

Aus dem Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Entwicklung von Maßnahmen zur Verringerung
der Kreuzkontamination mit ESBL-bildenden
E. coli im Rahmen der Zerlegung und
Verpackung von Mastgeflügel**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor of Philosophy (PhD)
in Biomedical Sciences
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Christian Thomas
Lebensmitteltechnologe
aus Karl-Marx-Stadt

Berlin 2021
Journal-Nr.: 4268

**Aus dem Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Entwicklung von Maßnahmen zur Verringerung der Kreuzkontamination mit ESBL-
bildenden *E. coli* im Rahmen der Zerlegung und Verpackung von Mastgeflügel**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor of Philosophy (PhD)
in Biomedical Sciences
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Christian Thomas
Lebensmitteltechnologe
aus Karl-Marx-Stadt**

Berlin 2021

Journal-Nr.: 4268

**Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. med. vet. Uwe Rösler
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. med. vet. Thomas Alter
Zweiter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. med. vet. Uwe Rösler
Dritter Gutachter:	Prof. Dr. med. vet. Karsten Nöckler

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): poultry, ESBL, contamination, livestock, food hygiene, epidemiology, disease transmission, disease vectors

Tag der Promotion: 13.07.2021

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
Kapitel 1: Literatur	1
1.1 Die Spezies <i>Escherichia coli</i>	1
1.2 Taxonomie, Morphologie und Klassifikation	2
1.3 Physiologie und humanmedizinische Relevanz.....	4
1.4 ESBL/AmpC-bildende <i>E. coli</i>	6
1.5 Epidemiologie ESBL-bildender <i>E. coli</i>	9
1.5.1 Prävalenz in der Umwelt	9
1.5.2 Prävalenz ESBL/AmpC-bildender <i>E. coli</i> in lebensmittelproduzierenden Tieren und Lebensmitteln	11
1.5.3 Prävalenz beim Menschen.....	17
Kapitel 2: Publikation 1	20
2.1 Abstract	20
2.2 Highlights.....	21
2.3 Introduction.....	21
2.4 Materials and Methods.....	22
2.4.1 Strains used.....	22
2.4.1 Preparation of artificial residue substance.....	22
2.4.2 Disinfectants	22
2.4.3 In vitro treatment.....	23
2.4.4 In vivo treatment	23
2.4.5 Statistical analysis.....	24
2.5 Results and Discussion.....	25
2.5.1 Reduction of <i>E. coli</i> and <i>P. aeruginosa</i> in vitro	25
2.5.2 Effectiveness of Sanitation-in-Place for reducing bacterial numbers on surfaces	26
2.6 Conclusion.....	28
2.7 Acknowledgements.....	28
2.8 Conflicts of Interest	28
2.9 References	29
2.10 Tables.....	32
Kapitel 3: Publikation 2	35
3.1 Abstract	35
3.2 Key Words	35

3.3 Introduction.....	36
3.4 Materials and Methods.....	38
3.4.1 Strain Used.....	38
3.4.2 Chicken Meat Weight/Volume Ratio.....	38
3.4.3 Sample Preparation and Packaging.....	38
3.4.4 Sampling.....	39
3.4.5 Microbiological Analysis.....	39
3.4.6 Color Assessment.....	40
3.4.7 pH Measurement.....	40
3.4.8 Statistical Analyses.....	40
3.5 Results.....	41
3.5.1 Microbiological Examination.....	41
3.5.2 pH Assessment.....	42
3.5.3 Surface color measurements.....	43
3.6 Discussion.....	44
3.7 Conclusion.....	47
3.8 Acknowledgments.....	47
3.9 Conflicts of Interest.....	47
3.10 References.....	48
3.11 Tables.....	53
3.12 Figures.....	56
Kapitel 4: Übergreifende Diskussion.....	60
Kapitel 5: Zusammenfassung/Summary.....	66
Kapitel 6: Literaturverzeichnis.....	70
Publikationsverzeichnis.....	86
Danksagung.....	87
Finanzierungsquellen.....	88
Interessenkonflikt.....	88
Eidesstattliche Erklärung.....	89

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beispiele für Tiere weltweit, in denen ESBL-bildende <i>E. coli</i> nachgewiesen werden konnten.....	10
Tabelle 2: Nachweis cefotaxim- und ceftazidimresistenter <i>E. coli</i> aus den Untersuchungen zu Indikator- <i>E. coli</i> in der EU	13
Tabelle 3: Nachweis cefotaxim- und ceftazidimresistenter <i>E. coli</i> aus den Untersuchungen zu Indikator- <i>E. coli</i> in Deutschland.....	14
Tabelle 4: ESBL- und AmpC-bildende <i>E. coli</i> Isolate aus den Untersuchungen der Indikator <i>E. coli</i> in der EU von 2014 bis 2016.....	15
Tabelle 5: ESBL- und AmpC-bildende <i>E. coli</i> Isolate aus den Untersuchungen der Indikator <i>E. coli</i> in Deutschland von 2014 bis 2016	15
Tabelle 6: Häufigkeit ESBL- und AmpC-bildende <i>E. coli</i> Isolate, nachgewiesen im spezifischen Monitoring in der EU von 2015 bis 2016	16
Tabelle 7: Häufigkeit ESBL- und AmpC-bildende <i>E. coli</i> Isolate, nachgewiesen im spezifischen Monitoring in Deutschland von 2015 bis 2016.....	16
Tabelle 8: Farbwerte L*a*b* am Tag der Verpackung und nach siebentägiger Inkubation in Gegenwart der jeweiligen modifizierten Atmosphäre	65

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Verwandtschaft pathogener <i>E. coli</i> nach Sonnenberg (2002).	5
Abbildung 2: Verwendung von Beta-Laktam-Antibiotika in Deutschland und der EU	8
Abbildung 3: Anzahl untersuchter <i>E. coli</i> -Isolate und deren Anteil gegen Cephalosporine dritter Generation resistenter Isolate in der EU	18
Abbildung 4: Anzahl untersuchter <i>E. coli</i> -Isolate und deren Anteil gegen Cephalosporine dritter Generation resistenter Isolate in Deutschland	18
Abbildung 5: Anteil an <i>E. coli</i> -Isolaten, die gegen Cephalosporine resistent sind.....	19

Abkürzungsverzeichnis

AmpC	Ampicillinase C
APEC	Avian Pathogenic <i>E. coli</i>
ATCC	American Type Culture Collection
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTX	Cefotaxime
DAEC	Diffus Adhärente <i>E. coli</i>
DDD	daily defined dose
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
EAEC	Enteroadgretative <i>E. coli</i>
EFSA	European Food Safety Authority
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>E. coli</i>
EPEC	Enteropathogene <i>E. coli</i>
ESBL	extended-spectrum betalactamases
EsRAM	<u>E</u> ntwicklung <u>s</u> tufenübergreifender <u>R</u> eduktionsmaßnahmen für <u>A</u> ntibiotikaresistente Erreger beim <u>M</u> astgeflügel
ETEC	Enterotoxische <i>E. coli</i>
ExPEC	Extraintestinal Pathogenen <i>E. coli</i>
HUS	hämolytisch-urämische Syndrom
InPEC	Intestinal Pathogenic <i>E. coli</i>
MAP	modified atmosphere packaging
MS	Milchsäure
N ₂	Stickstoff
NMEC	Neugeborenen-Meningitis verursachende <i>E. coli</i>
O ₂	Sauerstoff
OXA	Oxacillinase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PES	Peressigsäure
ppm	parts per million
SePEC	zu Septikämie in Verbindung stehende <i>E. coli</i>
SHV	Sulphydryl-variable
TAB	Aerobe Mesophile Keimzahl
TEM	Temoneira beta-lactamase

Abkürzungsverzeichnis

UPEC	Uropathogene <i>E. coli</i>
VTEC	Verotoxinproduzierende <i>E. coli</i>

Kapitel 1: Literatur

1.1 Die Spezies *Escherichia coli*

Theodor Escherich isolierte 1885 *Escherichia (E.) coli*, zunächst *Bacterium coli commune* genannt, aus dem Fäzes eines gesunden Säuglings (Escherich 1989). *E. coli* ist ein stäbchenförmiges, gramnegatives Bakterium, das kommensal im Verdauungstrakt von Säugetieren, Vögeln und anderen Wirbeltieren vorkommt (Ferens und Hovde 2011; Krämer 2011; Weber 2010). Hier bringt *E. coli* dem Wirt verschiedene Vorteile, wie zum Beispiel die Aufrechterhaltung des Mikrobioms und des intestinalen Immunsystems. Des Weiteren unterstützt *E. coli* die Verdauung und Vitaminsynthese (Schierack et al. 2009; Kaper et al. 2004; Gordon und Cowling 2003; Haller et al. 2002; Palaniappan et al. 1992; Bentley und Meganathan 1982). Zusätzlich können kommensale *E. coli* vor Entzündungen des zentralen Nervensystems schützen und als Probiotikum der Kolonisierung pathogener Mikroorganismen, wie zum Beispiel Salmonellen oder *E. coli* O157:H7, im Darms vorbeugen (Sonnenborn 2016; Ochoa-Reparaz et al. 2011; Leatham et al. 2009; Hudault et al. 2001).

Das ubiquitäre Vorkommen von *E. coli* spiegelt die Fähigkeit wider, sich an unterschiedlichen Umgebungen, wie Erde oder Wasser, anpassen zu können (Holden et al. 2014; Ishii et al. 2006; McLellan 2004). *E. coli* ist ein sehr umfangreich untersuchter und bekannter Modelorganismus. Wissenschaftliche Verwendung findet es in der biotechnischen Produktion von Proteinen, im Genetic-Engineering und in der Molekularbiologie (Kamionka 2011). Neben den ungefährlichen kommensalen *E. coli*-Stämmen gibt es auch verschiedene pathogene Vertreter, die eine große Spannbreite von Krankheiten bei Menschen und Tieren verursachen können. Zu diesen zählen unter anderen Enteropathogene *E. coli* (EPEC), Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) und Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC).

1.2 Taxonomie, Morphologie und Klassifikation

Bei *E. coli* handelt es sich um ein ca. 1,3 x 2,0-6,0 µm großes, stäbchenförmiges, heterotrophes, gram-negatives und nicht-sporenbildendes Bakterium, das zur Familie der Enterobacteriaceae und zur Gattung Escherichia gehört. Des Weiteren ist *E. coli* fakultativ anaerob und reagiert auf den Oxidasetest negativ (Schlegel 2007; Madigan und Martinko 2006; Brenner et al. 2005; Chaudhury et al. 1999). *E. coli* kann sowohl unbeweglich als auch bei peritricher Begeißelung beweglich sein (Darnton et al. 2007). Durch seine fakultativ anaeroben Eigenschaften ist *E. coli* dazu in der Lage, Energie aus der Atmungskette oder aber auch aus der gemischten Säuregärung zu gewinnen. Endprodukte der verschiedenen Stoffwechselwege können Laktat, Bernsteinsäure, Ethanol, Acetat und Kohlenstoffdioxid sein (Tortora et al. 2010; Schlegel 2007; Madigan und Martinko 2006). *E. coli* ist zwischen Temperaturen von 7 bis 49 °C vermehrungsfähig mit einem Optimum bei ca. 37 °C (Rudolph et al. 2010; Fotadar et al. 2005; Jones et al. 2004). In der Zellmembran befinden sich verschiedene Transportproteine zum aktiven und passiven Stoffaustausch (Facey und Kuhn 2004).

Zur Differenzierung einzelner *E. coli*-Subtypen kann die Serotypisierung herangezogen werden. Die Serotypisierung von *E. coli*-Stämmen liefert Aufschluss über eine spezifische Kombination aus unterschiedlichen O- und H-Antigenen. Hierbei werden die Antigene der Zellwand (O) und Flagellaren (H) zur Klassifizierung genutzt. In der Vergangenheit wurde zusätzlich auch noch ein Kapsel-(K)-Antigen zur Klassifizierung verwendet. Mittlerweile wird im Wesentlichen jedoch die Serotypisierung über die O- und H-Antigene als Standardserotypisierung verwendet. Bei den O-Antigenen handelt es sich um den äußersten der drei Teile von Lipopolysacchariden, die typisch für gramnegative Mikroorganismen sind. Das O-Antigen weist durch Variationen in der Kombination, Position, Stereochemie und Verbindungen in den Zuckerresten eine relativ hohe Diversität der Struktur auf. O-Antigene bilden einen passiven Schutz gegen immunologische Effektoren und werden auch für die bakteriologische Routinediagnostik genutzt. Über 180 O-Gruppen, durchnummeriert von O1 bis > O180, können mit Agglutinationreaktionen des O-Antigens mit Antiseren differenziert werden (DebRoy et al. 2016; Hahn et al. 2001; Guentzel 1996). Für die Spezifizierung der Flagellen über die H-Gruppen wurden mit H1 bis > H55 ebenso fortlaufende Zahlen eingeführt. Hinzu kommt die Möglichkeit zur Bezeichnung als H-Antigen negativ für unbewegliche Vertreter. Die Differenzierung erfolgt ebenfalls serologisch über eine Agglutinationsreaktion mit monovalenten Antiseren oder einem PCR-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus, bei dem das *fliC*-Gen, auf welchem die Flagellen kodiert sind, amplifiziert wird (Prager et al. 2003; Guentzel 1996). Die Serotypisierung wird angewendet, um Stämme mit humanmedizinischer Relevanz zu

identifizieren. Diese Methode ist allerdings relativ aufwendig und durch Kreuzreaktionen bei den adsorbierten O-Antigen-Antiseren aus Kaninchen kann es oft zu Fehlern kommen. Des Weiteren können einige Stämme zum Beispiel aufgrund von Autoagglutination nicht identifiziert werden. Hier bietet die Ganz-Genom-Sequenzierung eine neue zuverlässigere Methode (Prager et al. 2003).

1.3 Physiologie und humanmedizinische Relevanz

E. coli ist sowohl Teil des normalen Mikrobioms im menschlichen Verdauungstrakt als auch häufige Ursache bakterieller Infektionen. *E. coli* ist die häufigste Ursache für Infektionen des Blutkreislaufes und des Harntraktes. Des Weiteren wird *E. coli* mit intra-abdominale Infektionen in Verbindung gebracht, verursacht neonatale Meningitis und ist eine der häufigsten Auslöser lebensmittelbedingter Infektionen weltweit (European Centre for Disease Prevention and Control 2017; WHO 2014). Im Wesentlichen können pathogene *E. coli* daher in zwei große Gruppen eingeteilt werden: die Intestinal Pathogenic *E. coli* (InPEC), die den Gastrointestinaltrakt infizieren können, und die Extraintestinal Pathogenen *E. coli* (ExPEC). Die Kombinationen spezifischer Virulenzfaktoren, die phänotypische Darstellung in *in vitro*-Infektionsmodellen und das klinische Erscheinungsbild im Zusammenhang mit Infektionen werden genutzt, um *E. coli* in bestimmte Pathotypen zu gliedern (Kaper et al. 2004).

Vertreter der ExPEC sind:

Uropathogene *E. coli* (UPEC), die Infektionen des Harntraktes von Tier und Mensch verursachen können, Neugeborenen-Meningitis verursachende *E. coli* (NMEC), zu Septikämie in Verbindung stehende *E. coli* (SePEC) und Avian Pathogenic *E. coli* (APEC), die Colibacillose auslösen können (Moulin-Schouleur et al. 2007).

Vertreter der InPEC sind:

EHEC sind häufig die Ursache für lebensmittel- und wasserassoziierte Infektionen in Entwicklungsländern. Wichtigste Vertreter sind die des Serotypen O157:H7. Hierbei handelt es sich um Verotoxinproduzierende *E. coli* (VTEC), welche das Darmepithel beschädigen. Daraus können sich schwere Krankheitsbilder wie hämorrhagische Kolitis oder das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) entwickeln (Hartland und Leong 2013). Trotz der nahen Verwandtschaft zu EHEC sind EPEC keine Toxin-Bildner. Diese Vertreter der pathogenen *E. coli* lösen häufig akute und länger andauernde Diarrhö bei Kindern in Entwicklungsländern aus (Sherman et al. 2005; Nataro und Kaper 1998). Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) sind nicht-toxin-produzierend, aber hoch invasiv. Ihr Pathogenitätsmechanismus führt zu Schädigungen der Darmwand durch die Zerstörung derer Zellen (Lan et al. 2004). Enterotoxische *E. coli* (ETEC) werden häufig mit der Reisediarrhö in Verbindung gebracht. Sie produzieren sowohl hitzelabile als auch -stabile Toxine (Bourgeois et al. 2016). Per Definition produzieren EAEC weder die hitzelabilen noch die hitzestabilen Toxine der ETEC, zeigen aber eine aggregative Adhärenz an HEp-2-Zellen, wobei sie ein typisches Mauersteinmuster („stacked brick“) bilden. Dieser Pathotyp steht in Verbindung mit persistenter Diarrhö bei Kindern (Boisen et al. 2013; Nataro et al. 1998). Diffus Adhärente *E. coli* (DAEC) bilden keine klaren Adhärenzmuster an HEp-2-Zellen. Ihre

Rolle in der Auslösung von Diarrhö ist noch nicht abschließend geklärt (Kaper et al. 2004). Die verwandtschaftlichen Beziehungen dieser Vertreter sind in Abbildung 1 dargestellt.

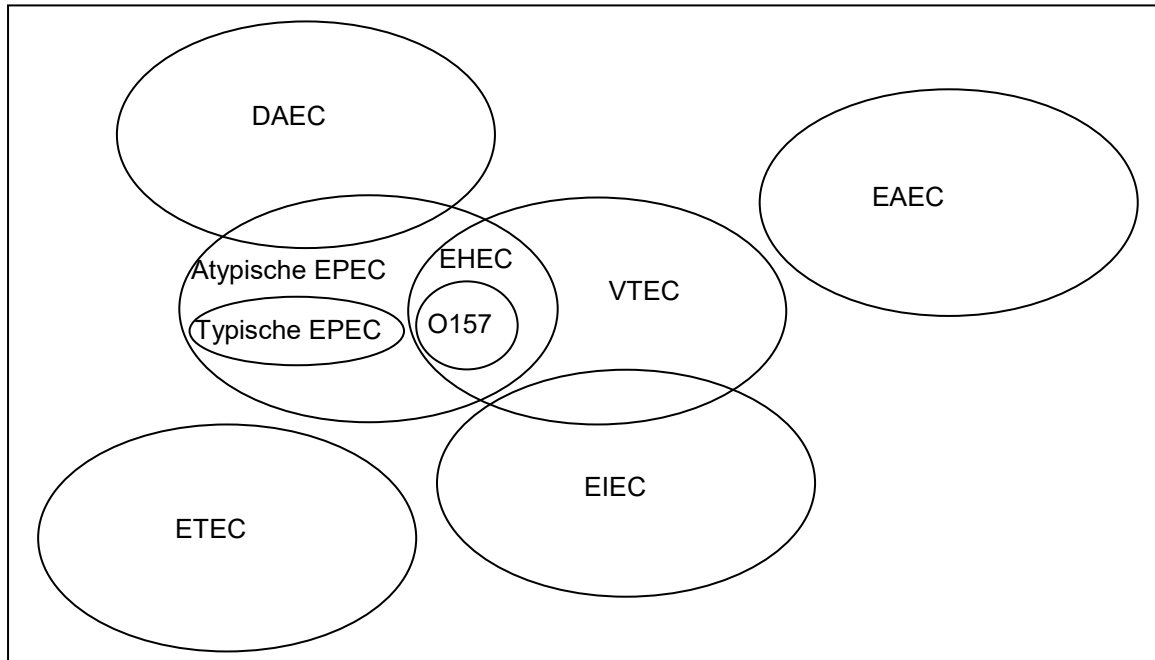


Abbildung 1: Darstellung der Verwandtschaft pathogener *E. coli* nach Donnenberg (2002)

1.4 ESBL/AmpC-bildende *E. coli*

ESBL/AmpC-bildende Bakterien sind dazu in der Lage, Enzyme zu produzieren, die die Wirkung von Antibiotika wie Penicillin und Cephalosporin reduzieren oder sogar komplett inhibieren können. Dadurch reagieren die entsprechenden Bakterien nicht mehr sensitiv auf diese Antibiotika. Während ESBL-bildenden (**e**xtended-**s**pectrum **b**etalactamases) Bakterien resistent gegen Cephalosporine der 4. Generation sind, sind AmpC Beta-Laktamase - bildende (**A**mpicillinase **C**) Bakterien resistent gegen Cephalosporine der 2. und 3. Generation. Diese Resistenzen sind auf unterschiedlichen Genen kodiert, auch auf Plasmiden. Diese mobilen Elemente können zwischen unterschiedlichen Spezies aber auch Gattungen ausgetauscht werden. Somit können auch die Antibiotikaresistenzen weitergegeben werden (BfR 2015; Vaidya 2011; Cullik et al. 2010; Canton et al. 2008). In fast allen Gram-negativen Bakterienpezies können ESBL/AmpC -bildende Vertreter vorkommen, sowohl in nicht-pathogenen kommensalen *E. coli* des Verdauungstraktes als auch in pathogenen Bakterien wie z. B. Salmonellen. Die Ausbreitung ESBL/AmpC -bildender Bakterien im Allgemeinen wird durch die Verwendung von Antibiotika begünstigt (BfR 2015, 2011).

