© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

umweltbundesamt

Anwendungsbereiche molekularbiologischer Analytik

Vorstudie zur Anwendbarkeit molekularbiologischer Analytik im Zusammenhang mit der Qualitätssicherung von Produkten

BUNDESMINISTERIUM für WIRTSCHAFT und ARBEIT

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

umweltbundesamt

ANWENDUNGSBEREICHE MOLEKULARBIOLOGISCHER ANALYTIK

Vorstudie zur Anwendbarkeit molekularbiologischer Analytik im Zusammenhang mit der Qualitätssicherung von Produkten

Frank Narendja

BUNDESMINISTERIUM für WIRTSCHAFT und ARBEIT

REPORT
REP-0228

Wien, 2009

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

Projektleitung
Frank Narendja

Autor
Frank Narendja

Lektorat
Maria Deweis

Satz/Layout
Ute Kutschera

Diese Publikation wurde im Auftrag des Bundesministeriums für Wirtschaft und Arbeit Abt. C1/9 erstellt.

Weitere Informationen zu Umweltbundesamt-Publikationen unter: http://www.umweltbundesamt.at/

Haftungsausschluss:

Die in dieser Studie angeführten kommerzielle Produkte oder Firmen stellen Beispiele für im thematischen Zusammenhang erwähnte Verfahren dar. Die Nennung dieser Produkte oder Firmen bedeutet keine ausdrückliche Empfehlung dieser Produkte oder Firmen durch die Umweltbundesamt GmbH.

Impressum

Medieninhaber und Herausgeber: Umweltbundesamt GmbH
Spittelauer Lände 5, 1090 Wien/Österreich

Diese Publikation erscheint ausschließlich in elektronischer Form auf http://www.umweltbundesamt.at/.

© Umweltbundesamt GmbH, Wien, 2009
Alle Rechte vorbehalten
ISBN 978-3-99004-026-3

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

INHALT

SUMMARY 5

ZUSAMMENFASSUNG 6

1 EINLEITUNG 7

1.1 Problemstellung 7

1.2 Methode 8

1.3 Grundlagen molekularbiologischer Analyseverfahren 9

1.3.1 Polymerase Ketten Reaktion – PCR 9

1.3.2 DNA-Chip 11

1.3.3 Fluoreszenz *in Situ* Hybridisierung – FISH 12

1.3.4 Durchflusszytrometrie 13

1.3.5 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 14

1.3.6 Problem Probenaufbereitung 15

2 EINSATZ VOM MOLEKULARBIOLOGISCHEN METHODEN IN DER PROZESSKONTROLLE VON INDUSTRIEANLAGEN 16

2.1 Problemstellung Industrieprozesse 16

2.2 Spezifische Bedarfserhebung – Industrieprozesse 16

2.2.1 Kläranlagen 16

2.2.2 Mikrobiell induzierte Korrosion (MIC) 18

2.2.3 Erdölindustrie 21

2.2.4 Biotreibstoffe 23

3 EINSATZ VOM MOLEKULARBIOLOGISCHEN METHODEN IN DER LEBENSMITTELANALYTIK 26

3.1 Problemstellung Lebensmittelanalytik 26

3.2 Spezifische Bedarfserhebung Lebensmittelanalytik 27

3.2.1 Getränkeerzeugung 27

3.2.2 Molkereiprodukte 30

3.2.3 Authentizität von Rohstoffen 32

3.2.4 Nachweis gentechnisch veränderter Bestandteile 34

3.2.5 Nachweis von Allergenen 35

4 ÖKONOMISCHE EINSCHÄTZUNG MOLEKULARBIOLOGISCHER ANALYSEMETHODEN 36

5 RESÜMEE 40

6 LITERATURVERZEICHNIS 42

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

SUMMARY

product safety and quality control

The analysis of biological parameters plays an important role in different areas. Apart from classic analyses for pathogenic germs aspects of food safety are focusing on the monitoring and control of the production processes (e.g. fermentation). Increasing economic pressure due to the globalisation of markets requires strict quality assurance and control – the early detection of a quality problem will minimizes the costs through production failure.

analytical methods

The selected examples presented in this study gives an overview of analytical methods for biological parameters already in use in different industrial sectors, and of the potentials for molecular biological and biochemical analysis in future. The cited examples are intended to give an idea of the wide range of possible applications for these analyses.

