützt, was die Wirkung von Desinfektionsmitteln oder des mechanischen Abwaschens durch Wasser reduziert (Jefferson, 2004). Da Biofilme zumeist über hydrophobe Wechselwirkungen an die mit einer wachshaltigen Cuticula überzogen Blattoberfläche haften (Gross und Logan, 1995; Ölmez und Temur, 2010), könnten pflanzliche Detergenzien zu einer verbesserten Ablösung der Biofilme während des Waschvorgangs beitragen. Im vorliegenden Projekt soll ein Extrakt aus *Quillaja saponaria* MOLINA (chilenischer Seifenrindenbaum), der in der Lebensmittelindustrie als Emulgator beispielsweise in Getränken angewandt wird, hinsichtlich seiner Eignung als Waschwasseradditiv zur Keimreduktion geprüft werden. Darüber hinaus wurden für Extrakte aus *Quillaja saponaria* antivirale und antifungale Eigenschaften nachgewiesen (Chapagain et al., 2007; Roner et al., 2007).

Zugabe von phenolischen Extrakten zum Waschwasser

Für phenolische Extrakte aus grünem Tee oder Mangokernen wurden antimikrobielle Eigenschaften beschrieben (Engels et al., 2009; Engels et al., 2011; Martín-Diana et al., 2008). Der antimikrobielle Effekt von Gallotanninen aus Mangokernen, besonders auf grampositive Bakterien wie *Listeria monocytogenes* und *Staphylococcus aureus*, beruht u.a. auf ihre hohe Eisenbindungskapazität, wodurch das für viele Bakterien essentielle Eisen entzogen wird (Engels et al., 2011).

Zugabe von Molkenproteinkonzentraten zum Waschwasser

Durch Zugabe von Molkenproteinen (28 mg/L) wurde in vorausgehenden Untersuchungen gezeigt, dass die Polyphenoloxidase (PPO) Aktivität in Eisbergsalat um 60% gehemmt werden konnte (Altunkaya, 2011) und dadurch Bräunungsreaktionen des Gewebes sowie der Verlust ernährungsphysiologisch wertvoller Polyphenole durch enzymatische Oxidation vermieden werden konnte. Zudem wurden Coatings auf Basis von Molkenproteinen erfolgreich zur Reduzierung der enzymatischen Bräunung von Apfelscheiben („Golden Delicious“) eingesetzt (Perez-Gago et al., 2005). Da in der milchverarbeitenden Industrie große Mengen an Molke anfallen, könnte der Einsatz von Molkenproteinen zur Reduzierung enzymatischer Bräunungen vielversprechend sein. Detaillierte Studien in größerem Maßstab stehen hierzu allerdings noch nicht zur Verfügung.

Wasserstrahlschneiden

Konventionell werden zum Schneiden von Salat Bandschneidemaschinen verwendet. Ein Nachteil der Bandschneidemaschinen besteht darin, dass durch die rotierenden Schneidemesser keimarme Blätter im Inneren des Salatkopfes aufgrund der hohen Keimbelastung der äußeren Blätter (King et al., 1991) kreuzkontaminiert werden. Da beim Wasserstrahlschneiden eine ständige Erneuerung des Schneidmediums stattfindet, könnte so eine Kreuzkontamination vermieden werden. Außerdem wurde bei Äpfeln bereits gezeigt, dass durch das Wasserstrahlschneiden eine Reduktion von Bräunungsreaktionen an den Schnittkannten erzielt werden kann (Carreño-Olejua et al., 2010). Dies deutet darauf hin, dass eine geringere Zerstörung des Pflanzengewebes stattgefunden hat und Substrate für die enzymatische Bräunung und mikrobielles Wachstum direkt mit dem Wasserstrahl ausgetragen wurden.

Entkeimung des Waschwasser mit UV-C Strahlung

Das Waschwasser stellt in besonderem Maße eine Quelle für Kreuzkontaminationen dar. Zudem steigt durch Rezyklierung des Prozesswassers die mikrobielle Belastung des Waschwassers mit zunehmender Verarbeitungszeit stark an (Gil et al., 2009). Energiereiche

UV-C Strahlung wird bereits erfolgreich zur Desinfektion von Luft, Wasser und Oberflächen angewandt. Die desinfizierende Wirkung von UV-C Strahlen beruht darauf, dass die energiereiche Strahlung zu Veränderungen am bakteriellen Erbgut sowie an Proteinen führt (Allende et al., 2006). Die UV-C Behandlung von Obst und Gemüse selbst gilt als ein vielversprechendes Verfahren zur Erhöhung der Produktsicherheit. Eine kurze Bestrahlungsdauer sowie die Freiheit von Rückständen stellen bei diesem Verfahren neben einem kostengünstigen Betrieb und einfach zu realisierenden Sicherheitsvorkehrungen besondere Vorteile dar. Zudem zeigten Yaun *et al*. (2004), dass bei direkter Bestrahlung (Bestrahlungsintensität von 24 mW/cm^2) von mit *Salmonella* spp. und *E. coli* O157:H7 inokuliertem Kopfsalat, die Keimzahlen um 2,65 $\log_{10}$ (*Salmonella* spp.) bzw. 2,79 $\log_{10}$ (*E. coli* O157:H7) reduziert werden konnten.

Die Bewertung der einzelnen neuartigen Verarbeitungsverfahren erfolgte anhand der Bestimmung verschiedener Qualitätsparameter. Die verwendete Fachliteratur für die angewandten Methoden zur Herstellung und Qualitätsbeurteilung der Produkte ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Verwendete Fachliteratur

Position	Verwendungszweck
Studie zur Anwendung von warmem Wasser als Vorwaschschritt	Baur et al. (2005)
Bestimmung von Enzymaktivitäten	Klaiber et al. (2005), Schweiggert et al. (2005)
Bestimmung von Chlorophyllen	Kaiser et al. (2012)
Bestimmung von Polyphenolen	Baur et al. (2004b)

1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Durchführung des Forschungsvorhabens erfolgte in Zusammenarbeit dem Institut für Biologische Produktionssysteme der Leibniz Universität Hannover (LUH; Zuwendungsempfänger I). Die LUH übernahm den Anbau der für die Verarbeitungsversuche benötigten pflanzlichen Rohware und war verantwortlich für die Organisation von Feldversuchen und die Erhebung pflanzenbaulicher Parameter. Ferner erfolgte eine Zusammenarbeit mit verschiedenen Industriepartnern. Zur Verarbeitung der Salate wurde von der Firma Kronen GmbH (Kehl am Rhein, Deutschland) eine Bandschneidemaschine, eine herkömmliche Salat-

waschmaschine, eine Zentrifuge sowie eine innovative VORTEX-Waschanlage zur Verfügung gestellt. Ein Wasserstrahlschneider wurde von der Firma HydroProcess (Chalon-sur-Saône, Frankreich) angemietet. UV-C Tauchstrahler zur Entkeimung des Wassers wurden von Dinies Technologies GmbH (Villingendorf, Deutschland) bereitgestellt. Handelsübliche Folienbeutel zum Abpacken der fertigen Produkte wurden von dem Industrieparten Amcor flexibles GmbH (Teningen, Deutschland) erhalten. Die Bewertung der mikrobiologischen Qualität der verzehrfertigen Salate erfolgte in Kooperation mit dem Lehrstuhl Lebensmittelmikrobiologie und -hygiene des Instituts für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie der Universität Hohenheim. Weiterführende Untersuchungen hinsichtlich der Dekontamination des Waschwassers mittels UV-C erfolgten in Zusammenarbeit mit dem Max Rubner-Institut (MRI, Karlsruhe, Deutschland), Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik.

II. 2. Eingehende Darstellung

2.1 Verwendung der Zuwendung und Darstellung der erzielten Ergebnisse im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

2.1.1 Verwendung der Zuwendung

Die Verwendung der Zuwendung ist Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Übersicht über die Verwendung der Zuwendung

Position	Verwendungszweck
0812 (Beschäftigte E12-E15)	Gehalt für wissenschaftliche Mitarbeiter
0817 (Beschäftigte E1-E11)	Gehalt für technischen Angestellten
0822 (sonstige Beschäf.-Entgelte)	Gehalt für wissenschaftliche Hilfskraft
0843 (sonst. allg. Verw.-Ausg.)	Sachmittel (Chemikalien, HPLC-Säulen, Referenzsubstanzen, Rohware)
0846 (Dienstreisen)	Dienstreisen (Messe)

2.1.2 Darstellung der erzielten Ergebnisse

Anwendung von warmem Wasser und Calciumlaktat:

Die Anwendbarkeit von warmem Wasser in Kombination mit Calciumlaktat zur Herstellung sicherer, qualitativ hochwertiger Salatprodukte wurde an biologisch produziertem Eisberg- und Eichblattsalaten überprüft. Der Anbau der Salate erfolgte durch Zuwendungsempfänger I (LUH). Die Verarbeitung der Salate zu verzehrfertigen Salatprodukten wurde im vorindustriellen Maßstab mit Chargengrößen von ca. 60 kg Rohware pro Verarbeitungslinie durchgeführt. Die Verarbeitung erfolgte wie in Abbildung 1 dargestellt nach 3 verschiedenen Verarbeitungslinien (I-III). Nach manueller Vorbereitung (entfernen des Strunks und der äußeren Hüllblätter) wurde der Salat mit Hilfe einer Bandschneidemaschine (GS-10, Kronen, Kehl) in 6 mm breite Streifen geschnitten. Die geschnittenen Salate der Verarbeitungslinie II und III wurden anschließend in einer industriellen Waschmaschine (Gewa 3800 B-Plus mit Insektenaustrag, Kronen, Kehl) gewaschen. Bei Verarbeitungslinie III erfolgte zudem eine Nachbehandlung der Salate mit warmem Wasser (45 °C) und Calciumlaktat (5 g/L) in einem industriellen Röhrenwaschsystem (VORTEX, Kronen, Kehl) für 2 min. Nach dem Abschleudern von anhaftendem Waschwasser wurden die Salate zu je 200 g in mikroperforierte Polyamid-Folienbeutel der Firma Amcor flexibles (Teningen, Deutschland) verpackt und bis zu 10 Tage bei 4 °C gelagert.

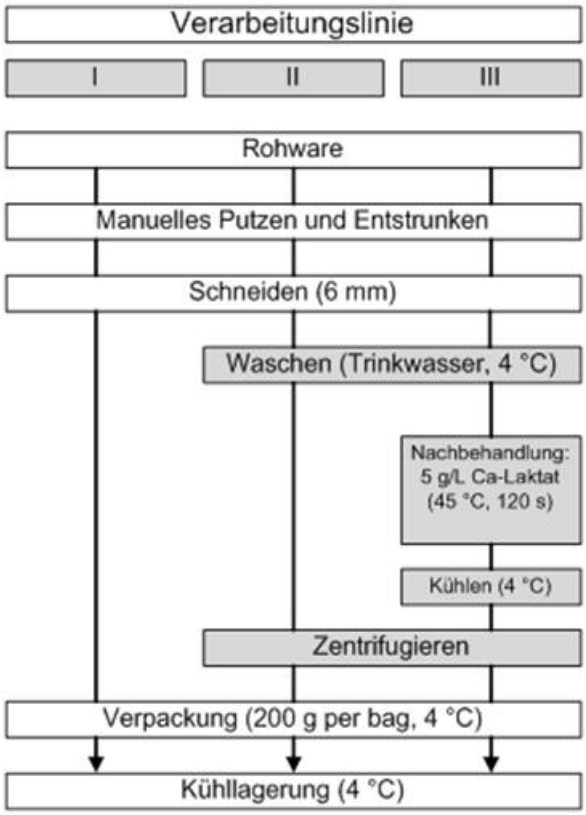


Abbildung 1: Fließschema zur Herstellung verzehrfertiger Salatprodukte aus Eisberg- und Eichblattsalaten nach drei verschiedenen Verarbeitungslinien (I-III)

Im Folgenden werden die Ergebnisse des Versuches beschrieben:

Aufgrund der offenen Kopfform wurden beim Eichblattsalat höhere Keimzahlen bestimmt als beim Eisbergsalat. Erwartungsgemäß verringerte Waschen der geschnittenen Salate, unabhängig der Wassertemperatur, die Keimbelastung der Produkte. Die Behandlung der geschnittenen Salate mit warmem Wasser und Calciumlaktat bewirkte gegenüber dem Waschen in kaltem Wasser eine größere Keimreduktion. Bei beiden Sorten wurde zu Beginn der Lagerung eine Keimreduktion von ca. 90% gegenüber den ungewaschenen Salaten von Verarbeitungslinie I beobachtet Abbildung 1). Bei geschnittenem Eichblattsalat blieb diese Keimreduktion bis zum Ende der Lagerung bestehen. Bei Eisbergsalat war dies lediglich bis Lagertag 4 zu beobachten.

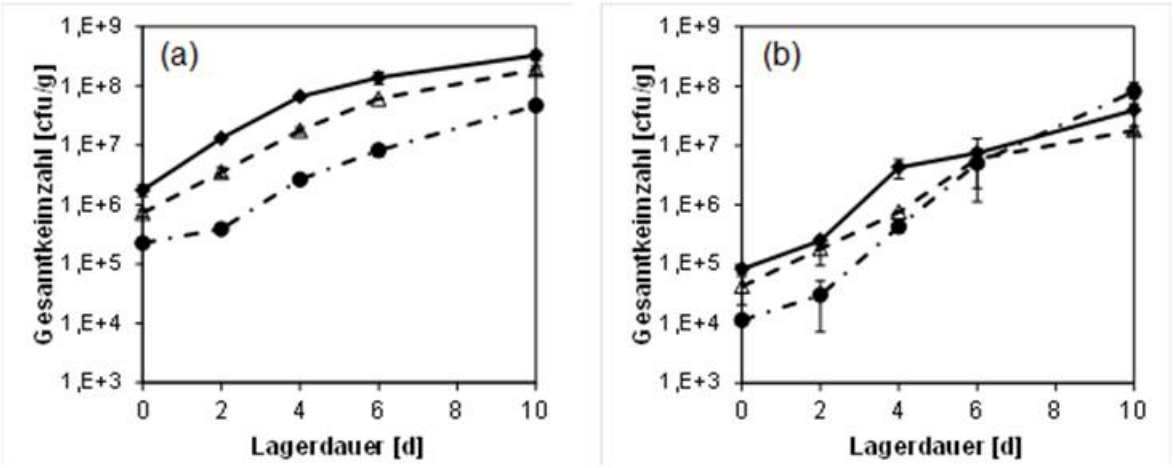


Abbildung 2: Entwicklung der Keimzahlen auf verzehrfertigem Eichblattsalat (a) und Eisbergsalat (b) im Verlauf einer 10-tägigen Lagerung; ◆: Verarbeitungslinie I (ungewaschen); △: Verarbeitungslinie II (Kaltwasser (4 °C); ●: Verarbeitungslinie III (Warmwasser (45 °C) + Calciumlaktat (5 g/L))

Die Bestimmung der Atmungsaktivität erlaubt die Bewertung der Stoffwechselaktivität pflanzlicher Gewebe. Als Folge einer durch das Schneiden verursachten Verwundung steigt die Atmungsaktivität vieler Pflanzengewebe stark an. Während der Lagerung kam es daher innerhalb der Folienbeutel zu einem Verbrauch an Sauerstoff (O_2) und einer gleichzeitigen Zunahme von Kohlenstoffdioxid (CO_2) (Abbildung 3).

Erwartungsgemäß wiesen die ungewaschenen Salate eine höhere Atmungsaktivität auf als die gewaschenen Eisberg- und Eichblattsalate. Dies ist vermutlich auf die mangelnde Keimreduktion der aeroben Mikrobiota auf den Salatprodukten durch den fehlenden Waschschritt zu erklären. Insbesondere beim Eichblattsalat bewirkte die Anwendung von warmem Wasser und Calciumlaktat eine Reduktion der Atmungsaktivität, was sich positiv auf die Produktqualität auswirkte.

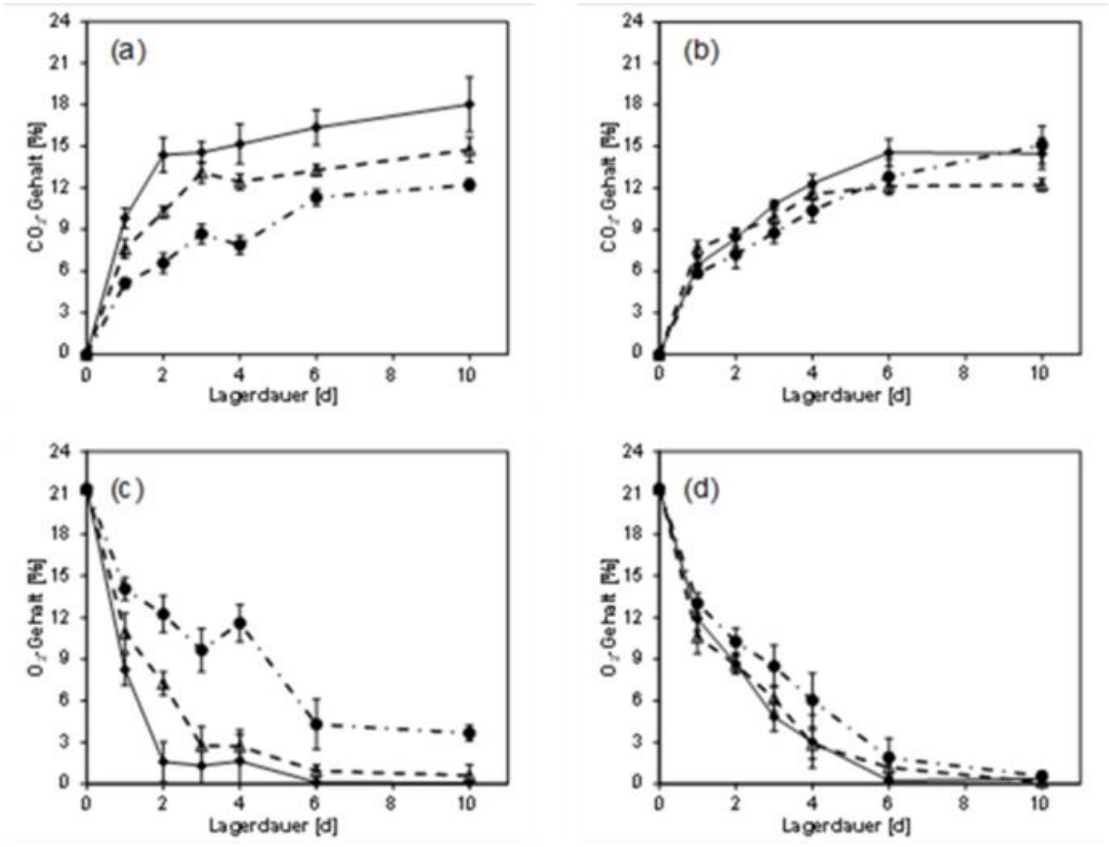


Abbildung 3: Entwicklung der CO_2- (a, b) und O_2-Gehalte (c, d) im Kopfraum verzehrfertiger Eichblatt- (a, c) und Eisbergsalate (b, d); ◆: Verarbeitungslinie I (ungewaschen); △: Verarbeitungslinie II (Kaltwasser (4 °C)); ●: Verarbeitungslinie III (Warmwasser (45 °C) + Calciumlaktat (5 g/L))

Die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) katalysiert die Bildung von Zimtsäure aus Phenylalanin und ist damit maßgeblich an der Synthese phenolischer Verbindungen beteiligt. Phenolische Verbindungen wie Kaffeesäure oder Chlorogensäure werden durch pflanzeneigene Enzyme wie der Polyphenoloxidase zu Braunen Pigmenten oxidiert, welche für die Schnittkantenbräunung bei verzehrfertigen Salatprodukten verantwortlich sind.

Aufgrund der Verwundung des Pflanzengewebes stieg die PAL-Aktivität aller Verarbeitungslinie im Verlauf der 10-tägigen Lagerung stark an. In Abbildung 4 ist der Verlauf der PAL-Aktivität von geschnittenem Eichblattsalat dargestellt.

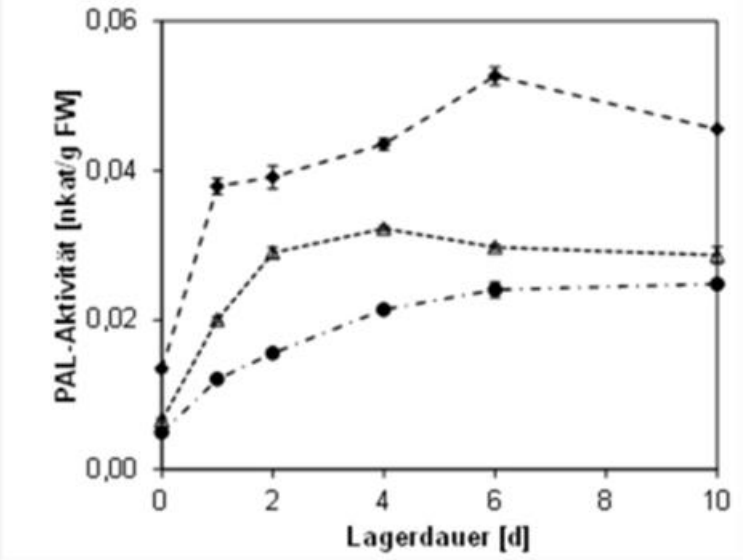


Abbildung 4: Entwicklung der PAL-Aktivitäten von geschnittenem Eichblattsalat im Verlauf der Lagerung); ◆: Verarbeitungslinie I (ungewaschen); △: Verarbeitungslinie II (Kaltwasser (4 °C)); ●: Verarbeitungslinie III (Warmwasser (45 °C) + Calciumlaktat (5 g/L))

Die ungewaschene Verarbeitungsvariante zeigte mit einer maximalen PAL-Aktivität von 0,053 nkat/ g Frischgewicht (FG) an Lagertag 6 die höchste Enzymaktivität, wohingegen die mit warmem Wasser behandelten Salate die geringste Enzymaktivität aufwies. Auch an Lagertag 10 betrug die PAL-Aktivität mit 0,025 nkat/g FG nur ca. 50% der Maximalaktivität der ungewaschenen Variante. Auch das Waschen mit kaltem Wasser (Verarbeitungsvariante II) führte im Vergleich zu ungewaschenem Eichblattsalat zu einer Reduktion der PAL-Aktivitäten. Grund für die geringeren Enzymaktivitäten in gewaschenen Salaten könnte einerseits die geringere Besiedelung mit Mikroorganismen sein, die das Salatgewebe zusätzlich zur Verwundung durch die Verarbeitung stressen. Andererseits verursacht eine Warmwasserbehandlung einen „Hitzeschock“ durch welchen die Bildung von Hitzeschockproteinen (HSPs) in den Pflanzenzellen induziert wird. Da in diesem Fall die Stoffwechselkapazität der Zelle vorzugsweise für die Synthese von HSPs verwendet wird, bleibt die *de-novo* Synthese der PAL aus.