Beta-Laktam-Antibiotika bilden kovalente Bindungen mit bakteriellen Penicillin-Bindungsproteinen und stören die Funktion der Zellwand von Bakterien durch die Unterbrechung der Peptidoglycansynthese und einer daraus resultierenden Störung des Mureinschichtaufbaus. Dies wirkt bakterizid während der Vermehrung (Rolle und Mayr 2007; Frei und Löscher 2002). Die Wirksamkeit der einzelnen Beta-Laktamgruppen hängt von der Stärke der Bindung an die Penicillin-Bindungsproteine, der Abbaurate durch Beta-Laktamasen und der Fähigkeit, die äußeren Membranen der Bakterien zu durchdringen, ab (Simon und Stille 1993).

Die Hauptursache für mikrobielle Resistenz gegen Beta-Laktame liegt in der Fähigkeit, Beta-Laktamase zu produzieren (Livermore 1995). Dieses Enzym hydrolisiert den Beta-Laktam-Ring von Beta-Laktam-haltigen Wirkstoffen, der für die Hemmung von Penicillin-Bindungsproteinen entscheidend ist (Abraham und Chain 1988). Die Resistenz gegen Breitbandpenicilline, wie Ampicillin und Amoxicillin, wird hauptsächlich durch plasmidcodierte Beta-Laktamasen des TEM-Typs (Temoneira beta-lactamase) und seltener durch die des SHV-Typs (Sulphydryl-variable beta-lactamase) induziert. Resistenzen gegen Cephalosporine der 3. Generation, wie Cefotaxim und Ceftazidim, werden hingegen hauptsächlich durch ESBL ausgelöst. Der am häufigsten festgestellt Resistenzmechanismus in Amoxicillin-Clavulansäure-resistenten *E. coli* sind die OXA-1 (Oxacillinase) Produktion, eine Überproduktion von Penicillinasen, die Produktion plasmidaler AmpC, eine Überproduktion chromosomaler AmpC und die Produktion Inhibitor-resistenter TEM. Die ersten ESBL, die sich in *E. coli* verbreiteten, waren Varianten von TEM oder SHV-Enzymen,

in welchen einzelne oder mehrere Aminosäuresubstitutionen die Hydrolyse von Cephalosporinen der 3. und 4. Generation der neuen MRSA Cephalosporine und Monobactamen ermöglichten. Diese Enzyme wurden in den letzten Jahren weitestgehend durch CTX-M-Typen der ESBL abgelöst, welche einen der wichtigsten Faktoren für die weltweite Dominanz darstellen. Die meisten ESBL können durch Beta-Laktamase-Inhibitoren wie Clavulansäure, Sulbactam Tazobactam oder Avibactam inhibiert werden. Die WHO verzeichnet in einem 2014 veröffentlichten Bericht eine Weltweit hohe Resistenzrate gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation (European Centre for Disease Prevention and Control 2017; WHO 2014).

In Europa sind die AmpC *E. coli* weniger verbreitet als die ESBL *E. coli* deren Nachweishäufigkeit EU- und auch deutschlandweit in den vergangenen Jahren zunahm. Häufiger verbreitet sind die AmpC in den USA (European Centre for Disease Prevention and Control 2017).

Abbildung 2 zeigt die verwendeten Mengen von Beta-Laktam-Antibiotika (in DDD, daily defined dose: definierte Tagesdosis) in der EU und in Deutschland. Es ist zu erkennen, dass es erst seit 2018 zu einer deutlichen Verringerung der Verwendungsmengen kam. Beta-Laktame sind nur einige der heute erhältlichen Antibiotika, die Verwendung in der Humanmedizin finden (European Centre for Disease Prevention and Control 2018c).

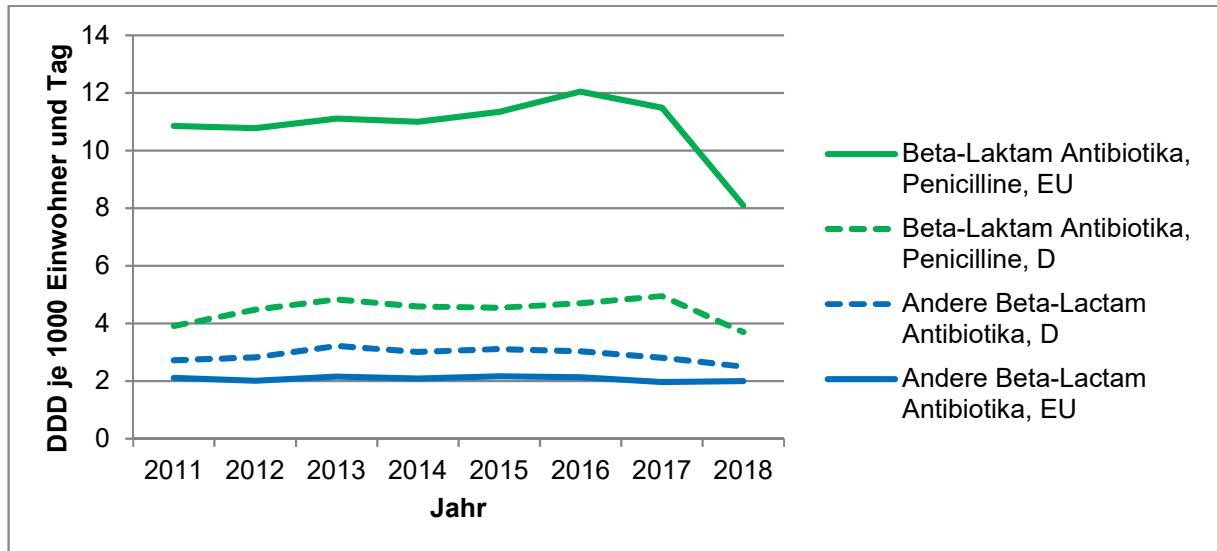


Abbildung 2: Verwendung von Beta-Laktam-Antibiotika in Deutschland und der EU

von 2011 bis 2018; DDD daily defined dose: definierte Tagesdosis (European Centre for Disease Prevention and Control 2019a, 2018a, 2018b)

1.5 Epidemiologie ESBL-bildender *E. coli*

1.5.1 Prävalenz in der Umwelt

Bei Untersuchungen in Schweden konnten aus 17 % der 170 getesteten Möwenkotproben ESBL-bildende *E. coli* isoliert werden. Es zeigte sich eine ähnliche Genetik der Isolate zu denen, die in zwei weiteren Studien aus Humanisolaten erhoben wurden. Die Autoren schlussfolgerten aus ihren Ergebnissen, dass die Verbreitung von ESBL-bildenden *E. coli* eine Art von Umweltverschmutzung sei, die über die Vögel weiterverbreitet werden könne (Atterby et al. 2017). Auch in Spanien konnten in 14 % der untersuchten Vögel unterschiedlicher Spezies ESBL-bildende *E. coli* nachgewiesen werden (Alcala et al. 2016). Einen entscheidenden Beitrag zur Verbreitung neuer Resistenzen können unter Umständen Zugvögel leisten (Mohsin et al. 2017; Baez et al. 2015; Guenther et al. 2012). Verschiedene Tierarten wurden weltweit als Träger und potentielle Verbreiter ESBL-bildender *E. coli* identifiziert (Wang et al. 2017). Eine Auswahl davon ist in Tabelle 1 dargestellt.

Auch Oberflächen- und Brunnenwasser oder gesammeltes Regenwasser kann mit ESBL-bildenden *E. coli*, zum Teil auch pathogenen Vertretern, wie zum Beispiel Enteroaggregative und Enterotoxische *E. coli* (EAEC und ETEC), kontaminiert sein. Wird dieses zur Bewässerung von Obst und Gemüse eingesetzt, kann es zu einer Kontamination dieser Produkte kommen (Gekenidis et al. 2018; Franz et al. 2015). Im Boden kann *E. coli* über Monate hinweg verweilen und auch über diesen Weg Lebensmittel kontaminieren (Ishii et al. 2006). Eine großräumige Verbreitung in der Umwelt kann neben den infizierten Zugvögeln auch durch kontaminiertes Fluss- und Meerwasser ermöglicht werden (Leonard et al. 2018; Chen et al. 2016; Rashid et al. 2015; Alves et al. 2014).

Bei Untersuchungen in den Niederlanden und in Spanien konnten ESBL-bildenden *E. coli* auf Fliegen, die in der Nähe von Masthähnchen- und Legehennenbetrieben gefangen wurden, nachgewiesen werden (Sola-Gines et al. 2015; Blaak et al. 2014). In einer umfangreichen Studie wurden zwischen 2011 bis 2012 in der Umgebung von 8 Legehennen- (n = 5) und Masthähnchenbetrieben (n = 3) 330 Proben auf ESBL-bildende *E. coli* hin untersucht und ausgewertet. Untersucht wurden hierbei Oberflächen- und Schmutzwasser, Erde, Staub, Stallluft, Fliegen und der Fäzes anderer auf dem Betriebsgelände gehaltener Tiere. Hierbei konnten 183 Isolate gewonnen werden. Lediglich in der Stallluft und den Ablaufrinnen in den Legebetrieben konnten keine ESBL-bildende *E. coli* nachgewiesen werden (Blaak et al. 2015). Durch die bereits genannten Vektoren können sich die Mikroorganismen in der Umwelt ausbreiten und in andere Tierbeständen oder zum Menschen gelangen.

Tabelle 1: Beispiele für Tiere weltweit, in denen ESBL-bildende *E. coli* nachgewiesen werden konnten

Tierart	Land	Quelle
Wildschwein	Algerien	(Bachiri et al. 2017)
Wildschwein	Portugal	(Poeta et al. 2009)
Präriemöwe	Chile	(Baez et al. 2015)
Präriemöwe	Kanada	(Bonnedahl et al. 2015)
Saatkrähe	Tschechien, Deutschland, Polen, Serbien, Spanien	(Jamborova et al. 2015)
Wildfisch	Mittelmeer	(Brahmi et al. 2015)
Wildvögel	Niederlande	(Veldman et al. 2013)
Rotfuchs	Portugal	(Radhouani et al. 2013)
Wilde Nagetiere	China	(Ho et al. 2015)

1.5.2 Prävalenz ESBL/AmpC-bildender *E. coli* in lebensmittelproduzierenden Tieren und Lebensmitteln

Im Rahmen von Untersuchungen zur Antibiotikaresistenz in Zoonoseerregern und Indikatorkeimen wurden unter anderem *E. coli*-Stämme, die zunächst aus Hygieneanalysen in verschiedenen Ländern der EU isoliert wurden, auf eine eventuelle Antibiotikaresistenz hin untersucht. Diese Untersuchungen sind in Berichten der EFSA zusammengefasst, die seit 2009 angefertigt werden (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control 2011). Tabelle 2 und Tabelle 3 zeigen die Häufigkeit an cefotaxim- und ceftazidimresistenten *E. coli*, die aus *E. coli* Isolaten in der EU und Deutschland zwischen 2009 und 2014 identifiziert werden konnten. Diese *E. coli*-Isolate wurden im Rahmen von Hygieneindikatoruntersuchungen gewonnen und stichprobenartig auf die Anwesenheit dieser Antibiotikaresistenzen gegen Cephalosporine der 3. Generation hin untersucht.

Aufgrund der zunehmenden Bedeutung der Resistenz gegen Cephalosporine der dritten und vierten Generation für die öffentliche Gesundheit, wurde in der EU eine Rechtsvorschrift zur harmonisierten Überwachung der Resistenz gegen antimikrobielle Mittel bei lebensmittelproduzierenden Tieren und in Lebensmitteln festgelegt. Diese verpflichtet seit 2014 alle EU-Mitglieder zur Überwachung der Resistenz gegen relevante Substanzen dieser antimikrobiellen Klassen bei Salmonellen und als Indikator isolierten *E. coli* (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control 2016). Die in diesem Zusammenhang festgestellten prozentualen Anteile ESBL und AmpC-bildender *E. coli* sind in Tabelle 4 (EU) und Tabelle 5 (Deutschland) zusammengefasst. Des Weiteren wurden ab 2015 in einer Vielzahl von EU-Staaten Proben von lebensmittelproduzierenden Tieren direkt auf die Anwesenheit von ESBL und AmpC-bildenden *E. coli* hin untersucht (Tabelle 6). Es zeigte sich, dass EU-weit 5 bzw. 7 % der Schweinefleisch- bzw. Rindfleischproben mit ESBL-bildenden *E. coli* kontaminiert waren. Bei Mastschweinen und Kälbern lagen die Prävalenzen bei ca. 32 bzw. 37 %. Die Menge AmpC-positiver Befunde war bei diesen Untersuchungen deutlich geringer. Jeweils vergleichbare Werte konnten auch in Deutschland erfasst werden (Tabelle 7) (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control 2018, 2017).

Im Rahmen des Zoonosen-Monitorings des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) von 2016 wurden in Deutschland insgesamt 3305 Proben auf das Vorkommen von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* hin untersucht. Hierbei konnten in 6,4 % der untersuchten Kotproben von Wildschweinen ESBL/AmpC-bildende *E. coli* nachgewiesen werden. In 50,2 % der untersuchten Kotproben aus konventionellen Masthähnchenbetrieben und 52,6 % der Proben von Blinddarminhalt von Masthähnchen am Schlachthof wurden

ebenfalls ESBL/AmpC-bildende *E. coli* nachgewiesen. In den Kotproben, die von nach ökologischen Richtlinien arbeitenden Erzeugerbetrieben genommen wurden, konnten bei 25,7 % ESBL/AmpC-bildende *E. coli* nachgewiesen werden. Ein Anteil von 49,8 % des untersuchten frischen Hähnchenfleisches ohne Haut und 38,8 % des frischen Putenfleisches ohne Haut war ebenso mit ESBL/AmpC-bildende *E. coli* belastet. Von den Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs wurden Tomaten und Sprossen untersucht. Während auf Tomaten keine ESBL/AmpC-bildende *E. coli* nachgewiesen werden konnten, waren 2,2 % der untersuchten Sprossen hiermit kontaminiert (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) 2017). Untersuchungen in den Niederlanden, bei denen von 2008 bis 2009 Isolate von ESBL-bildenden *E. coli*, die von Hähnchenfleisch und aus menschlichem Faeces gewonnen wurden, verglichen wurden, zeigten klare genetische Ähnlichkeiten zwischen den Gruppen. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass Hähnchenfleisch mit hoher Wahrscheinlichkeit für die Ausbreitung ESBL-bildender *E. coli* im Menschen mitverantwortlich sein könnte (Kluytmans et al. 2013).

Tabelle 2: Nachweis cefotaxim- und ceftazidimresistenter *E. coli* aus den Untersuchungen zu Indikator-*E. coli* in der EU

Tierart	Jahr	MS	Resistenz gegen			
			Cefotaxim		Ceftazidim	
			N	p	N	p
Haushühner	2009	7	1.869	9	900	7
	2010	6	2.156	5	1.686	7
	2011	10	2.814	6,4	1.772	5,4
	2012	8	1.751	10,2	1.276	11,1
	2013	4 (nur Broilerfleisch)	656	9,1	440	8,2
		10	2.606	6,3	1.342	7,2
Schweine	2009	7	1.242	2	433	1
	2010	6	1.059	1	480	2
	2011	10	2.337	1,7	1.694	1,5
	2012	7	1.239	1,4	1.019	1,6
	2013	10	1.954	1,3	1.035	0,9
Rinder	2009	9	1.877	0,7	617	2
	2010	5	1.039	3	752	4
	2011	7	2.075	0,9	1.622	0,6
	2012	7	2.294	2,4	1.901	2,6
	2013	8	2.527	1,2	1.609	1,2

MS: Anzahl teilnehmender Mitgliedstaaten, N: Anzahl untersuchter *E. coli*-Isolate; p: prozentualer Anteil von Isolaten mit jeweiliger Resistenz (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control 2016, 2015, 2014, 2013, 2012, 2011)

Tabelle 3: Nachweis cefotaxim- und ceftazidimresistenter *E. coli* aus den Untersuchungen zu Indikator-*E. coli* in Deutschland

Tierart	Jahr	Resistenz gegen				Anmerkung
		Cefotaxime		Cefotaxime		
		N	p	N	p	
Haushühner	2009	514	3	514	3	
	2010	200	14	200	14	Broiler
		1.001	3	1.001	3	Legehennen
	2011	246	7,7	246	7,3	Broiler
		642	1,6	642	1,7	Legehennen
	2013	440	8,6	440	8,2	Broiler
		599	5	599	5	Alle
	2014	227	1,3	227	1,3	Broiler
Schweine	2009	46	2	46	2	
	2011	859	1,9	859	1,5	
Rinder	2009	361	1	361	3	
	2010	272	10	272	8	Nur Mastkälber
	2011	909	0,4	909	0,6	
	2012	515	2,5	515	1,7	
	2013	526	0,8	526	0,6	

N: Anzahl untersuchter *E. coli*-Isolate; p: prozentualer Anteil von Isolaten mit jeweiliger Resistenz (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control 2016, 2015, 2014, 2013, 2012, 2011)

Tabelle 4: ESBL- und AmpC-bildende *E. coli* Isolate aus den Untersuchungen der Indikator *E. coli* in der EU von 2014 bis 2016

Jahr	MS	N	% dieser Isolate bilden			Anmerkung
			ESBL	AmpC	AmpC + ESBL	
2014	21	4.179	3,6	1,7	0,5	Broilerherden
	9	1.457	2,1	0,4	-	Puten
2015	16	2.956	1,5	0,4	0,03	Schweine
	6	1.113	2,2	0,2	0,1	Kälber
2016	23	4.350	2,5	2,0	2,0	Broilerherden
	9	1.599	2,8	0,1	0,1	Puten

MS: Anzahl teilnehmender Mitgliedstaaten; N: Anzahl getesteter *E. coli* Isolate; (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control 2018, 2017, 2016)

Tabelle 5: ESBL- und AmpC-bildende *E. coli* Isolate aus den Untersuchungen der Indikator *E. coli* in Deutschland von 2014 bis 2016

Jahr	N	% dieser Isolate bilden			Anmerkung
		ESBL	AmpC	AmpC + ESBL	
2014	227	1,3	-	-	Broilerherden
	170	2,4	-	-	Puten
2015	212	2,4	0,9	-	Schweine
	191	1,6	0,5	-	Kälber
2016	177	1,1	0,6	0,6	Broilerherden
	188	1,6	-	-	Puten

N: Anzahl getesteter *E. coli* Isolate; (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control 2018, 2017, 2016)

Tabelle 6: Häufigkeit ESBL- und AmpC-bildende *E. coli* Isolate, nachgewiesen im spezifischen Monitoring in der EU von 2015 bis 2016

Jahr	MS	N	%			Anmerkungen
			ESBL	AmpC	AmpC + ESBL	
2015	22	5.350	7,0	2,3	0,4	Schweinefleisch
	23	5.329	5,0	1,8	0,3	Rindfleisch
	27	6.167	31,9	9,7	1,5	Mastschweine
	9	2.343	36,8	4,8	2,0	Kälber
2016	27	6.241	35,9	26,8	2,0	Broilerfleisch
	27	9.273	35,4	24,4	2,6	Broiler
	11	2.727	36,6	7,2	1,7	Mastpute

MS: Anzahl teilnehmender Mitgliedstaaten; N: Anzahl getesteter Proben; %: Prozentualer Anteil Proben bei denen ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* nachgewiesen werden konnten (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control 2018, 2017)

Tabelle 7: Häufigkeit ESBL- und AmpC-bildende *E. coli* Isolate, nachgewiesen im spezifischen Monitoring in Deutschland von 2015 bis 2016

Jahr	N	%			Anmerkung
		ESBL	AmpC	AmpC + ESBL	
2015	454	5,5	0,5	0,5	Schweinefleisch
	452	3,7	0,5	0,3	Rindfleisch
	352	39,5	8,7	1,8	Mastschweine
	363	57,5	5,5	2,3	Kälber
2016	360	42,8	18,9	5,0	Broilerfleisch
	344	35,8	19,5	2,9	Broiler
	323	34,6	4,5	2,6	Mastpute

N: Anzahl getesteter Proben; %: Prozentualer Anteil Proben bei denen ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* nachgewiesen werden konnten (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control 2018, 2017)

1.5.3 Prävalenz beim Menschen

Die vom europäischen Zentrum für Krankheitsprävention und -kontrolle (European Centre for Disease Prevention and Control - ECDC) erhobene Daten zeigen, dass es bei den untersuchten *E. coli*-Isolaten seit 2009 zu einem kontinuierlichen Anstieg im Nachweis gegen Cephalosporine der dritten Generation resistenter *E. coli*-Isolate in der EU und in Deutschland kam (Abbildung 3 und Abbildung 4). Die für die Untersuchungen auf Resistenz herangezogenen invasiven Stämme wurden bei Infektionen des Blutes und der Gehirn-Rückenmark-Flüssigkeit isoliert und sind somit von klinischer Relevanz (European Centre for Disease Prevention and Control 2019b, 2018c, 2017, 2014, 2010).

Die Nachweisrate an Cephalosporin-resistenten *E. coli* in Patienten und Patientinnen in ambulanter und stationärer Versorgung ist nach Angaben des Robert Koch-Institutes in den vergangenen Jahren in Deutschland fast kontinuierlich gestiegen. Lagen die Nachweisraten von Cephalosporin-Resistenzen in den untersuchten *E. coli*-Isolaten 2008 noch zwischen 2,7 und 3,9 % bei den ambulant versorgten Patienten und Patientinnen und zwischen 6,3 und 8,9 % bei den stationär versorgten, stieg die Nachweisrate bis 2018 auf 6,4 bis 12,4 % bei den ambulant und auf 8,9 bis 17,2 % bei den stationär versorgten Patienten und Patientinnen (s. Abbildung 5) (RKI 2019a, 2019b, 2019c, 2019d, 2019e, 2019f, 2019g, 2019h).