applications

Test methods such as polymerase chain reaction (PCR) or fluorescent in situ hybridisation (FISH) are already used to identify pathogens in the beverage industry or in some areas of sewage treatment plant technology. Questions of product authenticity are becoming increasingly important with regard to traceability and the indication of origin for foodstuffs. Similar to the testing for genetically modified organisms, molecular biological analyses (PCR) are becoming increasingly relevant for this applications.

process control in industrial plants

One of the potential applications for molecular biological analyses is the control of the production process in industrial plants, such as biogas production or wastewater treatment plants where materials are converted through the action of microorganisms. Currently process control in these plants is mainly performed on the basis of physical-chemical parameters or process-related experience. Microbiological analyses are used only to deal with specific aspects till now. Therefore experts see a large potential for process optimization for this application. By giving a better understanding of the relationship between the conversion of materials and the microorganisms involved, molecular biological analysis provides an opportunity to produce a relevant description of the microbiological status of the production process. These findings should be included to allow a better process control in future. Further scientific research will, however, be necessary in order to better understand the microbiological principles of such production processes.

potential for quality control

Despite the application potentials and the analytical methods already in existence, molecular biological test methods are still not widely used for aspects of quality assurance and control. This is partly due to the higher costs for these methods compared to conventional analytical techniques, and partly due to a certain level of uncertainty regarding the acceptance of such measuring techniques in the international or legal context.

problems with methods of molecular biological analysis

From a technical viewpoint, there are problems with sample preparation (quantitative detection of pathogenic germs with DNA-based methods) which – to a certain extent – lessen the advantages of the methods of molecular biological analysis. It can be expected, however, that technical developments will bring considerable improvements in this sector in future. One can thus assume that although molecular biological methods will become increasingly important in the next few years, they will not fully replace the current classic cultivation techniques.

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

ZUSAMMENFASSUNG

Produktsicherheit und Qualitätskontrolle

Die Analyse biologischer Parameter spielt in den verschiedensten Sachgebieten eine wichtige Rolle. Im Bereich der Produktsicherheit sind es bei Nahrungsmitteln neben den klassischen Analysen auf pathogene Keime auch Fragestellungen im Zusammenhang mit der Kontrolle und der Steuerung des Produktionsprozesses (z. B. Fermentation). Der zunehmende wirtschaftliche Druck durch die Internationalisierung der Märkte erfordert eine strikte Qualitätskontrolle – je früher ein Qualitätsproblem erkannt werden kann, desto geringer sind für gewöhnlich die Kosten durch Produktionsausfälle.

Die vorliegende Studie gibt anhand ausgewählter Beispiele einen Überblick, welche Analysemethoden für biologische Parameter in industriellen Bereichen bereits angewendet werden und welche Potenziale für molekularbiologische bzw. biochemische Analysen in Zukunft bestehen. Die angeführten Beispiele sollen auch einen Eindruck über die breiten Einsatzmöglichkeiten derartiger Analysen geben.

Anwendungsgebiete

So werden Testverfahren wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder die Fluoreszenz *in Situ*-Hybridisierung (FISH) in der Getränkeindustrie oder in einigen Bereichen der Kläranlagentechnik bereits zur Identifizierung von Schadorganismen eingesetzt. Zunehmend an Bedeutung gewinnen Fragen der Produktechtheit im Zusammenhang mit der Rückverfolgbarkeit und mit Ursprungsbezeichnungen von Lebensmitteln. Auch hier spielen – wie bei der Überprüfung der Kennzeichnung von gentechnisch veränderten Lebensmitteln – molekularbiologische Analysen (PCR) verstärkt eine Rolle.

Prozesssteuerung von Industrieanlagen

Ein potenzieller Anwendungsbereich für molekularbiologische Analysen liegt in der Prozesssteuerung von Industrieanlagen wie z. B. der Biogaserzeugung oder der Abwasserreinigung, in denen die stoffliche Umsetzung durch Mikroorganismen erfolgt. Zurzeit werden derartige Anlagen vorwiegend mittels physikalisch-chemischer Parameter oder verfahrenstechnischer Erfahrungswerte gesteuert. Mikrobiologische Analysen werden nur bei spezifischen Fragestellungen angewendet. Hier sehen Fachleute noch große Potenziale zur Prozessoptimierung. Aufbauend auf einem besseren Verständnis über die Zusammenhänge zwischen stofflichen Umsetzungen und den daran beteiligten Mikroorganismen bieten molekularbiologische Analysen die Möglichkeit, eine entsprechende mikrobiologische Zustandsbeschreibung des Produktionsprozesses zu erstellen und in die Prozessteuerung einfließen zu lassen. Hier sind aber noch weiterführende wissenschaftliche Untersuchungen nötig, um die mikrobiologischen Grundlagen dieser Produktionsprozesse besser zu verstehen.