Aus den Untersuchungen der mikrobiologischen Qualität, der Atmungsaktivität und der PAL-Aktivität geht hervor, dass eine Warmwasserbehandlung (45 °C, 120 s) unter Zugabe von Calciumlaktat (5 g/L) eine vielversprechende Möglichkeit zur Verbesserung der Qualität biologisch produzierter Eisberg- und Eichblattsalate darstellt.

Anwendung phenolischer Extrakte:

Für phenolische Extrakte, beispielsweise aus grünem Tee oder Mangokernen, wurden antimikrobielle Eigenschaften beschrieben (Engels et al., 2009; Martín-Diana et al., 2008). Die Eignung phenolischer Extrakte zur Dekontamination verzehrfertiger Blattsalate wurde am Beispiel eines handelsüblichen Grüntee-Extrakts (GT) (Kürschner Ingredients, Schönwalde, Deutschland) untersucht. Hierzu wurde Endiviensalat entsprechend einer herkömmlichen Verarbeitung vorbereitet, in 6 mm große Stücke geschnitten (Bandschneidemaschine GS-10, Kronen, Kehl) und anhand fünf verschiedener Verarbeitungslinien (I-V) für je 120 s in mit GT versetztem Waschwasser (4 °C) gewaschen (Abbildung 5). Die Dosierung des GT im Waschwasser betrug 0,5%, 0,22% (Dosage zur Herstellung eines trinkfertigen Grüntee-Getränkes), 0,1%, 0,05% und 0,0%. Nach dem Waschen wurde am Produkt anhaftendes Waschwasser mit einer handelsüblichen Salatschleuder entfernt, der Salat gut durchgemischt, zu je 100 g in Folienbeutel verpackt und bei 4 °C für bis zu neun Tage gelagert.

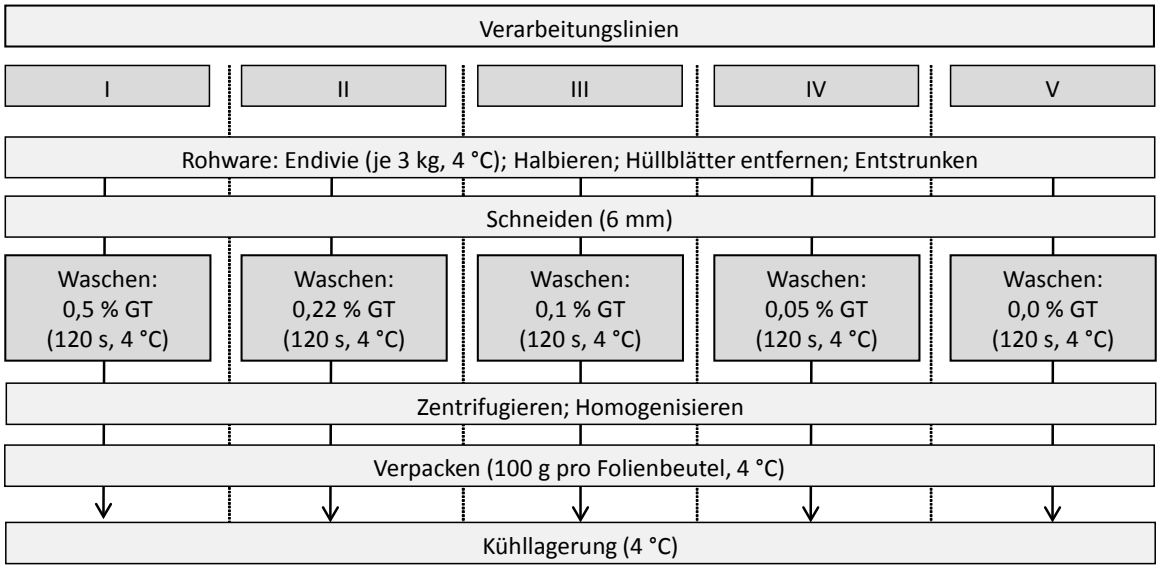


Abbildung 5: Fließschema zur Herstellung verzehrfertiger Salatprodukte aus Endiviensalat nach fünf verschiedenen Verarbeitungslinien (I-V); GT: Grüntee-Extrakt

Aufgrund der Atmungsaktivität wurde bei allen Verarbeitungslinien (I-V) ein inverser Verlauf der O_2- und CO_2- Konzentrationen im Kopfraum der Folienbeutel während der Lagerung beobachtet (Abbildung 6).

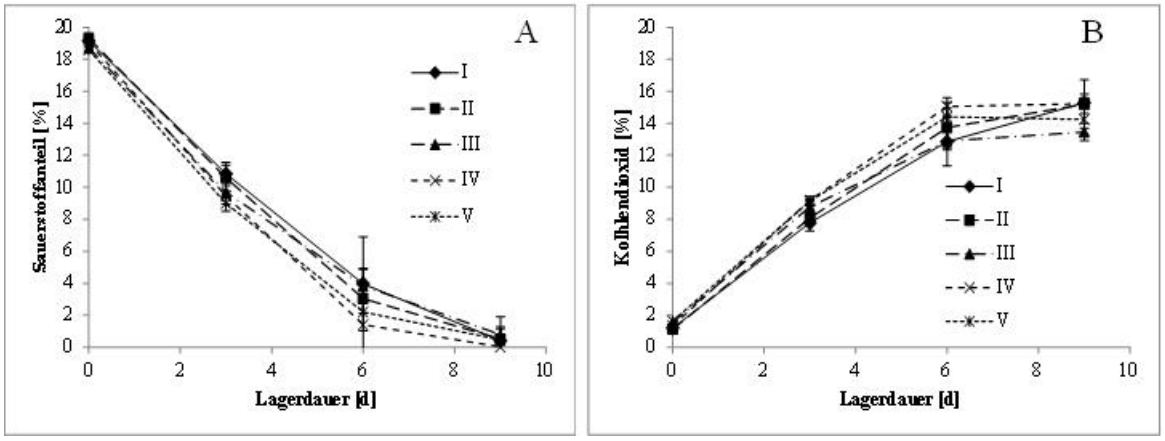


Abbildung 6: A) Sauerstoff- und (B) Kohlenstoffdioxidgehalt im Kopfraum der Folienbeutel im Verlauf einer Lagerzeit von neun Tagen.
I: 0,5% GT; II: 0,22% GT; III: 0,1% GT; IV: 0,05% GT; V: 0,0% GT; GT: Grüntee-Extrakt

Unabhängig von der eingesetzten GT Konzentration im Waschwasser wiesen alle Verarbeitungslinien eine vergleichbare Atmungsaktivität auf. Die Unterschiede der O_2- und CO_2- Konzentrationen im Kopfraum der Folienbeutel waren zu jedem Zeitpunkt nicht signifikant.

Die Entwicklung der Gesamtkeimzahlen, *Pseudomonas* spp. sowie der Enterobacteriaceae im Verlauf der Lagerung bei 4 °C ist in Abbildung 7 dargestellt. Im Verlauf der Lagerung stiegen die Gesamtkeimzahlen aller Verarbeitungslinien von $1{,}0 \cdot 10^5$-$2{,}1 \cdot 10^6$ KbE/g (Lagertag 0) auf $1{,}6 \cdot 10^7$-$7{,}2 \cdot 10^7$ KbE/g (Lagertag 9) stark an. Zwischen den einzelnen Waschvarianten konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Wie bei der Gesamtkeimzahl stiegen auch die Keimzahlen der Enterobacteriaceae und *Pseudomonas* spp. während der 9-tägigen Lagerung an. Zwischen den mit GT gewaschen Salaten (Linie I-IV) und herkömmlich verarbeiteten Salaten (Linie V) konnten allerdings auch hier keine Unterschiede festgestellt werden. Folglich konnte durch den Einsatz von GT, unabhängig von der Konzentration, kein positiver Effekt auf den mikrobiologischen Status der verzehrfertigen Endiviensalate erzielt werden. Ursache hierfür könnte eine zu geringe Kontaktzeit des Salates mit den phenolischen Verbindungen des GT während dem Waschvorgang sein. Im Waschwasser betrug die Gesamtkeimzahl nach dem Waschprozess $11{,}4 \cdot 10^4$-$30{,}0 \cdot 10^4$ KbE/mL (

Tabelle 3). Die Keimzahlen an *Pseudomonas* spp. waren unabhängig der eingesetzten Konzentration an GT bei allen Verarbeitungslinien im Wesentlichen identisch. Nur bei der Anzahl an Enterobacteriaceae konnten Unterschiede zwischen den einzelnen Prozesslinien nachgewiesen werden. Diese beruhten vermutlich aber auf eine inhomogene Keimbelastung der verwendeten Rohware und waren nicht auf die Waschvarianten zurückzuführen.

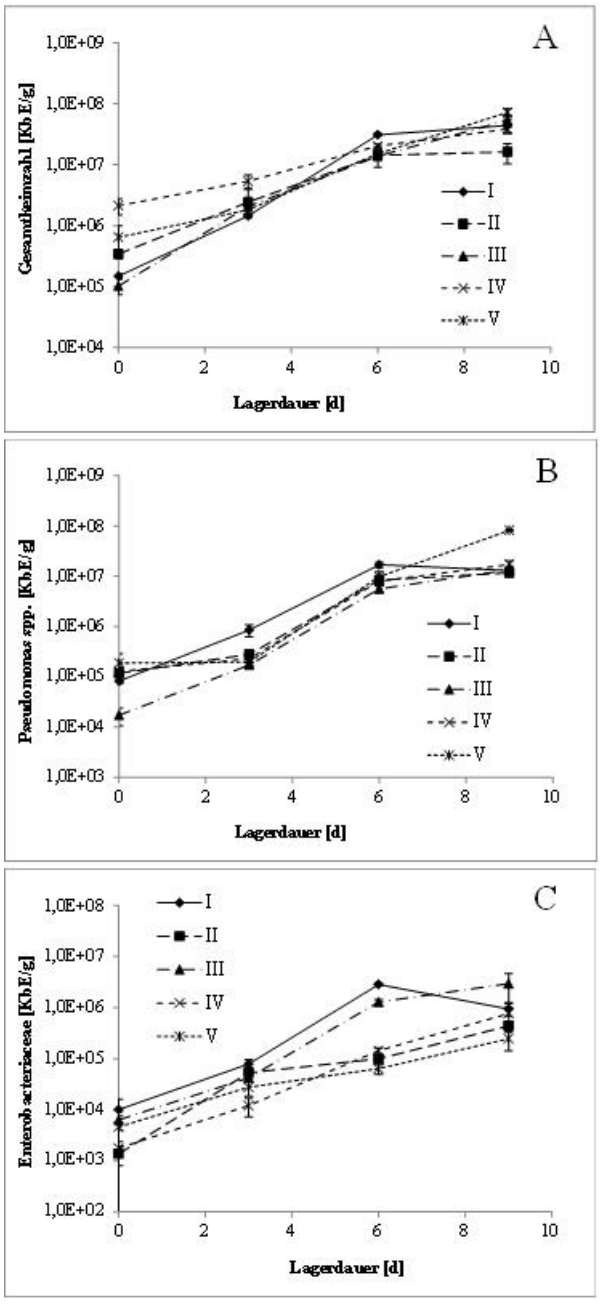


Abbildung 7: Einfluss des Grüntee-Extraktes auf (A) die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl, (B) *Pseudomonas* spp. und (C) Enterobacteriaceae des verzehrfertigem Endiviensalates im Verlauf der Lagerung

I: 0,5% GT; II: 0,22% GT; III: 0,1% GT; IV: 0,05% GT; V: 0,0% GT; GT: Grüntee-Extrakt

Tabelle 3: Gesamtkeimzahl, Anzahl an *Pseudomonas* spp. und *Enterobacteriaceae* im Waschwasser

Verarbeitungslinie	Gesamtkeimzahl* [KbE/mL x 10^4]	*Pseudomonas* spp.* [KbE/mL x 10^4]	Enterobacteriaceae* [KbE/mL x 10^3]
I	15,6 ± 2,2 b	9,8 ± 1,7 ab	28,0 ± 1,9 a
II	27,1 ± 2,3 a	12,3 ± 1,9 a	1,4 ± 0,1 c
III	11,4 ± 7,2 b	5,8 ± 0,6 b	16,4 ± 0,6 b
IV	30,0 ± 1,1 a	12,0 ± 2,0 a	0,6 ± 0,1 c
V	14,8 ± 2,9 b	12,4 ± 3,3 a	1,3 ± 0,1 c

* n = 2; I: 0,5% GT; II: 0,22% GT; III: 0,1% GT; IV: 0,05% GT; V: 0,0% GT; GT: Grüntee-Extrakt; Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Spalte weisen auf signifikante Unterschiede (α = 0.05) hin.

Wie bei den Versuchen mit warmem Wasser und Calciumlaktat stieg die PAL-Aktivität bei den Waschversuchen mit GT mit zunehmender Lagerung stark an (Abbildung 8).

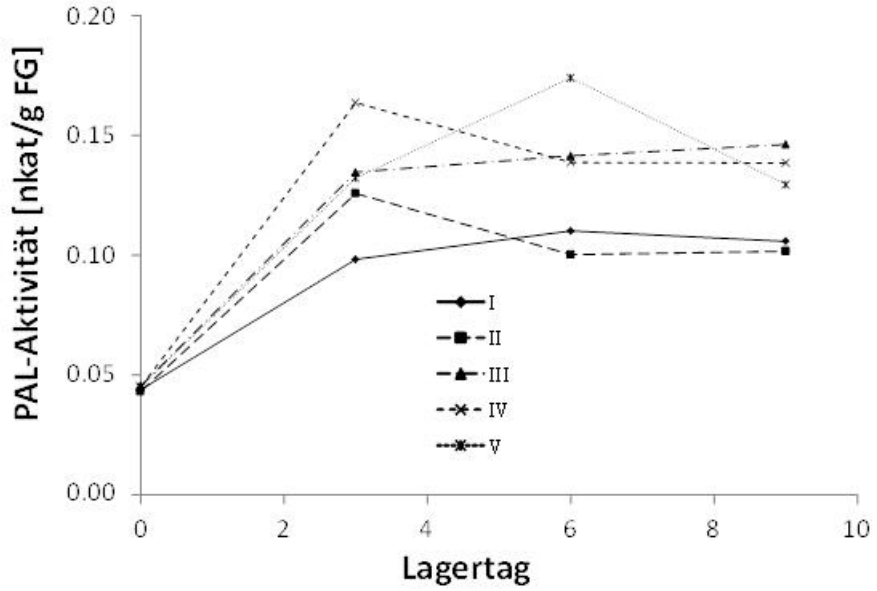


Abbildung 8: PAL-Aktivität der mit verschiedenen GT- Konzentrationen gewaschenen Endiviensalate während einer Lagerzeit von bis zu 9 Tagen bei 4 °C.
I: 0,5% GT; II: 0,22% GT; III: 0,1% GT; IV: 0,05% GT; V: 0,0% GT; GT: Grüntee-Extrakt

Mit einer maximalen Aktivität von ca. 0,16 nkat/g FG an Lagertag 6 (Linie IV) wiesen die geschnitten Endiviensalate eine deutlich höhere PAL-Aktivität auf als die Eisberg- und Eichblattsalate des oben beschriebenen Versuches. Da in beiden Fällen die Salate in 6 mm breite Streifen geschnitten wurden und damit ein identischer Verwundungsgrad vorliegt, sind diese Unterschiede vermutlich auf die eingesetzte Rohware zurückzuführen. Bei Variation der GT-Dosage wurde mit zunehmender GT-Konzentration eine zunehmende Hemmung der

PAL-Aktivität festgestellt. Diese verminderte Aktivität der PAL könnte mit einer Endproduktheммung des Enzyms durch die im Grüntee-Extrakt enthaltenen Polyphenole zu erklären sein**.**

Die sensorische Beurteilung des mit verschiedenen Grüntee-Extrakt-Konzentrationen gewaschenen Endiviensalates erfolgte am Lagertag 6, dem Ende der kommerziell üblichen Haltbarkeitsdauer (DGHM, 2011). Der Frischezustand verzehrfertiger Blattsalate wird vom Verbraucher in hohem Maße anhand der äußeren visuellen Beschaffenheit des Produktes bewertet. Insbesondere die Bräunung der Blattoberfläche und Schnittkanten trägt dabei zur negativen Beurteilung der Qualität bei (Loaiza-Velarde und Saltveit, 2001; Siddiqui et al., 2011). Bei der sensorischen Prüfung wurden die verarbeiteten Salate daher hauptsächlich hinsichtlich ihres visuellen Erscheinungsbildes beurteilt. Neben der Beurteilung des visuellen Gesamteindruck und der Schnittkantenbräunung erfolgte zusätzlich die Bewertung des Salatgeruchs und des Salatgeschmacks. Die Bewertung der Salate erfolgte mit Hilfe einer 5 Punkte Skala, wobei als Bestpunktzahl 5 Punkte und als schlechteste Bewertung 1 Punkt vergeben werden konnte. Hinsichtlich der geprüften Qualitätsparameter konnten zwischen den einzelnen Prozessvarianten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (Tabelle 4). Trotz zunehmender Inhibierung der PAL mit steigender GT-Konzentration (vgl. Abbildung 8) wurde kein positiver Effekte auf die Schnittkantenbräunung der Salate beobachtet. Folglich bewirkte die Anwendung von GT bei verzehrfertigem Endiviensalat, unabhängig der eingesetzten Konzentration, keine Verbesserung der sensorischen Eigenschaften.

Tabelle 4: Effekt verschiedener Verarbeitungsvarianten (Linien I-V) auf die sensorische Qualität verzehrfertiger Endiviensalatprodukte an Lagertag 6

Parameter	Verarbeitungslinie				
	I	II	III	IV	V
visueller Qualitätseindruck	3,2 ± 0,6 a	2,9 ± 1,0 a	3,8 ± 0,5 a	2,9 ± 0,5 a	3,4 ± 0,7 a
Schnittkantenbräunung	3,2 ± 0,8 a	3,0 ± 1,0 a	3,6 ± 0,8 a	2,9 ± 0,7 a	3,1 ± 0,5 a
typischer Salatgeruch	2,9 ± 1,0 a	2,9 ± 0,7 a	2,8 ± 1,0 a	2,4 ± 0,7 a	3,1 ± 0,7 a
typischer Salatgeschmack	3,3 ± 0,5 a	3,1 ± 1,2 a	3,4 ± 0,9 a	3,1 ± 0,8 a	3,4 ± 0,9 a

Jeder Wert stellt einen Mittelwert aus 12 Einzelwerten ± Standardabweichung dar. Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Zeile weisen auf signifikante Unterschieden (α = 0.05) hin.
I: 0,5% GT; II: 0,22% GT; III: 0,1% GT; IV: 0,05% GT; V: 0,0% GT; GT: Grüntee-Extrakt
Visueller Qualitätseindruck: 5 = sehr gut/frisches Aussehen, 3 = mittelmäßig, 1 = schlecht/kein frisches Aussehen; Schnittkantenbräunung: 5 = keine, 3 = etwas, 1 = stark; typischer Salatgeruch: 5 = ausgeprägt, charakteristisch, 3 = mittelmäßig, 1 = untypisch, abweichend; typischer Salatgeschmack: 5 = ausgeprägt, charakteristisch, 3 = mittelmäßig, 1 = untypisch, abweichend

Untersuchungen zum Auswaschen von Bitterstoffen bei verschiedenen Waschverfahren am Beispiel von Chicorée (*Cichorium intybus* L. var*. foliosum* Hegi):

Aufbauend auf den Untersuchungen zur Anwendbarkeit von warmem Wasser und Calciumlaktat sowie von phenolischen Extrakten aus Grüntee sollet zusätzlich untersucht werden ob industrielle Waschverfahren den Gehalt an Bitterstoffen in Blattsalaten unterschiedlich beeinflussen können. Der typische, bittere Geschmack von Blattsalaten ist vor allem auf die Sesquiterpenlactone zurückzuführen. Für diesen Zweck wurde exemplarisch Chicorée verwendet, da dieser Salat hohe Gehalte an Sesquiterpenlactonen und daher einen stark bitteren Geschmack aufweist.
Mittels HPLC/ LC-MS^n konnten in Chicorée 6 verschiedene Sesquiterpenlactone nachgewiesen werden (11(S),13-Dihydrolactucin (DLAC), Lactucin (LAC), 8-Deoxylactucin (8-DL), 11(S),13-Dihydro-8-deoxylactucin (D8-DL), 11(S),13-Dihydrolactucopicrin (DLCP) und Lactucopicrin (LCP). In Abbildung 9 ist ein Chromatogramm beispielhaft dargestellt.

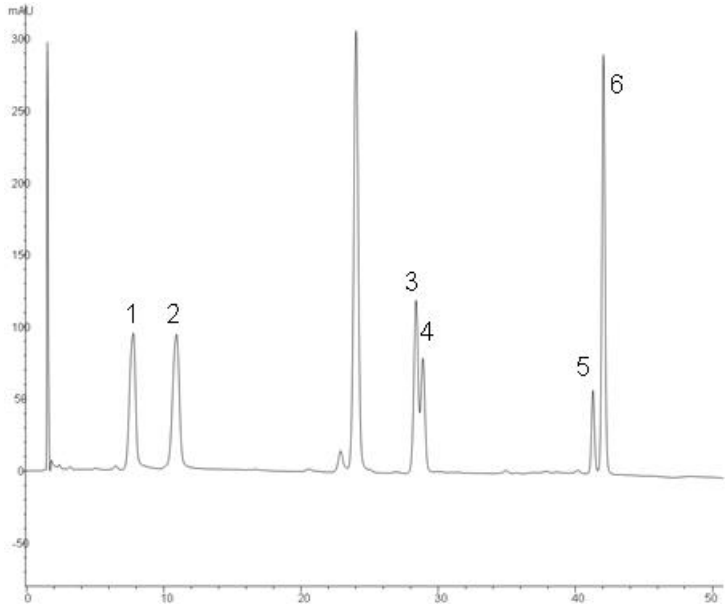


Abbildung 9: HPLC-Chromatogramm bei λ = 258 nm mit (1) 11(s),13-Dihydrolactucin; (2) Lactucin; (3) 8-Deoxylactucin; (4) 11(s),13-Dihydro-8-deoxylactucin; (5) 11(s),13-Dihydrolactucopicrin; (6) Lactucopicrin

Tabelle 5 zeigt die spektroskopischen und massenspektroskopischen Charakteristika der extrahierten Sesquiterpenlactone.