Im Rahmen einer Studie, die in den Jahren 2009 bis 2012 in Bayern durchgeführt wurde, wurden bei etwa 6,3 % der Normalbevölkerung ESBL-bildende *E. coli* nachgewiesen (Valenza et al. 2014).

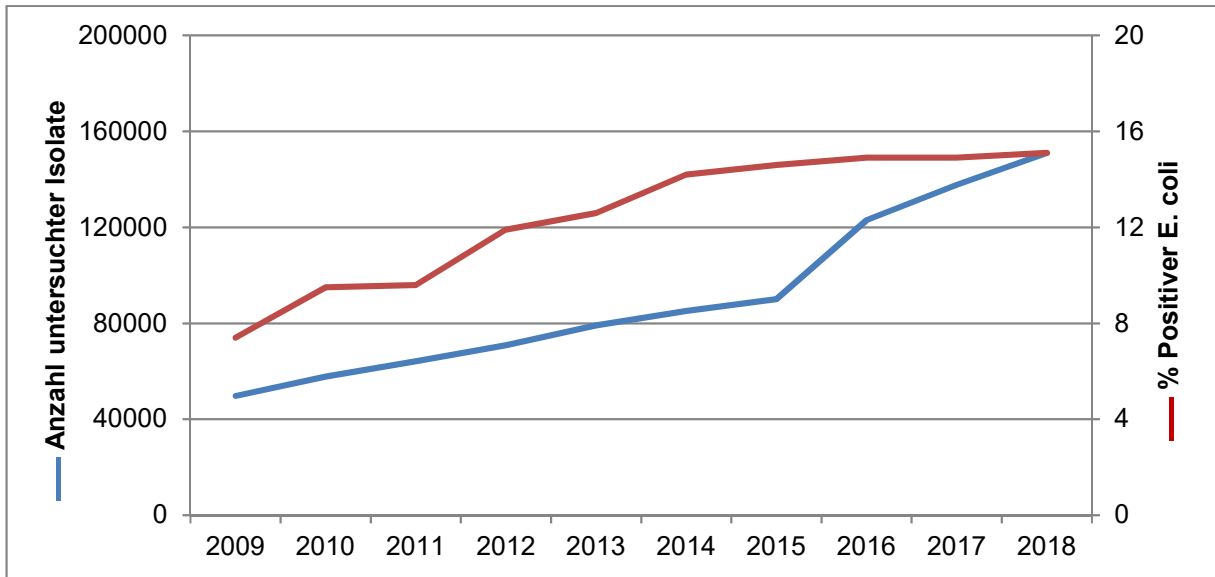


Abbildung 3: Anzahl untersuchter *E. coli*-Isolate und deren Anteil gegen Cephalosporine dritter Generation resistenter Isolate in der EU

von 2009 bis 2018 (European Centre for Disease Prevention and Control 2019b, 2018c, 2017, 2014, 2010)

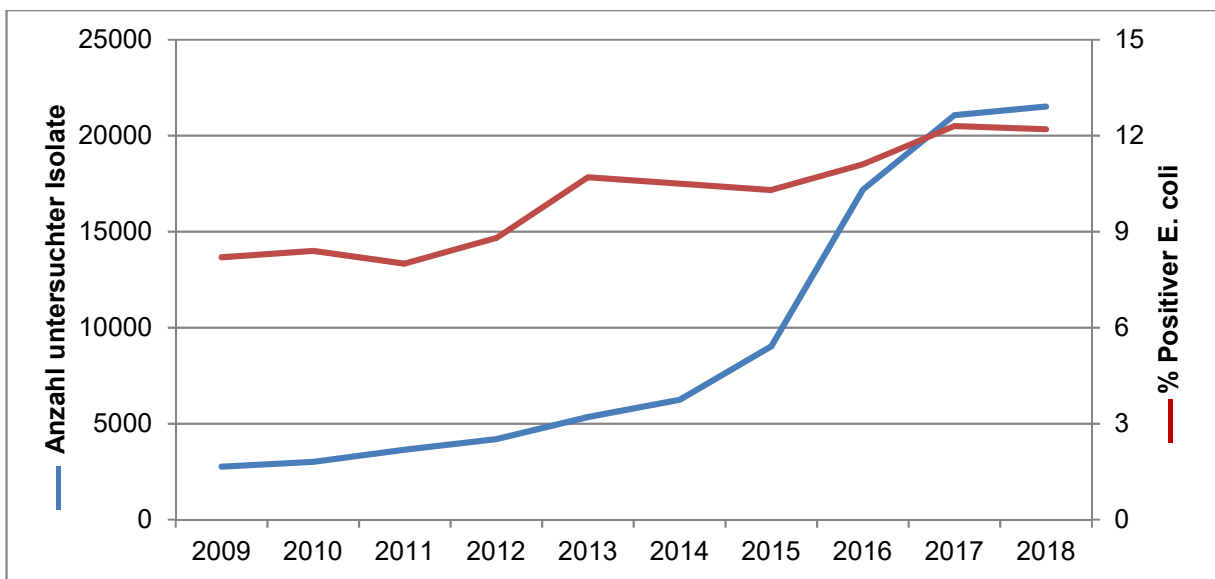


Abbildung 4: Anzahl untersuchter *E. coli*-Isolate und deren Anteil gegen Cephalosporine dritter Generation resistenter Isolate in Deutschland

von 2009 bis 2018 (European Centre for Disease Prevention and Control 2019b, 2018c, 2017, 2014, 2010)

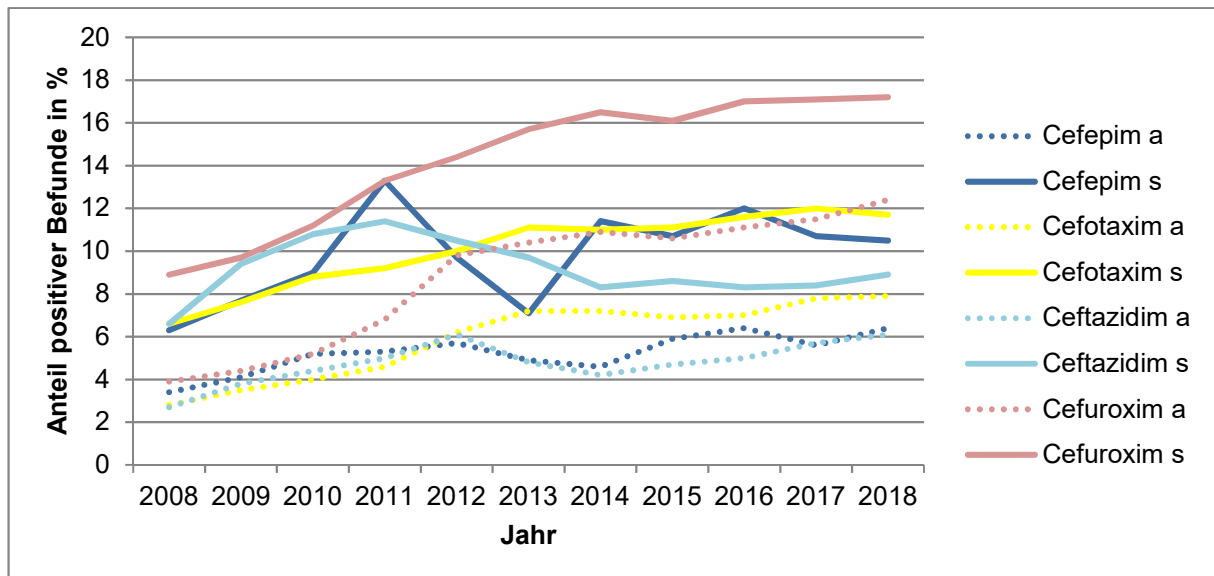


Abbildung 5: Anteil an *E. coli*-Isolaten, die gegen Cephalosporine resistent sind

Isolate erhalten aus Patienten in ambulanter (a) und stationärer (s) Versorgung von 2008 bis 2018 in Deutschland (RKI 2019a, 2019b, 2019c, 2019d, 2019e, 2019f, 2019g, 2019h)

Kapitel 2: Publikation 1

Effect of Peracetic Acid Solutions and Lactic Acid on Microorganisms in On-Line Reprocessing Systems for Chicken Slaughter Plants

Christian Thomas, Antje Schönknecht, Christoph Püning, Thomas Alter, Annett Martin, Niels Bandick

Journal of Food Protection, Vol. 83, No. 4, 2020, Pages 615–620

<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-350>

Eingereicht: 29.07.2019

Akzeptiert: 04.11.2019

Erschienen: 16.03.2020

You have to read this part online.

Kapitel 3: Publikation 2

Effects of modified atmosphere packaging on an extended-spectrum beta-lactamase–producing *Escherichia coli*, the microflora, and shelf life of chicken meat

Christian Thomas, Annett Martin, Jana Sachsenröder, Niels Bandick

Poultry Science Volume 99, Issue 12, December 2020, Pages 7004-7014

<https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.09.021>

Eingereicht: 06.02.2020

Akzeptiert: 04.09.2020

Online erschienen: 18.09.2020

3.1 Abstract

The effects of modified atmosphere packaging (MAP) on an ESBL-producing *E. coli* strain and product quality characteristics of skinless chicken meat were determined. The samples were packed separately in air, 100 % N₂ and in prefabricated gas mixtures with 75 % O₂ + 25 % CO₂ and 70 % CO₂ + 15 % O₂ + 15 % N₂ and incubated at 3 °C for 7 days. To investigate the influence of the headspace ratio, samples were packed in identical trays to 600 g and 120 g, respectively. After 0, 2, 5 and 7 days of incubation the samples were analyzed microbiologically, photometrically and pH was measured. The results show that the development of the microorganisms depends on the atmosphere, with the 70 % CO₂ + 15 % O₂ + 15 % N₂ atmosphere having the highest development inhibiting effect. This effect is increased with increased headspace. No significant effects on the pH and color of the samples were observed.

3.2 Key Words

ESBL-producing *E. coli*

chicken meat

shelf-life

modified atmosphere packaging

3.3 Introduction

In 2017, more than 11.2 billion tons of chicken meat (carcass weight) were consumed in the EU (Statista 2018). The typical microflora on chicken carcasses consists of shelf life decreasing microorganisms, pathogenic or facultative pathogen microorganisms such as *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Arcobacter* spp., *Helicobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli* (*E. coli*) and other bacteria (Mead 2004, Nieminen et al. 2012, Bhisare et al. 2014, Rouger et al. 2017). In particular, *Salmonella* spp. and *E. coli* are able to carry antibiotic resistance genes like the extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) gene (EFSA Panels on Biological Hazards (BIOHAZ) 2012). As a result, these microorganisms can deactivate beta-lactam antibiotics such as cephalosporin, penicillin and monobactam, which are commonly used in human medicine (Bush et al. 1995, Sturenburg and Mack 2003, Paterson and Bonomo 2005, Dhanji et al. 2010). This antibiotic resistance is mainly encoded on plasmids, which facilitates horizontal interspecies gene-transfer to other microorganisms to confer antibiotic resistance (Pfeifer et al. 2010).

Zarfel et al. (2014) observed ESBL-producing *E. coli* with a prevalence of 42 % in Austrian chicken meat (Zarfel et al. 2014). In Germany, out of 418 retail chicken meat samples 137 (33 %) were contaminated with ESBL-producing *E. coli* in 2016 (BVL 2017). A Dutch study compared the prevalence of ESBL-producing bacteria in organic and conventional retail chicken meat. These results showed a higher prevalence in conventionally (100 %) than in organically (84 %) produced chicken meat samples (Stuart et al. 2012).

Different non-thermal methods are known to reduce the development or number of microorganisms on food, for example active packaging and the use of non-thermal plasma (Conrads and Schmidt 2000, Panea et al. 2014, Dohlen et al. 2016, Lee et al. 2017, Yildirim et al. 2017, Souza et al. 2018, Moutiq et al. 2020).

Furthermore, modified atmosphere packaging (MAP) has become a routinely used non-thermal technology for food preservation, due to its potential for increasing the shelf-life of many kinds of food products as compared to air packaging (Daniels et al. 1985, Farber 1991, Lambert et al. 1991). Typically oxygen (O₂), nitrogen (N₂) and carbon dioxide (CO₂) gases are used in MAP (Air Products 2015, Dansensor 2018).

Oxygen is responsible for several undesirable reactions in food, including oxidation of fats and oils. Color changes and spoilage due to aerobic microbial development are also induced by oxygen. Oxygen generally promotes the development of aerobic microbes, but inhibits the development of anaerobic microorganisms (He and Hosney 1990, Jayasingh et al. 2002, Seydim et al. 2006). Due to the negative effects of oxygen on the preservation of food quality, it is generally avoided in the MAP of many products (Paul and Pandey 2014). But in

the case of meat, especially red meat, a high oxygen concentration is used to preserve the red color (Jayasingh et al. 2002, Dansensor 2018).

Nitrogen is an inert and tasteless gas, without any antimicrobial activity in food products, similar to the noble gas argon (Herbert et al. 2013). It is not very soluble in water, and is primarily used to displace oxygen and prevent package collapse (Floros and Matsos 2005).

Carbon dioxide is soluble in water and lipids and, with decreasing temperatures, its solubility increases. This characteristic can result in package collapse (Gill and Penney 1988). CO₂ slows down the respiration of many products and reduces the growth of different microorganisms on poultry meat by inhibiting their metabolism and, therefore, cell division (Lee et al. 1991). When dissolved in the cellular fluids, CO₂ freely permeates the bacterial membrane. Once inside the cells, it can form bicarbonate ions (HCO₃⁻) and liberate protons. To maintain the internal pH, protons are actively transported out of the cells, resulting in the dissipation of energy (Dixon and Kell 1989, Ma et al. 2017). Because of complex effects of carbon dioxide on bacterial development, different inhibitory mechanisms have been described, including the alteration of cell membrane function, decreases in the rate – or complete inhibition - of enzymatic reactions, changes in the physico-chemical characteristics of proteins and intracellular changes of the pH (Parkin et al. 1982, Daniels et al. 1985, Dixon and Kell 1989, Farber 1991).

The optimal concentration of each gas depends on the matrix, the target microorganism and the desired effect. To increase the positive and reduce the negative effects to the matrix and the microbiome, the optimal gas concentration must be determined for each product (Floros and Matsos 2005).

To test the effect of MAP on an ESBL-producing *E. coli*, the present study investigated the effect of three different modified atmospheres (MAs) compared to atmospheric air. The first MA consisted of 75 % O₂ and 25 % CO₂. These concentrations are similar to typical MA-conditions in poultry packaging with 70 % O₂ and 30 % CO₂ or 80 % O₂ and 20 % CO₂ being typical (Air Products 2015, Dansensor 2018). The second MA consisted of 100 % N₂. The inert properties of N₂ had the effect of simulating a skin package without changes in the study design. Additionally, dissolved gases from inside of the samples were diluted and less available for the microorganisms. The third MA consisted of 70 % CO₂, 15 % O₂ and 15 % N₂. This MA was described as being able to reduce the number of *E. coli* on chicken drumsticks by 2 log cfu g⁻¹ after 7 d of incubation at 3 °C (Al-Nehlawi et al. 2013).

3.4 Materials and Methods

3.4.1 Strain Used

An extended-spectrum beta-lactamase (TEM-52)-producing strain of *E. coli* 10714 assigned to phylogroup B1, isolated from a chicken meat sample, was used in this study. The strain was stored at - 20 °C in Luria-Bertani (LB) Miller broth (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) containing 25 % (vol/vol) glycerol and cultured at 37 °C on Tryptone Soya Agar (TSA) (Oxoid, Wesel, Germany) for 24 h. Colony material was passaged in LB to a concentration of 7 - 8 log cfu ml⁻¹. The concentration was verified by inoculating 50 µl of appropriate dilutions in maximum recovery diluent (MRD) (Merck) by the drop-plating method on Tryptone Bile X-glucuronide agar (TBX-Agar) (Oxoid). Incubation conditions were 37 °C for 24 h. The suspension was stored at 4 °C for 24 h until use in the experiments.

3.4.2 Chicken Meat Weight/Volume Ratio

For this study, two different types of meat were obtained from a local slaughterhouse directly after slaughter - fresh chicken breast filets and inner breast filets. These products are expected to show similar slaughtering and cutting caused surface contaminations in terms of type and amount of contamination per gram. Samples were immediately chilled and maintained as such during transport to the laboratory. The chicken breast filet samples were packaged according to common industrial specifications. Approx. 600 g chicken breast filet (2-3 pieces per package) were sealed under gas in trays with a final volume of approx. 860 ml. The samples were weighed by the chicken slaughter company. These samples were designated as “regular headspace”. To examine the influence of the headspace ratio, the amount of chicken meat was reduced to approx. 120 g per package, by packaging three pieces of inner breast filet. The volume of the package was maintained at 860 ml. These samples were designated as “increased headspace”.

3.4.3 Sample Preparation and Packaging

Chicken breast filets from each 600 g package were cut into six pieces (each approx. 100 g) and transferred into a new tray. Three of these pieces were inoculated with *E. coli* 10714. One of the three uninoculated pieces was used for the color and the pH measurement on the subsequent sampling days. On the remaining two pieces, the development of the microbiological contamination was investigated.

For tests with increased headspace, two inner filets were halved. Two of these pieces (each approx. 20 g) were inoculated with *E. coli* 10714. The third inner filet was used for the color and the pH measurements.

The experimental meat samples were inoculated to a concentration of 4 - 5 log cfu g⁻¹. Directly after inoculation, the samples were packed under the specific gas mixtures. The gas

mixtures used were: atmospheric air (air), an oxygen dominated gas mixture with 75 % O₂ + 25 % CO₂ (O₂), a carbon dioxide dominated gas mixture with 70 % CO₂ + 15 % O₂ + 15 % N₂ (CO₂) and 100 % nitrogen (N₂). The packaged samples were stored at 3 °C ± 1 °C.

3.4.4 Sampling

Samples were analyzed on days 0, 2, 5 and 7 after packaging. On day 0, two samples were analyzed before packaging. At each following sampling day, two trays held under the same incubation conditions, were examined. One piece of meat from each package was examined for color and pH measurement. For examination of *E. coli* 10714 and bacterial contamination, two pieces for each were sampled out of each tray. Tests were repeated three times independently for each gas and headspace ratio.

3.4.5 Microbiological Analysis

For the microbiological assessment, samples were analyzed after 0, 2, 5 and 7 days of incubation. Two samples from each tray were analyzed separately for enumeration of total viable aerobic bacteria (TAB), *Pseudomonas* spp., Enterobacteriaceae and *E. coli* 10714. On day 0, the initial number of *E. coli* was analyzed on uninoculated meat samples. Only batches of meat with less than 2 log cfu *E. coli* g⁻¹ were used for this study. Directly after opening the packages, samples were placed in stomacher bags (Interscience, Saint Nom, France). The higher weight pieces of chicken breast filets (approximately 100 g) were homogenized in 100 g MRD. The lower weight pieces of inner breast filets (approximately 20 g) were homogenized in 20 g MRD. All samples were homogenized for 4 min in a bag mixer (Interscience). Thereafter, a decadal dilution series in MRD + 0.75 g Agar l⁻¹ was spread on the following culture media by the drop-plating method (50 µl).

The amount of TAB was determined on TSA by incubation at 30.0 °C ± 1.0 °C for 72 h ± 2 h with a pre-counting after 48 h. The *E. coli* 10714 cell count was determined on TBX-Agar incubated at 37.0 °C ± 1.0 °C for 24 h ± 2 h. Enterobacteriaceae were determined on Violet Red Bile Glucose agar (VRBG) (Merck), incubated at 37.0 °C ± 1.0 °C for 24 h ± 2 h. The number of *Pseudomonas* spp. was determined on glutamate starch phenol red agar (GSP-Agar *Pseudomonas* *Aeromonas* selective agar) (Merck), incubated at 28.0 °C ± 1.0 °C for 48 h ± 2 h. The initial amount of *E. coli* on day 0 was determined by the spread-plate method using 0.5 ml homogenate on TBX-Agar, incubated at 37.0 °C ± 1.0 °C for 24 h ± 2 h.

The calculations of the results were performed with the respective exact sample weights.

We refer to the growth or cell multiplication of these organisms under the conditions tested throughout the text as "development".

3.4.6 Color Assessment

The superficial color on one meat sample out of each package was measured with a colorimeter (Chroma Meter CR-210, Konica Minolta Sensing, Japan). To get representative measurements of the sample, three measurements were taken, for each replication, each time on the surface that was directly in contact with the gas mixture. The assessed parameters were lightness (L^*), the balance between green and red (a^*) and the balance between blue and yellow (b^*).

3.4.7 pH Measurement

The pH was measured according to ISO 2917:1999 (ISO 2917, 1999). After conditioning the meat samples at room temperature (approx. 25 ± 2 °C) measurements were performed using a Knick pH meter (Knick laboratory-ph-meter-766, Berlin, Germany), with an insertion electrode (InLab Solids, Mettler Toledo, Mississauga, Canada). The measurement of the pH in high weight samples was performed in one piece of chicken breast filet at three different positions. For the measurement of the pH in low weight samples, a 40 g piece of inner breast filet was placed into a cup and covered with deionized water.