Trotz der Anwendungspotenziale und der zum Teil bereits existierenden Analysemethoden werden molekularbiologische Testverfahren bei Aspekten der Qualitätssicherung noch wenig eingesetzt. Der Grund dafür liegt einerseits in den immer noch höheren Kosten dieser Verfahren im Vergleich zu konventionellen Analysetechniken, andererseits an einer gewissen Unsicherheit bezüglich der Akzeptanz dieser Messverfahren im internationalen oder rechtlichen Kontext.

Probleme molekularbiologischer Analysemethoden

Von technischer Seite gibt es Schwierigkeiten bei der Probenaufbereitung (quantitativer Nachweis von pathogenen Keimen mittels DNA-basierter Methoden), die die Vorteile molekularbiologischer Analysemethoden zum Teil relativieren. Es ist aber zu erwarten, dass durch die technische Entwicklung in den nächsten Jahren eine deutliche Verbesserung auf diesem Gebiet möglich ist. Man kann zwar davon ausgehen, dass molekularbiologische Methoden in Zukunft zunehmend an Bedeutung gewinnen, die bestehenden klassischen Kultivierungsverfahren aber nicht gänzlich verdrängen werden.

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

1 EINLEITUNG

1.1 Problemstellung

Anwendung bei der Lebensmittelqualität …

Bei der Entwicklung und Produktion moderner Lebensmittel werden hohe Anforderungen an die Qualität und die Produktsicherheit gestellt. Der zunehmende Konkurrenzdruck zwingt die ProduzentInnen dazu, konstant zufriedenstellende Qualität zu liefern. Wurde es z. B. früher von den KundInnen noch toleriert, dass Bier durch das Vorhandensein milchsäurebildender Bakterien manchmal einen säuerlichen Beigeschmack hatte, so wechseln sie heute bei einer derartigen Qualitätsminderung rasch auf ein anderes Produkt. Die Qualitätskontrollen der laufenden Produktionsprozesse müssen daher zuverlässig und rasch verfügbar sein um solche Qualitätseinbußen zu verhindern.

.. in industriellen Prozessen …

Neben der Lebensmittelproduktion spielen biologische Prozesse aber auch in anderen industriellen Bereichen (z. B. Kläranlagen, Biogasanlagen, Materialbeständigkeit) eine wichtige Rolle. Historisch bedingt werden bei derartigen Industrieprozessen vor allem physikalische-chemische Parameter zur Prozesskontrolle herangezogen. Dort wo mikrobiologische Befunde nötig sind, werden auch heute noch vielfach klassische, zeitaufwendige Analysemethoden eingesetzt. Da diese Produktions- bzw. Prozessverfahren oft auf biologischen Grundstoffen oder biologischen Vorgängen (z. B. Fermentation) beruhen, kann die direkte Analyse der entsprechenden biologischen Parameter nicht nur eine schnelle Verfügbarkeit der Messergebnisse gewährleisten, sondern auch für eine unmittelbare Beschreibung der biologischen Prozesse der Anlage herangezogen werden. Damit könnten neue Wege der Prozesssteuerung solcher Industrieanlagen entwickelt werden.

… und Vorteile gegenüber konventionellen Methoden

Biochemische und molekularbiologische Methoden haben in den letzten Jahren immer mehr Anwendung bei analytischen Fragestellungen wie z. B. GVO-Analytik oder Mikrobiologie gefunden (HOLST-JENSEN et al. 2003, MOZOLA 2006). Diese Methoden sind in vielen Fällen sensitiver und spezifischer als klassische chemische oder mikrobiologische Verfahren. Ein weiterer entscheidender Vorteil ist auch eine deutliche Verkürzung der Analysedauer. Während klassische Verfahren oft Tage dauern, kann mit Hilfe molekularbiologischen Techniken ein Ergebnis schon nach wenigen Stunden erhalten werden. Das wiederum erlaubt ein schnelles Reagieren während des laufenden Produktionsprozesses und verhindert Produktionsausfälle und Stillstände im Produktionsprozess. Die Erkenntnisse der modernen Biowissenschaften sowie die Entwicklungen auf dem Biotechnologie-Sektor bieten hier vollkommen neue Möglichkeiten, diese Anforderungen an die Analysemethodik umzusetzen.