Tabelle 5: UV-Spektroskopische massenspektrometrische Charakteristika von Sesquiterpenlactonen aus Chicorée

Peak Nr.	Verbindung	t_R (min)	HPLC-DAD λ_{max} (nm)	$[M+H]^+$ m/z	HPLC/ESI(+)-MS^2 und MS^3 m/z
1	DLAC	7.4	259	279	MS^2[279]: 215(100), 187(28), 261(22)
					MS^3[279→215]: 187(100), 197(71), 169(67)
2	LAC	11.6	258	277	MS^2[277]: 213(100), 241(38), 185(36)
					MS^3[277→213]: 185(100), 157(52), 143(41), 141(37)
3	8-DL	29.2	257	261	MS^2[261]: 215(100), 243(75), 169(36), 187(35), 197(34)
					MS3[261→215]: 187(100), 188(27), 119(24)
4	D-8-DL	29.7	257	263	MS^2[263]: 217(100), 245(68), 189(35)
					MS^3[263→217]: 189(100), 199(79), 159(70), 171(66), 161(57)
5	DLPCR	42.2	258	413	MS^2[413]: 261(100), 215(19), 262(12)
					MS^3[413→261]: 215(100), 188(55), 187(32), 169(31)
6	LPCR	42.8	258	411	MS^2[411]: 259(100), 213(26), 185(17)
					MS^3[411→259]: 213(100), 185(61), 214(48), 241(40), 158(30)

DLAC: 11(S),13-Dihydrolactucin; LAC: Lactucin; 8-DL: 8-Deoxylactucin; D-8-DL: 11(S),13-Dihydro-8-deoxylactucin; DLPCR: 11(S),13-Dihydrolactucopicrin; LPCR: Lactucopicrin

Nach manueller Vorbereitung (Entfernung des Strunks und der Hüllblätter) und Schneiden des Chicorées in 6 mm breite Streifen (GS-10, Kronen, Kehl) wurde der geschnittene Salat für je 120 s in kaltem Wasser (4 °C) bzw. warmem Wasser (45 °C) gewaschen. Als Kontrollvariante diente ungewaschener Chicorée.

Waschen bewirkte eine signifikante Reduktion der Sesquiterpenlactone-Gehalte in geschnittenem Chicorée. Waschen in warmem Wasser wies dabei eine deutlich größere Wirkung auf als Waschen in kaltem Wasser. Während das Waschen mit kaltem Wasser verglichen mit den Gehalten des ungewaschenen Chicorée eine Verringerung des Sesquiterpenlactongehaltes um 27,9% bewirkte, führte der Waschgang mit Warmwasser insgesamt zu einer Verringerung um 48,0% (Abbildung 10).

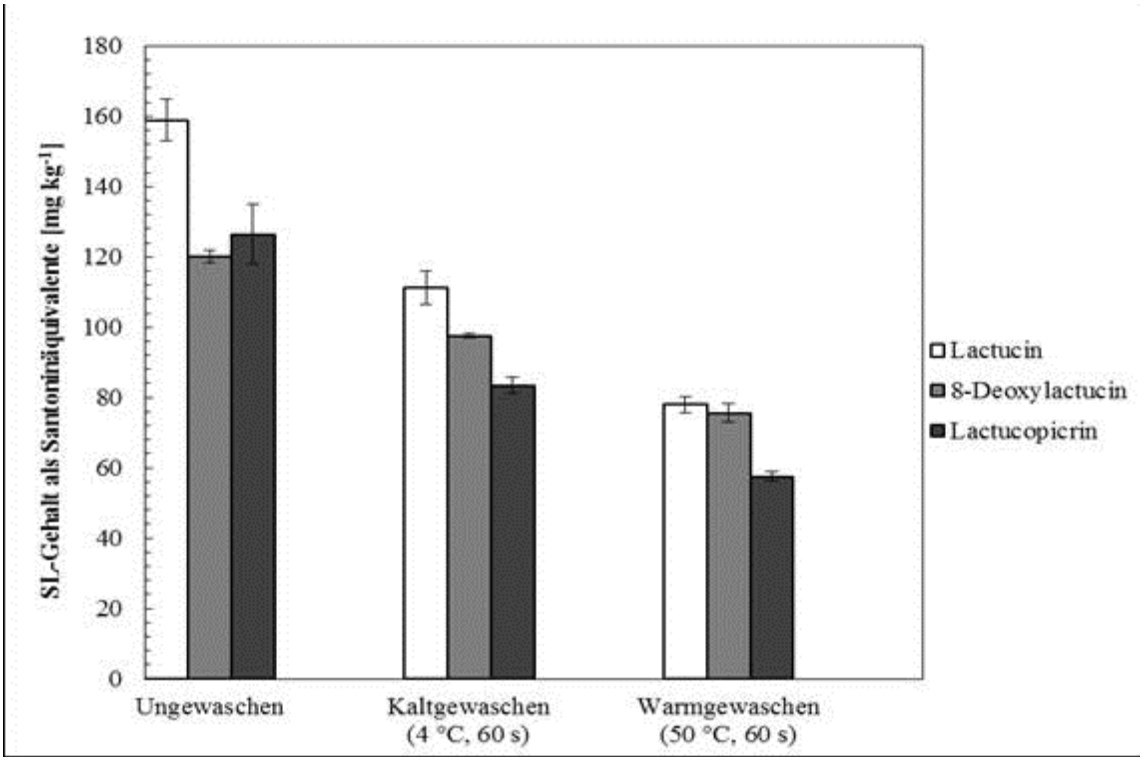


Abbildung 10: Einfluss von unterschiedlichen Waschverfahren auf den Sesquiterpenlactongehalt in Chicorée

Zudem wirkten sich die angewandten Waschvorgänge unterschiedlich stark auf die Gehalte der einzelnen Sesquiterpenlactone aus. Während Lactucin bei der Behandlung mit Kaltwasser um 30% und mit Warmwasser um 50,9% ausgewaschen wurde, konnte bei 8-Deoxylactucin lediglich eine Reduktion um 18,8% (Kaltwasser) und 37% (Warmwasser) beobachtet werden. Den stärksten Effekt bewirkte das Waschen bei Lactucopicrin (Kaltwasser: 34%; Warmwasser 54,5%).

Der Einfluss des Waschens auf die Sesquiterpenlactone in verzehrfertigem Chicorée wurde zusätzlich im Technikumsmaßstab anhand vier verschiedener Verarbeitungslinien untersucht (16 kg Chicorée je Prozesslinie). Dazu wurde Chicorée, neben einer ungewaschenen Variante, nach dem Schneiden kalt (4 °C, 120 s), warm (45 °C, 120 s) sowie mit Zusatz von Cystein in kaltem Waschwasser (0.5 mM, 4 °C, 120 s) gewaschen. Nach dem Entfernen von Haftwasser wurden die Salate zu 200 g in Folienbeutel verpackt und bis zu 10 Tage bei 4 °C gelagert.

Das Waschen mit Warmwasser reduzierte den Gehalt an Sesquiterpenlactonen bei dieser Study um 60,9–64,5%. Außerdem wurde die sensorische Qualität während der Kühllagerung signifikant verbessert. Während der Lagerung veränderten sich die Sesquiterpenlacton-Profile der Salatproben stark. Während direkt nach der Verarbeitung Lactucopicrin das vorherrschende Sesquiterpenlacton war, wiesen die Proben am Ende der 10-tägigen Kühllagerung

vorwiegend 11(*S*),13-Dihydrolactucin auf. Dies könnte auf die Aktivitäten von pflanzeneigenen Esterasen sowie Enoatreduktase zurückzuführen sein.
Obwohl LAC, 8-DL und LCP eine exocyclische α-Methylen-Funktion aufweisen und dadurch über eine Michaeladdition an die Sulfhydroxl-Gruppe des Cystein binden können, übte Cystein keinen Einfluss auf den Sesquiterpenlacton Gehalte aus. Möglicherweise könnte durch längere Waschzeiten (>120 s) oder eine höhere Cystein-Konzentrationen im Waschwasser dennoch ein positiver Effekt erzielt werden.

Aufgrund der starken Bitterkeit von Chicorée werden heute zunehmend Sorten angebaut, deren Bitterkeit durch Züchtung drastisch reduziert wurde. Jedoch dienen Sesquiterpenlactone u.a. zur Schädlingsabwehr der Pflanzen (Rees und Harborne, 1985), weshalb derartige Sorten eine geringere Resistenz aufweisen. Die Anwendung von Warmwasser stellt eine gute Möglichkeit dar, den Bitterstoffgehalt nacherntetechnologisch zu reduzieren und zugleich die Qualität und Lagerstabilität verzehrfertiger Chicoréeprodukte zu verbessern. Sorten mit höherem Bitterstoffgehalt könnten dadurch als Zutat zu Salatmischungen verfügbar gemacht werden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden im Journal of Agricultural and Food Chemistry“ veröffentlicht:
Wulfkuehler, S., Gras, C., Carle, R. (2013) Sesquiterpene lactone content and overall quality of fresh-cut witloof chicory (*Cichorium intybus* L. var. *foliosum* Hegi) as affected by different washing procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**(32), S. 7705-7714.

Anwendung eines Wasserstrahlschneiders:

Ziel dieses Arbeitspaketes war es zu untersuchen, inwieweit sich das Wasserstrahlschneiden zur Herstellung qualitativ hochwertiger, sicherer Salatprodukte eignet. Durch den sich ständig erneuernden Wasserstrahl könnte das Risiko von Kreuzkontaminationen reduziert werden, da es im Gegensatz zu einer Messerklinge nicht zu einer Produktanhaftung kommt. Außerdem sollte der Effekt des Waschens vor- bzw. nach dem Schneiden untersucht werden. Da bisher die Anwendbarkeit von Warmwasser-Behandlungen lediglich an robusten Salatsorten (Endivie, Eisberg) untersucht wurde, sollte zudem überprüft werden ob sich derartige Behandlungen auch für die Herstellung von zarten Salaten wie z.B. roter Eichblattsalat eignen.

Versuche mit biologisch produziertem rotem Eichblattsalat (*Lactuca sativa* L. var. *crispa*):
An zwei aufeinanderfolgenden Tagen (Serie 1 und 2) wurde biologisch produzierter, roter Eichblattsalat anhand sechs verschiedener Verarbeitungslinien (I-VI) im Technikumsmaßstab zu verzehrfertigen Salatprodukten verarbeitet (Abbildung 11).

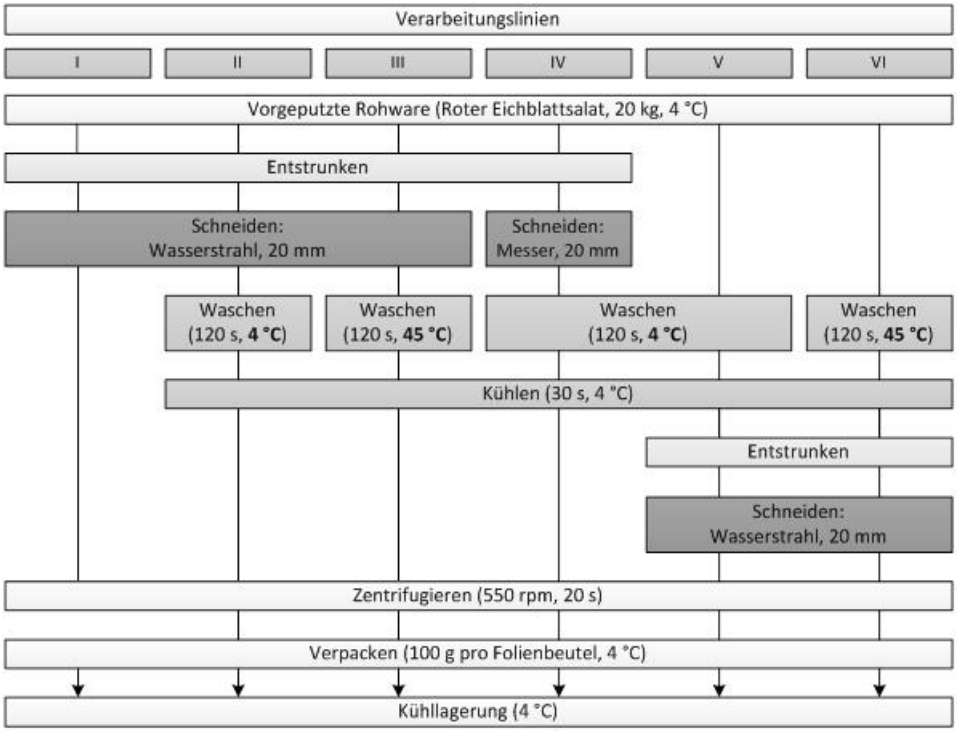


Abbildung 11: Fließschema der Herstellung verzehrfertiger Salatprodukte aus rotem Eichblattsalat nach sechs verschiedenen Verarbeitungslinien (I-VI)
Wulfkuehler et al. (2014). *Food and Bioprocess Technology*, **7**(12), S. 3478-3492

Je Verarbeitungslinie wurden 20 kg Rohware verarbeitet. Nach manueller Vorbereitung wurde der rote Eichblattsalat entweder mit einer herkömmlichen Bandschneidemaschine oder mit einem innovativen Ultra-Hochdruck Wasserstrahlschneider-Prototyp in 2 cm große Stücke geschnitten. Der eingesetzte Wasserstrahlschneider bestand aus einer Hochdruckpumpe (G+ 4022, HydroProcess, Chalon-sur-Saône, Frankreich) und einer modifizierten Bandschneidemaschine GS10 (Kronen, Kehl, Deutschland), deren rotierendes Messer gegen einen Düsenblock mit 5 Saphirdüsen (Abstand: 2 cm) ausgetauscht werden konnte. Bei allen Schneideversuchen wurde ein Wasserdruck von 2500 bar gewählt. Der Düsendurchmesser betrug 0,1 mm. Hinter der Schneidevorrichtung wurde ein mobiles Förderband angebracht um den geschnittenen Salat abzutransportieren. Der Aufbau des innovativen Wasserstrahlschneiders ist in Abbildung 12 dargestellt.

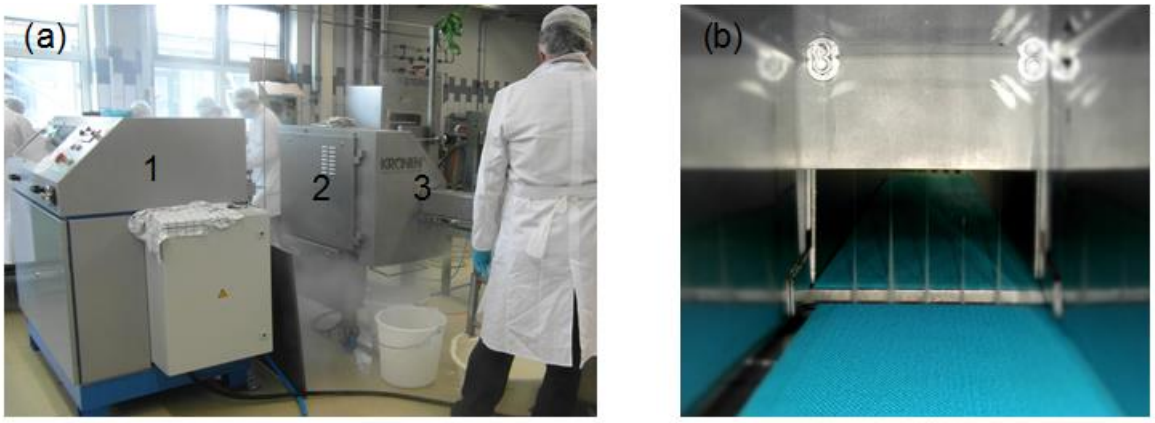


Abbildung 12: a) Aufbau des Prototyp-Wasserstrahlschneiders mit Ultrahochdruckpumpe (1), Bandschneidemaschine GS10 (2) und Düsenblock (3); (b) Düsenblock mit 5 Saphirdüsen im Betrieb

Das Waschen des Salates erfolgte sowohl vor- bzw. nach dem Schneidevorgang in kalten (4 °C) und warmem (45 °C) Waschwasser für je 120 s. Als Kontrollvariante diente ungewaschener Salat. Um den Einfluss der einzelnen Prozessvarianten auf die Qualität der verzehrfertigen Produkte während der Lagerung bewerten zu können wurde der Eichblattsalat zu je 100 g in handelsübliche Folienbeutel (Amcor flexibles, Teningen, Deutschland) verpackt und bei 4 °C gelagert für bis zu 12 Tage gelagert.

In Abbildung 13 ist die Entwicklung O_2- und CO_2-Konzentrationen im Kopfraum der Folienbeutel aus Serie 1 während der Kühllagerung dargestellt. Weder die Schneide- noch die Waschverfahren übten einen Einfluss auf die Atmungsaktivität der Salate aus. Dies lässt darauf schließen, dass das Pflanzengewebe durch das Wasserstrahlschneiden nicht stärker verwundet wurde als beim herkömmlichen Bandschneiden mit dem Messer.

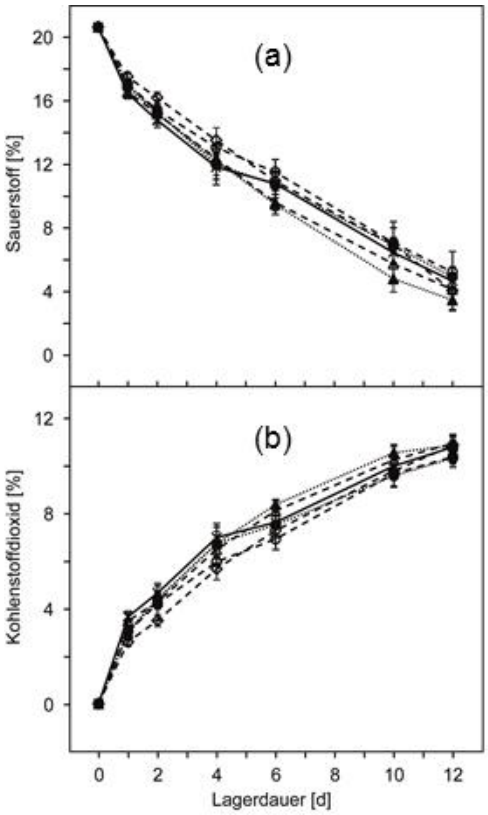


Abbildung 13: Effekt der verschiedenen Verarbeitungsverfahren auf die O_2- (a) und CO_2-Konzentrationen (b) im Kopfraum der Folienbeutel (Serie 1) während der Lagerung.

(x, durchgezogene Linie) Linie I – Wasserstrahlschneiden, ungewaschen; (○, gestrichelte Linie) Linie II – Wasserstrahlschneiden, Waschen in kaltem Wasser; (●, gepunktete Linie) Linie III – Wasserstrahlschneiden, Waschen in warmem Wasser; (◊, gestrichelte Linie) Linie IV – Messerschneiden, Waschen in kaltem Wasser; (Δ, gestrichelte Linie) Linie V – Vorwaschen in kaltem Wasser, Wasserstrahlschneiden; (▲, gepunktete Linie) Linie VI – Vorwaschen in warmem Wasser, Wasserstrahlschneiden

Wulfkuehler et al. (2014). *Food and Bioprocess Technology*, **7**(12), S. 3478-3492

Die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl des ungewaschenen, geschnittenen roten Eichblattsalate betrug zu Beginn der Lagerung 8,2 ± 0,7 x 10^6 KbE/g (Serie 1) bzw. 10,6 ± 0,9 x 10^6 KbE/g (Serie 2) (Abbildung 14). Bis zum Enden der Lagerung (Tag 10) nahem die Gesamtkeimzahlen um etwa 0,9 $\log_{10}$ KbE/g zu. Sowohl Waschen vor- bzw. nach dem Schneiden bewirkte eine signifikante Keimreduktion innerhalb der kommerziellen Haltbarkeitsdauer von 6 Tagen. Waschen mit warmem Wasser nach dem Schneiden bewirkte mit 1,3-1,4 $\log_{10}$ KbE/g dabei die größte Keimreduktion. Waschen vor dem Schneiden erwies sich als weniger effektiv als das Waschen von geschnittenem Salat. Dies ist vermutlich auf einen besseren Kontakt der Blattoberfläche mit dem Wasser beim Waschen von geschnittenem Salat zurückzuführen. Unterschiede zwischen dem herkömmlichen Messerschneiden und dem innovativen Messerschneiden konnten nicht festgestellt werden. Es ist daher davon auszugehen, dass das Waschen stärker zur Kreuzkontamintation beiträgt als das Schneiden.