3.4.8 Statistical Analyses

The described experiment was repeated three times separately with each gas and headspace ratio. All results of microbiological investigations beneath the detection limit were set to the respective detection limits of approx. $1.6 \log \text{ cfu ml}^{-1}$ for the statistical analyses. Results were summarized as the mean count. The statistical analyses of the influence of the present atmosphere and the headspace ratio were performed with the nonparametric Mann-Whitney U test for independent samples using SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21) (Sachs 2003). Results were considered significant at $p \leq 0.008$ for the influence of the atmosphere by comparing all atmospheres to each other. Multiple testing was taken into account using a corresponding Bonferroni-adjusted significance level of $\alpha < 0.008$ and at $p \leq 0.05$ for the influence of the headspace ratio. A significance level of $\alpha < 0.05$ was applied when analyzing the influence of headspace ratio on the development of microorganisms.

3.5 Results

3.5.1 Microbiological Examination

Changes in microbial populations are shown in Figure 1 a/b. Microbial counts were expressed as differences in the mean on the respective day to the mean on day 0 in $\Delta \log \text{cfu g}^{-1}$. Significant differences in the development of microorganisms were induced by gas conditions ($p < 0.001$) and the headspace ratio ($p < 0.001$).

3.5.1.1 Influence of the Atmosphere

3.5.1.1.1 Regular Headspace

All measurements of bacterial development showed continuously increasing numbers of TAB, *Pseudomonas* spp. and Enterobacteriaceae during incubation of the samples at 3 °C (Figure 1 a). The development of these microorganisms was significantly increased ($p < 0.001$) after 7 d of incubation in the presence of air compared to incubation in the presence of the other gases (Table 1). No significant influence of the other gases on the development of TAB was observed. CO₂ was able to hinder the development of *Pseudomonas* spp. significantly in comparison to the development under the O₂-atmosphere ($p < 0.008$) and in presence of N₂ ($p < 0.008$). The development of Enterobacteriaceae was also significantly decreased ($p < 0.001$) in the presence of CO₂ as compared to N₂. After 7 d of incubation, the count for *E. coli* 10714 had decreased under all atmospheres. The greatest decrease of *E. coli* 10714 was determined in the presence of O₂, though no significant difference induced by the atmospheres was observed.

3.5.1.1.2 Increased Headspace

Already after 5 d of incubation, the development of TAB, *Pseudomonas* spp. and Enterobacteriaceae had increased significantly ($p < 0.001$) in the presence of air as compared to the other gases (Figure 1 b, Table 1). Comparing the influence of N₂ to the influences of O₂ and CO₂, the development of TAB was significantly higher ($p < 0.008$) at day 5 and later. While the count for TAB increased continuously in the presence of CO₂, the development of *Pseudomonas* spp. and Enterobacteriaceae was inhibited under the same conditions. CO₂ significantly reduced the development of these three bacterial groups also already after 5 d incubation ($p < 0.008$). Similar to the investigations with regular headspace, the count of *E. coli* 10714 had decreased by day 7. No significant impact by the atmosphere on *E. coli* 10714 was determined.

3.5.1.2 Influence of the Headspace Ratio

The influences of the headspace ratio to the development of the investigated microorganisms are shown in Table 1. The development of TAB was not influenced by the headspace ratio in the presence of an O₂ atmosphere. However, the increased headspace significantly facilitated development of TAB under the air and N₂ atmospheres ($p < 0.05$). Furthermore a significant reduction of the rate of development of TAB was observed in the presence of CO₂ in samples with increased headspace.

While the increased headspace supported the development of *Pseudomonas* spp. in the presence of air significantly ($p < 0.008$) already after 5 days of incubation, O₂ and CO₂ significantly reduced the rate of development ($p < 0.05$) already after 5 days of incubation.

The observations of Enterobacteriaceae as a function of the headspace ratio showed a significant ($p < 0.01$) inhibition of their development in the presence of all tested MAs after 5 days of incubation.

No significant influence of the headspace ratio on *E. coli* 10714 was observed after 7 days of incubation in the presence of all tested MAs. In the presence of air, significant differences ($p < 0.05$) in the development were observed after 2 and 5 days of incubation. While the counts of *E. coli* 10714 were reduced after 2 and 5 days of incubation with regular headspace, an increase in counts was observed with increased headspace.

3.5.2 pH Assessment

The means of the pH values of all samples under different atmospheric conditions, weight and different incubation times (0, 2, 5 and 7 d) are shown in Figures 2 a) and b) and Table 2. The initial pH of samples with regular headspace ratio varied between 5.70 in samples packed under O₂ and 5.93 in the samples packed under N₂. After 7 d of incubation, the pH varied between 5.66 in O₂-samples and 5.91 in the N₂-samples. Samples stored in the presence of O₂ showed a significantly reduced ($p < 0.001$) pH in comparison to the influence of the other gases. In comparison to CO₂, the samples stored in N₂ showed an increase ($p < 0.008$) in pH (Table 2).

The initial pH of the samples with increased headspace varied between 5.94 in samples packed under air and O₂ and 6.06 in samples packed under N₂. After 7 days of incubation, the pH varied between 5.87 in CO₂-samples and 5.91 in the N₂-samples. The increased headspace did not result in a significant change in the development of the pH of the meat samples.

3.5.3 Surface color measurements

The mean results of the color measurements (Lightness (L^*), redness (a^*) and yellowness (b^*)) are shown in Figure 3. The values of L^* , a^* and b^* were compared in each possible combination for the respective incubation atmospheres. The significance values of the comparisons between the influences of the individual gases are shown in Table 3.

The initial values of L^* of the samples stored with regular headspace ratio varied between 64.50, measured on samples packed in N_2 , and 67.90, measured on samples packed in air. After 7 days of incubation, the L^* values varied between 64.60 (N_2) and 69.09 (air). The rank order of the respective gases did not change. After 7 days of incubation, the L^* values of the meat stored in the presence of N_2 differed significantly ($p < 0.008$) from those of the samples incubated in the presence of the other atmospheres. The a^* values were also influenced by the incubation under N_2 . There was an increase ($p < 0.001$) in this parameter as compared to the results of the samples incubated in the presence of the other gases after 5 days of incubation. After 7 days of incubation the b^* values varied significantly between almost all individual gases. Except for the comparison of the samples packed under O_2 to the samples packed under CO_2 , a significant difference in this parameter was also determined on day 0. After 7 days of incubation, only the comparison of the samples packed under air to the samples packed under O_2 showed no significant differences in the b^* values.

The L^* -values of the samples with increased headspace showed significant differences only between the samples packed under CO_2 and the samples packed under N_2 . The a^* values differed partially significant since day 0. Only the differences of the values between CO_2 and N_2 has developed to significance differences ($p < 0.001$) during the incubation. After 7 days of incubation, only samples stored in O_2 and samples stored in CO_2 did not differ significantly from each other ($p < 0.008$).

3.6 Discussion

In the present study, the effect of modified packaging atmosphere with different gas mixtures and headspace ratios on an inoculated ESBL-producing *E. coli* strain and the typical microflora on skinless chicken meat was examined. The aim was to identify a gas-headspace combination generating a safer product with an increased shelf life.

In comparison to the development in air, the O₂-atmosphere, similar to common MAs used in praxis, slowed the development of TAB and *Pseudomonas* spp. significantly ($p < 0.001$) (Air Products 2015, Dansensor 2018). Similar results concerning the development of TAB and *Pseudomonas* spp. were reported by Bingol and Ergun (2011). Their investigations have shown that a MA consisting of 80 % O₂ + 20 % CO₂ reduces the development of TAB and *Pseudomonas* spp. in comparison to air-packed samples. However, the results of Bingol and Ergun (2011) did not show an increased development of TAB and *Pseudomonas* spp. in the presence of air in samples packed with increased headspace compared to samples packed with regular headspace, as investigated in the present study. This difference could be linked to the different sampling method we used in comparison to the Bingol and Ergun study. While Bingol and Ergun (2011) have used similar meat samples to examine the influence of the different headspace ratios, whole chicken breast filets and inner filets were used in the present study to achieve the different headspace ratios. These meat parts had different initial microbial loads. CO₂ and N₂ were also able to reduce the development ($p < 0.001$) of TAB and *Pseudomonas* spp. in comparison to air. The most inhibiting effect on *Pseudomonas* spp. in both headspace ratios was observed for CO₂. Compared to the influence of the other atmospheres, this MA significantly reduced the development of *Pseudomonas* spp. ($p < 0.008$). Inhibiting effects on the development of *Pseudomonas* spp. were increased significantly ($p < 0.05$) by an increased headspace in samples packed under O₂ and CO₂. The development of TAB was also decreased ($p < 0.05$) by increased headspace in the presence of CO₂. Inhibiting effects of high CO₂-atmospheres to TAB and *Pseudomonas* spp. on chicken breast meat, fresh beef, minced beef and broiler meat have also been observed in other studies (Skandamis and Nychas 2002, Chouliara et al. 2007, Esmer et al. 2011, Zhang et al. 2015).

The initial counts for Enterobacteriaceae per gram meat were nearly the same in the 600 g and 120 g packages (Table 1), and the differences in development seem to be affected by both the atmospheric conditions and the headspace ratio: in the 600 g packages, the development decreased in the MA atmospheres compared to in air ($p < 0.001$). Comparing the results of incubation with regular compared to increased headspace, the increased headspace was able to reduce the development of Enterobacteriaceae ($p < 0.01$) in the presence of all investigated atmospheres. The development of the Enterobacteriaceae was completely inhibited in the presence of CO₂ in samples packed with increased

headspace. The decelerated development of the Enterobacteriaceae in the presence of the 80 % O₂ + 20 % CO₂ mixture compared to the development in air, as well as the decelerating effect of the increased headspace were well described by Bingol and Ergun (2011). Chouliara et al. (2007) described a slower development of Enterobacteriaceae on chicken breast meat packed under a high CO₂-atmosphere compared to the development in air. The influence of a high CO₂-atmosphere on the development of Enterobacteriaceae on minced beef was described by Esmer et al. (2011) as completely inhibiting during the first seven days of incubation, with similar findings in a highly concentrated O₂-atmosphere. Also Skandamis and Nychas (2002) have reported that the development of Enterobacteriaceae on fresh beef was inhibited by a high CO₂-atmosphere.

As expected, in contrast to the development of the Enterobacteriaceae, no increase in the *E. coli* 10714 number induced the atmosphere nor the headspace ratio by was detected in the investigations. A temperature of 3 °C was completely inhibiting and slight decreases in the cell numbers were detected under all testing conditions. The main influencing atmosphere was O₂. The cell number was decreased by approx. 0.3 log cfu g⁻¹ after 7 days of incubation in both investigated headspace ratios. These results are similar to those found by Jones et al. (2004). Their investigations have shown a decreased count for *E. coli* caused just by storing at 2 °C. Heinrich et al. (2016) also determined a decreased count for *E. coli* inoculated on ham, with values similar to those reported in the present study. But the results of the present study differ from the results of Bingol and Ergun (2011) and Al-Nehlawi et al. (2013). While Bingol and Ergun (2011) reported increasing *E. coli* counts during storage in all tested atmospheres, Al-Nehlawi et al. (2013) observed lower *E. coli* counts under the same CO₂-atmosphere used in the present study. The reasons for this may be the different set ups compared to the present study. In the present study the effect of the atmospheres on a known and inoculated *E. coli* strain was investigated. The initial counts for *E. coli* on all samples were known and similar at day 0. Differences from day 0 were therefore not due to different initial cell counts. Furthermore, the incubation temperature in the present study (3 °C) was lower than in the investigations of Bingol and Ergun (2011) (4 °C).

Significant differences ($p < 0.008$) were observed in the effect of the atmosphere on the pH in samples packed with regular headspace. The values varied from 5.57 to 5.89 in the mean of the single samples at day 0 and from 5.57 to 5.92 after 7 days of incubation. No significant differences were observed in samples packed with increased headspace. The pH varied from 5.87 to 6.04 at day 0 and from 5.68 to 6.32 after 7 days of incubation. Therefore, the significance of the regular headspace sample simply resulted from the low standard derivation, not by large differences caused by the atmospheres. The differences between the means of the pH-measurements per atmosphere and headspace ratio were less than 0.16 from day 0 to day 7 (regular headspace, O₂) in all pH investigations. Similar observations

were also reported by Mbagwa et al. (2014). Al-Nehlawi et al. (2013) reported that the incubation of chicken drumsticks under a CO₂-atmosphere decreases the pH from approx. 6.5 to 6.2. Bingol and Ergun (2011) reported a decrease in pH under all investigated atmospheres with both tested headspace ratios, but the increased headspace reduced the differences in pH induced by the atmosphere. The investigations of Lorenzo et al. (2014) have shown that a high O₂-atmosphere does not influence the pH of pork patties. The results of the present study suggest that the final pH was reached before the chicken meat was packed and investigated in this study. Additionally, no further influence of the atmosphere on the meat samples was investigated. The data of the statistical analysis of the comparison between the headspace ratio and the pH are not shown, since the initial pH at day 0 differs significantly.

After 7 days of incubation with regular headspace, the L* and a*-values differed significantly ($p < 0.008$) only in N₂ compared to the results of the samples packed in presence of the other atmospheres. These N₂-samples were darker and more reddish. Excepting the gas combinations being significantly different since day 0 in b*-value, only samples packed in O₂ compared to samples packed in CO₂ developed a significant difference ($p < 0.001$) during incubation samples packed in O₂ and with regular headspace were more yellowish. Comparing the L*-values of the samples packed with increased headspace, a significant difference ($p < 0.001$) was detected only between CO₂-samples and N₂-samples, with samples packed in CO₂ being brighter. Significant differences in the b*-value developed in samples packed in air compared to samples packed in O₂. Samples packed in O₂ became more reddish. Also, samples packed in CO₂ differed from samples packed in N₂, with CO₂ samples becoming more greenish. With increased headspace, except for the samples packed in O₂ compared to samples packed in CO₂, all comparisons of the influence of the atmosphere on the b*-value showed significant differences. With regular headspace, the b*-values only of air packed and O₂ packed meat did not differ significantly. Comparisons of the effect of the headspace would not be purposeful caused by significant differences of L*, a* and b* since the first measurements at day 0 (Table 3). Chouliara et al. (2007) have also found nearly constant L*, a* and b*-values on chicken meat over an incubation period of 12 days.

Seydim et al. (2006) have reported effects on the L*-value of ostrich meat in air and in an 80 % O₂ + 20 % CO₂ atmosphere similar to those of the respective atmospheres in the present study. They described an almost constant L*-value over an incubation period of 6 days in the presence of both gases. Bingol and Ergun (2011) also described nearly constant values of L* of ostrich meat packed with two different headspace ratios after 7 days of incubation. But in both studies the a*-value decreased over the incubation time of 6 and 7 days, respectively. The b*-value also decreased slightly in the presence of air and the

80 % O₂ + 20 % CO₂ atmosphere in both studies. Slight decreases in the L* and a*-values and an increased b*-value were reported by Lorenzo et al. (2014) on pork patties packed under a high O₂-atmosphere. Except for the slightly darker initial color, the a* and b*-values were similar to the values measured in the present study. Even when some differences of the influence of the atmosphere on the color parameters L*, a* and b* were significant, no unappetizing colors were detected in the present study. The meat was still pink in different nuances and did not become pale or dark.

3.7 Conclusion

The use of MAP has increased the shelf life of chicken meat. The atmosphere with the highest potential for reducing the development of the corresponding microorganisms is composed of 70 % CO₂ + 15 % O₂ + 15 % N₂. Samples packed with increased headspace have shown an increased shelf life depending on the composition of MA, but no significant decrease of the number of *E. coli* 10714 has been observed. However, before using the most efficient MA in praxis, it is necessary to investigate the influence on the flavor and the odor of chicken meat during incubation.

3.8 Acknowledgments

We thank the Institute for Animal Hygiene and Environmental Health of the Freie Universität Berlin for providing the *E. coli* 10714 strain. The EsRAM-project was supported by funds from the German Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL) based on a decision of the Parliament of the Federal Republic of Germany via the Federal Office for Agriculture and Food (BLE) under the innovation support program (grant no.: 2817701614).

3.9 Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

3.10 References

Air Products 2015. Freshline® MAP Gases-Poultry and Game.

Al-Nehlawi, A., Saldo, J., Vega, L. F., & Guri, S. 2013. Effect of high carbon dioxide atmosphere packaging and soluble gas stabilization pre-treatment on the shelf-life and quality of chicken drumsticks. *Meat Science*, 94:1-8.

Bhaisare, D., Thyagarajan, D., Churchil, R. R., & Punniamurthy, N. 2014. Bacterial Pathogens in Chicken Meat: Review. *International Journal of Life Sciences Research*, 2:1-7.

Bingol, E. B., & Ergun, O. 2011. Effects of modified atmosphere packaging (MAP) on the microbiological quality and shelf life of ostrich meat. *Meat Science*, 88:774-785.

Bush, K., Jacoby, G. A., & Medeiros A. A. 1995. A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39:1211-1233.

BVL. 2017. BVL-Report 12.2; Reports to Food Safety Zoonoses Monitoring 2016. Berlin, Federal Office of Consumer Protection and Food Safety.

Chouliara, E., Karatapanis, A., Savvaidis, I. N., & Kontominas, M. G. 2007. Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4 degrees C. *Food Microbiology*, 24:607-617.

Conrads, H., & Schmidt, M. 2000. Plasma generation and plasma sources. *Plasma Sources Science and Technology*, 9:441-454.

Daniels, J. A., Krishnamurthi, R., & Rizvi, S. S. H. 1985. A Review of Effects of Carbon-Dioxide on Microbial-Growth and Food Quality. *Journal of Food Protection*, 48:532-537.

Dansensor. 2018. A Guide to MAP Gas Mixtures.

Dhanji, H., Murphy, N. M., Doumith, M., Durmus, S., Lee, S. S., Hope, R., Woodford, N., & Livermore, D. M., 2010. Cephalosporin resistance mechanisms in *Escherichia coli* isolated from raw chicken imported into the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65:2534-2537.

Dixon, N. M., & Kell, D. B. 1989. The Inhibition by CO₂ of the Growth and Metabolism of Microorganisms. *Journal of Applied Bacteriology*, 67:109-136.

- Dohlen, S., Braun, C., Brodkorb, F., Fischer, B., Ilg, Y., Kalbfleisch, K., Lorenz, R., Robers, O., Kreyenschmidt, M., & Kreyenschmidt, J. 2016. Potential of the polymer poly-[2-(tert-butylamino) methylstyrene] as antimicrobial packaging material for meat products. *Journal of Applied Microbiology*, 121:1059-1070.
- EFSA Panels on Biological Hazards (BIOHAZ), on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), and on Animal Health and Welfare (AHAW); Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (poultry). *EFSA Journal* 2012;10(6):2741. [179 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2741. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal
- Esmer, O. K., Irkin, R., Degirmencioglu, N., & Degirmencioglu, A. 2011. The effects of modified atmosphere gas composition on microbiological criteria, color and oxidation values of minced beef meat. *Meat Science*, 88:221-226.
- Farber, J. M. 1991. Microbiological Aspects of Modified-Atmosphere Packaging Technology - a Review. *Journal of Food Protection*, 54:58-70.
- Floros, J. D., & Matsos, K.I., 10 - Introduction to modified atmosphere packaging, in *Innovations in Food Packaging*, J.H. Han, Editor. 2005, Academic Press: London. 159-172
- Fraqueza, M. J. , & Barreto, A. S. 2009. The effect on turkey meat shelf life of modified-atmosphere packaging with an argon mixture. *Poultry Science*, 88 :1991–1998
- Gill, C. O., & Penney, N. 1988. The Effect of the Initial Gas Volume to Meat Weight Ratio on the Storage Life of Chilled Beef Packaged under Carbon-Dioxide. *Meat Science*, 22:53-63.
- He, H. & Hosney, R. C. 1990. Changes in Bread Firmness and Moisture during Long-Term Storage. *Cereal Chemistry*, 67:603-605.
- Heinrich, V., Zunabovic, M., Nehm, L., Bergmair, J., & Kneifel, W. 2016. Influence of argon modified atmosphere packaging on the growth potential of strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Food Control*, 59:513-523.
- Herbert, U., Rossaint, S., Khanna, M. A., & Kreyenschmidt, J. 2013. Comparison of argon-based and nitrogen-based modified atmosphere packaging on bacterial growth and product quality of chicken breast fillets. *Poultry Science*, 92:1348-1356.
- ISO 2917:1999. 1999. Meat and meat products – Measurement of pH (Reference method), International Organisation for Standardisation Geneva, Switzerland.