Zielsetzung der Studie

Ziel dieser Vorstudie ist es, die Anwendbarkeit solcher innovativer molekularbiologischer Methoden im Bereich Produktsicherheit sowie für umweltrelevante Industriesektoren zu untersuchen und die Relevanz für eine entsprechende wirtschaftliche Anwendung abzuschätzen. Eine Erfassung aller möglichen Anwendungsbereiche würde den Rahmen dieser Vorstudie sprengen, die Auswahl der näher bearbeiteten Anwendungsbereiche erfolgte daher nach Einschätzung der wirtschaftlichen Bedeutung und der Relevanz für eine breitere Anwendung. Unberücksichtigt blieben klinische Anwendungen sowie Methoden zur Qualitätssicherung bei medizinischen Materialien oder im pharmazeutischen Sektor, da in diesem Bereich molekularbiologische Nachweisverfahren bereits Standard sind oder einschlägige gesetzliche Bestimmungen existieren.

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

1.2 Methode

Die vorliegende Studie basiert im Wesentlichen auf einer umfangreichen Literaturrecherche sowie der Auswertung wissenschaftlicher Publikationen. Parallel erfolgte eine Befragung (Interviews) von Fachleuten aus verschiedenen Industriebereichen. Dies diente v. a. dazu, die branchenspezifischen Anforderungen an die Analytik biogener Parameter zu erfassen und mögliche Innovationspotenziale zu identifizieren. Für spezifische wissenschaftliche Fragestellungen bzw. konkrete Anwendungen bereits existierender Analyseverfahren wurden wissenschaftliche Fachleute bzw. Unternehmen kontaktiert.

In den nachstehenden Kapiteln wird zu den jeweiligen Themen eine kurze Darstellung der Problematik gegeben und die zurzeit gängigen Analyseverfahren werden kurz umrissen. Anschließend wird versucht das Potenzial und die Relevanz neuer Methoden zu skizzieren und – wo möglich – eine Einschätzung der Umsetzbarkeit zu geben.

Im Zuge der Recherchen zu dieser Studie wurden folgende Expertinnen und Experten interviewt:

• Ing. Christian Matzke	Ensorgungsbetriebe Simmering GmbH – Hauptkläranlage Wien
• DI Annemarie Novak	MA 48 (Biogas Wien)
• Dr. Martin Wagner	Veterinärmedizinische Universität Wien, Christin-Doppler Labor für molekularbiologische Lebensmittelanalytik
• DI Roland Kirchmayr	Institut für Umweltbiotechnologie/Universität für Bodenkultur
• DI Melanie Auer	AGRANA Bioethanol GmbH
• Markus Jankowich	Biodiesel Vienna GmbH
• DI Andreas Rosa	Ottakringer Brauerei AG
• Dr. Richard Sold	Vermicon AG
• Dr. Clemens Forster	Brau Union Linz
• Dr. Norbert Leclere	Becton& Dickinson Inc.
• DI Linda Toccafondi	Mautner Markhof Feinkost GmbH
• Dr. Josef Strauss	ARC Seibersdorf
• DI Georg Kammerer	NÖM AG
• DI Michael Wirth	Eurofin-ofi Lebensmittelanalytik GmbH
• Dr. Mathias Kuhn	Congen GmbH
• ExpertInnen[1] der	OMV
• Dr. Holger Daims	Department für Mikrobielle Ökologie, Universität Wien

[1] Entsprechend dem Wunsch der Fa. OMV werden die ExpertInnen nicht namentlich genannt

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

1.3 Grundlagen molekularbiologischer Analyseverfahren

Analysemethoden wie sie in der modernen Biotechnologie entwickelt und angewendet werden, haben in den letzten Jahren zunehmend den Weg aus den Forschungslabors in die Routineanalytik gefunden. Die Erkenntnisse der Molekularbiologie und die Potenziale der daraus entwickelten Analysetechniken erlauben Analysen, die bis vor einigen Jahren noch unmöglich waren (z. B. DNA Fingerprint-Technik in der Forensik, Genanalysen in der medizinischen Diagnostik). Diese Analysetechniken können aber auch auf die meisten anderen Materialien biologischen Ursprungs angewendet werden und finden daher zunehmend Verbreitung in einer Vielzahl von Anwendungsbereichen.