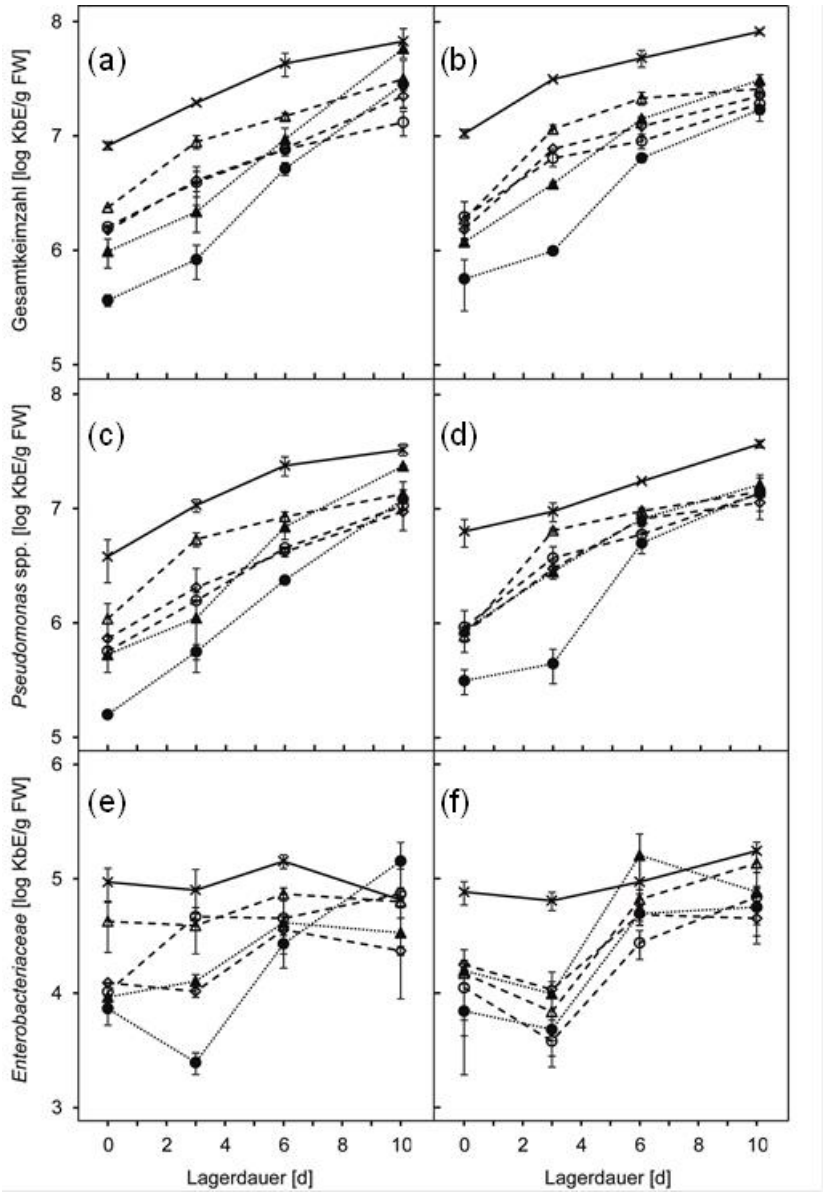


Abbildung 14: Einfluss verschiedener Verarbeitungs-verfahren auf die Gesamtkeimzahl (a,b), *Pseudomonas* spp. (c,d) und *Enterobacteriaceae* (e,f) der Salatprodukte aus Serie 1 (a,c,e) und Serie 2 (b,d,f) während der Kühllagerung (Zuordnung der Verarbeitungslinien siehe Abbildung 13)

Wulfkuehler et al. (2014). *Food and Bioprocess Technology*, **7**(12), S. 3478-3492

Nach dem jeweiligen Waschvorgang (Linie II-VI) wurde zusätzlich die mikrobiologische Qualität des Waschwassers sowie, der chemische Sauerstoffbedarf (CSB) und die Absorption des Wasser bei 254 nm (Wellenlänge kommerzieller UV-C Lampen) bestimmt. Prozesswasser der Warmwasservarianten wiesen in beiden Serien signifikant geringere Keimzahlen auf als das Prozesswasser der Kaltwasservarianten (Tabelle 6). Da jedoch die mikrobiologischen Untersuchungen der verzehrfertigen Salatprodukte zeigten, dass mit warmem Wasser

eine effektivere Keimablösung von der Blattoberfläche erzielt werden kann (Abbildung 14), ist davon auszugehen, dass die Anwendung von Warmwasser (45 °C, 120 s) bereits zu einer teilweisen Inaktivierung der Bakterien im Wasser führte. Prozessvarianten, bei denen vor dem Schneiden gewaschen wurde (Linien V und VI), wiesen signifikant geringere CSB-Werte und Absorptionen bei 254 nm auf. Diese ist dadurch begründet, dass beim Waschen ganzer Blätter weniger Zellsäfte in das Prozesswasser ausgewaschen werden als bei geschnittenen Salaten. Daher schneit die Anwendung von UV-C Entkeimung des Waschwassers aufgrund der geringen Absorption bei 254 nm vorallem im Vorwaschschritt vielversprechend. Weil die mikrobiologische Qualität der Produkte auch nach einem Vorwaschschritt signifikant verbessert wurde, könnte die Kombination aus Waschvorgängen vor- und nach dem Schneiden eine zusätzliche Verbesserung der Produktqualität bewirken.

Tabelle 6: Qualität des Waschwassers direkt nach dem Waschvorgang (Linien II-VI, Wulfkuehler et al. (2014). *Food and Bioprocess Technology*, 7(12), S. 3478-3492)

Parameter	Verarbeitungslinie[a]				
	II	III	IV	V	VI
Serie 1					
GK [KbE/ml*10^4][b]	64,5 ± 5,7 w	6,4 ± 1,4 x	75,0 ± 7,8 w	45,8 ± 22,3 wx	4,8 ± 0,5 x
PS [KbE/ml*10^4][c]	45,3 ± 8,1 w	1,9 ± 0,6 y	37,3 ± 6,7 wx	22,8 ± 0,8 x	1,3 ± 0,2 y
EB [KbE/ml*10^2][d]	38,0 ± 2,8 wx	0,9 ± 0,3 x	74,3 ± 2,2 w	13,2 ± 4,1 x	0,4 ± 0,0 x
CSB [mg/l][e]	134 ± 7 w	130 ± 4 w	133 ± 6 w	29 ± 1 x	29 ± 12 x
$Absorption_{254\ nm}$	0,38 ± 0,00 x	0,41 ± 0,00 w	n.a.	0,14 ± 0,00 z	0,17 ± 0,00 y
Serie 2					
GK [KbE/ml*10^4][b]	82,8 ± 6,7 w	4,5 ± 0,2 z	62,8 ± 6,7 x	43,8 ± 0,4 y	2,8 ± 0,3 z
PS [KbE/ml*10^4][c]	37,3 ± 1,8 w	2,0 ± 0,2 y	34,5 ± 1,4 w	15,0 ± 1,5 x	0,8 ± 0,2 y
EB [KbE/ml*10^2][d]	36,3 ± 26,5 w	0,3 ± 0,4 w	27,0 ± 4,2 w	12,3 ± 9,2 w	0,4 ± 0,1 w
CSB [mg/l][e]	126 ± 5 w	118 ± 5 w	123 ± 4 w	31 ± 1 x	26 ± 3 x
$Absorption_{254\ nm}$	0,37 ± 0,01 w	0,37 ± 0,00 w	0,32 ± 0,00 x	0,14 ± 0,00 y	0,15 ± 0,01 y

Jeder Wert stellt den Mittelwert aus 2 Einzelwerten ± Standardabweichung dar. w,x,y,z: innerhalb einer Zeile (für einen Parameter) weisen unterschiedliche Buchstaben auf signifikante Unterschieden (α = 0.05) hin.

[a](I) Wasserstrahlschneiden, ungewaschen; (II) Wasserstrahlschneiden, Waschen in kaltem Wasser; (III) Wasserstrahlschneiden, Waschen in warmem Wasser; (IV) Messerschneiden, Waschen in kaltem Wasser; (V) Vorwaschen in kaltem Wasser, Wasserstrahlschneiden (VI) Vorwaschen in warmem Wasser, Wasserstrahlschneiden; [b] Gesamtkeimzahl (GK); [c] *Pseudomonas* spp. (PS); [d] *Enterobacteriaceae* spp. (EB); [e] Chemischer Sauerstoffbedarf (CSB)

An Lagertag 8, zwei Tage nach der kommerziellen Haltbarkeitsdauer, wurde für jede Prozessvariante eine sensorische Beurteilung vorgenommen (Tabelle 7). Zudem wurden die Schnittkanten der Salate mit einem Auflichtmikroskop visualisiert (Abbildung 15).

Tabelle 7: Effekt verschiedener Verarbeitungsvarianten (Linien I-VI) auf die sensorische Qualität verzehrfertiger Eichblattsalatprodukte an Lagertag 8 (Wulfkuehler et al. (2014). *Food and Bioprocess Technology*, 7(12), S. 3478-3492)

Parameter	Verarbeitungslinie[a]					
	I	II	III	IV	V	VI
Serie 1						
VQ[b]	1,8 ± 0,8 z	3,0 ± 1,0 wx	4,0 ± 0,9 v	2,6 ± 1,1 xy	2,2 ± 1,0 z	3,7 ± 1,1 vw
SKB[c]	1,5 ± 0,7 x	2,7 ± 0,9 w	3,9 ± 0,9 v	2,5 ± 1,1 w	2,1 ± 0,9 wx	3,8 ± 0,9 v
PKE[d]	6,1	48,5	90,9	42,4	21,2	87,9
Serie 2						
VQ[b]	2,2 ± 0,7 w	2,5 ± 1,0 w	3,9 ± 0,8 v	2,4 ± 0,9 w	2,4 ± 0,9 w	3,9 ± 0,7 v
SKB[c]	1,8 ± 0,6 x	2,3 ± 0,9 x	4,3 ± 0,7 v	2,3 ± 1,0 x	2,2 ± 0,8 x	3,7 ± 0,7 w
PKE [%][d]	6,1	24,2	90,9	33,3	15,2	75,8

Jeder Wert stellt den Mittelwert aus 33 Einzelwerten ± Standardabweichung dar. v,w,x,y,z: innerhalb einer Zeile (für einen Parameter) weisen unterschiedliche Buchstaben auf signifikante Unterschieden (α = 0.05) hin.

[a](I) Wasserstrahlschneiden, ungewaschen; (II) Wasserstrahlschneiden, Waschen in kaltem Wasser; (III) Wasserstrahlschneiden, Waschen in warmem Wasser; (IV) Messerschneiden, Waschen in kaltem Wasser; (V) Vorwaschen in kaltem Wasser, Wasserstrahlschneiden (VI) Vorwaschen in warmem Wasser, Wasserstrahlschneiden ; [b] Visuelle Qualität (VQ); Bewertung: 5 = sehr gut/frisches Aussehen, 3 = mittelmäßig, 1 = schlecht/kein frisches Aussehen; [c] Schnittkantenbräunung (SKB); Bewertungssystem: 5 = keine, 3 = etwas, 1 = starke; [d] Positive Kaufentscheidung (PKE)

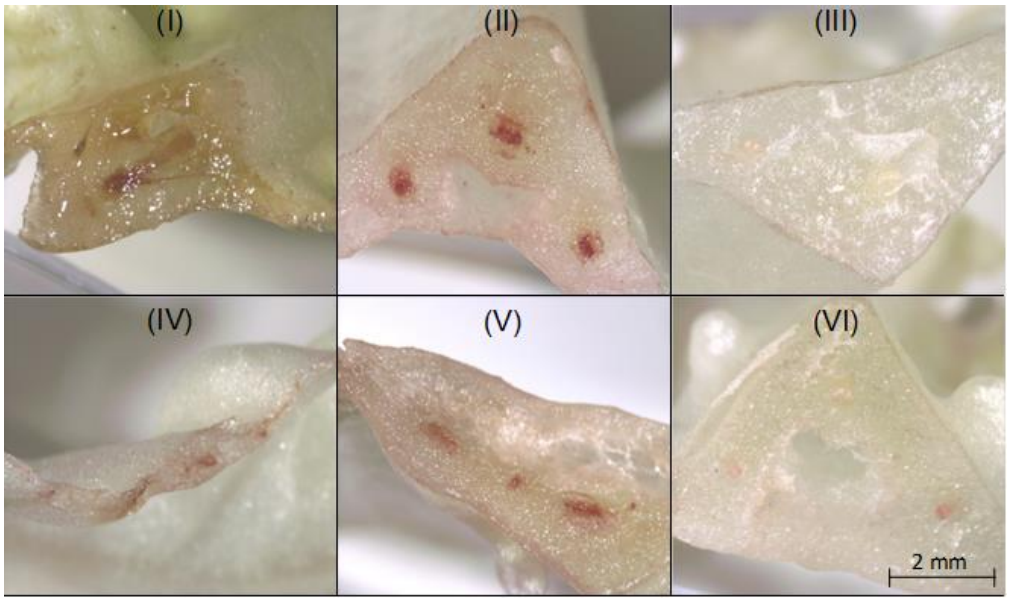


Abbildung 15: Auflichtmikroskopische Aufnahmen der Schnittkanten an Lagertag 8 (Zuordnung der Verarbeitungslinien siehe Tabelle 7)

Wulfkuehler et al. (2014). *Food and Bioprocess Technology*, **7**(12), S. 3478-3492

Sowohl die sensorische Beurteilung als auch die mikroskopischen Beobachtung der verzehrfertigen Salatprodukte zeigten, dass die Anwendung von warmem Wasser eine signifi-

kante Verbesserung der visuellen Qualität bewirkte. Prozessvarianten, bei denen nach dem Schneiden gewaschen wurde, wiesen eine leicht höhere Qualität auf als Varianten, bei denen der Waschschritt vor dem Schneiden erfolgte. Das Schneideverfahren wirkte sich nur unwesentlich auf die visuelle Qualität der Salatprodukte aus.

Außerdem wurden die verzehrfertigen Eichblattsalate hinsichtlich ihrer PAL-Aktivität untersucht (Abbildung 16). Die mit Warmwasser gewaschenen Prozessvarianten (Linien III und VI) wiesen im Verlauf der Lagerdauer die signifikant geringsten PAL-Aktivitäten und somit auch das geringste Potential zur Ausbildung brauner Schnittkanten auf. Diese Ergebnisse bestätigen somit die Ergebnisse der sensorischen Untersuchungen und der mikroskopischen Beobachtungen. Die Wahl des Schneidverfahrens sowie auch die Reihenfolge der Schneid- und Waschschritte übten dagegen nur einen unwesentlichen Einfluss auf die Enzymaktivität aus.

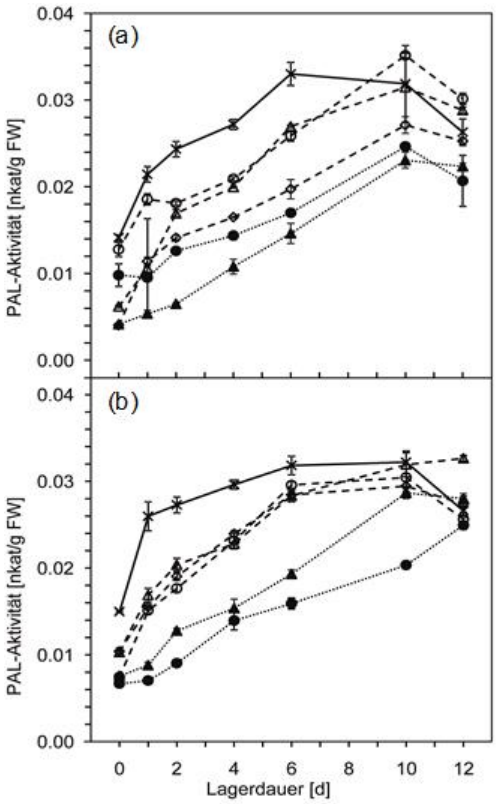


Abbildung 16: Einfluss verschiedener Verarbeitungsverfahren auf die PAL-Aktivität der verzehrfertigen Eichblattsalate aus Serie 1 (a) und Serie 2 (b) während der Kühllagerung (Zuordnung der Verarbeitungslinien siehe Abbildung 13)
Wulfkuehler et al. (2014). *Food and Bioprocess Technology*, **7**(12), S. 3478-3492

Desweiteren sollte untersucht werden inwieweit sich die Warmwasserbehandlung auf die Gehalte photosynthetischer Pigmente und Anthocyane in den verzehrfertigen roten Eich-

blattsalaten auswirkt. Dazu wurden an verschiedenen Zeitpunkten während der Lagerung die Gehalte an Chlorophyll a, Chlorophyll b, β-Carotin und Cyanidin-3-*O*-malonyl-glucosid der ungewaschenen sowie warmwassergewaschenen Varianten (Linien I und III) beider Serien bestimmt. Die Gehalte der untersuchten Pigmente blieben während der gesamten 12-tägigen Lagerung in ungewaschenen sowie warmwassergewaschenen Salatprodukten konstant. Somit kann ein negativer Effekt durch die angewandte Warmwasserbehandlung auf die Qualität der Salate ausgeschlossen werden.

Tabelle 8: Auswirkung des Warmwasserwaschens des geschnittenen, roten Eichblattsalats (Linie III; 45 °C, 120 s) auf den Erhalt der Pigmente während der Kühllagerung[a] (Wulfkuehler et al. (2014). *Food and Bioprocess Technology*, 7(12), S. 3478-3492)

	Tag	Serie 1		Serie 2	
		Linie I	Linie III	Linie I	Linie III
Chlorophyll a	0	240 ± 1 x	234 ± 4 x	227 ± 1 x	192 ± 3 y
	2	211 ± 3 y	237 ± 4 x	191 ± 2 y	220 ±0 x
	6	218 ± 9 x	235 ± 1 x	228 ± 0 x	164 ± 8 y
	10	242 ± 12 x	254 ± 6 x	237 ± 1 x	178 ± 16 y
	12	232 ± 7 x	213 ± 2 x	258 ± 1 x	226 ± 2 y
Chlorophyll b	0	81,5 ± 0,0 x	76,2 ± 1,0 y	77,8 ± 0,6 x	65,7 ± 0,6 y
	2	70,1 ± 0,6 y	81,0 ± 2,0 x	68,9 ± 0,1 y	75,4 ± 0,5 x
	6	75,2 ± 0,6 y	79,4 ± 1,2 x	80,5 ± 1,2 x	67,7 ± 4,5 x
	10	83,8 ± 4,5 x	84,2 ± 1,7 x	79,8 ± 0,5 x	65,6 ± 1,0 y
	12	84,3 ± 0,5 x	70,9 ± 0,5 y	88,6 ± 0,9 x	76,0 ± 1,6 y
β-Carotin	0	5,5 ± 0,1 x	5,5 ± 0,0 x	5,1 ± 0,0 x	3,9 ± 0,3 y
	2	4,5 ± 0,3 y	5,4 ± 0,1 x	4,2 ± 0,1 x	5,1 ± 0,4 x
	6	4,9 ± 0,1 x	5,2 ± 0,2 x	5,6 ± 0,0 x	4,3 ± 0,3 y
	10	5,5 ± 0,0 x	5,6 ± 0,3 x	3,8 ± 0,0 x	4,0 ± 0,1 x
	12	5,2 ± 0,2 x	4,8 ± 0,1 x	6,0 ± 0,0 x	5,2 ± 0,0 y
Cyanidin-3-*O*-malonyl-glucosid	0	448 ± 12 x	364 ± 10 y	364 ± 7 x	324 ± 8 y
	2	287 ± 15 y	420 ± 12 x	305 ± 12 y	431 ± 13 x
	6	356 ± 2 x	368 ± 6 x	400 ± 7 x	372 ± 15 x
	10	394 ± 4 x	338 ± 5 y	343 ± 7 x	326 ± 4 x
	12	325 ± 2 x	328 ± 4 x	333 ± 4 y	457 ± 25 x

[a] Werte sind dargestellt in mg/kg Frischgewicht (FW); Linie I: Wasserstrahlschneiden, ungewaschen; Linie III: Wasserstrahlschneiden, Waschen in warmem Wasser; Jeder Wert stellt den Mittelwert aus 2 Einzelwerten ± Standardabweichung dar. y,z: innerhalb einer Serie weisen unterschiedliche Buchstaben (horizontal) auf signifikante Unterschieden (α = 0.05) hin.

Die oben dargestellten Ergebnisse wurden im Journal „*Food and Bioprocess Technology*“ veröffentlicht:

Wulfkuehler, S., Stark, S., Dietz, J., Schmidt, H., Weiss, A., Carle, R. (2014) Effect of water jet cutting and moderate heat treatment on quality of fresh-cut red oak leaf lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *crispa*). *Food and Bioprocess Technology*, **7**(12), S. 3478-3492

Versuche mit Radicchio cv. Rosso di Chioggia (*Cichorium intybus* L. var. *foliosum* Hegi):

Aufbauend auf den Versuchen mit biologisch erzeugtem rotem Eichblattsalat wurden die Auswirkungen des Wasserstahlschneidens auch an Radicchio untersucht. Zusätzlich wurde die Anwendung eines herkömmlichen Standardmesser und eines neuartigen Hohlschliffmessers untersucht. Aufgrund der im Vergleich zur offenen Blattstruktur des Eichblattsalates sehr fest geschlossenen Struktur der Radicchio-Köpfe, wurde auch hier die Effektivität eines Waschschritts vor sowie nach dem Schneiden evaluiert. Der schematische Ablauf der einzelnen Prozessvarianten ist in Abbildung 17 dargestellt.

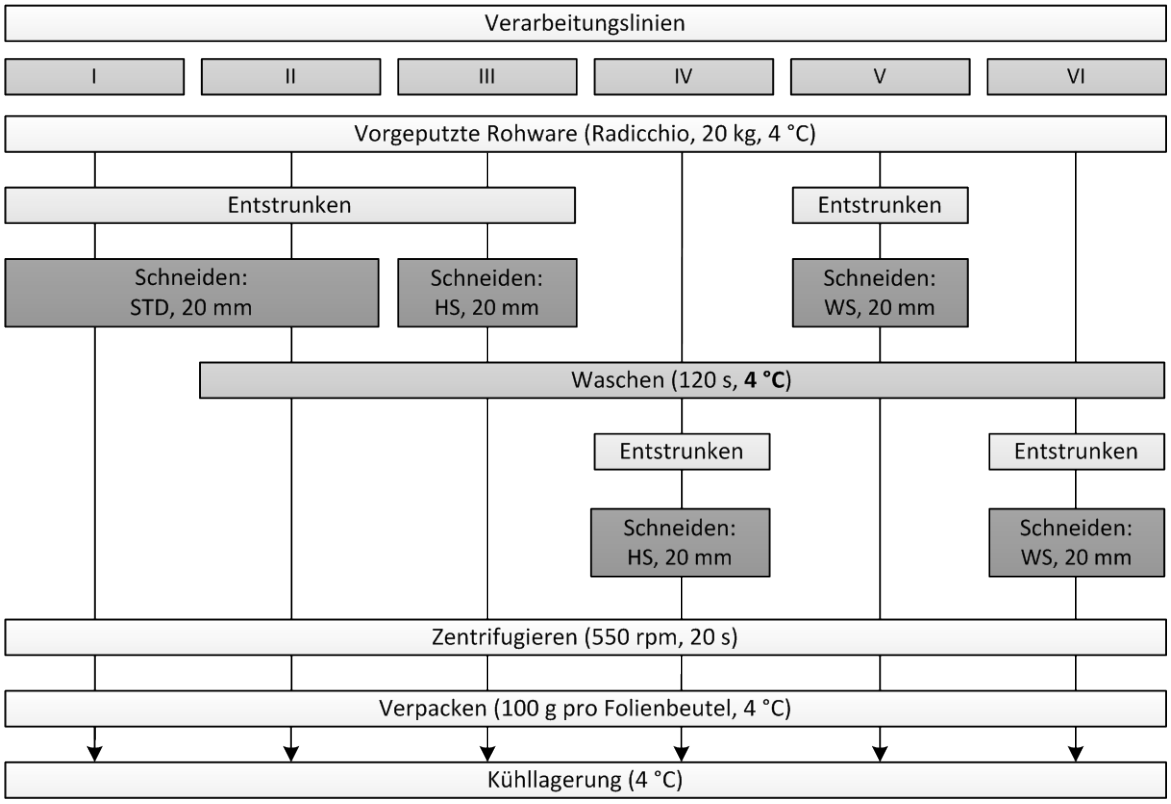


Abbildung 17: Fließschema der Herstellung verzehrfertiger Salatprodukte aus Radicchio nach sechs verschiedenen Verarbeitungslinien (I-VI). STD: Standardmesser; HS: Hohlschliffmesser; WS: Wasserstrahl

Wulfkuehler et al. (2015). *European Food Research and Technology*, **240**(1), S. 159–172

Die Qualität der verzehrfertigen Endprodukte wurde während einer 12-tägigen Kühllagerung anhand der folgenden Untersuchungen beurteilt:

Gegenüber den ungewaschenen und mit dem herkömmlichen Messer geschnittenen Salaten konnte durch das Waschen der Salate eine Erniedrigung der Atmungsaktivität erzielt werden (Abbildung 18). Unterschiede zwischen Wasserstrahl- und den beiden Messerschneideverfahren wurden nicht festgestellt. Auch der Waschvorgang vor- oder nach dem Schneiden beeinflusste die Atmungsaktivität der Salate nicht.

