

Spridning av *E. coli* O157:H7 *gfp+* i groddningsmoduler

Spreading of *E. coli* O157:H7 *gfp+* in growing modules

Sebastian Farkas



Spridning av *E. coli* O157:H7gfp+ i groddningsmoduler

Spreading of *E. coli* O157:H7 gfp+ in growing modules

Sebastian Farkas

Handledare: Prof. Dr. Beatrix Waechter Alsanius, SLU, Institutionen för biosystem och teknologi

Btr handledare: Andrea Kosiba Held, SLU, Institutionen för biosystem och teknologi

Examinator: Lars Mogren, SLU, Institutionen för biosystem och teknologi

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: G2E

Kurstitel: Kandidatarbete i trädgårdsvetenskap

Kurskod: EX0495

Program/utbildning: Trädgårdssingenjör:odling – kandidatprogram

Utgivningsort: Alnarp

Utgivningsår: 2016

Omslagsbild: Sebastian Farkas

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: groddar, *E. coli*, sprouts, containers, modules, spreading, spridning

Sammanfattning

På grund av ökande global handel av matvaror ökar även riskerna för att få livsmedelsburna sjukdomar. En av de farligaste humanpatogenerna för människor som smittar genom livsmedel är shigatoxin-producerande *Escherichia coli* som varit i rampljuset ett antal gånger genom historien. På grund av sin låga infektiösa dos har den skapat större utbrott. Denna bakterie har många gånger förknippats med bl. a. groddar. Samtidigt har hemmaodling blivit ett större begrepp i Sverige och Norden och groddar odlas allt oftare för färskkonsumtion i diverse odlingsmoduler i hemmen. Frönas hygieniska kvalitet kan inte alltid garanteras. Detta arbete utfördes för att ta reda på om tarmsmittor sprids mellan de tre lager som finns i en typ av odlingsmodul för hemmaodling. Som modellorganism valdes en biokemisk *E. coli* O157:H7 *gfp+* och bockhornsklöverfrö (*Trigonella foenum-graecum*) som modellväxt. Studien lades upp som ett två-faktoriellt försök med två hemmaodlingsmoduler där smittade frön antingen fanns i översta eller nedersta lagret.

Ett experiment gjordes för att fastställa huruvida den skadliga patogenen *Escherichia coli* sprids mellan olika lager på odlingsmoduler gjorda för hemmaodling. Resultaten påvisade att det finns mycket stor spridning mellan lagren. Spridningsgraden var stor i båda sorters testade odlingskärl. Främst skedde spridningen nedåt från smittade groddar i toppbehållaren till groddarna i de båda nedre lagren. Det fanns även en spridning från lagren med smittade fröer i botten, uppåt.

Abstract/Summary

Since the global trading of food products is increasing, the risks of getting food borne diseases has also increased. One of the most harmful food borne human pathogens is *Escherichia coli* and has been in the spotlight several times throughout history because of its infectivity and epidemic nature of spreading. This type of bacteria has been associated with sprouts several times and has had sprouts as its vector during some of *E. coli*'s largest epidemics. At the same time home growing of sprouts has become a more common phenomenon in Sweden and the Scandinavia and sprouts are more often grown in growing modules for fresh consumption in private homes. The seeds to grow these sprouts often has their origin in countries where the sanitary aspects are not always guaranteed, and seeds may be contaminated.

An experiment was conducted to determine whether the harmful pathogen *Escherichia coli*

spreads between different layers of modules made for home growing of sprouts. The results showed that the spreading of bacteria was high between the layers. The degree of the spread was large in both kinds of tested vessels. The largest spread was in the modules with the contaminated sprouts on top, down to the sprouts in the layers underneath it. There was also a spread from the bottom container, upwards, in the modules with contaminated seeds in the bottom, but not to the same extent.