Analytik von Mikroorganismen

Speziell bei der Analytik von Mikroorganismen bieten molekularbiologische Techniken entscheidende Vorteile. Traditionell erfolgt der Nachweis von Mikroorganismen mittels Kultivierung. Da viele Mikroorganismen nicht kultivierbar oder sehr empfindlich sind (z. B. die Bakterien *Campylobacter, Mycobacterium)*, werden sie durch die übliche mikrobielle Analytik nicht oder nur sehr lückenhaft erfasst (MORGAN et al. 1987). Insbesondere bei Analyse von komplexeren, mikrobiologischen Gemeinschaften (Biozönosen) liefern kultivierungsabhängige Verfahren nur einen sehr verfälschten Einblick in die Zusammensetzung und Dynamik der mikrobiellen Biozönosen (WAGNER et al. 1993).

Molekularbiologische Techniken sind nicht auf die Vermehrungsfähigkeit der Mikroorganismen im Labor angewiesen und können daher diese Organismengruppen unmittelbar nachweisen.

Zum besseren Verständnis der in den folgenden Kapiteln behandelten Anwendungsbereiche sollen nachstehend die grundlegenden Prinzipien der verschiedenen Analysemethoden dargestellt werden.

1.3.1 Polymerase Ketten Reaktion – PCR

Funktionsweise der PCR

Die Polymerase Ketten Reaktion (polymerase chain reaction, PCR) stellt eine der wichtigsten auf DNA basierenden Verfahren in der Molekularbiologie dar (MULLIS 1997, SAIKI et al. 1988). Bei der PCR wird mit Hilfe von spezifischen Gensonden (Primer) ein genau definierter Bereich der DNA vermehrt und so nachgewiesen. Diese Gensonden sind so konstruiert, dass sie sich nur an einen ganz bestimmten Bereich der Ziel-DNA (z. B. Salmonellen-spezifisches Gen) anlagern können, wodurch diese Methode eine sehr hohe Spezifität besitzt. Wenn diese Anlagerung der Gensonden erfolgt ist, kann mit Hilfe eines speziellen Enzyms eine Kopie der betreffenden Zielsequenz hergestellt werden – es kommt zu einer Verdoppelung des gesuchten DNA-Abschnitts. Dieser „Kopiervorgang“ wird dann 30- bis 40-mal wiederholt, wobei es zu einer milliardenfachen Vermehrung der gesuchten Ziel-DNA kommt, so dass selbst geringste Ausgangsmengen (z. B. 2–3 DNA-Moleküle) nachgewiesen werden können (siehe Abbildung 1). Die PCR stellt somit eine der sensitivsten Nachweisverfahren überhaupt dar.

Anwendungsbereiche von PCR

Das Endresultat einer PCR-Reaktion ist nach ca. zwei Stunden verfügbar (ohne Probenvorbereitung). Die Anwendung von so genannter „Real Time PCR“ bei der die Vermehrung der Ziel-DNA an ein Fluoreszenzsignal gekoppelt ist, eröffnet auch die Möglichkeit zur quantitativen Bestimmung. Bei entsprechender Optimierung des Reaktionsgemisches ist auch der Nachweis mehrerer Zielsequenzen in einer Nachweisreaktion möglich (Multiplex-Reaktion).