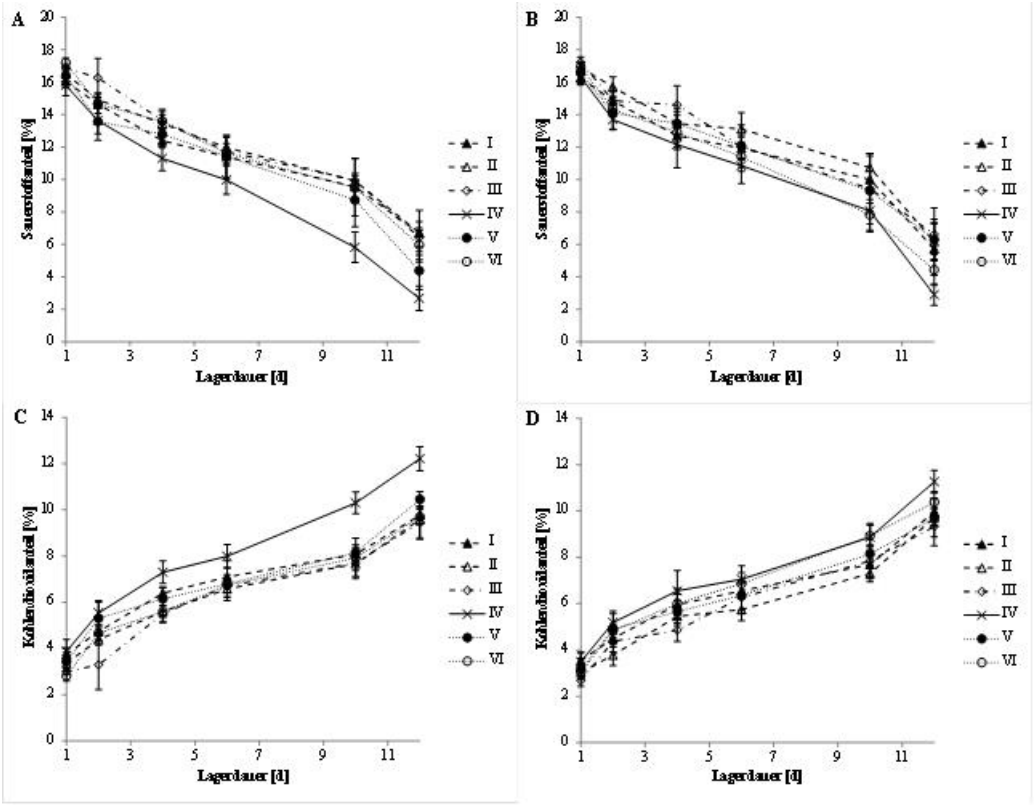


Abbildung 18: Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidgehalt im Kopfraum der Folienbeutel von Serie 1 (A, C) und Serie 2 (B, D) im Verlauf einer Lagerzeit von 12 Tagen.
I: vorgewaschen, mit Hohlschliffmesser geschnitten; II: mit Hohlschliffmesser geschnitten, gewaschen; III: mit Standardmesser geschnitten, gewaschen; IV: mit Standardmesser geschnitten, ungewaschen; V: vorgewaschen, mit Wasserstrahlschneider geschnitten; VI: mit Wasserstrahlschneider geschnitten, gewaschen.
Wulfkuehler et al. (2015). *European Food Research and Technology*, **240**(1), S. 159–172

Die Gesamtkeimzahl der ungewaschenen und mit Standardmesser geschnittenen Salate stiegen in beiden Verarbeitungsserien von $4{,}2 \cdot 10^6$-$6{,}0 \cdot 10^6$ KbE/g (Lagertag 0) auf $8{,}2 \cdot 10^7$-$1{,}1 \cdot 10^8$ KbE/g (Lagertag 10) an. Ein Waschschritt nach dem Schneiden führte unabhängig vom Schneideverfahren zu einer deutlichen Keimzahlreduktion auf $7{,}0 \cdot 10^5$-$2{,}3 \cdot 10^5$ KbE/g (Lagertag 0) bzw. $2{,}2 \cdot 10^7$-$4{,}0 \cdot 10^7$ KbE/g (Lagertag 10). Das Waschen der Salate vor dem

Schneiden bewirkte, verglichen mit einem Nachwaschschritt, erwartungsgemäß eine geringere Keimzahlreduktion. Als dominierende Mikrobiota auf Radicchio zeigten Pseudomonaden ähnliche Tendenzen auf wie die Gesamtkeimzahl. Die Anzahl der Enterobakterien im ungewaschenen und mit Standardmesser geschnittenen Radicchio erhöhte sich von $1{,}5 \cdot 10^5$-$7{,}5 \cdot 10^5$ KbE/g (Lagertag 0) auf $1{,}3 \cdot 10^6$-$3{,}4 \cdot 10^6$ KbE/g (Lagertag 10). Das Waschen des Radicchios vor oder nach dem Schneiden führte zu einer Reduktion der Enterobakterien auf $2{,}6 \cdot 10^4$-$8 \cdot 10^4$ KbE/g (Lagertag 0) bzw. $9{,}6 \cdot 10^4$-$1{,}0 \cdot 10^6$ KbE/g (Lagertag 10). Zwischen den jeweiligen Schneideverfahren konnte jedoch keine eindeutigen Unterschiede festgestellt werden. In mikrobieller Hinsicht ist das Wasserstrahlschneiden folglich mit dem herkömmlichen Messerschneiden vergleichbar.

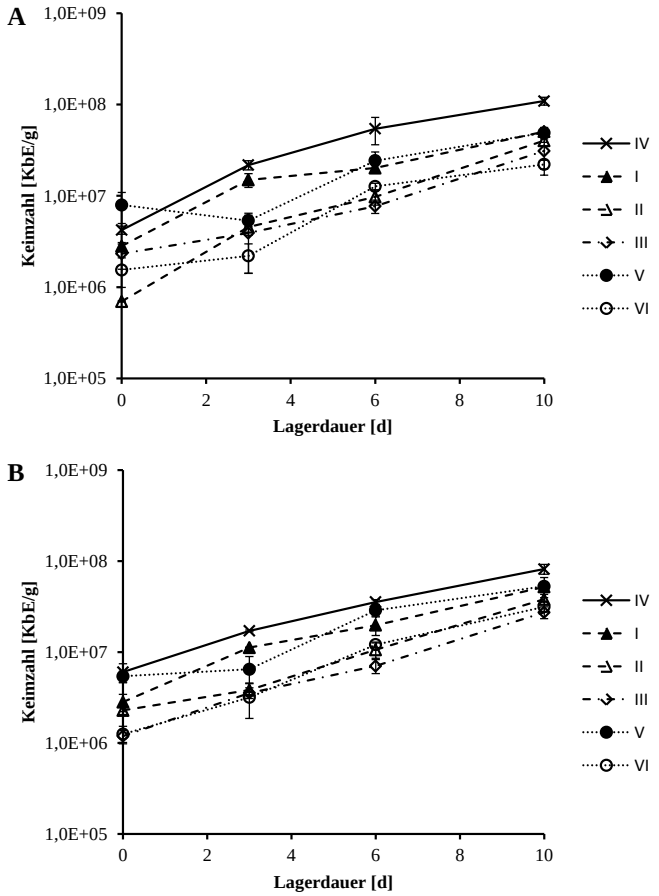


Abbildung 19: Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl auf verzehrfertigem Radicchio der Serien 1 (A) und 2 (B) im Verlauf der Lagerung

I: vorgewaschen, mit Hohlschliffmesser geschnitten; II: mit Hohlschliffmesser geschnitten, gewaschen; III: mit Standardmesser geschnitten, gewaschen; IV: mit Standardmesser geschnitten, ungewaschen; V: vorgewaschen, mit Wasserstrahlschneider geschnitten; VI: mit Wasserstrahlschneider geschnitten, gewaschen

Wulfkuehler et al. (2015). *European Food Research and Technology*, **240**(1), S. 159–172

Da das Prozesswasser eine Quelle von Kreuzkontaminationen darstellt und wesentlich die Qualität der Endprodukte beeinflusst, wurde ebenfalls die mikrobielle Qualität des Wassers direkt nach der Verarbeitung untersucht (Tabelle 9).

Tabelle 9: Gesamtkeimzahl, Anzahl an Pseudomonaden und *Enterobacteriaceae* im Waschwasser der Serie 1

Verarbeitungslinie der **Serie 1**	Gesamtkeimzahl* [KbE/mL*10^4]	Pseudomonaden* [KbE/mL*10^4]	*Enterobacteriaceae** [KbE/mL*10^2]
I	15,8 ± 0,2	7,6 ± 1,4	4,5 ± 0,7
II	72,8 ± 1,1	18,8 ± 2,0	48,8 ± 19,4
III	94,3 ± 35,0	16,4 ± 0,9	36,5 ± 6,4
V	21,9 ± 2,5	8,5 ± 0,6	23,6 ± 9,3
VI	143,3 ± 12,4	44,8 ± 3,9	88,0 ± 26,9

*: n = 2; I: vorgewaschen, mit Hohlschliffmesser geschnitten; II: mit Hohlschliffmesser geschnitten, gewaschen; III: mit Standardmesser geschnitten, gewaschen; V: vorgewaschen, mit Wasserstrahlschneider geschnitten; VI: mit Wasserstrahlschneider geschnitten, gewaschen

Erwartungsgemäß war das Prozesswasser der Nachwaschvarianten am stärksten mikrobiell belastet. Bedingt durch den Austritt von Zellsaft ergab auch die Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) und der Leitfähigkeit des Waschwassers innerhalb der Nachwaschvarianten wesentlich höhere Werte als bei den Vorwaschvarianten (**Abbildung 20** und **Abbildung 21**).

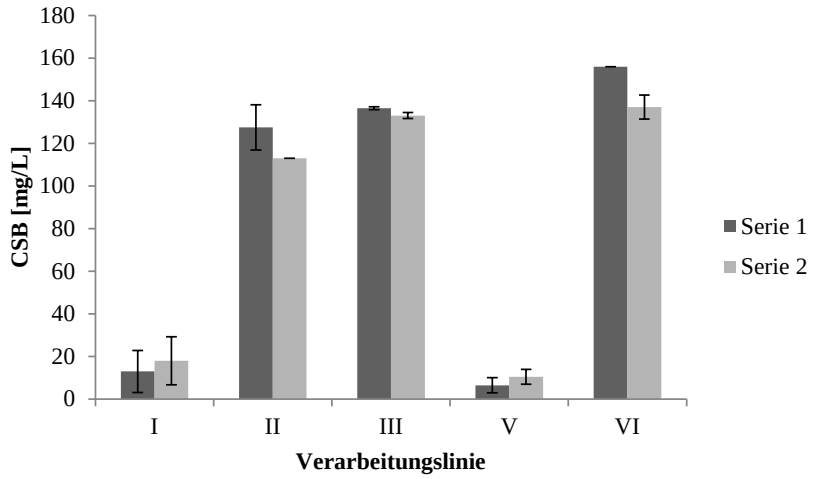


Abbildung 20: CSB des Waschwassers von Radicchio der Serien 1 und 2
I: vorgewaschen, mit Hohlschliffmesser geschnitten; II: mit Hohlschliffmesser geschnitten, gewaschen; III: mit Standardmesser geschnitten, gewaschen; V: vorgewaschen, mit Wasserstrahlschneider geschnitten; VI: mit Wasserstrahlschneider geschnitten, gewaschen

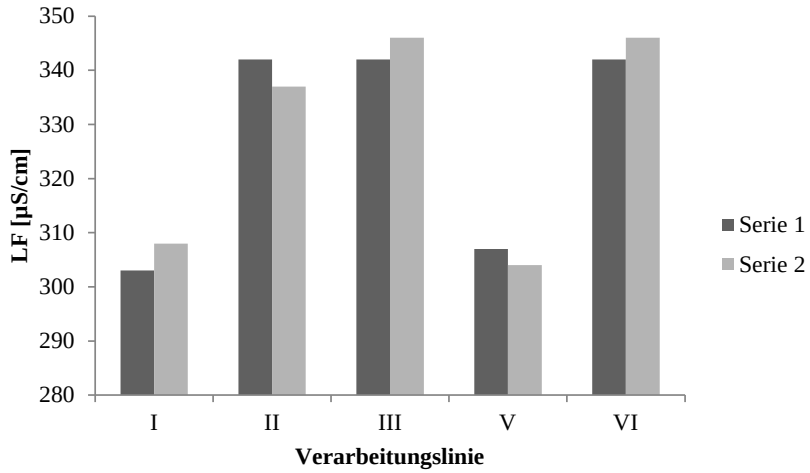


Abbildung 21: Leitfähigkeit des Waschwassers von Radicchio der Serien 1 und 2
I: vorgewaschen, mit Hohlschliffmesser geschnitten; II: mit Hohlschliffmesser geschnitten, gewaschen; III: mit Standardmesser geschnitten, gewaschen; V: vorgewaschen, mit Wasserstrahlschneider geschnitten; VI: mit Wasserstrahlschneider geschnitten, gewaschen

Wie zuvor bei den roten Eichblattsalaten wurden die Schnittkanten des verarbeiteten Radicchio mittels Auflichtmikroskopie visualisiert. Wie aus Abbildung 22 hervorgeht wiesen die Schnittkanten der Messer- bzw. Wasserstrahlgeschnittenen Salate ein sehr ähnliches Schnittbild auf, das optisch nicht voneinander unterschieden werden konnte.

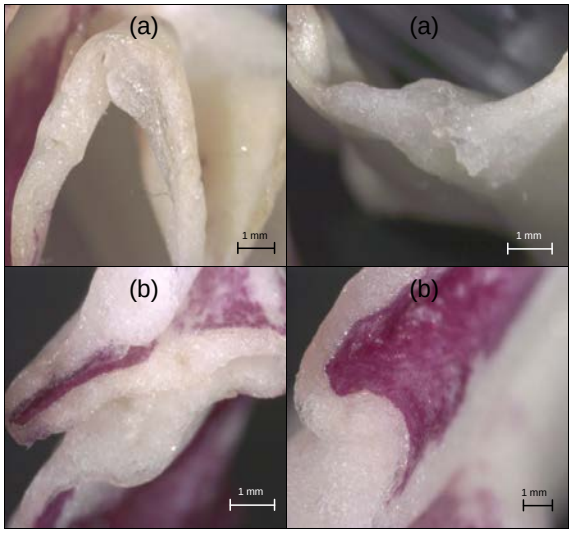


Abbildung 22: Auflichtmikroskopische Aufnahmen der Schnittkanten direkt nach dem Schneiden mittels Bandschneidemaschine (a) bzw. Wasserstrahlschneider (b)

Die PAL-Aktivität aller Verarbeitungsvarianten stieg bis Lagertag 2 stark an. Anschließend wurde bis zum Ende der Lagerung eine Stagnation der wundinduzierten PAL-Aktivität beobachtet (Abbildung 23). Tendenziell wiesen die ungewaschene Variante und die Varianten mit Vorwaschschritt, die höchste PAL-Aktivität auf. Anhand der PAL-Aktivitäten konnte jedoch

kein Unterschied zwischen Wasserstrahl- und Messerschneideverfahren beobachtet werden. Dies deutet auf einen vergleichbaren Verwundungsgrad des Salatgewebes durch die beiden Schneidverfahren hin.

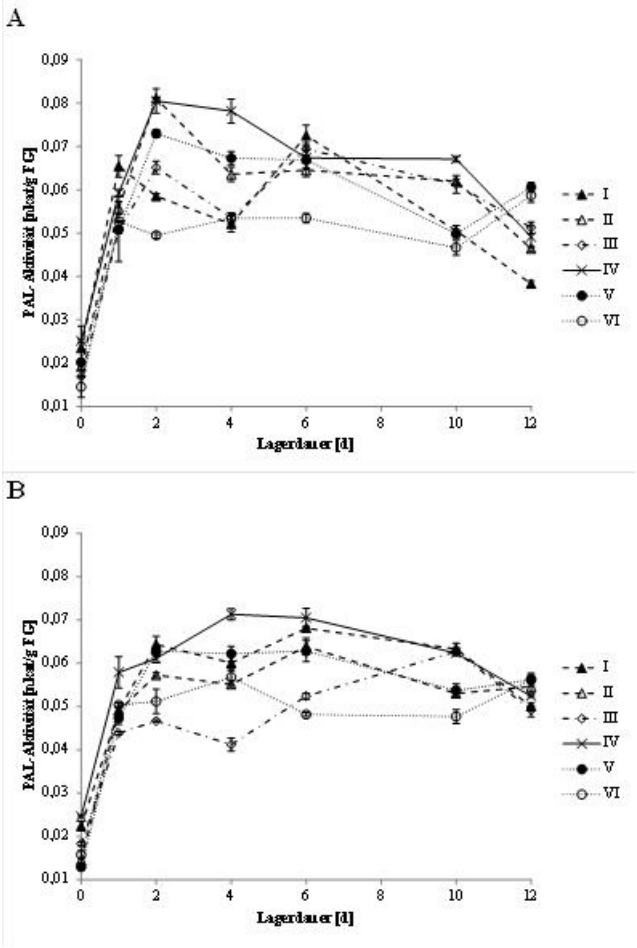


Abbildung 23: PAL-Aktivität in Radicchio der Serien 1 (A) und 2 (B) im Verlauf der Lagerdauer

I: vorgewaschen, mit Hohlschliffmesser geschnitten; II: mit Hohlschliffmesser geschnitten, gewaschen; III: mit Standardmesser geschnitten, gewaschen; IV: mit Standardmesser geschnitten, ungewaschen; V: vorgewaschen, mit Wasserstrahlschneider geschnitten; VI: mit Wasserstrahlschneider geschnitten, gewaschen

Wulfkuehler et al. (2015). *European Food Research and Technology*, **240**(1), S. 159–172

Im Verlauf der Lagerung wurden die sechs Sesquiterpenlactone Lactucin (LAC), Dihydrolactucin (DLAC), 8-Deoxylactucin (8-DL), 11(S),13-Dihydrolactucin (DLAC), 11(S),13-Dihydrolactucopicrin und 11(S),13-Dihydro-8-Deoxylactucin (D-8-DL) quantifiziert (Abbildung 24).

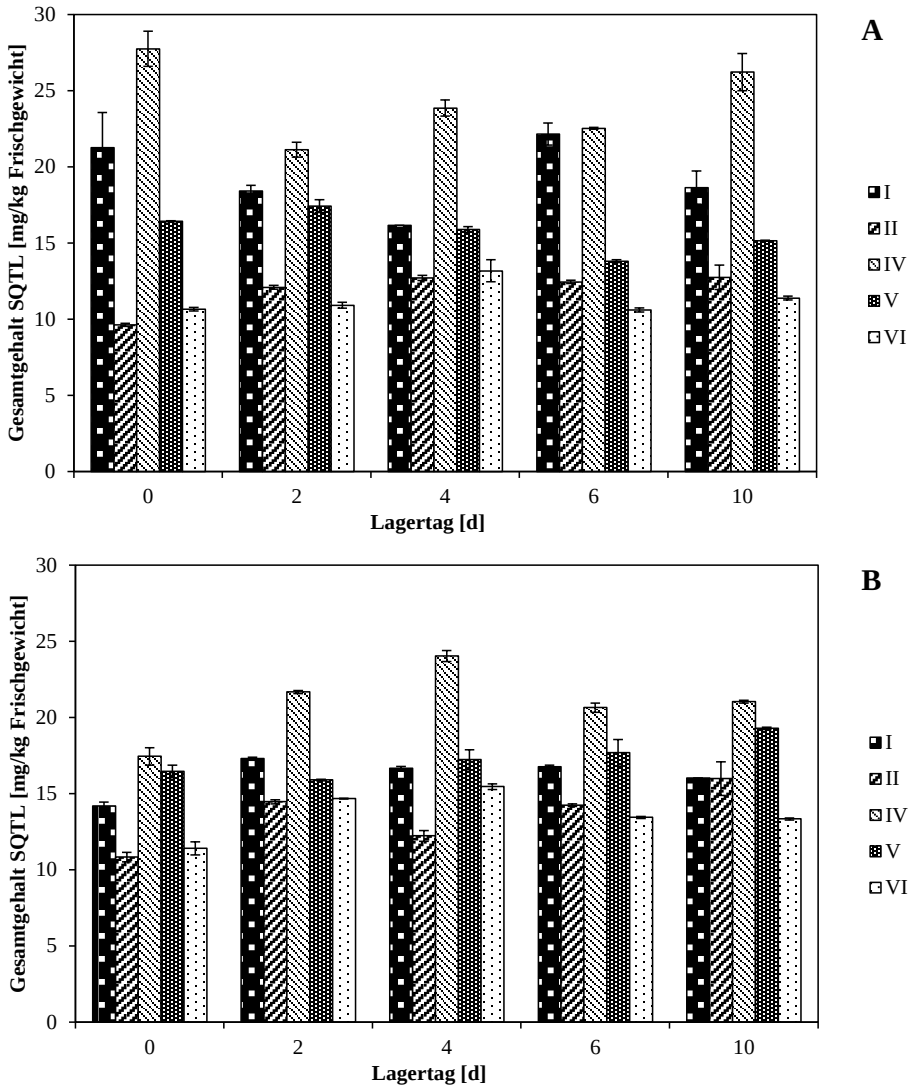


Abbildung 24: Entwicklung des Gesamtgehaltes an Sesquiterpenlactonen von Radicchio der Serien 1 (A) und 2 (B) während einer Lagerzeit von 10 Tagen

I: vorgewaschen, mit Hohlschliffmesser geschnitten; II: mit Hohlschliffmesser geschnitten, gewaschen; IV: mit Standardmesser geschnitten, ungewaschen; V: vorgewaschen, mit Wasserstrahlschneider geschnitten; VI: mit Wasserstrahlschneider geschnitten, gewaschen; SQTL: Sesquiterpenlactone

Durch Auswascheffekte, wurde eine stufenweise Reduktion der Sesquiterpenlacton(SL)-Gehalte von der ungewaschenen (21,1-27,7 mg/kg FG), über die vorgewaschenen (10,6-22,2 mg/kg FG), bis hin zu den nachgewaschenen Varianten (9,6-16,0 mg/kg FG) festgestellt. Der Gesamtgehalt an SLs blieb im Verlauf der Lagerdauer für alle Versuchsansätze relativ konstant. Innerhalb der einzelnen SL-Verbindungen konnten hingegen Veränderungen beobachtet werden. Die Gehalte an LAC, 8-DL und LCP nahmen ab, während die Dihydroderivate von LAC und 8-DL zunahmen. Vermutlich resultierte die Zunahme der Gehalte von DLAC und D-8-DL aus einer enzymatisch katalysierten Reduktion der exocyclischen Methylengruppe von LAC und 8-DL. Durch die Analyse der SL konnten keine eindeutigen Unterschiede zwischen Wasserstrahl- und Messerschneiden festgestellt werden.