Innehåll

Inledning	6
Bakgrund.....	6
Hypoteser	7
Material och metoder	7
a. Odlingscontainrar.....	7
b. Växtmaterial.....	8
c. Mikrobiologiska medier.....	8
d. Modellorganismen och dess uppfödning.....	9
Försök	10
a. Växtanalyser	10
b. Mikrobiologiska analyser.....	10
Beräkning och statistik.....	11
Resultat	11
Vidhäftning av smittor vid groddkammarna.....	12
Spridning av <i>E. coli</i> O157:H7 <i>gfp</i> + inom modulerna.....	12
Diskussion.....	15
a. Vidhäftning av smittor vid groddkammarna.....	15
b. Förflyttning av smitta inom modulen	15
Slutsatser.....	16
Tack.....	17
Referenser	18

Inledning

Intresset för odling är stort bland människor i Sverige och enligt statistik från Jordbruksverket (2014) odlade hela 43 % av de svenska hushållen någon form av gröda för förtäring år 2012. Groddar är en av grödorna som odlas i hemmet och dessa äts oftast i rått eller delvis tillagat tillstånd i Sverige. Detta kan bli ett problem då fröer kan vara kontaminerade av bland annat humanpatogenen *Escherichia coli*.

Många gånger är informationen på fröförpackningar och i frökataloger bristfällig, gällande huruvida materialet är fritt från smitta. Istället påpekas i informationen om fröerna lämpar sig för eko-odling eller inte.

När det gäller den hälsovådliga shigatoxin-producerande typen av *E.coli* behövs mycket få bakterier för att man ska insjukna, enligt (Livsmedelsverket 2016), (10-100 stycken), då dessa bakterier enligt (John W. Foster 2004) klarar väldigt lågt pH (ner till pH 2) och till stor del kan ta sig förbi magens sura miljöer oskadda. Därför behövs det inte någon speciellt stor uppförökning av bakterierna på livsmedlet för att det ska vara mycket sjukdomsframkallande.

För att ta reda på hur stort potentiellt problem detta kan bli och om ifall bakterierna förökar sig och sprids mellan omkringliggande groddar genomfördes ett försök i en kontrollerad miljö.

Bakgrund

Med anledning av den globaliserade mathandeln bör allt större vikt läggas vid mathantering och livsmedelshygien. Historien visar att detta är något man bör beakta i varje enskilt fall av handel med extra känsliga livsmedel. Diverse utbrott av livsmedelsburna sjukdomar, till exempel shigatoxin-producerande *Escherichia coli* (*E. coli*), (Kupferschmidt 2011), i olika delar av världen gör att handel med i synnerhet livsmedel som ska förtäras råa eller delvis tillagade blir problematisk. I ett mycket stort och allvarligt utbrott av *E. coli* O104:H4 i Tyskland år 2011 blev enligt Buchholz m.fl (2011) groddar utpekade som vektorn till sjukdomen. Enligt (EFSA 2011), hade fröna som använts till groddarna sitt ursprung i Egypten, vilket gör att man kan ifrågasätta hygien och riskbedömningar hos de ansvariga egyptiska frödistributörerna.

Hypoteser

- 1) Smittor vidhäftar på insidan av groddkammaren.
 - a. Vidhäftningen skiljer sig mellan materialen.
- 2) Smittor kan förflytta sig mellan groddlagren i samma modul.
 - a. Smittor förflyttar sig nedåt med vattenflödet.
 - b. Smittor förflyttar sig uppåt i modulen med hjälp av aerosoler.

Material och metoder

a. Odlingscontainrar

Två odlingsmoduler ingick i studien

- 1) Bergs Bio Salad odlingsmoduler (bild 1), från GMPack ApS, Hadsund, Danmark, gjorda i polystyrene-plast, var en av de två testade produkterna för hemmaodling.
- 2) Cult Design Sweden kitchen farming odlingsmoduler (bild 1), från Cult Design AB, Göteborg, Sverige, var den andra modulen som blev testad, dessa var gjorda i terrakotta.

Båda sorters odlingsmoduler är gjorda i staplingsbara containrar som används i torn. Bergs Bio Salad odlingskontainer brukar användas i lager av två, medan Cult Design Sweden kitchen farming modulen används i moduler med tre odlingskammare. I föreliggande försök används båda moduler i torn med tre lager.