- Jayasingh, P., Cornforth, D. P., Brennand, C. P., Carpenter, C. E., & Whittier, D. R. 2002. Sensory evaluation of ground beef stored in high-oxygen modified atmosphere packaging. *Journal of Food Science*, 67:3493-3496.
- Jones, T., Gill, C. O., & McMullen, L. M. 2004. The behaviour of log phase *Escherichia coli* at temperatures that fluctuate about the minimum for growth. *Letters in Applied Microbiology*, 39:296-300.
- Lambert, A. D., Smith, J. P., & Dodds, K. L. 1991. Shelf-Life Extension and Microbiological Safety of Fresh Meat - a Review. *Food Microbiology*, 8:267-297.
- Lee, D. S., Hagggar, P. E., Lee, J., & Yam, K. L. 1991. Model for Fresh Produce Respiration in Modified Atmospheres Based on Principles of Enzyme-Kinetics. *Journal of Food Science*, 56:1580-1585.
- Lee, J., Lee, C. W., Yong, H. I., Lee, H. J., Jo, C., & Jung, S. 2017. Use of Atmospheric Pressure Cold Plasma for Meat Industry. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 37:477-485.
- Lorenzo, J. M., Sineiro, J., Amado, I. R., & Franco, D. 2014. Influence of natural extracts on the shelf life of modified atmosphere-packaged pork patties. *Meat Science*, 96:526-534.
- Ma, J., Zhang, W. Y., Zhang, S. L., Zhu, Q. L., Feng, Q. Y., & Chen, F. 2017. Short-term effects of CO₂ leakage on the soil bacterial community in a simulated gas leakage scenario. *Peer-Reviewed & Open Access*, 5:e4024.
- Mbaga, S. H., Sanka, Y. D., Katule, A. M., & Mushi, D. 2014. Effects of Storage Time on the Quality of Local Chicken Meat. *Tanzania Journal of Agricultural Sciences*, 13:48-54.
- Mead, G. C. 2004. Microbiological quality of poultry meat: a review. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 6:135 - 142.
- Moutiq, R., Misra, N. N., Mendonça, A., & Keener, K. 2020. In-package decontamination of chicken breast using cold plasma technology: Microbial, quality and storage studies. *Meat Science*, 159:107942.
- Nieminen, T. T., Koskinen, K., Laine, P., Hultman, J., Sade, E., Paulin, L., Paloranta, A., Johansson, P., Bjorkroth, J., & Auvinen, P. 2012. Comparison of microbial communities in marinated and unmarinated broiler meat by metagenomics. *International Journal of Food Microbiology*, 157:142-149.

-
- Panea, B., Ripoll, G., González, J., Fernández-Cuello, Á., & Albertí, P. 2014. Effect of nanocomposite packaging containing different proportions of ZnO and Ag on chicken breast meat quality. *Journal of Food Engineering*, 123:104-112.
- Parkin, K. L., Wells, M. J., & Brown, W. D. 1982. Modified Atmosphere Storage of Rockfish Fillets. *Journal of Food Science*, 47:181-184.
- Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18:657-686.
- Paul, V., & Pandey, R. 2014. Role of internal atmosphere on fruit ripening and storability-a review. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 51:1223-1250.
- Pfeifer, Y., Cullik, A. & Witte, W. 2010. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 300:371-379.
- Rouger, A., Tresse, O., & Zagorec, M. 2017. Bacterial Contaminants of Poultry Meat: Sources, Species, and Dynamics. *Microorganisms*, 5:50.
- Sachs, L. 2003. *Applied Statistics*. Vol. 11. Berlin, Springer.
- Seydim, A. C., Acton, J. C., Hall, M. A., & Dawson, P. L. 2006. Effects of packaging atmospheres on shelf-life quality of ground ostrich meat. *Meat Science*, 73:503-510.
- Skandamis, P. N., & Nychas, G. J. E. 2002. Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 79:35-45.
- Souza, V. G. L., Pires, J. R. A., Vieira, É. T., Coelho, I. M., Duarte, M. P., & Fernando, A. L. 2018. Shelf Life Assessment of Fresh Poultry Meat Packaged in Novel Bionanocomposite of Chitosan/Montmorillonite Incorporated with Ginger Essential Oil. *Coatings*, 8:177.
- Statista. 2018. Consumption of chicken meat in key markets worldwide, 2016 and 2018 (in 1,000 tonnes carcass weight).
- Stuart, J. C., van den Munckhof, T., Voets, G., Scharringa, J., Fluit, A., & Leverstein-Van Hall, M. 2012. Comparison of ESBL contamination in organic and conventional retail chicken meat. *International Journal of Food Microbiology*, 154:212-214.

- Sturenburg, E., & Mack, D. 2003. Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *Journal of Infection*, 47:273-295.
- Yildirim, S., Røcker, B., Pettersen, M. K., Nilsen-Nygaard, J., Ayhan, Z., Rutkaite, R., Radusin, T., Suminska, P., Marcos, B., & Coma, V. 2017. Active Packaging Applications for Food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17:165 - 199.
- Zarfel, G., Galler, H., Luxner, J., Petternel, C., Reinthaler, F. F., Haas, D., Kittinger, C., Grisold, A. J., Pless, P., & Feierl, G. 2014. Multiresistant Bacteria Isolated from Chicken Meat in Austria. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11:12582-12593.
- Zhang, X. X., Wang, H. H., Li, N., Li, M., & Xu, X. L. 2015. High CO₂-modified atmosphere packaging for extension of shelf-life of chilled yellow-feather broiler meat: A special breed in Asia. *Lwt-Food Science and Technology*, 64:1123-1129.

3.11 Tables

Table 1: Influence of the respective atmosphere and the headspace ratio on the development of microorganisms.

Weight per package	Microbiological parameter	Atmosphere	Days of incubation				
			0	2	5	7	
600 g	TAB	Air	4.40	4.58	6.61 [*]	7.68 ^{a+, b+, c+**}	
		O ₂	4.68	4.52	6.30 [*]	6.99 ^{a+}	
		CO ₂	4.43	4.68	5.95 [*]	6.74 ^{b+*}	
		N ₂	4.33	4.84	6.04	6.92 ^{c+**}	
	<i>Pseudomonas</i> spp.	Air	3.77	4.03 ^{a+}	6.18 ^{a+, b+, c+*}	7.26 ^{a+, b+, c+**}	
		O ₂	4.03	3.79 ^{a, b*}	5.37 ^{a+*}	5.72 ^{a+, d*}	
		CO ₂	3.75	3.95	4.52 ^{b+*}	4.83 ^{b+, d, e+*}	
		N ₂	3.70	4.13 ^b	4.79 ^{c+}	5.62 ^{c+, e+}	
	Enterobacteriaceae	Air	2.12	2.22	3.45 ^{a+}	4.97 ^{a+, b+, c+*}	
		O ₂	2.24	2.44	3.38 ^{**}	4.05 ^{a+**}	
		CO ₂	2.14	2.65 [*]	3.28 ^{a+*}	3.93 ^{b+, d+*}	
		N ₂	2.13	2.40	3.26 [*]	4.37 ^{c+, d+*}	
	<i>E. coli</i> 10714	Air	7.66	7.59 [*]	7.54 [*]	7.53	
		O ₂	7.60	7.55	7.48	7.31	
		CO ₂	7.71	7.60	7.63	7.50	
		N ₂	7.90	7.83	7.81	7.70	
	120 g	TAB	Air	3.01	3.43 ^{a, b}	5.79 ^{a+, b+, c+*}	7.15 ^{a+, b+, c+**}
			O ₂	3.16	3.05 ^a	4.21 ^{a+, d*}	5.37 ^{a+, d+}
			CO ₂	3.13	3.12 ^b	3.83 ^{b+, e+*}	4.80 ^{b+, e+*}
			N ₂	3.14	3.43	5.03 ^{c+, d, e+}	6.41 ^{c+, d+, e+**}
<i>Pseudomonas</i> spp.		Air	2.12	2.85 ^{a, b, c*}	5.36 ^{a+, b+, c+*}	6.86 ^{a+, b+, c+**}	
		O ₂	2.12	2.27 ^{a*}	2.84 ^{a+*}	3.39 ^{a+, d+*}	
		CO ₂	1.86	2.02 ^b	2.05 ^{b+, d*}	2.10 ^{b+, d+, e+*}	
		N ₂	2.13	2.33 ^c	3.11 ^{c+, d}	3.99 ^{c+, e+}	
Enterobacteriaceae		Air	1.75	1.77	2.83 ^{a+, b+, c+*}	4.16 ^{a+, b+, c+*}	
		O ₂	1.75	1.67	1.82 ^{a+**}	2.12 ^{a+, d+**}	
		CO ₂	1.74	1.62 [*]	1.61 ^{b+, d+**}	1.76 ^{b+, e+**}	
		N ₂	1.71	1.80	2.03 ^{c+, d+*}	3.25 ^{c+, d+, e+**}	
<i>E. coli</i> 10714		Air	7.70	7.74 [*]	7.72 [*]	7.60	
		O ₂	7.70	7.62	7.55	7.42	
		CO ₂	7.73	7.66	7.62	7.64	
		N ₂	7.77	7.77	7.67	7.58	

Means of Microbial population (log cfu g⁻¹).

^{a-e} Means with same superscript (in the respective bacterial group and weight) suggest significant differences ($p < 0.008$) in the development of the microorganisms.

^{a+-e+} Means with same superscript (in the respective bacterial group and weight) suggest significant differences ($p < 0.001$) in the development of the microorganisms.

* Differences in the mean are significantly ($p < 0.05$) influenced by the headspace ratio.

** Differences in the mean are significantly ($p < 0.001$) influenced by the headspace ratio. The statistical analyses were performed with the Mann–Whitney U test by comparing the development of the respective parameter in the presence of the respective atmosphere.

Table 2: Influence of the atmosphere on the development of pH.

Weight per package	MA combination	Days of incubation			
		0	2	5	7
600 g	Air	5.7	5.8	5.8	5.8 ^a
	O ₂	5.8	5.8 ^a	5.8	5.7 ^{a, b, c}
	CO ₂	5.8	5.8	5.8	5.8 ^{b, d}
	N ₂	5.9	5.9 ^a	5.7	5.9 ^{c, d}
120 g	Air	5.9	6.0	6.0	6.0
	O ₂	5.9	6.0	5.9	6.0
	CO ₂	6.0	5.9	5.9	5.9
	N ₂	6.1	6.0	6.1	6.0

Means of the pH.

^{a-c} Means with same superscript (in the respective weight) suggest significant differences ($p < 0.008$) of the pH.

The statistical analyses were performed with the Mann–Whitney U test by comparing the respective pH values in the presence of the respective atmosphere.

Table 3: Influence of the atmosphere on the development of color.

Weight per package	Attribute	MA combination	Days of incubation			
			0	2	5	7
600 g	L	Air	67.90	70.03	65.47	68.98 ^{a+}
		O ₂	67.79	64.57	66.79	69.09 ^{b+}
		CO ₂	66.28	64.98	66.85	66.92 ^c
		N ₂	64.50	65.86	64.53	64.60 ^{a+, b+, c}
	a	Air	12.81	12.23	12.43 ^{a+}	11.07 ^{a+}
		O ₂	12.12	13.28	12.50 ^b	11.62 ^{b+}
		CO ₂	12.23	12.66	12.00 ^{c+}	11.55 ^{c+}
		N ₂	13.63	12.55	14.49 ^{a+, b, c+}	13.90 ^{a+, b+, c+}
	b	Air	10.72 ^{a, b+}	10.79 ^{a, b+}	9.96 ^{a+, b+}	11.51 ^{a, b+}
		O ₂	8.93 ^{c+}	11.09 ^{c, d+}	11.79 ^{a+, c+}	12.73 ^{c+, d+}
		CO ₂	7.99 ^{a, d+}	8.11 ^{a, c}	9.17 ^{c+, e}	9.24 ^{a, c+, e}
		N ₂	5.27 ^{b+, c+, d+}	7.38 ^{b+, d+}	6.56 ^{b+, d+, e}	6.80 ^{b+, d+, e}
120 g	L	Air	60.26	60.87	59.88	60.07
		O ₂	60.26	61.51	60.10	60.20
		CO ₂	58.10	59.86	59.57	61.44 ^{a+}
		N ₂	58.56	60.06	59.15	58.96 ^{a+}
	a	Air	13.17 ^{a, b}	13.92	13.37	12.24
		O ₂	13.17 ^{c, d}	15.51 ^{a+, b+}	15.16 ^{a+}	14.95 ^{a+}
		CO ₂	15.11 ^{a, c}	12.62 ^{a+}	12.38 ^{a+, b+}	9.68 ^{a+, b+}
		N ₂	14.14 ^{b, d}	13.17 ^{b+}	14.61 ^{b+}	14.03 ^{b+}
	b	Air	11.17	12.18 ^a	13.75	12.89 ^{a, b+, c}
		O ₂	11.17	14.92 ^{a, b+, c+}	15.25 ^{a, b+}	14.40 ^{a, d}
		CO ₂	11.47	11.87 ^{b+}	13.30 ^a	15.30 ^{b+, e+}
		N ₂	11.30	11.46 ^{c+}	12.58 ^{b+}	11.23 ^{c, d, e+}

Means of the color parameters L*, a* and b*.

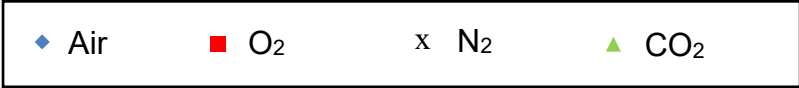
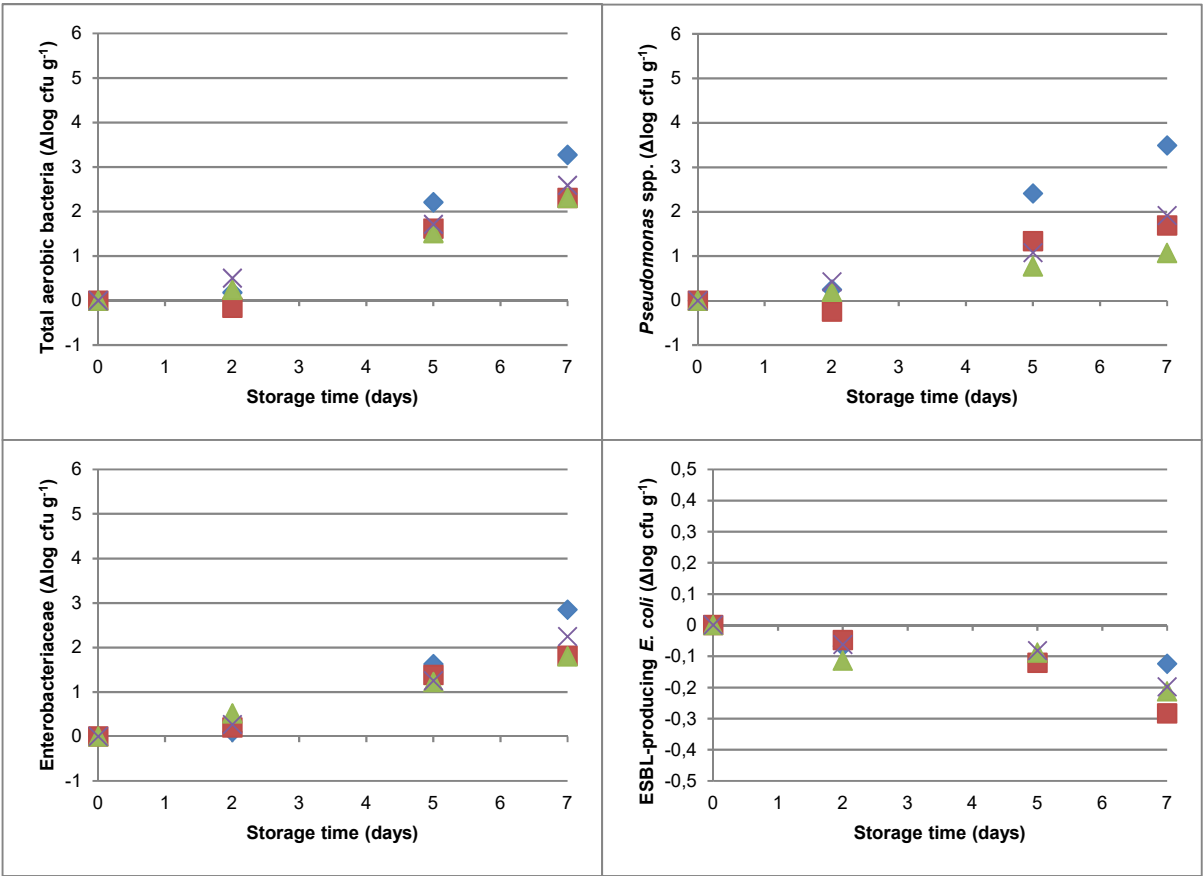
^{a-e} Means with same superscript (in the respective color parameters group and weight) suggest significant differences ($p < 0.008$) of the color parameters.

^{a+-e+} Means with same superscript (in the respective bacterial group and weight) suggest significant differences ($p < 0.001$) in the development of the microorganisms.

The statistical analyses were performed with the Mann–Whitney U test by comparing the respective color parameter in the presence of the respective atmosphere.

3.12 Figures

a



b

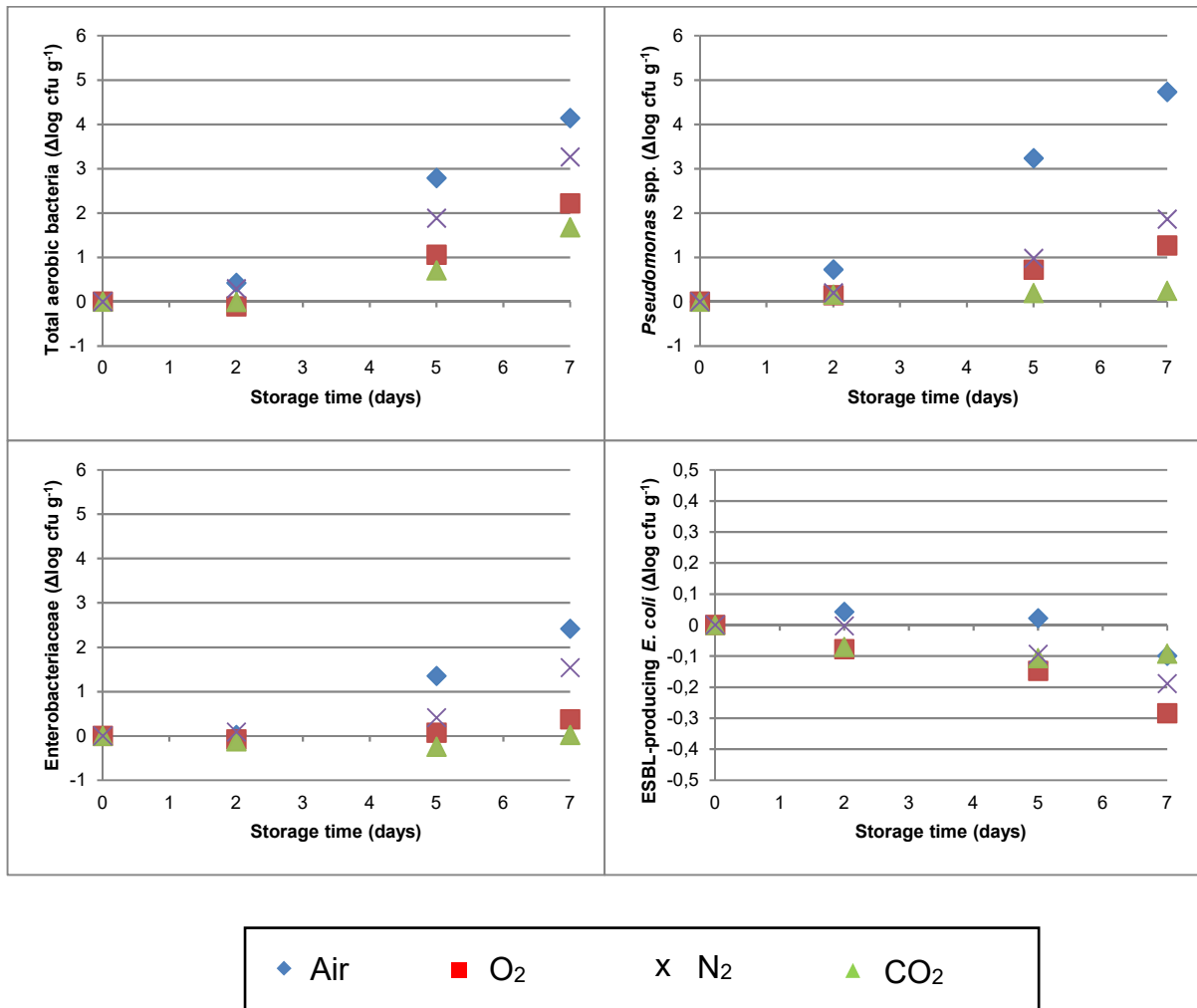


Figure 1: Development of microorganisms. Effect of the atmospheres (air, O₂, CO₂ and N₂) on the development of TAB, *Pseudomonas* spp., Enterobacteriaceae and *E. coli* 10714 in samples of meat packed to 600 g (a) and 120 g (b) per tray, stored for 7 days at 3 °C ± 1 °C. Pictured are the differences in the mean of the respective day from the mean of day 0 in Δlog cfu g⁻¹. Day 0 → n = 6; Day 2, 5 and 7 → n = 12.