Die zu diesem Versuch dargestellten Ergebnisse wurden im Journal „*European Food Research and Technology*“ veröffentlicht:

Wulfkuehler, S.; Dietz, J.; Schmidt, H.; Weiss, A.; Carle, R. (2015) Quality of fresh-cut radicchio cv. Rosso di Chioggia (*Cichorium intybus* L. var. *foliosum* Hegi) as affected by water jet cutting and different washing procedures. *European Food Research and Technology*, **240**(1), S. 159–172.

Zusammenfassend konnte die Gleichwertigkeit des Wasserstrahlschneidens dem Schneiden durch ein Standardmesser bzw. Hohlschliffmesser gezeigt werden. Da bei der kommerziellen Salatverarbeitung ein schnelles Stumpfwerden der Messer und das Schleifen der der Messer durch Fachpersonal mit erheblichen Problemen und Kosten verbunden ist, könnte das Wasserstrahlschneiden insbesondere in großen Betrieben aufgrund der nahezu identischen Schnittgüte, eine Alternative zum Messerschneiden darstellen. Desweiteren wurde gezeigt, dass ein Vorwaschschritt, insbesondere mit warmem Wasser (45 °C), maßgeblich zur Verbesserung der Qualität und Sicherheit der Produkte beitragen kann. Durch Kombination aus Vor- und Nachwaschschritt könnte eine zusätzliche Verbesserung der Produkte erzielt werden.

UV-C Entkeimung des Waschwassers:

Bei der Produktion verzehrfertiger Blattsalate stellt das Waschwasser eine Quelle von Kreuzkontaminationen zwischen inneren, keimarmen Gewebebereichen und äußeren, mikrobiell stark belasteten Salatblättern dar. Daher sollte die Effektivität einer UV-C Behandlung des Waschwassers hinsichtlich ihres Potentials zur Keimreduktion, getestet werden. Zu diesem Zweck wurden vier 30 W TSS23-620VA UV-C Tauchstrahler (Dinies Technologies GmbH, Villingendorf) im Wasserreservoir einer industriellen Röhrenwaschmaschine (VORTEX, Kronen, Kehl, Fassungsvermögen ca. 770 L) installiert und die mikrobielle Belastung sowie die Trübung des Waschwassers während des ablaufenden Waschprozesses untersucht. Hierfür wurden je 60 kg geschnittener Eisberg- oder Endiviensalat (Bandschneidemaschine GS-10, 6 mm, Kronen, Kehl) sechs Mal in einem Zeitraum von 10 min durch die Anlage prozessiert. Zur Kontrolle wurde der Waschprozess auf die beschriebene Weiße zusätzlich ohne UV-C Strahler im Wasserreservoir durchgeführt.
Die Trübung des Waschwassers stieg nach einem Waschzyklus bei Eisberg- und Endiviensalat von 1,9 und 1,3 Trübungseinheiten (TE) auf 20,5 und 34,5 TE stark an. Im weiteren Verlauf des Prozesses stieg die Trübung nur noch geringfügig an.

Bei Bestrahlung des Waschwassers mit UV-C nahmen die Gesamtkeimzahlen und die Pseudomaden mit jedem Waschzyklus ab (Abbildung 25). Nach sechsmaligem Prozessieren des geschnittenen Salates konnte eine Keimreduktion im Waschwasser von ca. 2 logarithmischen Stufen erzielt werden. Diese Reduktion konnte, trotz unterschiedlicher Trübung des Waschwassers, sowohl bei Eisbergsalat als auch bei Endivie beobachtet werden.

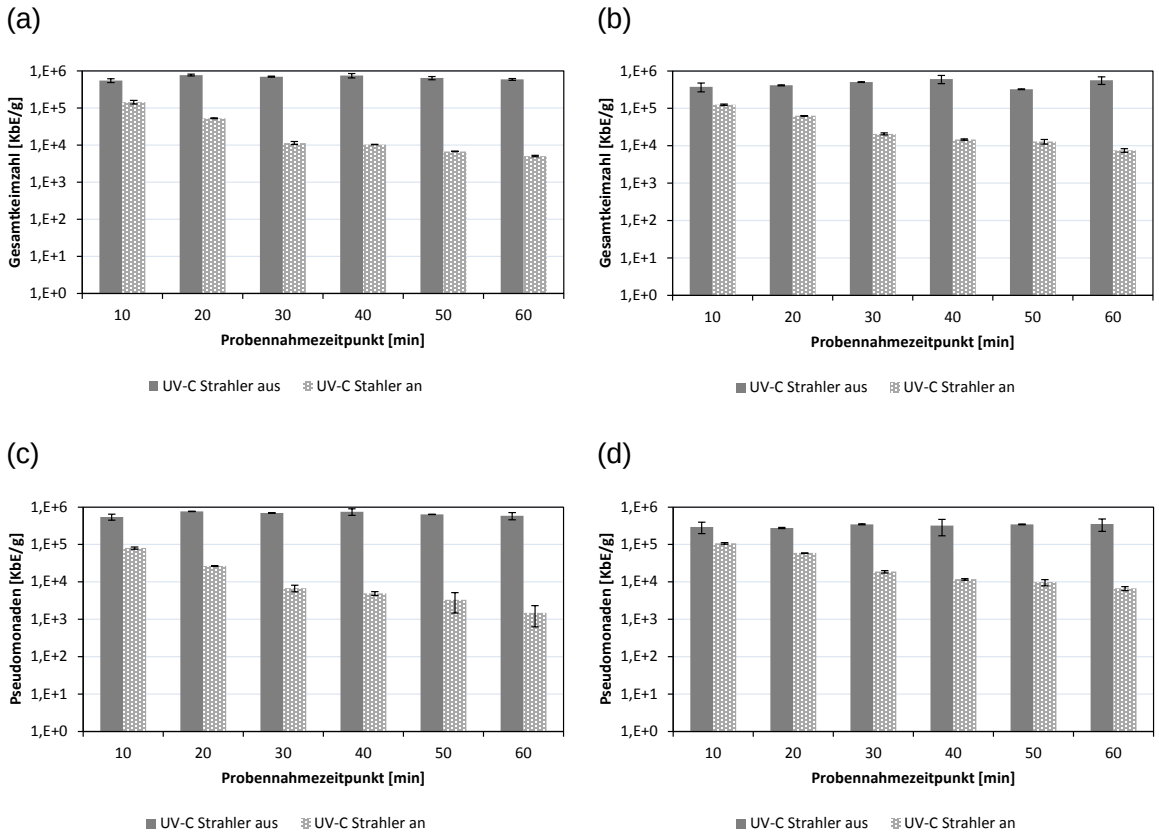


Abbildung 25: Gesamtkeimzahlen (a, b) und Pseudomonaden (c, d) im Prozesswasser während des Waschens von Endivie (a, c) und Eisbergsalat (b, d) mit und ohne UV-C Behandlung des Wassers

Aufbauend auf den oben beschriebenen Versuchsergebnissen wurden weiterführende Untersuchungen hinsichtlich der Dosis-Wirkungs-Beziehung einer UV-C Dekontamination von Prozesswassern aus der Salatverarbeitung vorgenommen. Dazu wurde im Technikumsmaßstab Eisberg- und Eichblattsalate aus den Feldversuchen des Zuwendungsempfängers I (LUH) zu verzehrfertigen Salatprodukten verarbeitet und das Prozesswasser mit unterschiedlichen UV-C Dosen von 34,8 – 174,2 J/L bestrahlt. Die Bestrahlung des Wassers erfolgte am Max Rubner-Institut (MRI), Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik (Karlsruhe, Deutschland). Dabei wurde mit zunehmender UV-C Dosis eine größer werdende Reduktion der Gesamtkeimzahlen beobachtet (Abbildung 26). Der größere inhibierende Ef-

fekt der UV-C Strahlung in Waschwasser von Eisbergsalat ist vermutlich darauf zurück zu führen, dass die Effizienz der UV-C Strahlung aufgrund einer geringeren Verschmutzung des Wassers weniger stark beeinträchtigt wurde als im insgesamt deutlich stärker belasteten Waschwasser von Endiviensalat. Auch die höchste Bestrahlungsdosis von 174,2 J/L reichte allerdings nicht aus, um eine vollständige Keimreduktion zu bewirken.

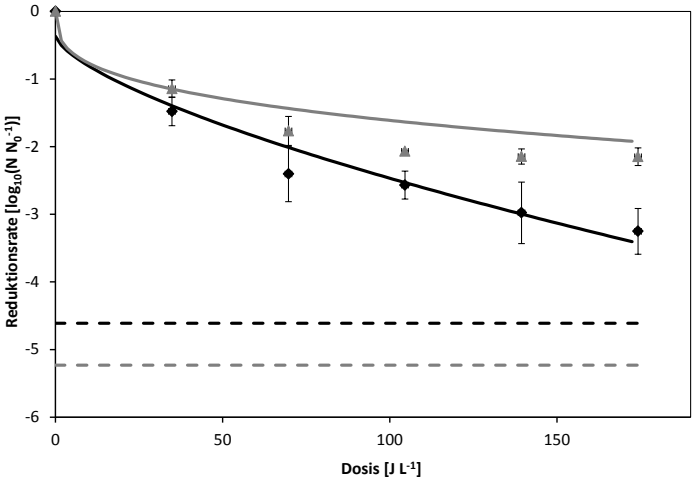


Abbildung 26: UV-C Inaktivierungskinetik der Gesamtkeimzahlen in Prozesswasser von Eisbergsalat (schwarz) und Eichblattsalat (grau). Gestrichelte Linien zeigen die anfänglichen negativen Gesamtkeimzahlen der Wasser.

Die bei Bestrahlungsversuchen erzielten Ergebnisse zeigen, dass eine UV-C Behandlung von Prozesswassern bei der Salatverarbeitung eine vielversprechende Möglichkeit darstellt die Keimbelastung des Wassers zu verringern. Folglich könnte durch die Anwendung von UV-C Strahl die Gefahr einer Kreuzkontamination minimiert und eine höhere Produktqualität ermöglicht werden. Darüber hinaus könnte durch die UV-C Bestrahlung des Waschwassers der Verbrauch an Frischwasser reduziert werden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden in „*Acta Horticulturae*“ angenommen:

Wulfkuehler, S., Müller, A., Weiss, A., Mix, K., Rebmann, M., Schmidt, H., Stahl, M., Carle, R. (2014) Sanitation of process water from fresh-cut lettuce production by means of UV-C. *Acta Horticulturae*, *accepted*.

Gegenüberstellung der erzielten Ergebnisse und der angedachten Ergebnissen des Forschungsantrags:

Ursprüngliche Planung	**Erzielte Ergebnisse**
Erarbeitung von SOPs	SOPs für die Verarbeitung von Salaten im industriellen Maßstab sowie für die Verpackung und Lagerung der Salatprodukte wurden ausgearbeitet und erfolgreich angewandt. Methoden zur Bestimmung von Enzymaktivitäten (PAL, PPO), für die Extraktion und Bestimmung von, Sesquiterpenlactonen, Chlorophyllen und Anthocyanen wurden optimiert.
Mikrobiologische Untersuchungen im Prozesswasser sowie an der Rohware und verarbeiteten Produkten	Keimzahlbestimmungen (Gesamtkeimzahl, Pseudomonaden, *Enterobacteriaceae*, Listerien, Salmonellen, Hefen, Schimmelpilze und Milchsäurebakterien) an Salaten und im Prozesswasser wurde etabliert.
Visualisierung von Biofilmen auf den Salatoberflächen mittels Transmissionselektronenmikroskopie	Wurde nicht durchgeführt
Anwendung von warmem Wasser und Calciumlaktat bei der Herstellung verzehrfertiger Eisberg- und Eichblattsalaten	Waschen der Salate in warmem Wasser und Calciumlaktat bewirkte eine größere Keimreduktion als Waschen in kaltem Wasser. Zu Beginn der Lagerung konnte die mikrobielle Kontamination der Salate um ca. 90% gesenkt werden. Zudem verringerte warmes Wasser und Calciumlaktat die Atmungsaktivität und die PAL Aktivität. Bestimmung der Textur führte aufgrund mangelnder Reproduzierbarkeit zu keinen Ergebnissen.

Anwendung phenolischer Extrakte	Die durchgeführten Waschversuche mit Grünem Tee-Extrakt (GT) führten nicht zum erwarteten positiven Einfluss auf die mikrobielle Qualität des Prozesswassers oder der Produkte. Atmung, PAL-Aktivität und sensorische Eigenschaften der Produkte blieben ebenfalls unbeeinflusst.
Anwendung pflanzlicher Detergenzien (Quillaja saponaria)	Während der Versuche verhinderte eine extrem starke Schaumentwicklung den Betrieb der industriellen Waschmaschinen und kann daher nicht empfohlen werden.
Anwendung von Molkenproteinkonzentraten	Wurde nicht durchgeführt.
Anwendung eines Wasserstrahlschneiders	Die Wasserstrahlschneidetechnologie wurde erfolgreich zum Schneiden von biologisch erzeugtem rotem Eichblatt- und Radicchiosalat angewandt. Die mit dem Wasserstrahlschneider geschnittenen Salate wiesen eine mit konventionell verarbeiteten Salaten vergleichbare Qualität auf (Keimzahlen, sensorische Qualität, PAL-Aktivität, Atmung, Chlorophylle, Sesquiterpenlactone).
Anwendung eines Waschschrittes in warmem Wasser vor und nach dem Wasserstrahlschneiden	Die Anwendung eines Waschschrittes in warmem Wasser vor und nach dem Schneiden wurde an biologisch erzeugtem rotem Eichblatt- und Radicchiosalat untersucht. Warmwasser übte weder vor noch nach dem Schneiden einen negativen Einfluss auf Atmungsaktivität und Pigmentgehalte aus. Warmwasserwachen ganzer Salate vor dem Schneiden verbesserte den mikrobiellen Status und die sensorischen Eigenschaften der Salate. Warmwasserwacshen der geschnittenen Salate erzielte den besten Effekt.

Anwendung von UV-C Strahlung zur Dekontamination von Prozesswasser mit Salaten aus Feldversuch 2 des Zuwendungsempfänger I (LUH)	Eisberg- und Eichblattsalat aus Feldversuch 2 wurde zu verzehrfertigen Salatprodukten verarbeitet und das Prozesswasser mikrobiell untersucht sowie anhand analytisch-chemischer Qualitätsparameter charakterisiert. Das Prozesswasser wurde mit unterschiedlichen UV-C Dosen dekontaminiert. Die Anwendung von UV-C Strahlen während eines industriellen Waschprozesses verringerte die Gesamtkeimzahlen im Prozesswasser um bis zu 2 $\log_{10}$ Stufen. Die desinfizierende Wirkung der UV-C Strahlen nahm mit steigender Strahlendosis zu. Schmutziges Prozesswasser verringerte die Effektivität der UV-C Strahlung.
Zusätzlich durchgeführte Untersuchungen	
Einfluss verschiedener Waschverfahren auf die Sesquiterpenlactongehalte in verzehrfertigem Blattsalat	Waschen bewirkte eine signifikante Reduktion der Sesquiterpenlactone-Gehalte in geschnittenem Chicorée und Radicchio. Die Verbindungen prägen den Bittergeschmack dieser Salate maßgeblich. Nach Waschen in warmem Wasser wurde eine deutlich stärkere Reduktion als nach Waschen in kaltem Wasser gezeigt. Der Auswascheffekt beim Vorwaschen war erwartungsgemäß weniger stark ausgeprägt als beim Waschen von geschnittenem Salat. Die Profile der individuellen Sesquiterpenlactone in den Salatproben veränderten sich während der Lagerung stark.
Anwendung eines neuartigen Hohlschliffmessers zum Schneiden von Salat	Mit dem Hohlschliffmesser geschnittene Salate waren mit den Wasserstrahl- bzw. herkömmlichen Messer geschnittenen Salate vergleichbar

2.2 Wichtigsten Positionen des Zahlenmäßigen Nachweises

Im vorliegenden Projekt entfiel der größte Teil der Ausgaben auf die Positionen 0812 und 0817 (Personalausgaben). Eine detaillierte Ansicht Verwendung der zugewiesenen Mittel ist dem zahlenmäßigen Nachweis zu entnehmen.

2.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die im Rahmen des vorliegenden Projektes geleisteten Arbeiten waren zum Erreichen der unter 2.1.2 dargestellten Ergebnisse erforderlich und angemessen.

2.4 Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Im Rahmen des Forschungsprojekts konnten wichtige Erkenntnisse hinsichtlich der Verbesserung der mikrobiellen Sicherheit und der Produktqualität von verzehrfertigen Salate gewonnen werden. Durch Anwendung von warmem Wasser (und Calciumlaktat) konnte der mikrobielle Status der verzehrfertigen Salatprodukte sowohl direkt nach der Verarbeitung als auch im Verlauf der Lagerung in handelsüblichen Folienbeuteln signifikant verbessert werden. Prozesswasser von warm gewaschenem Salat zeichnete sich zudem durch eine geringere Keimbelastung aus, was die Gefahr einer Kreuzkontamination beim Waschprozess deutlich verringern sollte. Gleichzeitig verbesserte das Waschen mit warmem Wasser die sensorischen Eigenschaften der Produkte. Ferner könnte Waschen in warmem Wasser als nacherntetechnologische Methode zur Reduktion der Bitterstoffgehalte in Salaten eingesetzt werden. Dies würde den Anbau resistenter Salatsorten mit höherem Bitterstoffgehalt ermöglichen.

Die mit dem Wasserstrahlschneider geschnitten Produkte wiesen eine mit konventionell verarbeiteten Salaten vergleichbare Qualität auf. Da bei der kommerziellen Salatverarbeitung ein schnelles Stumpfwerden der Messer und insbesondere das Schleifen durch Fachpersonal erhebliche Probleme und Kosten verursacht, könnte das Wasserstrahlschneiden besonders in großen Betrieben, aufgrund der nahezu identischen Schnittgüte, eine Alternative zum Messerschneiden darstellen. Eine Unterbrechung des Verarbeitungsprozesses zum Nachschleifen der Messer wäre beim Wasserstrahlschneiden nicht notwendig.

Durch die Anwendung von UV-C Strahlung konnten die Keimzahlen im Waschwasser um ca. 2 logarithmische Stufen reduziert werden. Eine UV-C Entkeimung des Prozesswassers bei

der Produktion verzehrfertiger Salate könnte somit eine vielversprechende Maßnahme zur Erhöhung der Produktqualität bzw. zur Einsparung von Wasser sein.

2.5 Während der Durchführung des Vorhabens dem Zahlungsempfänger bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Nach derzeitigem Kenntnisstand sind keine der im vorliegenden Projekt angewandten technologischen Verfahren bei der Herstellung verzehrfertiger Blattsalate im Einsatz. Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Forschungsstellen sind nicht bekannt.

2.6 Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses

Publikationen in Fachzeitschriften

Wulfkuehler, S., Gras, C., Carle, R. (2013) Sesquiterpene lactone content and overall quality of fresh-cut witloof chicory (*Cichorium intybus* L. var. *foliosum* Hegi) as affected by different washing procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**(32), S. 7705-7714.

Wulfkuehler, S., Müller, A., Weiss, A., Mix, K., Rebmann, M., Schmidt, H., Stahl, M., Carle, R. (2014) Sanitation of process water from fresh-cut lettuce production by means of UV-C. *Acta Horticulturae*, *accepted*.

Wulfkuehler, S., Stark, S., Dietz, J., Schmidt, H., Weiss, A., Carle, R. (2014) Effect of water jet cutting and moderate heat treatment on quality of fresh-cut red oak leaf lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *crispa*). *Food and Bioprocess Technology*, **7**(12), S. 3478-3492

Wulfkuehler, S.; Dietz, J.; Schmidt, H.; Weiss, A.; Carle, R. (2015) Quality of fresh-cut radicchio cv. Rosso di Chioggia (*Cichorium intybus* L. var. *foliosum* Hegi) as affected by water jet cutting and different washing procedures. *European Food Research and Technology*, **240**(1), S. 159–172.

Posterpräsentationen

Wulfkuehler, S.; Carle, R. (2014) Qualität und Sicherheit in der Produktionskette biologisch produzierter Fertigsalate – verarbeitungsversuche zur Verbesserung der Qualität verzehrfertiger Salate. Internationale Grüne Woche, Berlin, Deutschland.

Vorträge

Wulfkuehler, S., Kurfiss, L., Weiss, A., Schmidt, H., Carle, R. (2013) Effectiveness of industrial washing procedures on quality of fresh-cut endive (*Chicorium endivia* L.). IV International Postharvest Conference on Managing Quality in Chains (MQUIC 2013), 02.-05. September, Cranfield, GB.

Wulfkuehler, S., Weiss, A., Schmidt, H., Carle, R. (2013) Minimal verarbeitete Blattsalate – Verbesserung der mikrobiellen und sensorischen Qualität durch innovative Verarbeitungstechnologien. 4. Symposium „Frische Convenience / Fresh cut Produkte“, 19.-20. Juni, Berlin.

Wulfkuehler, S.; Stark, S.; Carle, R. (2013) Effect of moderate heat on shelf-life and physiological properties of ready-to-use oak leaf lettuces. Future Days, Kronen Nahrungsmitteltechnik GmbH, 27.-28. November, Kehl am Rhein.

Wulfkuehler, S.; Dietz, J.; Stark, S.; Carle, R. (2013) Quality of ready-to-use leaf lettuces as affected by waterjet cutting. Future Days, Kronen Nahrungsmitteltechnik GmbH, 27.-28. November, Kehl am Rhein.

Carle, R.; Wulfkuehler, S. (2014) Wie bleiben Salate länger fit? Maßnahmen zur Qualitätsverbesserung minimal verarbeiteter Blattsalate. GDL - Festkolloquium zum 60. Geburtstag von Herrn Prof. Dr. Buckenhüskes, 07. Februar, Stuttgart.