Bild 1. De två sorternas odlingsmoduler. Bergs Bio Salad i plast till vänster och Cult Design i terrakotta till höger. Egentagna bilder.

b. Växtmaterial

Modellgrödan som användes i studien var frön av bockhornsklöver (*Trigonella foenum-graecum*). Dessa packades i Perugia, Italien för Bavicchi GEO. Mängden bockhornsklöverfrön som användes för respektive odlingsmodul justerades med hänsyn till odlingskamrarnas yta. I varje plastbehållare användes 17,57 gram frön, det vill säga ca 1477 frön. I modulerna av terrakotta användes 11,37 gram frön per behållare, det vill säga ca 956 frön.

c. Mikrobiologiska medier

Till mikrobiologiska medier användes fyra olika typer

1) LB agar

Lysogeny Broth (LB) agar gjord på 20g LB Broth (SIGMA-ALDRICH St. Louis U.S.A, pcode 101626850, Lot BCBQ1867V) och 15 g bacto agar (DIFCO, Becton, Dickinson and Company, Sparks, U.S.A, Ref 214030, Lot 4259750) /liter med 10 ml ampicillin (SIGMA-ALDRICH Steinheim, Belgien, pcode 101634335, Lot BCBP8492V) /liter och 5 ml arabinos (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland, 1.01492.0100, Lot K44502792 502) /liter användes för selektiv odling av den inokulerade stammen *E. coli* O157:H7gfp+.

2) LB buljong

-För LB buljongen användes 20 g LB Broth (SIGMA-ALDRICH St. Louis U.S.A, pcode 101626850, Lot BCBQ1867V) / liter.

3) 0.1 x TSA

Utspädd Trypton Soya Agar (0.1x TSA; 4 g TSA, DIFCO, Becton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix, Frankrike, ref 236950, Lot 5275792), och 15 g Bacto Agar, (DIFCO, Becton, Dickinson and Company, Sparks, U.S.A, Ref 214030, Lot 4259750) användes för odlingsbara heterotrofa bakterier.

4) VRBD

Violet Red Bile Dextrose Agar (VRBD, Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland,

1.10275.0500, Lot VM656875 438) 39,5 g /liter användes för odling av bakterier tillhörande familjen *Enterobacteriaceae*

LB agar och 0.1x TSA blandades och steriliserades vid 121 °C i 20 min i en mediaklav (Integra, Artnr. 136005, Zizers, Schweiz). Medierna kylades ner och plattorna gjöts maskinellt med hjälp av en plattgjutare (Integra, Serienr. 11311162, Zizers, Schweiz). Blandat VRBD värmdes till kokpunkten i 1 min och plattorna gjöts efter nedkylning till 50 °C. För beredning av LB buljong löstes alla ingredienserna under omrörning och värme och autoklaverades vid 121 °C i 20 min. Tabell 1 visar odlingsbetingelserna för de olika näringsmedierna.

Tabell 1. Odlings- och avläsningsbetingelser för mikrobiologiska medier som användes i studien

Medium	Inkubationslängd (h)	Inkubationstemperatur (° C)	Kommentar
LB agar + amp + ara	18	37	Avläsning under UV-ljus (Spectroline, CM-10A, Westbury, New York, U.S.A)
LB buljong	15	37	Under skakning (200 rpm)
0.1 x TSA	72	22	
VRBD	24	37	

d. Modellorganismen och dess uppförökning

E. coli O157:H7gfp+, uppförökades 24 h på LB agar vid 37 C. En koloni överfördes till provrör med 6 ml LB buljong och uppförökades i sex individuella provrör över natt (15 h) vid 37 C under skakning. -För framställning av inokulum centrifugerades provrören vid 3000 rpm och 4 °C i 15 min. Supernatanten togs bort och 1 ml 0.85 % NaCl tillsattes. Suspensionen vortexades och flyttades till ett sterilt provrör. Suspensionens optiska densitet (OD₅₉₀) justerades spektrofotometriskt till 0.9 (Asys expert 96, Biochrom Ltd. Cambridge, Storbritannien) vilket motsvarar 10⁹ CFU ml⁻¹. Denna lösning kallades stamlösning. För beredning av inokulationsvätskan späddes först 5 ml av stamlösningen i 45 ml 0.85% NaCl. Sedan tillsattes hela volymen på 50 ml till 450 ml autoklaverat kranvatten. Slutkoncentrationen av *E. coli*

O157:H7 *gfp+* i inokulationsvätskan var 10^7 CFU ml⁻¹.