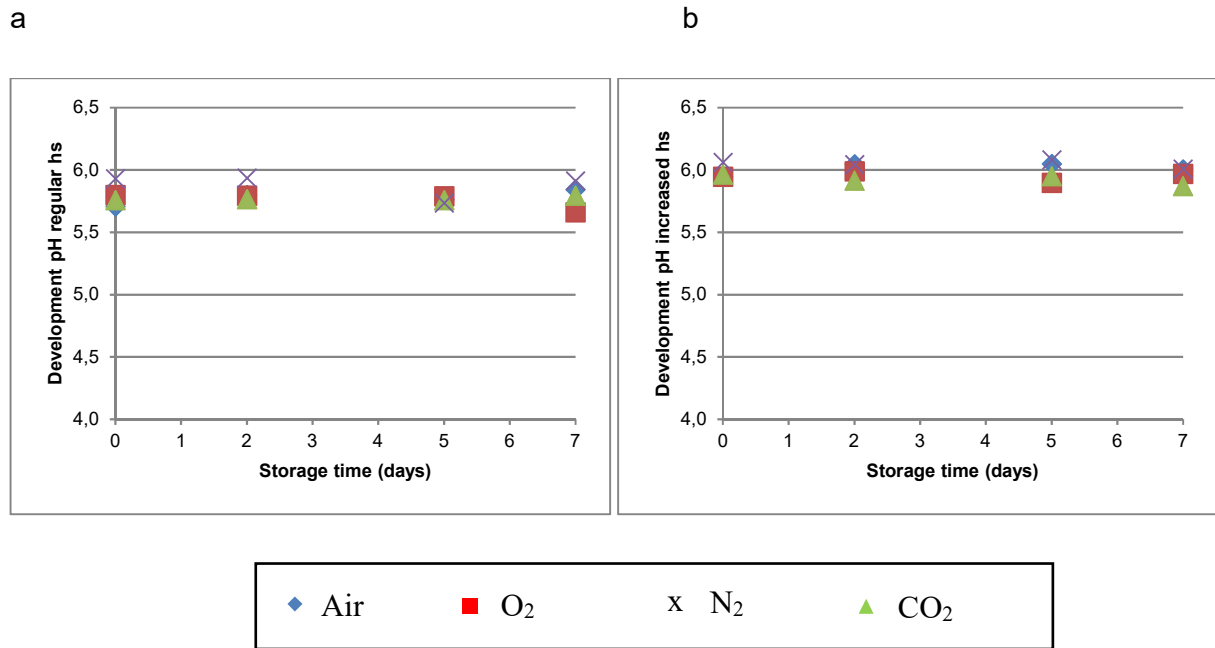


Figure 2: Development of pH. Trend of the pH in samples of chicken meat packaged under different atmospheres with regular headspace (hs) (a) and increased headspace (b), stored for 7 days at 3 °C ± 1 °C. Day 0 -> n = 3; Day 2, 5 and 7 -> n = 6.

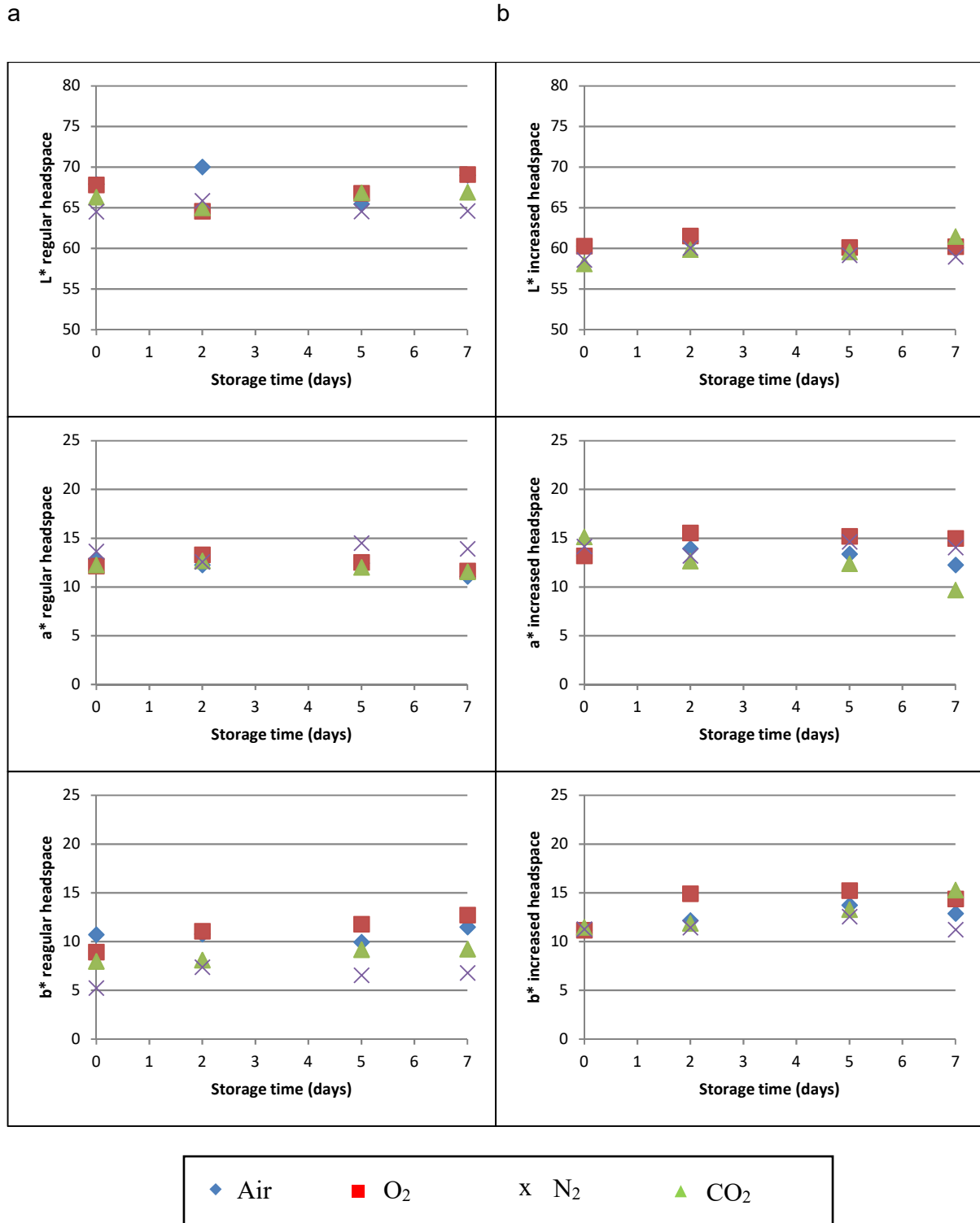


Figure 3: Development of color. Effect of the atmospheres (air, O₂, CO₂ and N₂) on the color parameters L*, a* and b* in samples of meat packed with regular (a) and increased (b) headspace, stored for 7 days at 3 °C ± 1 °C. Day 0 -> n = 3; Day 2, 5 and 7 -> n = 6.

Kapitel 4: Übergreifende Diskussion

In den letzten Jahren gewannen antibiotikaresistente Mikroorganismen sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin immer mehr an Bedeutung. Im Zusammenhang mit der Veterinärmedizin ist neben dem damit verbundenen Wegfallen von Behandlungsmöglichkeiten für kranke Tiere der Aspekt der Produktion sicheren Fleisches für den menschlichen Verzehr zu beachten (WHO 2019, 2011; Renwick et al. 2016). Über kontaminiertes frisches Fleisch kann es im Rahmen der Zubereitung durch mangelnde Küchenhygiene oder nicht ausreichend gegartes Fleisch zu einer Infektion mit diversen Mikroorganismen, darunter auch mit solchen, die Resistenzen tragen, kommen (BfR 2018, 2017, 2011). Im Rahmen des EsRAM-Projektes (Entwicklung stufenübergreifender Reduktionsmaßnahmen für Antibiotikaresistente Erreger beim Mastgeflügel) sollen verschiedene Möglichkeiten zur Reduzierung antibiotikaresistenter Mikroorganismen entlang der Hähnchenfleisch produzierenden Kette auf ihre Wirksamkeit hin untersucht werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Effektivität einer On-Line-Desinfektion, wie sie während der laufenden Zerlegung von Hähnchen eingesetzt werden kann, und die Wirkung modifizierter Atmosphären auf einen ESBL-bildenden *E. coli* und weitere Mikroorganismen untersucht.

Desinfektionsmittelprüfung im Labor

Für die Untersuchungen zum ersten Teil der Arbeit, der Desinfektionsmittelprüfung, wurde zunächst eine Methodik entwickelt, mit der unter praxisnahen Bedingungen die Effektivität unterschiedlichster Desinfektionsmittel getestet werden kann. Die Methodik orientiert sich im Wesentlichen an den entsprechenden Vorgaben der DIN EN 13697 und der DVG bezüglich der Desinfektionsmitteltestung im Oberflächenverfahren mit dem Keimträgertest (DIN EN 13697:2015-06; DVG-Prüfrichtlinien 2007). Angepasst wurden die Einwirkzeit, die Temperatur, die Fixierung der Mikroorganismen und die Zusammensetzung der Belastungssubstanz. Die Einwirkzeit wurde reduziert von 5 bzw. 30 min. auf 5, 30 und 60 Sekunden, wobei 5 Sekunden bereits eine relativ lange Einwirkzeit im Bereich der Geflügelzerlegung repräsentieren, wie Schlachthofbegehungen zeigten. Als Temperatur wurden 7 °C gewählt, was etwa der Umgebungstemperatur im Bereich der Zerlegung entspricht. Im Gegensatz zu den Vorgaben nach DIN EN 13697 und der DVG wurden die Mikroorganismen nicht auf der Keimträgeroberfläche festgetrocknet, sondern in Suspension aufgegeben. Dieser wurden neben der nach DVG festgelegten Proteinbelastung noch Agar (0,2 %) hinzugegeben, um eine gelartige Struktur ähnlich der Rückstände auf den Geräten und fleischführenden Oberflächen der Zerlegung zu schaffen. Dadurch wurde zusätzlich die

Diffusionszeit der zu testenden Desinfektionsmittel verlängert. Außerdem wurde das vorgegebene Rinder-Serum-Albumin durch Albumin von Hühnereiklar substituiert. In einem Screening-Verfahren wurden verschiedene gängige Desinfektionsmittelwirkstoffe und organische Säuren auf ihre Effektivität hin geprüft. Als Zielvorgabe sollte eine Reduktion der Mikroorganismen durch sehr hohe Konzentrationen des Desinfektionsmittels in 60 Sekunden ohne die Gegenwart der wirkungsreduzierenden Belastungssubstanz um zwei Log-Stufen erreicht werden. Erst nach Erreichen dieser Vorgabe wurde das entsprechende Desinfektionsmittel in der bereits getesteten und einer niedrigeren Konzentration in die weiteren Versuche einbezogen. Lediglich Peressigsäure (PES) (5000 ppm) und Milchsäure (MS) (66.666 ppm) konnten diese Vorgabe erfüllen. Anschließend wurde die Desinfektionsmittelwirkung auf einen ESBL-bildenden *E. coli* 10714 und *Pseudomonas (P.) aeruginosa* ATCC 15442 überprüft. Um den Einfluss der Belastungssubstanz zu überprüfen, wurden die Tests vergleichend in Gegenwart und in Abwesenheit dieser durchgeführt. Es zeigte sich, dass es nur in Abwesenheit der Belastungssubstanz nach fünfsekündiger Einwirkzeit zu signifikanten Reduktionen des *E. coli* 10714 und *P. aeruginosa* 15442 durch PES kam. Außerdem war die Konzentration der verwendeten PES mit 5.000 ppm so hoch, dass sie aus Gründen des Arbeitsschutzes nicht in größeren Mengen in offenen Bereichen angewendet werden kann. Nach 30 Sekunden Einwirkzeit konnten sowohl bei *E. coli* 10714 als auch bei *P. aeruginosa* 15442 signifikante Reduktionen um mehr als 2 log-Stufen verzeichnet werden. Jedoch wurden diese Ergebnisse ebenfalls in Abwesenheit der Belastungssubstanz erzielt. Außerdem wäre eine 30-sekündige Einwirkzeit zu lang, als dass sie zwischen zwei aufeinanderfolgenden Karkassen während des Schlachtbetriebes erreicht werden könnte. In Anwesenheit der gewählten Belastungssubstanz waren signifikante Reduktionen um 0,5 bis 0,8 log-Stufen erst nach 30 Sekunden Einwirkzeit zu verzeichnen.

Milchsäure zeigte in den verwendeten Konzentrationen gegenüber *E. coli* 10714 eine geringere Wirkung mit einer Reduktion der Zellzahl um maximal 2,4 log-Stufen (vgl. PES > 4,2 log-Stufen). Unter gleichen Bedingungen konnte die Zellzahl von *P. aeruginosa* 15442 allerdings stärker reduziert werden als durch PES. Die Gegenwart der verwendeten Belastungssubstanz inhibierte jedoch nahezu vollständig die antimikrobielle Wirkung der MS.

Neben der durch den Agar erhöhten Diffusionszeit verursacht die Gegenwart von Proteinen einen Eiweißfehler, der die Wirkung des Desinfektionsmittels reduziert, was unter anderem bei Desinfektionsmittel auf Basis von Persäuren typisch ist (IHO 2019; DVG 2019). Beide wirkungsreduzierenden Eigenschaften waren in Abhängigkeit der Zeit ursächlich für die festgestellt signifikante Reduktion der Desinfektionsmittelwirkung in Gegenwart der Belastungssubstanz. In Gegenwart dieser war die Zellzahlreduktion von *E. coli* 10714 und *P. aeruginosa* 15442 induziert durch PES bzw. MS signifikant geringer. In zusätzlich

getätigten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sowohl die Anwesenheit der Proteinbelastung als auch die Anwesenheit des Agar, jeweils separat, zu einer signifikanten Reduktion der Desinfektionsmittelwirkung gegen *E. coli* 10714 beitragen.

Desinfektionsmittelprüfung im Schlachthof

Parallel zu den Untersuchungen im Labor wurde durch die Projektpartner der FU Berlin die Wirkung einer PES-Lösung mit 210 ppm im Schlachthof überprüft. Hierbei wurden im Bereich der Schlachtung mit Tupfern die mikrobielle Belastung auf diversen Oberflächen mit Fleischkontakt untersucht. Jeweils sechsmal wurden hierbei Proben nach einem Arbeitstag mit ca. 120.000 geschlachteten Tieren mit und ohne einer kontinuierlichen Beaufschlagung der Oberflächen mit dem Desinfektionsmittel genommen. Während der kontinuierlichen Beaufschlagung wurde das Desinfektionsmittel über Düsen auf die Oberflächen gesprüht. Bei der Kontrolle ohne Beaufschlagung blieben die Oberflächen unbehandelt. Untersuchte Parameter waren die aerobe mesophile Keimzahl und Enterobacteriaceae. Es zeigten sich an nahezu allen Oberflächen signifikante Reduktionen sowohl bei der untersuchten aeroben mesophilen Keimzahl als auch bei den Enterobacteriaceae. Literaturdaten deuten darauf hin, dass dieser Effekt mit Wasser allein nicht erreicht werden könnte (Julião et al. 2018; Soares et al. 2018). Die Untersuchungen, die im Labor durchgeführt wurden, zeigen, dass die üblichen Einwirkzeiten während der Geflügelschlachtung zu kurz für diese Reduktion sind. Der nachgewiesene Effekt der Reduktion im Schlachthof kann unterschiedlichen Ursprungs sein. Zum einen ist die Einwirkzeit des Desinfektionsmittels durch die Art der Probenahme erhöht gewesen. Aus Sicherheitsgründen musste das Schlachtband erst vollständig stehen, bevor die Proben genommen werden konnten. Hierbei wurde weiterhin Desinfektionsmittel auf die Oberflächen gesprüht, ohne dass sie unmittelbar davor mit Karkassen in Kontakt waren, was zu einer erhöhten Einwirkzeit führte. Des Weiteren beinhaltet das Desinfektionsmittel Oktansäure, das eine grenzflächenaktive Substanz ist und somit das Abspülen der Oberflächen begünstigt, wodurch die Mikroorganismen nicht abgetötet sein müssen und dennoch nicht mehr auf den Oberflächen nachweisbar sind und auch keine Kreuzkontaminationen über diese verursachen können. Ein weiterer Punkt, der zu dem gezeigten Bild führen könnte ist, dass das Desinfektionsmittel über den gesamten Produktionstag auf die Oberflächen gesprüht wurde. Dadurch könnte sowohl kontinuierlich eine leichte Reduktion der Mikroorganismen stattgefunden haben, als auch ein Ansammeln oder Stapeln über den Tag hinweg reduziert worden sein. Ein eventueller Stapeleffekt und damit eine Kontamination folgender Karkassen kann dadurch reduziert und somit Fleisch mit geringerer Ausgangsbelastung produziert werden. Den gleichen Effekt kann das kontinuierliche Aufbringen einer Desinfektionsmittellösung im Bereich der Zerlegung haben.

Eine vergleichbare Reduktion der Mikroorganismen konnte durch die Verwendung einer PES mit 750 ppm bei der Reinigung eines Schlachthofes nachgewiesen werden. Rodrigues et al. (2018) untersuchten den Effekt verschiedener Desinfektionsmittel während einer Reinigung und Desinfektion am Ende eines Prozesstages in einem Schlachthof. Sie wiesen eine Reduktion der aeroben mesophilen Keimzahl von ca. 4 log je Flächeneinheit nach. Allerdings konnte hierbei das Desinfektionsmittel 15 Minuten einwirken (Rodrigues et al. 2018).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass es zu einer signifikanten Reduktion der untersuchten Mikroorganismen auf den Oberflächen im Bereich der Schlachtung während der Verwendung des Desinfektionsmittels kam, wobei nicht abschließend geklärt wurde, ob es sich um eine desinfizierende oder reinigende Wirkung durch den mechanischen Spüleffekt handelte.

Einfluss modifizierte Atmosphären auf ESBL-bildenden *E. coli*

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss verschiedener modifizierter Atmosphären auf *E. coli* 10714 untersucht. Modifizierte Atmosphären in Fertigverpackungen setzen sich überwiegend aus den Gasen Sauerstoff (O₂), Kohlenstoffdioxid (CO₂) und Stickstoff (N₂) zusammen (Floros und Matsos 2005). Besonderes Augenmerk sollte hierbei auf die mögliche Reduktion der Zellzahl des Teststammes durch die Anwesenheit der Atmosphären gelegt werden. Hierzu wurde mit *E. coli* 10714 inokuliertes Hähnchenfleisch in Gegenwart von drei verschiedenen modifizierten Atmosphären verpackt und 7 Tage bei 3 °C gelagert. Als Vergleichsatmosphäre diente hierbei atmosphärische Luft. Eine der drei gewählten modifizierten Atmosphären ähnelte solchen, die aktuell in Geflügelfleischverpackungen verwendet werden. Diese bestand aus 75 % O₂ + 25 % CO₂ (im Folgenden abgekürzt als O₂-reiche Atmosphäre bezeichnet). In der industriellen Verpackung übliche Atmosphären setzen sich zu 70 - 80 % aus O₂ und ergänzend CO₂ zusammen (Dansensor 2018; Air Products 2015). Einer Publikation von Al-Nehlawiet al. (2013) konnte eine Gaszusammensetzung mit 70 % CO₂ + 15 % O₂ + 15 % N₂ (im Folgenden abgekürzt als CO₂-reiche Atmosphäre bezeichnet) entnommen werden (Al-Nehlawi et al. 2013). Außerdem wurde als dritte Variante der Einfluss reinen Stickstoffes (im Folgenden abgekürzt als N₂-Atmosphäre bezeichnet) auf den Teststamm untersucht.

Es zeigte sich, dass bei einem Verhältnis von Verpackungsvolumen zu Fleischeinwaage (600 g), wie es in der industriellen Verpackung üblich ist, mit den in den Untersuchungen verwendete Atmosphären eine Reduktion des *E. coli* 10714 um maximal 0,3 log erreicht werden konnte. Diese Reduktion war in Gegenwart der O₂-reichen Atmosphäre zu

verzeichnen und nicht signifikant stärker ausgeprägt, als in Gegenwart der weiteren verwendeten Atmosphären inklusive Luft.

Um zu prüfen, ob eine vergrößertes Gasvolumen einen gesteigerten Effekt auf den Teststamm hat, wurde die Einwaage bei beibehaltenem Packungsvolumen auf 20 % (120 g) reduziert, während alle weiteren Parameter unverändert blieben. Hierbei zeigte sich, dass das Gasvolumen keinen Einfluss auf *E. coli* 10714 hatte.

Einfluss modifizierte Atmosphären auf weitere mikrobiologische Parameter

Bei zusätzlichen Untersuchungen wurde der Einfluss der Atmosphären und des vergrößerten Gasvolumens in der Verpackung auf die Aerobe Mesophile Keimzahl (TAB), Enterobacteriaceae und *Pseudomonas* spp. untersucht. Hierbei zeigte sich, dass diese Mikroorganismen sich in Gegenwart von atmosphärischer Luft am stärksten vermehrten. In Gegenwart von O₂ und CO₂ vermehrten sich die TAB und die Enterobacteriaceae am langsamsten, während *Pseudomonas* spp. sich in Gegenwart von CO₂ am langsamsten vermehrten. Einen vergleichbaren Einfluss zeigten auch die Untersuchungen von Bingol und Ergun (2011), bei deren Untersuchungen eine sauerstoffreiche Atmosphäre ebenfalls die Vermehrung von TAB und *Pseudomonas* spp. verlangsamen konnte (Bingol und Ergun 2011). Dieser Effekt wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Reduzierung der Einwaage teilweise signifikant verstärkt. Hierbei hatte die CO₂-reiche Atmosphäre (70 % CO₂ + 15 % O₂ + 15 % N₂) den stärksten vermehrungsinhibierenden Effekt auf TAB, Enterobacteriaceae und *Pseudomonas* spp.. Auch bei Bingol und Ergun (2011) hatte eine Reduktion der Einwaage bei gleichem Verpackungsvolumen eine reduzierte Vermehrung der untersuchten Mikroorganismengruppen zur Folge.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen somit keinen signifikanten Effekt auf den untersuchten *E. coli* 10714, deuten jedoch darauf hin, dass mit einer reduzierten Einwaage bei gleichbleibender Verpackungsgröße und der Verwendung einer CO₂ -reichen Atmosphäre die mikrobiologische Haltbarkeit von Geflügelfleisch verlängert werden kann.