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

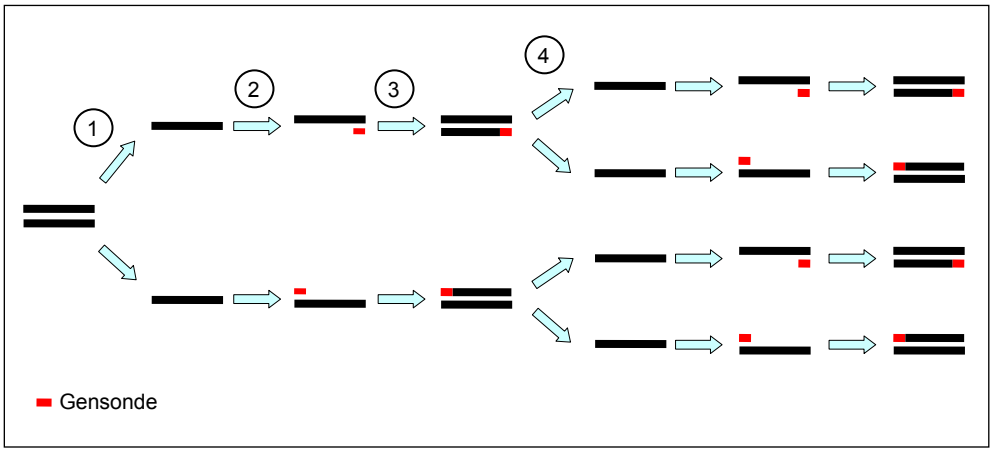


Abbildung 1: Funktionsweise der PCR:
1. In einem ersten Schritt werden die beiden Stränge der DNA-Helix getrennt.
2. Danach können sich die spezifischen DNA Sonden (rot) anlagern.
3. Das Enzym Taq-Polymerase ergänzt das fehlende Stück DNA. Die erste Kopie der Ziel-DNA ist fertig.
4. Der Vorgang beginnt von neuem. (Quelle: Umweltbundesamt)

Der apparative Aufwand ist verhältnismäßig hoch. Moderne Real Time PCR-Maschinen (siehe Abbildung 2) kosten zwischen 25.000 und 30.000 €.

Abbildung 2: Real Time PCR-Gerät (© mit freundlicher Erlaubnis der Fa. Applied Biosystems Inc.).

Vorteile der PCR

Neben der Sensitivität und der raschen Verfügbarkeit der Resultate bietet die PCR aber noch weitere Vorteile. Einer davon ist die Flexibilität der Nachweisverfahren. Die Umstellung auf einen neuen oder zusätzlichen Nachweis kann für gewöhnlich vom Laborpersonal selbst durchgeführt werden. Weiters können alle Arbeitsschritte von der Probenaufbereitung bis zum Ansetzen der Reaktionsgemische automatisiert werden. Dies erlaubt die gleichzeitige Analyse vieler Proben und somit die Reduktion der Analysekosten. Eine weitere Kosteneinsparung kann durch die Verwendung von Multiplex-Reaktionen erzielt werden. Voraussetzung für eine derartige Automatisierung ist aber ein hoher Probendurchsatz, wie er entweder in großen Betrieben oder im Labor eines Analysedienstleisters gegeben ist.

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

1.3.2 DNA-Chip

Funktionsweise des DNA-Chips

Der DNA-Chip wurde ursprünglich entwickelt, um genetische Analysen der gesamten Erbinformation eines Organismus zu erhalten (SCHENA et al. 1995, LASHKARI et al. 1997). Mit Hilfe eines DNA-Chips (oft auch als DNA Array bezeichnet) lassen sich viele verschiedene Gene (zurzeit bis zu 80.000) gleichzeitig detektieren. Die Genabschnitte, die untersucht werden sollen, werden zuerst synthetisch hergestellt und dann in Form winziger Punkte auf einem Trägermaterial gebunden (gespottet). Auf einer Fläche von 1 cm^2 können so mehrere Tausend Punkte platziert werden, wobei jeder Punkt einen spezifischen Genabschnitt darstellt, dessen Position auf dem Träger genau bestimmt ist. Für die Analyse wird die DNA aus der zu untersuchenden Probe isoliert, mit einer Markierung (z. B. Fluoreszenzfarbstoff) versehen und auf den DNA-Chip aufgetragen. Sind entsprechende DNA-Stücke in der Probe vorhanden, lagern sich diese an die komplementären Vorlagen auf dem DNA-Chip an (siehe Abbildung 3). Durch die angehängte Markierung können jene Genabschnitte identifiziert werden, bei denen es zu einer solchen Anlagerung gekommen ist.