Försök

Undersökning av spridning av *E. coli* O157:H7 *gfp+* mellan lagren i odlingsmodulen studerades i ett två-faktoriellt försök, där faktor 1 var odlingsmodulen och faktor 2 var positionen av det inokulerade lagret (längst upp resp. längst ner i modulen).

Undersökningen genomfördes med tre replikat per behandling och modul och utfördes i sin helhet två gånger. Bokhornsklöverfrö blötlades individuellt för varje lager i sterila flaskor. De icke-inokulerade fröerna blötlades i 40 ml sterilt kranvatten, medan frön som skulle överföras till de inokulerade lagren blötlades i 40 ml inokulationsvätska. Blötlaggningsen skedde i 6 h under skakning (200 rpm) vid rumstemperatur (20 °C).

Efter blötlaggningsen överfördes frön till respektive lager i modulen. Modulerna fuktades med 80 ml sterilt vatten och sattes i högkantade behållare i en inkubator (22 °C) i 3.5 dygn. Fröna sköljdes med 500 ml sterilt kranvatten en gång per dag, efter att uppsamlingskärlet blivit tomt. Sköljningen skedde i toppkärlet och vattnet fick rinna genom hela modulen ner till uppsamlingskärlet.

Analyser

a. Växtanalyser

Efter tre dygn skördades först 30 groddar ur vardera lager i varje modul under aseptiska betingelser för analys av frisk- och torrsvikt. Torrsvikten bestämdes efter frystorkning av provmaterialet.

b. Mikrobiologiska analyser

Resterande groddar fylldes i individuella filterpåsar (Grade Products LTD, Artnr. 10, Leicestershire, England), vägdes, 40 ml detergent (0,1% Pepton + 0,2% Na-hexametafosfat) tillsattes och påsarna bearbetades därefter i en stomacher (60 s, modus: snabb; Smasher, Chamonix, Bruz, Frankrike). Filtrerad suspension (70 µm)

tillvaratogs och användes för spädningsserien (10^0 - 10^7). Spädningsserien bereddades i 0.85% NaCl. 100 μ l av respektive spädningsssteg spreds på plattor med 0.1x TSA, LB agar och VRBD med tre paralleller. Efter inkubering (tabell 1) avlästes plattor som innehöll mellan 30 till 300 bakteriekolonier. Proverna som hade färre än 30 CFU markerades med <30 och de som hade fler än 300 CFU markerades med >300. Vissa prover kunde inte avläsas då det antingen var så pass mycket tillväxt att hela mediet var övervuxet eller av annan anledning inte kunde avläsas och CFU urskiljas och dessa markerades då med NC (not countable).

Hela försöket upprepades i sin helhet ytterligare en gång. Mellan försöken tvättades och steriliserades allt som skulle återanvändas. Modulerna i plast låg i ett varmt klorinbad i 15 minuter, blev därefter lätt ursköljda och fick därefter ligga i en steril miljö fram tills att nästa försök startades. Modulerna i terrakotta låg i ett liknande klorinbad i 15 minuter, därefter ett nytt varmt vattenbad i 15 minuter och blev sedan inlagda i en torkugn inställd på 90 °C i 24 timmar. Efter de 24 timmarna passerat plockades modulerna ut och placerades i steril miljö fram tills att nästa försök skulle påbörjas.

Beräkning och statistik

Antal kolonier logtransformerades ($\text{Log}(\text{CFU}+1) \cdot \text{g}^{-1}$) innan bildning av medelvärde och statistisk analys. Statistisk analys genomfördes med hjälp av general linear model (GLM) där modul, behandling och kammarens position i groddmodulen användes som faktor och försöksomgång som kovariat faktor. Resultaten jämfördes med hjälp av Tukey-test ($p < 0.05$) på grundval av samspel mellan "modul*behandling*kammarens position". Korrelationerna beräknades med hjälp av Pearson korrelation.