Einfluss modifizierte Atmosphären auf Farbe und pH-Wert

Weitere in den Untersuchungen aufgezeichnete Parameter waren der pH-Wert und die Farbe (L*a*b*) des Fleisches. Bei diesen Parametern konnten nach siebentägiger Inkubation teilweise signifikante Unterschiede gemessen werden. Jedoch zeigten sich diese Unterschiede bereits teilweise am Tag der Verpackung. Die Mediane der Farbwerte lagen

nach 7 Tagen Inkubation bis auf wenige Ausnahmen innerhalb der Spannbreiten, der am Tag der Verpackung ermittelten Ausgangswerte (s. Tabelle 8).

Tabelle 8: Farbwerte L*a*b* am Tag der Verpackung und nach siebentägiger Inkubation in Gegenwart der jeweiligen modifizierten Atmosphäre

Farbe	Reguläre Einwaage		Reduzierte Einwaage	
	Min. - Max.	Median	Min. - Max.	Median
Tag 0	L*: 62,1 - 70,8 a*: 10,5 - 14,6 b*: 4,8 - 11,7	L*: 66,5 a*: 13,0 b*: 7,9	L*: 55,8 - 61,6 a*: 12,6 - 16,3 b*: 9,0 - 13,0	L*: 59,6 a*: 13,5 b*: 11,2
Tag 7 Luft	L*: 66,6 - 73,3 a*: 9,2 - 13,0 b*: 9,0 - 13,7	L*: 68,4 a*: 11,2 b*: 11,3	L*: 56,5 - 64,7 a*: 8,0 - 15,5 b*: 10,7 - 13,9	L*: 59,8 a*: 12,7 b*: 13,3
Tag 7 O ₂ -reiche Atmosphäre	L*: 63,6 - 73,5 a*: 9,5 - 13,0 b*: 10,4 - 14,6	L*: 69,7 a*: 11,8 b*: 12,9	L*: 58,2 - 62,2 a*: 13,6 - 17,6 b*: 8,2 - 17,1	L*: 60,5 a*: 13,8 b*: 15,8
Tag 7 CO ₂ -reiche Atmosphäre	L*: 64,3 - 70,0 a*: 10,2 - 13,7 b*: 5,12 - 11,26	L*: 66,9 a*: 11,3 b*: 9,8	L*: 59,4 - 64,7 a*: 8,5 - 10,8 b*: 13,6 - 17,1	L*: 61,3 a*: 9,8 b*: 15,5
Tag 7 N ₂ -Atmosphäre	L*: 62,0 - 66,6 a*: 13,2 - 14,8 b*: 5,8 - 9,1	L*: 64,6 a*: 13,9 b*: 6,4	L*: 57,8 - 60,3 a*: 12,3 - 16,0 b*: 8,7 - 13,3	L*: 58,9 a*: 14,1 b*: 11,4

Tag 0: Tag der Verpackung; Tag 7: nach siebentägiger Inkubation; in Gegenwart des jeweiligen Gases

Zu beachten ist hierbei jedoch, dass der Einfluss auf die Sensorik in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde. Außerdem kam es durch die Zehrung von CO₂ zu einem Kollaps der Verpackungen, der jedoch bei der niedrigeren Einwaage deutlich geringer ausgeprägt war. Dieser Kollaps lässt sich durch einen leichten Überdruck bei der Verpackung oder durch eine kurzzeitige Lagerung des Fleisches in einer CO₂-reichen Atmosphäre vor der Verpackung reduzieren (Al-Nehlawi et al. 2013).

Schlussfolgerung

Die Ergebnisse, die in beiden Arbeiten gesammelt werden konnten zeigen, dass der ESBL-bildende *E. coli* 10714 weder während der Zerlegung auf den führenden Oberflächen durch Desinfektionsmittel noch in der Verpackung auf dem Fleisch unter den getesteten Bedingungen reduziert werden konnte. Jedoch zeigen die weiteren mikrobiologischen Parameter, TAB und Enterobacteriaceae im Bereich der Schlachtung und TAB, *Pseudomonas* spp. und Enterobacteriaceae in Gegenwart der modifizierten Atmosphären, dass durchaus das Potenzial besteht, geringfügiger kontaminiertes Fleisch zu produzieren und zusätzlich dessen Haltbarkeit weiter zu verlängern.

Kapitel 5: Zusammenfassung/Summary

Entwicklung von Maßnahmen zur Verringerung der Kreuzkontamination mit ESBL-bildenden *E. coli* im Rahmen der Zerlegung und Verpackung von Mastgeflügel

Bei *E. coli* handelt es sich in erster Linie um ein kommensales Darmbakterium, das in warmblütigen aber auch in wechselwarmen Tieren zu finden ist. Daher dient dieser zu den Enterobacteriaceae zählende Mikroorganismus in der Regel als Indikatorkeim für fäkale Kontamination von Wässern aber auch Lebensmittel. Neben den kommensalen, von denen keine gesundheitliche Gefahr ausgeht, gibt es auch pathogene Vertreter, die gesundheitliche Schäden verursachen können. Zu diesen zählen zum Beispiel Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) oder Enterotoxische *E. coli* (ETEC).

In den vergangenen Jahren rückten antibiotikaresistente Enterobacteriaceae immer mehr ins Rampenlicht. Wichtige Vertreter sind hierbei die ESBL- und AmpC-bildenden *E. coli*. Diese produzieren bestimmte Enzyme, die dazu in der Lage sind, die Wirkung von Cephalosporinen der dritten und vierten Generation zu reduzieren oder gar zu inhibieren.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des EsRAM-Projektes (Entwicklung stufenübergreifender Reduktionsmaßnahmen für Antibiotikaresistente Erreger beim Mastgeflügel) angefertigt. In diesem Projekt ging es darum, die Belastung von Geflügelfleisch mit antibiotikaresistenten Erregern zu reduzieren. Hierbei werden Verfahren entlang der gesamten geflügelfleischproduzierenden Kette geprüft, beginnend mit der Bruteihygiene, über die Mast, Haltung, Transport, Schlachtung, Zerlegung und Verpackung. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst geprüft, ob eine kurzzeitige Desinfektion dazu in der Lage ist, Kreuzkontaminationen während der Zerlegung zu reduzieren und ob modified atmosphere packaging (MAP) das Potential hat, die Belastung ESBL-bildender *E. coli* auf verpacktem Hähnchenfleisch zu reduzieren.

Für die Prüfung der Effektivität einer Kurzzeit-Desinfektion wurde eine Methodik in Anlehnung an die Prüfrichtlinien der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft entwickelt, mit der praxisnahe Einwirkzeiten, Temperaturen und Oberflächenkonditionen im Labor reproduziert werden sollten. Im Ergebnis der Untersuchungen konnte die Dynamik, mit der die zur Untersuchung verwendeten Desinfektionsmittel die Mikroorganismen abtöten, dargestellt werden. Mit zunehmender Einwirkzeit (untersuchte Zeiten: 5, 30 und 60 Sekunden) zeigte sich ein deutlicher Anstieg der bakteriziden Wirkung der Desinfektionsmittel, wobei 5 Sekunden bereits eine lange Einwirkzeit, verglichen mit denen in der Praxis, darstellt. Allerdings zeigten sich relevante und auch signifikante Reduktionen der in den Untersuchungen verwendeten Mikroorganismen erst nach 30 Sekunden bei

Desinfektionsmittelkonzentrationen, die wahrscheinlich unwirtschaftlich sind, aber vor allem nicht hinsichtlich der Arbeitssicherheit vertretbar sind.

Um die Wirkung modifizierter Atmosphären auf ESBL-bildende *E. coli* auf Hähnchenfleisch zu untersuchen, wurde schlachtfrisches Fleisch mit einem Teststamm inokuliert und in Gegenwart atmosphärischer Luft, einer sauerstoffreichen, einer kohlenstoffdioxidreichen und einer ausschließlich stickstoffhaltigen Atmosphäre verpackt und 7 Tage bei 3 °C gelagert. Die sauerstoffreiche Atmosphäre entspricht in ihrer Zusammensetzung in etwa der in der Industrie zur Verpackung von Hähnchenfleisch verwendeten Atmosphären. Es zeigte sich keine signifikante Reduktion des Teststammes, im Vergleich des Einflusses der einzelnen Atmosphären. Um zu prüfen, ob ein erhöhter Gasanteil einen anderen Effekt induziert, wurde weniger Produkt in gleichgroßen Packungen gelagert. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Einfluss durch die Atmosphären. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde zusätzlich der Einfluss auf die Gesamtkeimzahl, *Pseudomonas* spp. und Enterobacteriaceae, die als Kontamination während der Schlachtung und Zerlegung auf das Fleisch gelangten, untersucht. Hierbei zeigten sich deutliche Einflüsse der Atmosphären auf die Entwicklung der Mikroorganismen. Die sauerstoffreiche und die kohlenstoffdioxidreiche Atmosphäre konnten die Vermehrung während der Lagerung im Vergleich zur Lagerung in Gegenwart der beiden anderen Atmosphären signifikant reduzieren. Am effektivsten war hierbei die kohlenstoffdioxidreiche Atmosphäre. Verstärkt wurde dieser Effekt durch die Vergrößerung der Gasvolumina. Somit ist zu diesen Versuchen zu sagen, dass sowohl die Verwendung der kohlenstoffdioxidreichen Atmosphäre als auch eine reduzierte Fleischeinwaage bei gleicher Verpackungsgröße den mikrobiologischen Verderb von Hähnchenfleisch verzögern können.

Development of methods to reduce cross-contamination with ESBL-producing *E. coli* during the cutting and packaging of fattening poultry

E. coli is primarily a commensal intestinal bacterium that is found as well in warm-blooded as in poikilotherm animals. Therefore, this to the Enterobacteriaceae belonging microorganism is usually used as an indicator germ for fecal contamination of water and food. Beside the commensal *E. coli*, which pose no health hazard, there are also pathogenic agents that can cause infections. Examples for these pathogene *E. coli* are enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) or enterotoxigenic *E. coli* (ETEC).

In the recent years, antibiotic resistant Enterobacteriaceae became more and more important in human medicine. Important agents are ESBL- and AmpC-producing *E. coli*. These bacteria produce certain enzymes that are able to reduce or even inhibit the effectiveness of cephalosporins of the third and fourth generation.

The presented research was part of the EsRAM project ("Development of measures for reduction of antibiotic resistant bacteria along the entire poultry production chain"). The aim of the project is to reduce the amount of antibiotic resistant pathogens on poultry meat. Therefore, methods along the whole poultry producing chain were tested, starting with hatching hygiene, fattening, farming methods, transport, slaughtering, cutting and packaging. First part of the present work was the examination whether a short-term disinfection is able to reduce cross-contamination during cutting. In the second part the effect of modified atmosphere packaging (MAP) to the microbiome of chicken meat was investigated and if this method has the potential to reduce the burden of ESBL-producing *E. coli* on chicken meat.

To investigate the efficacy of a short-time disinfection, a method based on the DVG Test Guidelines was developed, which should reproduce in the laboratory the conditions in slaughteries like the exposure time, temperature and surface conditions. As a result of the investigations, the disinfection dynamics against the microorganisms could be displayed. With increasing exposure time (times tested: 5, 30 and 60 seconds) a significant increase in the bactericidal effect of disinfectants was shown. However, 5 seconds reaction time, already a long exposure time in praxis, where not enough to reduce the microorganisms in a relevant and also significant amount. Just after 30 seconds treatment time with disinfectant concentrations, which are probably uneconomical and not justifiable with occupational safety, a relevant reduction of the microorganisms was observed.

To investigate the effect of modified atmosphere packaging on ESBL-producing *E. coli* on chicken meat, chicken filets were inoculated and packaged in the presence of atmospheric air, a high oxygen, a high carbon dioxide and an only nitrogen-containing atmosphere. These

samples were stored at 3 °C for 7 days. The high oxygen atmosphere corresponds in composition to the atmospheres used in industry for packaging chicken meat. There was no significant reduction of the test strain comparing the influence of the individual atmospheres. To investigate whether an increased atmosphere volume induces a different effect, less product was stored in equally sized packages. Again, there was no significant influence induced by the atmospheres. In addition, the influence of the gases on the amount of Total Aerobic Bacteria, *Pseudomonas* spp. and Enterobacteriaceae was investigated. These bacteria were part of the microbiota on the chicken meat, caused by contaminations while slaughtering and cutting. Significant influences of the atmosphere on the development of these microorganisms were observed. The high oxygen and the high carbon dioxide atmosphere were able to reduce the proliferation of the microorganisms significantly during the storage comparing the proliferation in the presence of the other two atmospheres. The highest effect was observed in presence of the high carbon dioxide atmosphere. This effect was increased by an increased gas volume. Thus, these experiments have shown that both, the use of the high carbon dioxide atmosphere and a reduced amount of meat with the same packaging size can extend the microbial shelf-life of chicken meat.

Kapitel 6: Literaturverzeichnis

Abraham E P, Chain E (1988):

An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940
Rev Infect Dis, 10, 677-678

Air Products (2015):

Freshline® MAP Gases-Poultry and Game,
Air Products GmbH, Hattingen

Al-Nehlawi A, Saldo J, Vega L F, Guri S (2013)

Effect of high carbon dioxide atmosphere packaging and soluble gas stabilization pre-treatment on the shelf-life and quality of chicken drumsticks.
Meat Sci, 94, 1-8.

Alcala L, Alonso C A, Simon C, Gonzalez-Esteban C, Oros J, Rezusta A, Ortega C, Torres C (2016):

Wild Birds, Frequent Carriers of Extended-Spectrum beta-Lactamase (ESBL) Producing *Escherichia coli* of CTX-M and SHV-12 Types.
Microb Ecol, 72, 861-869.

Alves M S, Pereira A, Araujo S M, Castro B B, Correia A C M, Henriques I (2014):

Seawater is a reservoir of mult-resistant *Escherichia coli*, including strains hosting plasmid-mediated quinolones resistance and extended-spectrum beta-lactamases genes.
Front. Microbiol., 5, doi: 10.3389/fmicb.2014.00426

Atterby C, Borjesson S, Ny S, Jarhult J D, Byfors S, and Bonnedahl J (2017):

ESBL-producing *Escherichia coli* in Swedish gulls-A case of environmental pollution from humans?
PLoS One, 12, doi: 10.1371/journal.pone.0190380

Bachiri T, Bakour S, Ladjouzi R, Thongpan L, Rolain J M, Touati A (2017):

High rates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in wild boars and Barbary macaques in Algeria.
J Glob Antimicrob Resist, 8, 35-40.

Baez J, Hernandez-Garcia M, Guamparito C, Diaz S, Olave A, Guerrero K, Canton R, Baquero F, Gahona J, Valenzuela N, del Campo R, Silva J (2015):

Molecular Characterization and Genetic Diversity of ESBL-Producing *Escherichia coli* Colonizing the Migratory Franklin's Gulls (*Leucophaeus pipixcan*) in Antofagasta, North of Chile.

Microb Drug Resist, 21, 111-116.

Bentley R, and Meganathan R (1982):

Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria.

Microbiol Rev, 46, 241-280.

BfR (2011):

ESBL-bildende Bakterien in Lebensmitteln und deren Übertragbarkeit auf den Menschen.

Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

BfR (2015):

Fragen und Antworten zu ESBL- und/oder AmpC-bildenden antibiotikaresistenten Keimen.

Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

BfR (2017):

Schutz vor Lebensmittelinfektionen im Privathaushalt.

Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

BfR (2018):

Kleine Fehler, fatale Folgen: Warum Küchenhygiene nicht nur in Kantine und Restaurant, sondern auch zu Hause wichtig ist.

Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

Bingol E B, Ergun O (2011):

Effects of modified atmosphere packaging (MAP) on the microbiological quality and shelf life of ostrich meat.

Meat Sci, 88, 774-785.

Blaak H, Hamidjaja R A, van Hoek A H A M, de Heer L, Husman A M D, Schets F M (2014):

Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* on Flies at Poultry Farms.

Appl Environ Microbiol, 80, 239-246.

Blaak H, van Hoek A H A M, Hamidjaja R A, van der Plaats R Q J, Kerkhof-de Heer L, Husman A M D, Schets F M (2015):

Distribution, Numbers, and Diversity of ESBL-Producing *E. coli* in the Poultry Farm Environment

PLoS One, 10, doi: 10.1371/journal.pone.0135402

Boisen, N , Krogfelt K A , Nataro J P (2013):

Escherichia coli: Pathotypes and Principles of Pathogenesis.

Academic Press: London, UK, 2nd edition, Chapter 8, 247-273.

Bonnedahl J, Stedt J, Waldenstrom J, Svensson L, Drobni M, Olsen B (2015):

Comparison of Extended-Spectrum beta-Lactamase (ESBL) CTX-M Genotypes in Franklin Gulls from Canada and Chile.

PLoS One, 10, doi: 10.1371/journal.pone.0141315

Bourgeois A L, Wierzba T F, Walker R I (2016):

Status of vaccine research and development for enterotoxigenic *Escherichia coli*

Vaccine, 34, 2880-2886.

Brahmi S, Dunyach-Remy C, Touati A, and Lavigne J P(2015):

CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone O25b-ST131 isolated from wild fish in Mediterranean Sea.

Clin Microbiol Infect, 21, doi: 10.1016/j.cmi.2014.09.019

Brenner D J, Krieg N R, Staley J R, Garrity G (2005):

The Proteobacteria, The Gammaproteobacteria.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Springer: USA, ISBN 978-0-387-24144-9

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) (2017):

Zoonosen-Monitoring 2016.

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Berlin

Canton R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque T M (2008):

Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe.

Clin Microbiol Infect, 14, 144-153.

Chaudhury A, Nath G, Tikoo A, Sanyal S C (1999)

Enteropathogenicity and antimicrobial susceptibility of new *Escherichia* spp.

J Diarrhoeal Dis Res, 17, 85-87.

Chen P A, Hung C H, Huang P C, Chen J R, Huang I F, Chen W L, Chiou Y H, Hung W Y, Wang J L, Cheng M F (2016):

Characteristics of CTX-M Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Multiple Rivers in Southern Taiwan.

Appl Environ Microbiol, 82, 1889-1897.

Cullik A, Pfeifer Y, Prager R, von Baum H, Witte W (2010):

A novel IS26 structure surrounds bla(CTX-M) genes in different plasmids from German clinical *Escherichia coli* isolates.

J Med Microbiol, 59, 580-587.

Dansensor (2018):

A Guide to MAP Gas Mixtures.

AMETEK GmbH, Neuwied

Darnton N C, Turner L, Rojevsky S, Berg H C (2007)

On torque and tumbling in swimming *Escherichia coli*.

J Bacteriol, 189, 1756-1764.

DebRoy C, Fratamico P M, Yan X, Baranzoni G, Liu Y, Needleman D S, Tebbs R, O'Connell C D, Allred A, Swimley M, Mwangi M, Kapur V, Raygoza Garay J A, Roberts E L, Katani R (2016):

Comparison of O-Antigen Gene Clusters of All O-Serogroups of *Escherichia coli* and Proposal for Adopting a New Nomenclature for O-Typing

PLoS One, 11, e0147434

DIN EN 13697:2015-06 (2015):

Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –Quantitativer Oberflächen-Versuch nicht poröser Oberflächen zur Bestimmung der bakteriziden und/oder fungiziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen – Prüfverfahren und Anforderungen ohne mechanische Behandlung (Phase 2, Stufe 2).

Beuth Verlag, doi: 10.31030/3054767

Donnenberg M S (2002):

Escherichia coli: Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen.

Elsevier Ltd: UK, Academic Press, ISBN: 0-12-220751-3

DVG-Prüfrichtlinien (2007):

Methodenbeschreibung; VII - IX Lebensmittelbereich, Stand 17.02.2013

Abgerufen am 29.10.2018 um 19:00 Uhr, von http://www.desinfektion-dvg.de/fileadmin/FG_Desinfektion/Dokumente/Fuer_Gutachter/Pruefrichtlinien/7-RL-LM-gesamt-2013-02-17-aktuell.pdf

DVG (2019):

Liste der nach den Richtlinien der DVG (4. Auflage) geprüften und als wirksam befundenen Desinfektionsmittel (Handelspräparate, ohne Ausbringungsverfahren) für den Lebensmittelbereich.

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, Abgerufen am 14.04.2019 um 22:10 Uhr, von <http://www.desinfektion-dvg.de/index.php?id=2034>

Escherich T (1989):

The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. 1885.

Rev Infect Dis, 11, 352-356.

European Centre for Disease Prevention and Control (2010):

Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net).

Stockholm: ECDC, ISBN: 978-92-9193-227-6, doi: 10.2900/35994

European Centre for Disease Prevention and Control (2014):

Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net).