Wulfkuehler, S.; Stark, S.; Dietz, J.; Carle, R. (2014) Einfluss des Wasserstrahlschneidens und der Anwendung von warmem Wasser auf die Qualität und Lagerstabilität von verzehrfertigen Salatprodukten. WALA Heilmittel GmbH, 1. Doktorandenkolleg, Bad Boll.

Dissertation

Kuebler, S. (2015) Assessment of innovative, industrially applicable processing and sanitizing methods for the production of fresh-cut lettuce and chicory. Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.), Shaker Verlag, Band 39, ISBN 978-3-8440-3540-7.

Weitere Veröffentlichungen der Ergebnisse sind nicht geplant.

II. 3. Kurzfassung

SafeSalad - Qualität und Sicherheit in der Produktionskette biologisch produzierter Fertigsalate

Florian Hägele*, Sabine Kübler, Reinhold Carle

* Universität Hohenheim, Institut für Lebensmittelwissenschaft u. Biotechnologie, Lehrstuhl Technologie und Analytik pflanzlicher Lebensmittel, Garbenstraße 25, D-70599 Stuttgart, Deutschland
Priorität: florian.haegele@uni-hohenheim.de

Ziel des Projekts war die Gewährleistung der mikrobielle Sicherheit und der sensorischen Qualität von biologisch erzeugten, verzehrfertigen Blattsalaten während einer ausreichend langen Haltbarkeitsdauer mittels innovativer technologischer Verfahren. Zudem sollte durch geeignete Maßnahmen eine Reduktion des Wasserverbrauchs und die Vermeidung von Kreuzkontaminationen ermöglicht werden. Zu diesem Zweck wurden im Technikumsmaßstab innovative Wasch- und Entkeimungsverfahren unter der optionalen Zugabe biologischer Waschwasserzusätze erprobt. Ferner wurde das Hochdruckwasserstrahlschneiden zur Verringerung der Verwundung des Pflanzengewebes beim Schneiden angewandt. Die direkte Behandlung des Prozesswassers mit UV-C Strahlung sollte zur Verringerung der Keimbelastung und zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen beitragen. Zur Bewertung der einzelnen Verfahren wurden diverse Qualitätsparameter, wie z.B. die Atmungsaktivität, die Aktivität qualitätsrelevanter Enzyme, der Gehalte sekundärer Pflanzenstoffe, Keimzahlen und sensorische Eigenschaften, auf verschiedenen Stufen der Produktion sowie im Verlauf der Lagerung bestimmt.

Durch die Anwendung von warmem Wasser (45 °C, 120 s) vor oder nach dem Schneiden des Salates konnte der mikrobielle Status der verzehrfertigen Produkte gegenüber kaltgewaschen Salaten signifikant verbessert werden, was sich positiv auf die mikrobielle Sicherheit und die Haltbarkeit auswirkte. Aufgrund des besseren Kontaktes der Blattoberfläche mit dem Wasser beim Waschen von geschnittenem Salat erwies sich das Waschen nach dem Schneiden als effizientere Methode zur Reduktion des Keimgehaltes. Durch Kombination aus Vor- und Nachwaschschritt könnte jedoch eine zusätzliche Verbesserung der Produktqualität erzielt werden. Durch Hemmung der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL)-Aktivität konnten zudem unerwünschte Bräunungsreaktionen an den Schnittkanten der Salate deutlich reduziert werden. Darüber hinaus ermöglichte das Waschen in warmem Wasser eine

effektive Reduktion der Gehalte an bitter schmeckenden Sesquiterpenlactonen und ist somit gut als nacherntetechnologische Methode zur Entfernung von Bitterstoffen aus Salat geeignet. Die Atmungsaktivität sowie die Gehalte pflanzeneigener Pigmente (Chlorophylle, β-Carotin, Anthocyane) wurden durch Anwendung von warmem Wasser nicht beeinflusst, weshalb ein negativer Effekt der Warmwasserbehandlung auf die Qualität der Salate weitgehend vermieden werden kann. Trotz der effektiveren Keimablösung von der Blattoberfläche mit warmem Wasser wiesen diese Prozesswasser signifikant geringere Keimzahlen auf als Kaltwasservarianten, weshalb davon auszugehen ist, dass die Anwendung von Warmwasser (45 °C, 120 s) bereits zu einer teilweisen Inaktivierung der Bakterien im Wasser führte und dadurch das Risiko einer Kreuzkontamination maßgeblich verringert wurde.

Die Anwendung eines phenolischen Extraktes aus Grünem Tee bewirkte unabhängig der eingesetzten Konzentrationen (0,0-0,5% [m/v]) weder beim verzehrfertigen Salatprodukt noch im Waschwasser eine Reduktion der mikrobiologischen Belastung. Auch die sensorischen Eigenschaften der Produkte konnten durch den Grüntee-Extrakt nicht verbessert werden.

Bei den Versuchen mit einem innovativen Wasserstrahlschneider konnte gezeigt werden, dass sich diese Technologie zur Herstellung verzehrfertiger Blattsalate eignet. Die mit der Wasserstrahlschneidetechnologie (2500 bar; 0,1 mm Düsendurchmesser) geschnittenen Salate wiesen dabei eine mit dem herkömmlichen Messerschneiden vergleichbare Schnittqualität auf. Die Analyse der Atmungsaktivität, der PAL-Aktivität und der sensorischen Eigenschaften deuten auf einen vergleichbaren Verwundungsgrad des Salatgewebes durch die beiden Schneidverfahren hin. Auch in mikrobieller Hinsicht ist das Wasserstrahlschneiden mit dem herkömmlichen Messerschneiden vergleichbar. Da bei der kommerziellen Salatverarbeitung das Stumpfwerden und Schleifen der Messer durch Fachpersonal erhebliche Probleme und Kosten verursacht, könnte die vergleichsweise wartungsarme Wasserstrahlschneidetechnologie insbesondre in großen Betrieben, in denen eine gleichbleibenden Schnittgüte hohe Priorität hat, eine tragbare Alternative zum Messerschneiden darstellen.

Die Behandlung des Prozesswassers mit UV-C Strahlung ermöglichte bei der Salatverarbeitung von hochbelastetem Eisberg- oder Endiviensalat eine Reduktion der Gesamtkeimzahlen im Waschwasser um ca. 2 logarithmische Stufen. Der mikrobielle Status des Prozesswassers konnte somit gegenüber einer Verarbeitungsvariante ohne UV-C Behandlung signifikant verbessert werden, was die Gefahr von Kreuzkontaminationen deutlich verringert. Da das UV-C behandelte Wasser rezykliert werden könnte, wurde somit auch der Verbrauch an Frischwasser reduziert. In weiterführenden Untersuchen wurde gezeigt, dass mit zunehmender UV-C Dosis (34,8 – 174,2 J/L) eine größer werdende Keimreduktion im Prozesswasser erzielt werden kann. Da die Verschmutzung des Prozesswassers (Trübung, Absorp-

tion, Chemischer Sauerstoffbedarf) die Effektivität der UV-C Bestrahlung stark minimieren kann, erscheint es notwendig die UV-C Behandlung des Prozesswassers vor erfolgreicher Umsetzung in die industrielle Praxis weiter zu optimieren.

Die im Projekt erzielten Ergebnisse zeigen, dass durch die Anwendung geeigneter, mit den EG-Rechtsvorschriften für den ökologischen Landbau konformer, Prozessverfahren (Warmwasserwaschen vor bzw. nach dem Schneiden ggf. mit Zugabe von Calciumlaktat, UV-C Bestrahlung des Prozesswassers) sowohl die physiologischen Eigenschaften der verzehrfertigen Salate als auch der mikrobiologische Status der Produkte und des Waschwassers signifikant verbessert werden kann und somit eine Alternative zu chemischen Desinfektionsmittel (z.B. Chlor) darstellen. Außerdem wurde die Ultra-Hochdruck-Wasserstrahlschneidetechnologie zur Herstellung verzehrfertiger Blattsalate erfolgreich als Alternative zum herkömmlichen Bandschneideverfahren etabliert.

II. 4. Summary

SafeSalad – Quality and security throughout the production chain of organically produced fresh-cut lettuce

Florian Hägele*, Sabine Kübler, Reinhold Carle

* University of Hohenheim, Institute of Food Science and Biotechnology, Chair of Plant Food Technology and Analysis, Garbenstrasse 25, D-70599 Stuttgart, Germany
E-Mail: florian.haegele@uni-hohenheim.de

The objective of the present study was to improve shelf life, microbial safety and general product quality of organically grown, fresh-cut lettuce by establishing innovative processing technologies. Furthermore, the study aimed at reducing the consumption of freshwater and at minimizing the risk of dangerous cross contaminations applying suitable measures during the manufacturing process. Therefore, the application of innovative washing and disinfection methods as well as biological wash water additives has been tested in pre-industrial scale. Moreover, ultra-high pressure water jet cutting to reduce wounding during the cutting process were systematically evaluated for their applicability to produce fresh-cut lettuce. In a further approach, and the application of UV-C illumination to lower microbial counts in the process water was examined.

To assess the efficiency of the individual technologies, different quality parameters such as the respiratory activity, the activity of relevant enzymes, secondary plant metabolites, and sensorial properties of the products were determined at different levels of the production process as well as during the full course a commercial storage period.

Compared to conventional washing (cold water), warm water washing (45 °C, 120 s) before or after cutting of the raw material significantly improved the microbial status of fresh-cut lettuce, which has a positive effect on shelf life and microbial safety. Due to improved contact of the leaf surface with the process water, washing of cut lettuce turned more effectively reduced the microbial counts than washing before cutting. However, the combination of a washing procedure before and after cutting may result in an additional improvement of the microbial quality. In addition, since warm water treatments significantly reduced the activity of the phenylalanine ammonia lyase (PAL), undesired cut edge browning of warm washed lettuce was markedly reduced. Moreover, warm water washing treatments allowed an effective washout of bitter tasting sesquiterpene lactones (SLs), thus, representing a suitable method for post-harvest removing bitter substances from lettuce. Furthermore, neither the respiratory activity nor the contents of plants' own pigments (chlorophylls, β-carotene, anthocyanins) were adversely affected by warm water treatments. Although the initial reduction of microbial loads on fresh-cut lettuce was more pronounced for shredded lettuce washed in warm water, microbial counts in warm processing water were significant lower than in commercial cold water variants. This suggests that bacteria were partially inactivated by the application of warm water (45 °C), and therefore, the risk of cross-contamination is reduced.

Phenolic extracts of natural green tee neither improved the microbial quality of the process water nor of the fresh-cut lettuce, independent of the applied concentrations (0.0-0.5%). In addition, the sensorial properties of the products were not positively affected by the green tee extract. Hence, natural green tee extracts were identified to be unsuitable to improve quality and shelf life of minimally processed lettuce.

The innovative ultra-high pressure water jet cutting was showed to be a suitable cutting technology for the manufacture of fresh-cut leafy vegetables. Lettuce cut with the water jet cutter (2500 bar; nozzle diameter 0.1 mm) exhibited the same quality characteristics as lettuce prepared with a commercial blade cutting system using a newly sharpened blade. The determination of physiological parameters (respiratory activity, PAL activity), the levels of anthocyanins and SLs, and sensorial quality suggests a similar degree of tissue wounding due to both applied cutting techniques. Furthermore, microbiological quality of the fresh-cut lettuce was remained unaffected by water jet cutting. Hence, water jet cutting may be an appropriate alternative to blade cutting, particularly for large-scale producers. While sharpening the blades

required specialized staff and, more importantly, an interruption of the production process, water jet cutting allows substantially longer production periods.

The efficiency of UV-C disinfection to reduce the microbial load of lettuce washing water was evaluated using highly contaminated iceberg and endive lettuce, respectively. Thereby, compared to an untreated process variant, the UV-C irradiation of the process water reduced the total counts in the water by around 2 $\log_{10}$ colony forming units/mL. Thus, UV-C treatments proved to be a suitable method for reducing the consumption of fresh water and for diminishing the risk of hazardous microbial cross-contaminations. Further investigations indicated that with an increasing UV-C dose (34.8 – 174.2 J/L) improved the bactericidal effect in the process water. However, since the efficiency of the UV-C disinfection may be compromised by physiochemical parameters e.g. absorption, turbidity, and chemical oxygen demand of the water, there is still potential for optimization of the method prior to implementation into industrial practice.

The results obtained in the present project show that the physiological properties of fresh-cut lettuce as well as the microbiological state of the products and the process water effectively can be improved by the application of suitable processing methods (warm water treatments, UV-C disinfection of the process water), compliant to the EC regulations for the organic farming, and therefore, representing a good alternative for chemical disinfectants e.g. chlorine. Furthermore, the innovative ultra-high pressure water jet cutting technology was successfully established as an alternative for the commercial blade cutting in the manufacture of fresh-cut lettuce.

II. 5. Literaturverzeichnis

Allende, A.; McEvoy, J.L.; Luo, Y.; Artes, F.; Wang, C.Y. 2006. Effectiveness of two-sided UV-C treatments in inhibiting natural microflora and extending the shelf-life of minimally processed ‘Red Oak Leaf’ lettuce. *Food Microbiology* 23 (3), 241–249.

Altunkaya, A. 2011. Effect of whey protein concentrate on phenolic profile and browning of fresh-cut lettuce (*Lactuca Sativa*). *Food Chemistry* 128 (3), 754–760.

Baur, S.; Klaiber, R.; Hammes, W.P.; Carle, R. 2004a. Sensory and microbiological quality of shredded, packaged iceberg lettuce as affected by pre-washing procedures with chlorinated and ozonated water. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 5 (1), 45–55.

Baur, S.; Klaiber, R.; Wei, H.; Hammes, W.P.; Carle, R. 2005. Effect of temperature and chlorination of pre-washing water on shelf-life and physiological properties of ready-to-use iceberg lettuce. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 6 (2), 171–182.

Baur, S.; Klaiber, R.G.; Koblo, A.; Carle, R. 2004b. Effect of different washing procedures on phenolic metabolism of shredded, packaged iceberg lettuce during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (23), 7017–7025.

Carle, R.; Borzych, P.; Dubb, P.; Siliha, H.; Maier, O. 2001. A new process for firmer canned cherries and strawberries. *Food Australia* 53 (8), 343–348.

Carreño-Olejua, R.; Hofacker, W.C.; Hensel, O. 2010. High-pressure water-jet technology as a method of improving the quality of post-harvest processing. *Food and Bioprocess Technology* 3 (6), 853-860.

Chapagain, B.; Wiesman, Z.; Tsror, L. 2007. In vitro study of the antifungal activity of saponin-rich extracts against prevalent phytopathogenic fungi. *Industrial Crops and Products* 26 (2), 109–115.

De Roever, C. 1998. Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce. *Food Control* 9 (6), 321–347.

DGHM (Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie) 2011. Veröffentlichte mikrobiologische Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von Lebensmitteln. Online verfügbar unter: http://www.dghm.org/m_275, zuletzt geprüft am 12/06/2015.

Engels, C.; Knödler, M.; Zhao, Y.-Y.; Carle, R.; Gänzle, M.; Schieber, A. 2009. Antimicrobial activity of gallotannins isolated from mango (*Mangifera indica* L.) kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (17), 7712–7718.

Engels, C.; Schieber, A.; Gänzle, M. 2011. Inhibitory spectra and modes of antimicrobial action of gallotannins from mango kernels (*Mangifera indica* L.). *Applied and Environmental Microbiology* 77 (7), 2215–2223.

Francis, G.A.; O'Beirne, D. 2002. Effects of vegetable type and antimicrobial dipping on survival and growth of *Listeria innocua* and *E. coli*. *International Journal of Food Science and Technology* 37 (6), 711–718.

Francis, G.A.; Thomas, C.; O'Beirne, D. 1999. The microbiological safety of minimally processed vegetables. *International Journal of Food Science and Technology* 34 (1), 1–22.

Gil, M.I.; Selma, M.V.; López-Gálvez, F.; Allende, A. 2009. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions. *International Journal of Food Microbiology* 134 (1–2), 37–45.

Gross, M.; Logan, B. 1995. Influence of different chemical treatments on transport of *Alcaligenes paradoxus* in porous media. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (5), 1750–1756.

Jefferson, K.K. 2004. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters* 236 (2), 163–173.

Kaiser, A.; Brinkmann, M.; Carle, R.; Kammerer, D.R. 2012. Influence of thermal treatment on color, enzyme activities, and antioxidant capacity of innovative pastelike parsley products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (12), 3291–3301.

Kim, S.-Y.; Sagong, H.-G.; Ryu, S.; Mah, J.-H.; Kang, D.-H. 2011. Development of oscillation method for reducing foodborne pathogens on lettuce and spinach. *International Journal of Food Microbiology* 145 (1), 273–278.

King, A.; Magnuson, J.; Török, T.; Goodman, N. 1991. Microbial flora and storage quality of partially processed lettuce. *Journal of Food Science* 56 (2), 459–461.

Klaiber, R.G.; Baur, S.; Koblo, A.; Carle, R. 2005. Influence of washing treatment and storage atmosphere on phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic acid content of minimally processed carrot sticks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (4), 1065–1072.

Klaiber, R.G.; Baur, S.; Magel, L.; Hammes, W.P.; Carle, R. 2004. Quality of shredded, packaged carrots as affected by different washing treatments. *Journal of Food Science* 69 (4), SNQ161.

Loaiza-Velarde, J.G.; Saltveit, M.E. 2001. Heat shocks applied either before or after wounding reduced browning of lettuce leaf tissue. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 126 (2), 227–234.

Martín-Diana, A.B.; Rico, D.; Barry-Ryan, C. 2008. Green tea extract as a natural antioxidant to extend the shelf-life of fresh-cut lettuce. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 9 (4), 593–603.

Morris, C.E.; Monier, J.-M. 2003. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 41 (1), 429–453.

Oliveira, M.; Usall, J.; Viñas, I.; Anguera, M.; Gatius, F.; Abadias, M. 2010. Microbiological quality of fresh lettuce from organic and conventional production. *Food Microbiology* 27 (5), 679–684.

Ölmez, H.; Temur, S. 2010. Effects of different sanitizing treatments on biofilms and attachment of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on green leaf lettuce. *LWT - Food Science and Technology* 43 (6), 964–970.

Park, S.-H.; Choi, M.-R.; Park, J.-W.; Park, K.-H.; Chung, M.-S.; Ryu, S.; Kang, D.-H. 2011. Use of organic acids to inactivate *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh apples and lettuce. *Journal of Food Science* 76 (6), 293-298.

Perez-Gago, M.; Serra, M.; Alonso, M.; Mateos, M.; del Río, M.A. 2005. Effect of whey protein- and hydroxypropyl methylcellulose-based edible composite coatings on color change of fresh-cut apples. *Postharvest Biology and Technology* 36 (1), 77–85.

Rees, S.; Harborne, J. 1985. The role of sesquiterpene lactones and phenolics in the chemical defence of the chicory plant. *Phytochemistry* 24 (10), 2225–2231.

Rico, D.; Martín-Diana, A.B.; Barat, J.M.; Barry-Ryan, C. 2007. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. *Trends in Food Science & Technology* 18 (7), 373–386.

Rolle, R.S.; Chism, G.W. 1987. Physiological consequences of minimally processed fruits and vegetables. *Journal of Food Quality* 10 (3), 157–177.

Roner, M.; Sprayberry, J.; Spinks, M.; Dhanji, S. 2007. Antiviral activity obtained from aqueous extracts of the Chilean soapbark tree (*Quillaja saponaria* Molina). *Journal of General Virology* 88 (1), 275–285.

Sagong, H.-G.; Lee, S.-Y.; Chang, P.-S.; Heu, S.; Ryu, S.; Choi, Y.-J.; Kang, D.-H. 2011. Combined effect of ultrasound and organic acids to reduce *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce. *International Journal of Food Microbiology* 145 (1), 287–292.

Saltveit, M. E. 1997. Physical and physiological changes in minimally processed fruits and vegetables. in: Tomás-Barberán, F.A.; Robin, R.D. (Eds.), *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*. Oxford University Press, Oxford, S. 205-220.

Saltveit, M.E. 2000. Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock. *Postharvest Biology and Technology* 21 (1), 61–69.

Schweiggert, U.; Schieber, A.; Carle, R. 2005. Inactivation of peroxidase, polyphenoloxidase, and lipoxygenase in paprika and chili powder after immediate thermal treatment of the plant material. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 6 (4), 403–411.

Seymour, I.J.; Burfoot, D.; Smith, R.L.; Cox, L.A.; Lockwood, A. 2002. Ultrasound decontamination of minimally processed fruits and vegetables. *International Journal of Food Science and Technology* 37 (5), 547–557.

Siddiqui, M.W.; Chakraborty, I.; Ayala-Zavala, J.F.; Dhua, R.S. 2011. Advances in minimal processing of fruits and vegetables: a review. *Journal of Scientific and Industrial Research* 70 (10), 823–834.

Steele, M.; Mahdi, A.; Odumeru, J. 2005. Microbial assessment of irrigation water used for production of fruit and vegetables in Ontario, Canada. *Journal of Food Protection* 68 (7), 1388–1392.

Wießner, S.; Thiel, B.; Krämer, J.; Köpke, U. 2009. Hygienic quality of head lettuce: Effects of organic and mineral fertilizers. *Food Control* 20 (10), 881–886.

2. Gesamtzusammenfassung

(max. 2000 Zeichen/Projektteil)

Zur Analyse unterschiedlicher Wege einer mikrobiologischen Kontamination mit potenziellem Gesundheitsrisiko wurde die Produktion von verschiedenen Blattsalatarten (Eissalat, Eichblattsalat, Rucola, Mangold) in einem kommerziellen, biologisch produzierenden Betrieb in Norddeutschland in den Jahren 2012, 2013 und 2014 untersucht. Pro Jahr erfolgten jeweils zwei Pflanzungen zu unterschiedlichen Terminen. Die Pflanzen wurden mit verschiedenen Anbautechniken kultiviert. Variiert wurden Dünger (Haarmehlpellets, Hühnertrockenkot), Bewässerungssystem (Über-Kopfbewässerung, Tropfbewässerung), Bodenbedeckung (unbedeckter Boden, Mulcheinsatz) sowie genutzte Wasserqualität (Leitungswasser, Brunnenwasser, Teichwasser). In zweiwöchigem Abstand wurden Pflanzenproben gezogen, um die Auswirkungen der verschiedenen Anbautechniken auf die mikrobiologische Kontamination und das Pflanzenwachstum zu analysieren. Zusätzlich wurden Proben von Saatgut, Jungpflanzen, Substrat, Düngemittel, Bewässerungswasser, Boden und Blättern analysiert. Von ausgesuchten Sätzen wurden Pflanzenproben mit unterschiedlichen Verfahren zu Fertigsalaten verarbeitet. Auch hier wurde die mikrobielle Dynamik während der Verarbeitung und der Lagerung verfolgt sowie diverse Qualitätsparameter zur Bewertung der verschiedenen Verfahren bestimmt.