Resultat

Tabell 2 visar groddarnas frisk- och torrsvikt efter tre dagars groning. Modulerna skilde sig åt med hänsyn till groddarnas frisksvikt. Generellt var groddarna tyngre i plastmodulen jämfört med terrakottamodulen (undantag bottenlagret i terrakottamodulen där frön i topplagret hade aktivt inokulerats). Lägst vikt noterades i topplagret av terrakottamodulen som

inokulerats med *E. coli* O157:H7 *gfp+*. Groddarnas torrsvikt var mycket jämn, bortsett från inokulerade groddar som odlats i det översta lagret av terrakottamodulen som hade signifikant lägre torrsvikt än samtliga övriga groddar.

Tabell 2. Frisk- och torrsvikt (g/frö) av bockhornsklöver som i tre dagar odlats i två groddmoduler för hemmabruk. Varje groddmodul bestod av tre lager (topp, mitt och botten). Värderna som åtföljs av olika bokstäver skiljer sig signifikant åt (Tukey-test; $p < 0.05$). Studien genomfördes med tre replikat och upprepades en gång ($n=6$).

Modul	Behandling	Position	Frisksvikt	Torrsvikt
1	1	Topp	0.065 AB	0.011 A
1	1	Mitt	0.072 A	0.011 A
1	1	Botten	0.072 A	0.010 A
1	2	Topp	0.065 AB	0.011 A
1	2	Mitt	0.074 A	0.011 A
1	2	Botten	0.069 AB	0.010 A
2	1	Topp	0.040 D	0.006 B
2	1	Mitt	0.051 CD	0.011 A
2	1	Botten	0.057 BC	0.011 A
2	2	Topp	0.047 CD	0.011 A
2	2	Mitt	0.048 CD	0.011 A
2	2	Botten	0.052 CD	0.010 A

Vidhäftning av smittor vid groddkammarna

Proverna visade att smitta hade vidhäftat vid kanterna i moduler av båda typerna (se bild 2). Det fanns även smitta i de moduler som inte blev inokulerade.

Spridning av *E. coli* O157:H7 *gfp+* inom modulerna

Odlingsbara heterotrofa bakterier odlade på 0.1x TSA låg mellan $\log 5.97$ CFU g^{-1} och 6.25 CFU g^{-1} . Signifikanta skillnader konstaterades; de är dock enbart av teknisk betydelse.

Försöket visade att *E. coli* O157:H7 *gfp+* spred sig inom modulen (se figur 1). Främst skedde det i modulerna där smittan inokulerades i den översta kammaren där man kan se förflyttning neråt där inga skillnader konstaterades mellan lagren. I viss mån skedde också en spridning uppåt i modulerna då inokulerade frön grodde i bottenlagret.

Signifikanta skillnader fastställdes då mellan topp- och mittenlagret å ena sidan och bottenlagret å andra sidan, oberoende av modulen. Samspel mellan groddarnas frisk- resp. torrsvikt kunde inte förklara variationen i förekomsten av *E. coli* O157:H7 *gfp+*.

Förekomsten av *Enterobacteriaceae* låg mellan $\log 5.53 \text{ CFU g}^{-1}$ och 6.16 CFU g^{-1} och inga signifikanta skillnader konstaterades mellan moduler, behandling och kammarens position inom modulen. Inget samspel fanns mellan den inokulerade *E. coli* O157:H7 *gfp+* och förekomsten av *Enterobacteriaceae*, eller mellan odlingsbara heterotrofa bakterier och *Enterobacteriaceae*.