Stockholm: ECDC, ISBN: 978-92-9193-603-8, doi: 10.2900/3977

European Centre for Disease Prevention and Control (2017):

Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net).

Stockholm: ECDC, ISBN: 978-92-9498-029-8, doi: 10.2900/6928

European Centre for Disease Prevention and Control (2018a):

Antimicrobial consumption 2015. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2015; Downloadable tables.

Stockholm: ECDC, Abgerufen am 02.02.2019 um 20:35 Uhr, von <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/downloadable-tables-antimicrobial-consumption-annual-epidemiological-report-2015>

European Centre for Disease Prevention and Control (2018b):

Antimicrobial consumption 2017. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017; Downloadable tables.

Stockholm: ECDC, Abgerufen am 02.02.2019 um 21:40 Uhr von <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/downloadable-tables-antimicrobial-consumption-annual-epidemiological-report-2017>

European Centre for Disease Prevention and Control (2018c):

Surveillance of antimicrobial resistance in Europe – Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017

Stockholm: ECDC, ISBN: 978-92-9498-279-7, doi: 10.2900/230516

European Centre for Disease Prevention and Control (2019a):

Antimicrobial consumption in the EU/EEA, annual epidemiological report for 2018.

Stockholm: ECDC. Abgerufen am 04.01.2020 um 19:05 Uhr, von <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Antimicrobial-consumption-EU-EEA.pdf>

European Centre for Disease Prevention and Control (2019b):

Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018.

Stockholm: ECDC, ISBN: 978-92-9498-387-9, doi: 10.2900/22212

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (2011):

The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2009.

EFSA Journal 2011, 9(7):2154, 321 pp., doi: 10.2903/j.efsa.2011.2154

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (2012):

The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010.

EFSA Journal 2012, 10(3):2598, 233 pp., doi: 10.2903/j.efsa.2012.2598

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (2013):

The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011.

EFSA Journal 2013, 11(5):3196, 359 pp., doi: 10.2903/j.efsa.2013.3196

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (2014):

The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2012.

EFSA Journal 2014, 12(3):3590, 336 pp., doi: 10.2903/j.efsa.2014.3590

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (2015):

EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013.

EFSA Journal 2015, 13(2):4036, 178 pp., doi: 10.2903/j.efsa.2015.4036

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (2016):

The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014.

EFSA Journal 2016, 14(2):4380, 207 pp. doi: 10.2903/j.efsa.2016.4380

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (2017):

The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015.

EFSA Journal 2017, 15(2):4694, 212 pp. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4694

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (2018):

The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016.

EFSA Journal 2018, 16 (2):5182, 270 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5182>

Facey S J, Kuhn A (2004):

Membrane integration of *E. coli* model membrane proteins-
Biochim Biophys Acta, 1694, 55-66.

Ferens W A, Hovde C J (2011):

'*Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection',
Foodborne Pathog Dis, 8, 465-487.

Floros J D, Matsos K I (2005):

10 Introduction to modified atmosphere packaging.

Innovations in Food Packaging, Jung H. Han, S. 159-172, 1. Auflage

Academic Press, doi: 10.1016/B978-012311632-1/50042-5

Fotadar U, Zaveloff P, Terracio L (2005):

Growth of *Escherichia coli* at elevated temperatures.

J Basic Microbiol, 45, 403-404.

Franz E, Veenman C, van Hoek A H A M, Husman A D, and Blaak H (2015):

Pathogenic *Escherichia coli* producing Extended-Spectrum beta-Lactamases isolated from surface water and wastewater.

Scientific Reports, 5, doi: 10.1038/srep14372

Frei H H, Löscher W (2002):

Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin.

MVS Medizinverlage Stuttgart; 2., Aufl., ISBN: 978-3830410706

Gekenidis M T, Qi W H, Hummerjohann J, Zbinden R, Walsh F, Drissner D (2018):

Antibiotic-resistant indicator bacteria in irrigation water: High prevalence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli*.

PLoS One, 13, doi: 10.1371/journal.pone.0207857

Gordon D M, Cowling A (2003):

The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects.

Microbiology, 149, 3575-3586.

Guenther S, Aschenbrenner K, Stamm I, Bethe A, Semmler T, Stubbe A, Stubbe M, Batsajkhan N, Glupczynski Y, Wieler L H, and Ewers C (2012):

Comparable High Rates of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Birds of Prey from Germany and Mongolia.

PLoS One, 7, doi: 10.1371/journal.pone.0053039

Guentzel M N (1996):

Escherichia, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, and *Proteus*.

Medical Microbiology, S. Baron (ed.), 4th Edition, University of Texas Medical Branch at Galveston: Galveston (TX)

Hahn H, Falke D, Kaufmann S H E, Ullmann U (2001):

1 Bakterien: Definition und Morphologie, 1.2 Aufbau; Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie.

Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, 4. Auflage, S. 177-180, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York

Haller D, Serrant P, Peruisseau G, Bode C, Hammes W P, Schiffrin E, Blum S (2002):

IL-10 producing CD14^{low} monocytes inhibit lymphocyte-dependent activation of intestinal epithelial cells by commensal bacteria.

Microbiol Immunol, 46, 195-205.

Hartland E L, and Leong J M (2013):

Enteropathogenic and enterohemorrhagic *E. coli*: ecology, pathogenesis, and evolution.

Front Cell Infect Microbiol, 3, doi: 10.3389/fcimb.2013.00015

Ho P L, Lo W U, Lai E L, Law P Y, Leung S M, Wang Y, Chow K H (2015):

Clonal diversity of CTX-M-producing, multidrug-resistant *Escherichia coli* from rodents.

J Med Microbiol, 64, 185-190.

Holden N J, Wright F, Mackenzie K, Marshall J, Mitchell S, Mahajan A, Wheatley R, Daniell T J (2014):

Prevalence and diversity of *Escherichia coli* isolated from a barley trial supplemented with bulky organic soil amendments: green compost and bovine slurry.

Lett Appl Microbiol, 58, 205-212.

Hudault S, Guignot J, Servin A L (2001):

Escherichia coli strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection.

Gut, 49, 47-55.

IHO (2019):

Desinfektionsmittelliste Lebensmittelherstellung.

Industrieverband Hygiene und Oberflächenschutz. Abgerufen am 14.04.2019, um 19:15 Uhr, von <https://lebensmittel.desinfektionsmittelliste.de/Home/Produktliste/1>

Ishii S, Ksoll W B, Hicks R E, Sadowsky M J (2006):

Presence and growth of naturalized *Escherichia coli* in temperate soils from lake superior watersheds.

Appl Environ Microbiol, 72, 612-621.

Jamborova I, Dolejska M, Vojtech J, Guenther S, Uricariu R, Drozdowska J, Papousek I, Pasekova K, Meissner W, Hordowski J, Cizek A, Literak I (2015):

Plasmid-Mediated Resistance to Cephalosporins and Fluoroquinolones in Various *Escherichia coli* Sequence Types Isolated from Rooks Wintering in Europe.

Appl Environ Microbiol, 81, 648-657.

Jones T, Gill C O, McMullen L M (2004):

The behaviour of log phase *Escherichia coli* at temperatures that fluctuate about the minimum for growth.

Lett Appl Microbiol, 39, 296-300.

Julião T A, Cortezi A M, Rossi G A M, D'Abreu L F, Balieiro J C C, Vidal A M C (2018):

Influence of the cleaning system of conveyor belts on microbiological quality of poultry meat.

Arq Bras Med Vet Zootec, 70, 1325-1332.

Kamionka M (2011):

Engineering of therapeutic proteins production in *Escherichia coli*.

Curr Pharm Biotechnol, 12, 268-274.

Kaper J B, Nataro J P, Mobley H L (2004):

Pathogenic *Escherichia coli*.

Nat Rev Microbiol, 2, 123-140.

Kluytmans J A J W, Overdeest I T M A, Willemsen I, Kluytmans-van den Bergh M F Q, van der Zwaluw K, Heck M, Rijnsburger M, Vandenbroucke-Grauls C M J E, Savelkoul P H M, Johnston B D, Gordon D, Johnson J R (2013):

Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* From Retail Chicken Meat and Humans: Comparison of Strains, Plasmids, Resistance Genes, and Virulence Factors.

Clin Infect Dis, 56, 478-487.

Krämer J (2011):

Lebensmittelvergiftung, Enterobacteriaceae; Lebensmittel-Mikrobiologie.

6. Auflage, Eugen Ulmer, Stuttgart, ISBN: 978-3-8252-3607-6, S. 50-51

Lan R, Alles M C, Donohoe K, Martinez M B, Reeves P R (2004):

Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp.

Infect Immun, 72, 5080-5088.

Leatham M P, Banerjee S, Autieri S M, Mercado-Lubo R, Conway T, Cohen P S (2009):
Precolonized human commensal *Escherichia coli* strains serve as a barrier to *E. coli*
O157:H7 growth in the streptomycin-treated mouse intestine.
Infect Immun, 77, 2876-2886.

Leonard A F C, Zhang L H, Balfour A J, Garside R, Hawkey P M, Murray A K, Ukoumunne O
C, Gaze W H (2018):
Exposure to and colonisation by antibiotic-resistant *E. coli* in UK coastal water users:
Environmental surveillance, exposure assessment, and epidemiological study (Beach Bum
Survey).
Environ Int, 114, 326-333.

Livermore, D M (1995):
beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance.
Clin Microbiol Rev, 8, 557-84

Madigan M, Martinko J (2006):
Brock Biology of Microorganisms.
11. Auflage, Pearson Prentice Hall, Lebanon, Indiana, U.S.A., ISBN: 9780131443297

McLellan, S L (2004):
Genetic diversity of *Escherichia coli* isolated from urban rivers and beach water.
Appl Environ Microbiol, 70, 4658-4665

Mohsin M, Raza S, Schaufler K, Roschanski N, Sarwar F, Semmler T, Schierack P,
Guenther S (2017):
High Prevalence of CTX-M-15-Type ESBL-Producing *E. coli* from Migratory Avian Species in
Pakistan.
Front Microbiol, 8, doi: 10.3389/fmicb.2017.02476

Moulin-Schouleur M, Reperant M, Laurent S, Bree A, Mignon-Grasteau S, Germon P,
Rasschaert D, Schouler C (2007): Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian
and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns.
J Clin Microbiol, 45, 3366-3376.

Nataro J P, Kaper J B (1998):
Diarrheagenic *Escherichia coli*.
Clin Microbiol Rev, 11, 142-201.

Nataro J P, Steiner T, Guerrant R L (1998):

Enteroaggregative *Escherichia coli*.

Emerg Infect Dis, 4: 251-261.

Ochoa-Reparaz J, Mielcarz D W, Begum-Haque S, Kasper L H (2011):

Gut, bugs, and brain: role of commensal bacteria in the control of central nervous system disease.

Ann Neurol, 69, 240-247.

Palaniappan C, Sharma V, Hudspeth M E, Meganathan R (1992):

Menaquinone (vitamin K2) biosynthesis: evidence that the *Escherichia coli* menD gene encodes both 2-succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadiene-1-carboxylic acid synthase and alpha-ketoglutarate decarboxylase activities.

J Bacteriol, 174, 8111-8118.

Poeta P, Radhouani H., Pinto L, Martinho A, Rego V, Rodrigues R, Goncalves A, Rodrigues J, Estepa V, Torres C, Igrejas G (2009):

Wild boars as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of different phylogenetic groups.

J Basic Microbiol, 49, 584-588.

Prager R, Strutz U, Fruth A, Tschape H (2003):

Subtyping of pathogenic *Escherichia coli* strains using flagellar (H)-antigens: serotyping versus fliC polymorphisms.

Int J Med Microbiol, 292, 477-486.

Radhouani H, Igrejas G, Goncalves A, Estepa V, Sargo R, Torres C, and Poeta P (2013):

Molecular characterization of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from red foxes in Portugal.

Arch Microbiol, 195, 141-144.

Rashid, M, Rakib M M, and B Hasan (2015):

Antimicrobial-resistant and ESBL-producing *Escherichia coli* in different ecological niches in Bangladesh.

Infect Ecol Epidemiol, 5, doi: 10.3402/iee.v5.26712

Renwick M J, Simpkin V, Mossialos E (2016):

Targeting innovation in antibiotic drug discovery and development.

The need for a One Health – One Europe – One World Framework. Copenhagen: WHO, World Health Organization, ISBN: 978 92 890 5040 1

RKI (2019a):

Robert Koch-Institut: Cefepim ambulante Versorgung, ARS, <https://ars.rki.de>, Datenstand: 23.08.2019

RKI (2019b):

Robert Koch-Institut: Cefepim stationäre Versorgung, ARS, <https://ars.rki.de>, Datenstand: 23.08.2019

RKI (2019c):

Robert Koch-Institut: Cefotaxim ambulante Versorgung, ARS, <https://ars.rki.de>, Datenstand: 23.08.2019

RKI (2019d):

Robert Koch-Institut: Cefotaxim stationäre Versorgung, ARS, <https://ars.rki.de>, Datenstand: 23.08.2019

RKI (2019e):

Robert Koch-Institut: Ceftazidim ambulante Versorgung, ARS, <https://ars.rki.de>, Datenstand: 23.08.2019

RKI (2019f):

Robert Koch-Institut: Ceftazidim stationäre Versorgung ARS, <https://ars.rki.de>, Datenstand: 23.08.2019

RKI (2019g)

Robert Koch-Institut: Cefuroxim ambulante Versorgung, ARS, <https://ars.rki.de>, Datenstand: 23.08.2019

RKI (2019h):

Robert Koch-Institut: Cefuroxim stationäre Versorgung, ARS, <https://ars.rki.de>, Datenstand: 23.08.2019

Rodrigues L B, dos Santos L R , Rizzo N N, Ferreira D, de Oliveira A P, Levandowski R, Webber B, do Nascimento V P: (2018):

ATP-Bioluminescence and Conventional Microbiology for Hygiene Evaluation of Cutting Room Surfaces in Poultry Slaughterhouse.

Acta Sci Vet, 46, doi: 10.22456/1679-9216.81882

Rolle M , Mayr A (2007):

Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.

MVS Medizinverlage Stuttgart, ISBN: 3830410603

Rudolph B, Gebendorfer K M, Buchner J, Winter J (2010):

Evolution of *Escherichia coli* for growth at high temperatures.

J Biol Chem, 285, 19029-19034.

Schierack P, Romer A, Jores J, Kaspar H, Guenther S, Filter M, Eichberg J, Wieler L H (2009):

Isolation and characterization of intestinal *Escherichia coli* clones from wild boars in Germany.

Appl Environ Microbiol, 75, 695-702.

Schlegel H G (2007):

Allgemeine Mikrobiologie.

S. 9, 8. Auflage, Thieme, Stuttgart, ISBN 3-13-444608-1

Sherman P M, Johnson-Henry K C, Yeung H P, Ngo P S, Goulet J, Tompkins T A (2005):

Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements.

Infect Immun, 73, 5183-51888.

Simon, C , Stille B (1993):

Antibiotikatherapie in Klinik und Praxis.

8. Auflage, Schattauer, Stuttgart, ISBN: 3-7945-1549-8

Soaresa V M, Vianab C, Pereira J G, Destroc M T, Nerod L A, Bersotb L d S, and Pinto J P d A N (2018):

Absence of a continuous water spray system does not influence the microbiological contamination of the conveyor belts in chicken slaughterhouses.

LWT - Food Science and Technology, 97, 414 – 418.

Sola-Gines M, Gonzalez-Lopez J J, Cameron-Veas K, Piedra-Carrasco N, Cerda-Cuellar M, L Migura-Garcia (2015):

Houseflies (*Musca domestica*) as Vectors for Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* on Spanish Broiler Farms.

Appl Environ Microbiol, 81, 3604-3611.

Sonnenborn, U (2016):

Escherichia coli strain Nissle 1917-from bench to bedside and back: history of a special *Escherichia coli* strain with probiotic properties.

FEMS Microbiol Lett, 363, doi: 10.1093/femsle/fnw212

Tortora G J, Funke B R, Case C L (2010):

Microbiology: An Introduction

10. Auflage, Benjamin Cummings, San Francisco, ISBN: 978-0-321-55007-1

Vaidya V K (2011):

Horizontal Transfer of Antimicrobial Resistance by Extended-Spectrum beta Lactamase-Producing Enterobacteriaceae.

J Lab Physicians, 3, 37-42.

Valenza G, Nickel S, Pfeifer Y, Eller C, Krupa E, Lehner-Reindl V, Holler C(2014):

Extended-Spectrum-beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* as Intestinal Colonizers in the German Community.

Antimicrob Agents Chemother, 58, 1228-1230.

Veldman K, van Tulden P, Kant A, Testerink J, Mevius D (2013):

Characteristics of Cefotaxime-Resistant *Escherichia coli* from Wild Birds in The Netherlands.

Appl Environ Microbiol, 79, 7556-7561.

Wang J, Ma Z B, Zeng Z L, Yang X W, Huang Y, Liu J H (2017):

The role of wildlife (wild birds) in the global transmission of antimicrobial resistance genes.

Zool Res, 38, 55-80.

Weber, H (2010):

Bakterielle Lebensmittelvergiftungen; Mikrobiologie der Lebensmittel, Grundlagen

9. Auflage, S. 257, Behr's Verlag Hamburg, ISBN: 978-3-89947-447-3

WHO (2011):

World Health Organization, Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe .

World Health Organization, Copenhagen, ISBN: 978 92 890 1421 2

WHO (2014):

World Health Organization Antimicrobial resistance: global report on surveillance.

World Health Organization, Geneva. ISBN: 978 92 4 156474 8

WHO (2019):

World Health Organization, Antibiotic resistance: using a cultural contexts of health approach to address a global health crisis.

World Health Organization, Copenhagen, ISBN: 978 92 890 5394 5

Publikationsverzeichnis

Publikationen

Thomas, C., Schönknecht, A., Püning, C., Alter, T., Martin, A., Bandick, N. (2020) Effect of Peracetic Acid Solutions and Lactic Acid on Microorganisms in On-Line Reprocessing Systems for Chicken Slaughter Plants. *Journal of Food Protection* 83, 615-620

Thomas, C., Martin, A., Sachsenröder, J., Bandick, N. Effects of modified atmosphere packaging on an extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*, the microflora, and shelf life of chicken meat. *Poultry Science* 99, 7004-7014

Präsentationen

Öffentliche Präsentationen:

Präsentation der vorläufigen Ergebnisse bei der 17. Fachtagung für Fleisch- und Geflügelfleischhygiene am 06.03.2017 (Praxisnahe Desinfektionsmittelprüfung für CIP (cleaning in place) Verfahren).

Präsentation der Ergebnisse zu MAP während der 18. Fachtagung für Fleisch- und Geflügelfleischhygiene am 06.03.2018 (Auswirkungen von MAP auf ESBL-bildende *E. coli* und andere mikrobiologische Parameter).

Präsentation der Ergebnisse zu den modifizierten Atmosphären während des Kolloquiums der Abteilung 4 des Bundesinstituts für Risikobewertung am 23.10.2018 (Auswirkungen von MAP auf ESBL-bildende *E. coli* und andere mikrobiologische Parameter).

Präsentationen vor den Projektpartnern:

Am 24.11.2016 (Entwicklung einer praxisorientierten Desinfektionsmittelprüfung),

am 23.05.2017 (Untersuchungen zur keimreduzierenden Wirkung modifizierter Atmosphären),

am 08.11.2017 (Untersuchungen zur keimreduzierenden Wirkung modifizierter Atmosphären) und

am 07.06.2018 (Auswirkungen von MAP auf ESBL-bildende *E. coli* und andere mikrobiologische Parameter).

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Mentor Herrn Dr. med. vet. Niels Bandick für die Überlassung dieses lebensmittelhygienerelevanten Themas sowie die stets gewährte konstruktive und fachliche Unterstützung während der Durchführung der praktischen und theoretischen Arbeiten.

Außerdem möchte ich Herrn Prof. Dr. med. vet. Thomas Alter vom Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene der FU Berlin herzlich für die umfassende fachliche Betreuung und wissenschaftliche Unterstützung danken.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. med. vet. Uwe Rösler für die Möglichkeit der Begleitung einer Desinfektionsmittelprüfung nach DVG in den Laboren des Instituts für Tier- und Umwelthygiene der FU-Berlin.

Weiterer Dank gilt Frau Dr. Jana Sachsenröder für die Unterstützung bei der Laborarbeit und die Ideenfindungen.

Für die hervorragende statistische Betreuung bedanke ich mich bei Frau Annett Martin.

Zusätzlich bedanke ich mich bei Frau Antje Schönknecht und Herrn Christoph Püning für die Probennahmen im Schlachthof und die Durchführung der entsprechenden Untersuchungen.

Der größte Dank gilt meiner Familie: Meiner Frau Janika, die mir so oft die Zeit für zusätzliche Home-Office-Arbeiten freigeräumt hat, und unseren Kindern Eva, Mona und auch Lias, die meiner Abwesenheiten in dieser Zeit mit Nachsichtigkeit begegneten.

Finanzierungsquellen

Die Untersuchungen wurden im Rahmen des EsRAM-Projekts (Nr. 2817701014), finanziert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, durchgeführt.

Interessenkonflikt

Es besteht kein Interessenkonflikt durch finanzielle Unterstützung der Arbeiten.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Dissertation selbstständig ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Alle den benutzten Quellen wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen sind als solche einzeln kenntlich gemacht.

Berlin, 13.07.2021

Christian Thomas