Pflanzenwachstum

Die Daten des Pflanzenwachstums zeigen insgesamt nur wenige signifikante Unterschiede zwischen den Varianten. Herauszuheben wären das bessere Wachstum auf den Parzellen, die mit Hühnertrockenkot gedüngt wurden und der höhere Nitrat-N-Gehalt in diesen Varianten. Eine Analyse der Qualitätsparameter Nitratgehalt und Strukturkomponenten der Zellwand zeigte ebenfalls keine konsistenten Einflüsse hinsichtlich der unterschiedlichen Produktionsverfahren.

Mikrobiologie/Modellierung

Die risikofreudigeren Anbaumethoden im Freilandversuch (Hühnertrockenkot, Überkopfbewässerung mit Teichwasser, keine Mulchabdeckung) resultierten in keiner messbaren Änderung der mikrobiellen Besiedelung. Dies sollte jedoch nicht die Gefahr, welche von Input mit schlechter mikrobiologischer Qualität ausgeht, verharmlosen. Manche Krankheitserreger wie z.B. humanpathogene *E. coli* haben eine niedrige Infektionsdosis von unter 100 Bakterien (Rheinbaben, 2011). Folglich können auch schon geringe Mengen an Bakterien, welche unter dem Detektionslimit der hier angewandten Analysemethoden liegen und somit nicht erfasst würden, zu schweren Krankheitsausbrüchen führen.

In Gewächshausversuchen konnte gezeigt werden, dass *E. coli* gut auf Blättern überlebt, und dass die die Kolonisierung unabhängig von der N-Quelle vorkommt, wenn *E. coli* auf anderem Wege als durch Dünger eingebracht wird. Von Bedeutung ist weiterhin die Möglichkeit einer Internalisierung von *E. coli*. Dabei ist die Unversehrtheit der Salatblätter entscheidend, da festgestellt werden konnte, dass eine Schädigung die Invasion von *E. coli* O157:H7 begünstigen und somit zu einem erhöhten Risiko beitragen kann. Zur Verminderung des Kontaminationsrisikos müssen schon während der Produktion im Freiland oder Gewächshaus Maßnahmen (z.B. durch Anwendung des HACCP-Konzeptes) ergriffen werden.

In keinem der angebauten Freilandsätze traten allerdings zum Erntetermin Kontaminationen oberhalb der Warnwerte der Dt. Gesellschaft für Hygiene (DGHM, 2011) auf.

Eine Modellierung der Zusammenhänge zwischen Kontaminationsquelle, -zeitpunkt, Befallsdynamik und Umweltdaten war leider nicht möglich, da es im Versuchszeitraum nur zu geringer bzw. in einigen Sätzen zu keiner Kontamination kam. Dessen ungeachtet wurde zumindest die Grundstruktur eines Modells entwickelt.

Verarbeitung

Ziel des Projekts im Bereich der Verarbeitung war die Gewährleistung der mikrobielle Sicherheit und der sensorischen Qualität von biologisch erzeugten, verzehrfertigen Blattsalaten während einer ausreichend langen Haltbarkeitsdauer mittels innovativer technologischer Verfahren. Zudem sollte durch geeignete Maßnahmen eine Reduktion des Wasserverbrauchs und die Vermeidung von Kreuzkontaminationen ermöglicht werden. Zu diesem Zweck wurden im Technikumsmaßstab innovative Wasch- und Entkeimungsverfahren unter der optionalen Zugabe biologischer Waschwasserzusätze erprobt. Ferner wurde das Hochdruckwasserstrahlschneiden zur Verringerung der Verwundung des Pflanzengewebes beim Schneiden angewandt. Die direkte Behandlung des Prozesswassers mit UV-C Strahlung sollte zur Verringerung der Keimbelastung und zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen beitragen. Zur Bewertung der einzelnen Verfahren wurden diverse Qualitätsparameter, wie z.B. die Atmungsaktivität, die Aktivität qualitätsrelevanter Enzyme, der Gehalte sekundärer Pflanzenstoffe, Keimzahlen und sensorische Eigenschaften, auf verschiedenen Stufen der Produktion sowie im Verlauf der Lagerung bestimmt.

Die in diesem Projektteil erzielten Ergebnisse zeigen, dass durch die Anwendung geeigneter, mit den EG-Rechtsvorschriften für den ökologischen Landbau konformer, Prozessverfahren (Warmwasserwaschen vor bzw. nach dem Schneiden ggf. mit Zugabe von Calciumlaktat, UV-C Bestrahlung des Prozesswassers) sowohl die physiologischen Eigenschaften der verzehrfertigen Salate als auch der mikrobiologische Status der Produkte und des Waschwassers signifikant verbessert werden kann und somit eine Alternative zu chemischen Desinfektionsmittel (z.B. Chlor) darstellen. Außerdem wurde die Ultra-Hochdruck-

Wasserstrahlschneidetechnologie zur Herstellung verzehrfertiger Blattsalate erfolgreich als Alternative zum herkömmlichen Bandschneideverfahren etabliert.

3. Comprehensive summary

(max. 2000 characters/sub-project)

To analyze different pathways of microbial contamination with potential health risk the production of different leafy vegetables (iceberg lettuce, red oak leaf lettuce, rocket, Swiss chard) was studied on a commercial organically producing farm in North Germany in the years of 2012, 2013 and 2014. Per year two sets were planted at different dates. The plants were cultivated applying the following different production techniques: different fertilizers (pig hair pellets, dry chicken manure), irrigation systems (overhead irrigation, drip irrigation), soil covers (uncovered, mulch) and different water qualities (tap water, well water, pond water). In a two week interval plant samples were taken to investigate the effects of these different techniques on microbial contamination and plant growth. Additionally samples of seeds, transplants, substrate, fertilizers, irrigation water, soil and leaves were taken and analyzed. Plant material of selected sets was processed to ready-to-eat salads using different processing techniques. Also here the microbial contamination and its dynamics were quantified during the processing procedures and during storage. Several parameters were measured to evaluate the effects of the different processing techniques on the quality of the produce.

Plant development

Plant growth only showed a few significant differences between the production treatments. The two main effects were the better growth on plots fertilized by dry chicken manure and the higher leaf nitrate concentration of these treatments. The analyses of the nitrate content and the structural components of the cell wall also showed no consistent effects regarding the different production treatments.

Microbiology/Modelling

The production measures with a higher infection risk (dry chicken manure, overhead irrigation with pond water, no mulch) resulted in no gaugeable change in microbial contamination. This statement should not trivialize the danger which is associated with the input of material of low microbial quality into the production process. Some pathogens like e.g. human pathogenic *E.coli* have an infective dose of lower than 100 bacteria (Rheinbaben, 2011). Consequently only low amounts of bacteria, which lie below the detection limit of the analytic methods used and would not be detected here, can result in a serious disease outbreak. Greenhouse experiments showed high survival rates of *E.coli* on leaves, and colonization occurs independently from the nitrogen source, if *E.coli* is introduced by a non-fertilizer source. Of high importance is the finding that E. coli can enter the plant tissue. In this respect the in-

tactness of the lettuce leaves is of importance, because it could be detected that a damage promotes the invasion of *E. coli* O157:H7 into the leaf and causes a higher risk.

To reduce the risk of contamination in open field or in greenhouse production already during growth measures (e.g. application of the HACCP concept) have to be applied.

However, in none of the sets in the open field experiments a contamination above the threshold values published by the Deutschen Gesellschaft für Hygiene (DGHM, 2011) occured.

Caused by the low, and in some sets missing, infection modelling of the interactions between possible infection sources, point in time and development of infection and climate data was not possible. Nevertheless a structure of a model was developed.

Processing

The objective of the present study was to improve shelf life, microbial safety and general product quality of organically grown, fresh-cut lettuce by establishing innovative processing technologies. Furthermore, the study aimed at reducing the consumption of freshwater and at minimizing the risk of dangerous cross contaminations applying suitable measures during the manufacturing process. Therefore, the application of innovative washing and disinfection methods as well as biological wash water additives has been tested in pre-industrial scale. Moreover, ultra-high pressure water jet cutting to reduce wounding during the cutting process were systematically evaluated for their applicability to produce fresh-cut lettuce. In a further approach, and the application of UV-C illumination to lower microbial counts in the process water was examined.

To assess the efficiency of the individual technologies, different quality parameters such as the respiratory activity, the activity of relevant enzymes, secondary plant metabolites, and sensorial properties of the products were determined at different levels of the production process as well as during the full course a commercial storage period.

The results obtained in this sub-project show that the physiological properties of fresh-cut lettuce as well as the microbiological state of the products and the process water effectively can be improved by the application of suitable processing methods (warm water treatments, UV-C disinfection of the process water), compliant to the EC regulations for the organic farming, and therefore, representing a good alternative for chemical disinfectants e.g. chlorine. Furthermore, the innovative ultra-high pressure water jet cutting technology was successfully established as an alternative for the commercial blade cutting in the manufacture of fresh-cut lettuce.

4. Anhang

4.1 Erfolgskontrollbericht Projektteil Leibniz Universität Hannover

Beitrag der Ergebnisse zu den förderpolitischen Zielen

Eine Erkenntnis aus dem Ausbruch der letzten EHEC-Epidemie war, dass es keine ausreichenden Informationen über die Gefahrenquellen und die Wege einer möglichen bakteriellen Infektion in gemüsebaulichen Produktionsprozessen gibt. Für die biologische Produktion von frisch verzehrtem Gemüse, wie z.B. Blattsalaten und Fertigsalaten, könnte sogar ein erhöhtes Infektionsrisiko durch die Nutzung organischer Produktionsmaterialien bestehen. Das hier vorgestellte Projekt diente somit dem förderpolitischen Ziel des BÖLN Wissens- und Erfahrungslücken für diesen Produktionszweig zu schließen.

Wissenschaftlich-technische Ergebnisse des Vorhabens, erreichte Nebenergebnisse und gesammelte wesentliche Erfahrungen

Als ein wesentliches Ergebnis des Vorhabens kann angeführt werden, dass die Produktion von Blattsalaten als Rohware für die Produktion von Fertigsalaten in den geprüften biologischen Produktionsverfahren in mikrobiologischer Hinsicht kein Risiko darstellt. Es gab nur wenige Kontaminationen und zur Ernte wurde in keinem Fall der Richt- bzw. Warnwert für die untersuchten Bakterien überschritten. Gleichwohl muss als zweites wesentliches Ergebnis angeführt werden, dass Gewächshausversuche zeigten, dass unter bestimmten Umständen eine Internalisierung von *E. coli* Bakterien in das Pflanzengewebe von Rucola- und Mangoldblättern möglich ist. Eine solche Internalisierung stellt ein besonderes Gefahrenpotenzial dar, da sich die Bakterien im Gewebe geschützt vermehren können und durch z.B. Waschen des Produktes keine Reduzierung der Kolonienzahl möglich ist.

Fortschreibung des Verwertungsplans

<u>Wirtschaftliche Erfolgsaussichten</u>

In Zusammenhang mit diesem Projekt liegen keine Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen oder erteilte Schutzrechte vor. Die Themenstellung des Projektes hatte nicht zum Ziel wirtschaftliche Erfolge oder Vorteile zu generieren.

<u>Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit für eine mögliche notwendige nächste Phase bzw. die nächsten innovatorischen Schritte</u>

Es sollte über weitere Versuche (auch unter mehr kontrollierten Bedingungen) nachgedacht werden, in denen weitere Produktionsverfahren hinsichtlich der Kulturen aber auch der Pro-

duktionsfaktoren untersucht werden. Mit Hilfe der Ergebnisse aus diesen Versuchen könnte es gelingen das schon in diesem Projekt geplante Modell zu erstellen und zu parametrisieren. Wichtig wäre dabei eine Zusammenarbeit mit Einrichtungen, in denen entsprechende mikrobiologische Versuche durchgeführt werden dürfen.

Arbeiten die zu keiner Lösung geführt haben

Auf Grund der geringen Fälle von mikrobieller Belastung in den Feldversuchen war es leider nicht möglich, systematische und stabile Korrelationen zwischen den Versuchsvarianten und der mikrobiellen Situation auf den Pflanzen abzuleiten und aus diesen Zusammenhängen ein entsprechendes Modell zu parametrisieren. Hier müssten weitere Versuche durchgeführt werden.

Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer

Die Ergebnisse, wie sie insbesondere im Merkblatt öffentlich zur Verfügung stehen, können von Nutzern für Präsentationen genutzt werden. Gleiches gilt für die in wissenschaftlichen Zeitschriften publizierten Daten.

Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung

Die Ausgabenplanung wurde eingehalten. Trotz zweimaligem personellen Wechsel der Bearbeiter konnten die Freilandversuche im Praxisbetrieb wie geplant durchgeführt werden. Dadurch, dass die Versuche zur möglichen Internalisierung von Bakterien nicht auf den Freilandflächen der LUH stattfinden konnten (Zulassungsproblematik Freisetzung GMO), wurden zu diesem Thema noch nach geplantem Projektende Versuche im Gewächshaus durchgeführt. Insgesamt verzögerte sich durch diese Umstände die Auswertung der Versuche. Das Projekt wurde auf Antrag kostenneutral vom 15.03.2015 auf den 30.09.2015 verlängert.

4.2 Erfolgskontrollbericht Projektteil Universität Hohenheim

Beitrag der Ergebnisse zu den förderpolitischen Zielen

Durch die gezielte Anwendung eines Waschschritts mit warmem Wasser und ggf. nach Zugabe von Calciumlaktat konnte die Keimbelastung von verzehrfertigen Salatprodukten signifikant verringert werden. Die mikrobielle Sicherheit derartiger Produkte konnte somit deutlich verbessert werden. Ferner wurde die Gefahr von Kreuzkontaminationen durch die Bestrahlung des Prozesswassers mit UV-C Strahlung minimiert. Die Anwendung dieser Technologie ermöglicht dadurch die Einsparung von Frischwasser durch vermehrtes Rezyklieren.

Wissenschaftlich-technische Ergebnisse des Vorhabens, erreichte Nebenergebnisse und gesammelte wesentliche Erfahrungen

Das Waschen der verzehrfertigen Salate mit warmem Wasser (45 °C) ermöglichte eine effektivere Keimreduktion als das Waschen in kaltem Wasser (4 °C). Durch Waschen mit warmem Wasser konnte eine Reduktion der Gesamtkeimzahlen um bis zu 1,4 $\log_{10}$ koloniebildende Einheiten (KbE) pro Gramm erzielt werden. Das Vorwaschen ganzer Salatköpfe vor dem Schneiden ermöglichte eine Gesamtkeimreduktion von bis zu 0,7 $\log_{10}$ KbE/g in kaltem Wasser und 0,9 $\log_{10}$ KbE/g in warmem Wasser. Zudem wies Prozesswasser der warmgewaschen Salate signifikant geringere Keimzahlen auf als das Prozesswasser der kaltgewaschener Salate, was auf eine teilweise Inaktivierung der Bakterien im warmem Wasser schließen lässt. Neben der Verbesserung der mikrobiologischen Qualität konnten durch Anwendung von warmem Wasser auch die sensorischen Eigenschaften der verzehrfertigen Salate verbessert werden. Sowohl Waschen in warmem Wasser vor als auch nach dem Schneiden bewirkte eine signifikante Reduktion der Schnittkantenbräunung. Die Atmungsaktivität und die Gehalte an pflanzlichen Pigmenten (Chlorophylle, Anthocyane) wurden durch Anwendung von warmem Wasser nicht beeinflusst.

Ein in den Prozess integrierter Waschvorgang bewirkte eine signifikante Reduktion der Sesquiterpenlactone-Gehalte in geschnittenem Salat. Waschen in warmem Wasser wies dabei einen deutlich größeren Effekt auf als Waschen in kaltem Wasser. Während das Waschen mit kaltem Wasser, verglichen mit den Sesquiterpenlacton-Gehalten des ungewaschenen Chicorées, eine Verringerung des Sesquiterpenlactongehaltes um 27,9% bewirkte, führte der Waschgang mit Warmwasser insgesamt zu einer Verringerung um 48,0%. Beim Waschen geschnittener Salate wurde ein stärkerer Auswascheffekt der Sesquiterpenlactone beobachtet als beim Waschen ganzer Salatköpfe vor dem Schneiden.

Untersuchungen mit einem innovativen Wasserstrahlschneider zeigten, dass sich das Wasserstrahlschneiden in gleicher Weise zum Schneiden von Salaten eignet wie das herkömmliche Bandschneideverfahren. Die Wahl des Schneidverfahrens übte keinen wesentlichen Einfluss auf die Atmungsaktivität und die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) Aktivität aus, was darauf schließen lässt, dass beide Schneidverfahren eine vergleichbar starke Verwundung des Salatgewebes verursachten. Hinsichtlich der sensorischen Qualität, der Keimzahlen und der Gehalten an Chlorophyllen und Anthocyanen sowie den Sesquiterpenlactonen ließen sich keine Unterschiede zwischen den Schneideverfahren feststellen.

Untersuchungen hinsichtlich der Dosis-Wirkungs-Beziehung einer UV-C Dekontamination von Prozesswassern aus der Salatverarbeitung zeigten mit zunehmender UV-C Dosis (34,8 – 174,2 J/L) eine steigende Reduktion der Gesamtkeimzahlen im Wasser. Dennoch reichte auch die höchste Bestrahlungsdosis von 174,2 J/L nicht aus, um eine vollständige Keimreduktion zu bewirken.

Bei der UV-C Behandlung des Waschwassers während des Waschprozesses von geschnittenem Eisberg- oder Endiviensalat in einer industriellen Röhrenwaschmaschine konnte eine Abnahme der Gesamtkeimzahlen und der Pseudomaden mit jedem Waschzyklus beobachtet werden. Nach sechsmaligem Prozessieren des geschnittenen Salates (60 kg) konnte eine Keimreduktion im Waschwasser von ca. 2 logarithmischen Stufen erzielt werden. Im Gegenzug stieg die Trübung des Waschwassers nach einem Waschzyklus stark an, was die Effektivität der UV-C Strahlen nachteilig beeinflussen könnte.

Da das Prozesswasser beim Waschen von ganzem Salat weniger stark verschmutz wird, erscheint eine UV-C Entkeimung des Waschwassers vorallem im Vorwaschschritt als vielversprechend.

Unabhängig von der eingesetzten Konzentration bewirkte der phenolische Extrakt aus Grünem Tee keine Verbesserung der mikrobiologischen Qualität. Auch im Waschwasser blieb eine keimreduzierende Wirkung des Grüntee-Extrakts (GT) aus. Die sensorischen Eigenschaften der mit GT gewaschenen Salate waren mit denen herkömmlich gewaschener Salaten identisch. Die Anwendung eines natürlichen Extraktes aus *Quillaja saponaria* erwies sich als ungeeignet, da eine starke Bildung von Schaum den Betrieb der industriellen Waschmaschine verhinderte.

Fortschreibung des Verwertungsplans

Wirtschaftliche Erfolgsaussichten

Die Anwendung von warmem Wasser beim Waschprozess kann vor oder nach dem Schneiden durchgeführt werden und trägt so maßgeblich zur Verbesserung des mikrobiellen Status verzehrfertiger Blattsalate bei. Neben der verbesserten mikrobiellen Sicherheit wird zudem eine Verlängerung der Haltbarkeitsdauer derartiger Produkte erhöht. Warmwasser könnte

daher eine effiziente Alternative zu unerwünschten chemischen Desinfektionsmitteln wie Chlor darstellen. Zudem ermöglicht die Anwendung von warmem Wasser die Verbesserung der visuellen Eigenschaften verzehrfertiger Salatprodukte (Reduktion von Schnittkanten-Bräunung), was sich in einer besseren Akzeptanz der Verbraucher wiederspiegeln wird. Der Waschprozess wurde darüber hinaus durch Anwendung von UV-C Strahlung weiter optimiert und der mikrobielle Status des Prozesswassers konnte so signifikant verbessert werden. Dies ermöglicht eine Reduktion des Verbrauchs an Frischwasser und folglich die zukünftige Einsparung von Betriebskosten. Die Integration von UV-C Strahlern in einen bestehen Prozess könnte kostengünstig und vermutlich ohne größeren technischen Aufwand erfolgen. Die Anwendung eines Hochdruck-Wasserstrahlschneiders könnte sich insbesondere für größere Betriebe eignen, bei denen der Prozess durch die starke Abnutzung der herkömmlichen Schneidemesser häufig unterbrochen werden muss. Allerdings erfordert die Installation und der Betrieb eines Hochdruck-Wasserstrahlschneiders im Gegensatz zum herkömmlichen Bandschneideverfahren großen technischen Aufwand, weshalb die Anwendbarkeit in den Betrieben einschränkt sein könnte.

Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit für eine mögliche notwendige nächste Phase bzw. die nächsten innovatorischen Schritte

In der vorliegenden Studie wurde die Eignung des Wasserstrahlschneiders zur Herstellung verzehrfertiger Blattsalate lediglich gegenüber einem frisch geschliffenen, scharfen Messers untersucht. Da die Schnittqualität beim Wasserstrahlschneiden im Gegensatz zum herkömmlichen Messerschneiden konstant bleibt, könnte in weiteren Versuchen evaluiert ob durch die Anwendung Wasserstrahlschneidetechnologie eine bessere Schnittqualität erzielt werden kann als mit stumpfen, abgenutzten Messern. Obwohl sich die UV-C Behandlung des Prozesswassers im Technikumsmaßstab als effektive Methode zur Reduktion der Keimzahlen im Wasser erwies, sollte die Eignung des Verfahrens auch in kontinuierlich betriebenen Industrieprozessen untersucht werden, da insbesondere die zunehmende Verschmutzung des Prozesswassers die Effektivität der UV-C Strahlen stark minimieren kann. Eine Verbesserung der Effektivität der UV-C Strahlen, könnte möglicherweise durch Kombination dieser Technologie mit andern Aufreinigungsmethoden des Waschwassers wie z.B. Filtration erzielt werden.

Arbeiten die zu keiner Lösung geführt haben

Die Anwendung eines pflanzlichen Detergenz aus *Quillaja saponaria* war nicht möglich, da aufgrund extremer Schaumentwicklung ein Betrieb der industriellen Waschmaschinen unmöglich war. Phenolische Extrakte aus Grünem Tee bewirkten keine Verbesserung des mikrobiellen Status und der Qualität der verzehrfertigen Salatprodukte.

Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer

Mögliche Nutzer wurden durch Beiträge in Fachzeitschriften und auf Kongressen über die Forschungsergebnisse informiert (siehe Kapitel 2.6).

Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung

Die Ausgabenplanung wurde eingehalten. Aufgrund personeller Veränderungen und technischer Probleme bei der Erhebung der Daten musste die Projektlaufzeit um fünf Monate verlängert werden.