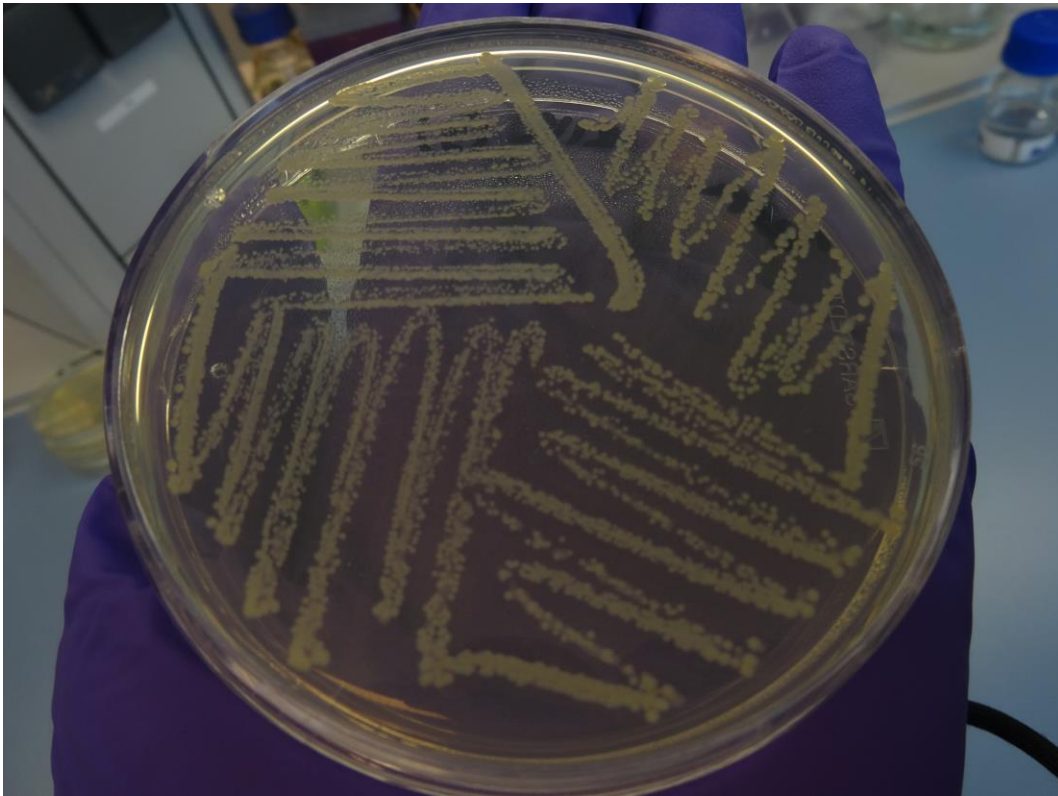
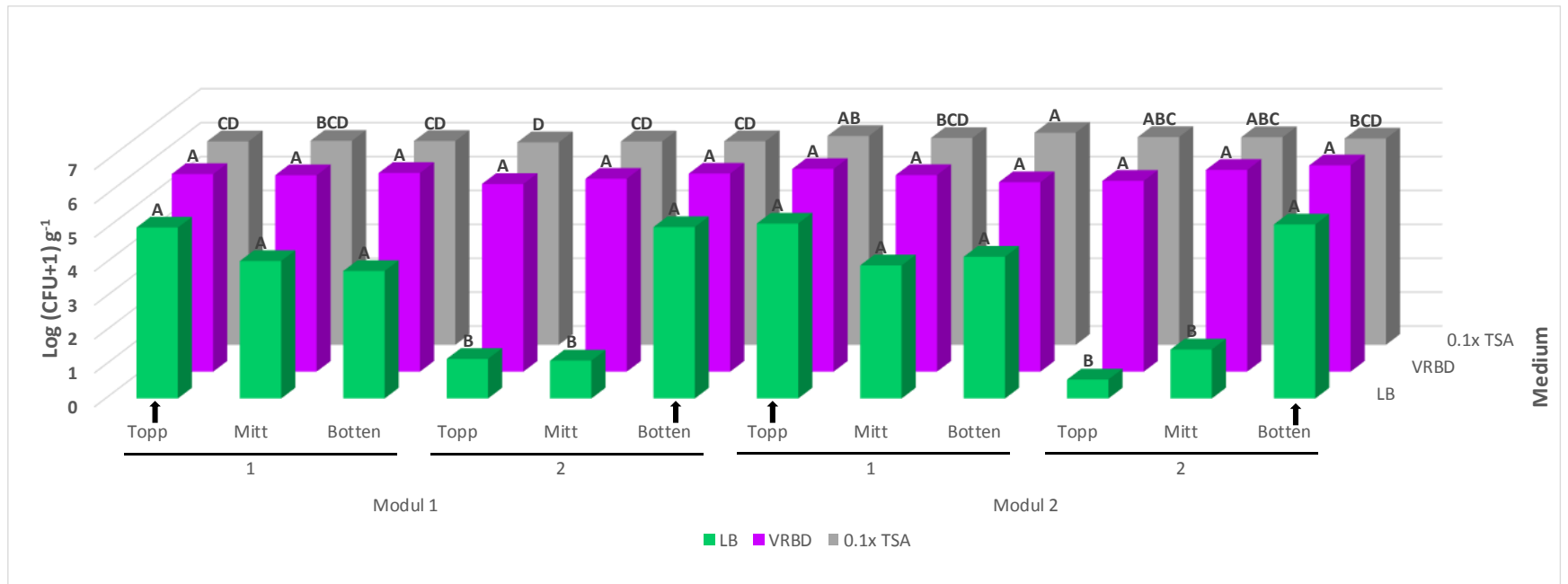


Bild 2. En petriskål innehållande LB och prov från svabningen av insidan av en odlingskammare. Egentagen bild.



Figur 1. Bakteriell kolonisering av bokhornsklövergroddar odlade i groddmoduler för hemmabruk. Antingen topp- (1) eller bottenlagret (2) fylldes med frön som under blötlaggningsen hade inokulerats med *E. coli* O157:H7 *gfp*+. Pilarna markerar lagren som fylldes med inokulerade frön. Groddarna analyserades efter tre dagars groddning med hänsyn antalet odlingsbara bakterier (TSA), *Enterobacteriaceae* (VRBD) och den inokulerade stammen *E. coli* O157:H7 *gfp*+

Diskussion

a. Vidhäftning av smittor vid groddkammarna

Att väggarna inuti modulerna var smittade med bakterien var föga förvånande, då det varit en mycket hög halt av mikrobiellt liv på groddarna i väldigt många av behållarna. Det behövs dock fler experiment för att se exakt hur många bakterier det handlar om, då prover enbart togs med svabb direkt från odlingsmodul till petriskål, utan spädningsserie. Även om vidhäftningen skiljde sig åt mellan de olika materialen på kamrarna är det svårt att se detta utan spädningsserie.

Något som kunnat vara intressant för framtida försök är att se huruvida en smittad modul blir totalt smittfri efter en maskindisk eller vanlig handdisk som skulle kunna vara fallet i ett hem där dessa moduler används. (Perez m.fl 2012) skriver i en studie att det är mycket svårt att få en gång kontaminerade produkter smittfria. Frågan är om detsamma gäller för odlingskärl då studien i fråga handlade om grön paprika. De moduler som använts till detta försök har blivit steriliserade före och mellan försöken och har därför inte kunnat visa om en smitta stannar kvar till nästa kultur eller inte. Skulle så vara fallet, att nästa kultur också blir smittad, finns det en ännu större hälsorisk i dessa odlingsmoduler och ytterligare anledning till försiktighet.

b. Förflyttning av smitta inom modulen

Att förflyttningen nedåt i kamrarna skedde var något som förväntats innan försöket. Förflyttning av smittan uppåt i kamrarna kunde även fastslås till viss del, och enligt (Wathes m.fl 1986) kan *E. coli* mycket väl förflyttas med aerosoler. Men om det är med aerosoler bakterien förflyttat sig med i denna studie, som hypotesen var, är ovisst tills fler experiment är gjorda.

Att bakterien spridit sig ner till underliggande behållare är utan tvekan bevisat, troligtvis med vattenflödet.

Eftersom att rötterna i samtliga groningskammare var på väg ner genom hålen till underliggande kammare kan man förutsätta att om försöket pågått ett antal dagar till hade rötterna nuddat groddarna i lagret under och därigenom spridit smittan både uppåt och neråt i kammaren med hjälp av sitt exudat.

Försöket kommer att behöva ytterligare en upprepning då en av karaktärsfaktorerna på *E.coli* O157:H7 *gfp+* inte syntes vid försöksomgång nr 2, för att fastställa resultatet och kunna publicera en artikel kring studien.

För vidare studier hade det varit intressant att se hur pass mycket *E.coli* O157:H7 *gfp+* sprids vågrätt inom odlingskamrarna. Möjligtvis att se hur ett fåtal smittade fröer smittar alla andra frön runt om. Även en studie för att se på vilket sätt smittan spred sig uppåt i överliggande kammare i denna studie hade varit på sin plats. Det syns i resultaten att smittan spred sig uppåt, men om det var med aerosoler eller inte, som hypotesen beskrev, är oklart.

Resultaten i denna studie pekar på att odling av groddar i moduler för hemmaodling inte är speciellt säkert. Det räcker att man får in en mycket liten smitta av *E. coli* eller annan *Enterobacteriaceae*-organism för att hela odlingen ska bli kontaminerad och personer som äter av groddarna kan bli sjuka.

Slutsatser

E.coli O157:H7 *gfp+* sprids mycket lätt mellan odlingsmoduler i ett hemmaodlingssystem.

Främsta spridningsväg inom modulen är vertikalt neråt.

E.coli O157:H7 *gfp+* sprids i viss mån uppåt från inokulerat bottenlager till mitten- och topplagret, inom ett modulsystem.

Bakterien fastnar lätt i odlingskamrarna och kan bli ett problem vid odling av nästa kultur.

Tack

Först och främst ett stort tack till min handledare och mentor under denna tid Prof. Dr. Beatrix Waechter Alsanius. Hennes enorma kunnande har varit en inspiration till att lära mig mer och hon har varit ett utomordentligt bollplank för tankar och idéer. Hennes vägledning har varit ofantligt viktig för mig.

Även ett stort tack till Julia Lindén, Andrea Kosiba Held, Maria Sousa, Samareh Gharaie, Emina Mulaosmanovic och Tabani Chirere, för att ha lärt mig hur man för sig i ett laboratorium och hjälpt mig med försöken. Utan er hade mina försök tagit oändligt mycket längre tid.

Tack även Institutionen för Biosystem och Teknologi vid SLU för gott samarbete och visat förtroende.

Referenser

Buchholz U., Bernard H., Werber D., Böhmer M. M., Remschmidt C., Wilking H., Deleré Y., an der Heiden M., Adlhoch C., Dreesman J., Ehlers J., Ethelberg S., Faber M., Frank C., Fricke G., Greiner M., Höhle M., Ivarsson S., Jark U., Kirchner M., Koch J., Krause G., Lubber P., Rosner B., Stark K., Kühne M. 2011. German Outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 Associated with Sprouts. *The New England Journal of Medicine*

EFSA 2011, (European Food Safety Authority). Tracing seeds, in particular fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds, in relation to the Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 2011 Outbreaks in Germany and France

Foster J. W. 2004. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nature Reviews Microbiology*

Jordbruksverket 2014. Fritidsodling i Sverige, De svenska hushållens odling av ätbara växter

Kupferschmidt K. 2011. As *E. coli* Outbreak Recedes, New Questions Come to the Fore. *Science*

Livsmedelsverket 2016. <http://www.livsmedelsverket.se/livsmedel-och-innehall/bakterier-virus-och-parasiter1/sjukdomsframkallande-mikroorganismer/enterohemorragisk-e.-coli-ehec/> Senast använd 5/3-2016

Perez K. L., Lucia L. M., Cisneros-Zevallos L., Castillo A., Taylor T. M. 2012. Efficacy of antimicrobials for the disinfection of pathogen contaminated green bell pepper and of consumer cleaning methods for the decontamination of knives. *International Journal of Food Microbiology*

[Wathes](#) C. M, [Howard](#) K., och Webster A. J. 1986. The survival of *Escherichia coli* in an aerosol at air temperatures of 15 to 30 degrees C and a range of humidities. *PubMed Central*