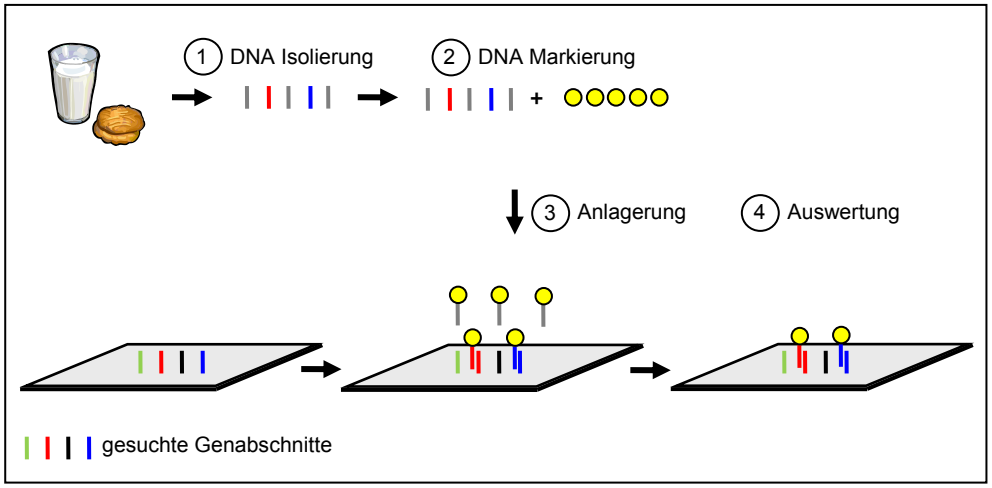


Abbildung 3: Analyseprinzip eines DNA-Chips: Auf dem DNA-Chip befinden sich die gesuchten DNA-Abschnitte an bestimmten Positionen.
1. In einem ersten Schritt wird die DNA aus der Probe extrahiert.
2. Anschließend wird die DNA mit dem Detektionssystem markiert.
3. Die Proben-DNA wird auf den DNA-Chip aufgetragen, wobei sich idente DNA-Stücke aneinander anlagern.
4. Durch die Position auf dem Chip kann der in der Probe vorhandene DNA-Abschnitt identifiziert werden (Quelle: Umweltbundesamt).

Anwendungsbereiche des DNA-Chips

Welche Art von Ziel-DNA auf das Trägermaterial gespottet wird, hängt von der Art der Anwendung ab. So wurden z. B. bei den im Kapitel 3.2.2 erwähnten „Milch-Chip“ Gensequenzen der wichtigsten pathogenen Bakterien, der üblicherweise verwendeten Fermentationsbakterien und von relevanten Viren verwendet, um mit einer einzigen Analyse alle erforderlichen Informationen über das Produkt bzw. den Fermentationsprozess zu erhalten.

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

Nachteile der Methodik

Diese Technik kann überall dort zum Einsatz kommen, wo viele verschiedene Parameter in einer Probe bestimmt werden müssen. Die Analyse ist aber aufwendig und erfordert eine sehr hohe Qualifizierung des Laborpersonals, so dass DNA-Chips bis jetzt nur für die Anwendung in Speziallabors geeignet sind. Die Kosten für eine Analyse sind entsprechend hoch. Die Anschaffungskosten für das Auswertegerät liegen bei ca. 15.000–30.000 €.

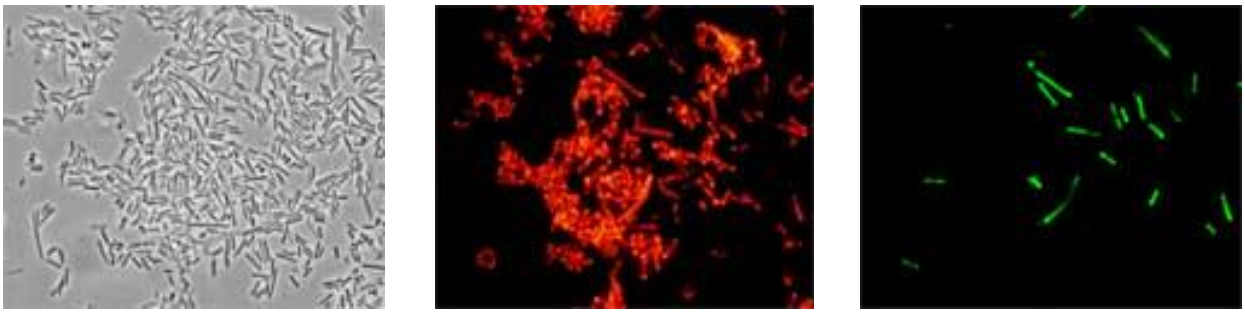
1.3.3 Fluoreszenz *in Situ* Hybridisierung – FISH

Anwendungsbereiche von FISH

Fluoreszenz *in Situ* Hybridisierung (FISH) bezeichnet ein Verfahren, bei dem nukleinsäurehaltige Strukturen in Inneren von Zellen mit Hilfe von spezifischen Gensonden unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden können (AMANN et al. 1998, WAGNER et al. 1993, 2003). In Gegensatz zu klassischen Färbemethoden kann aber die Spezifität der Gensonden an die jeweilige Fragestellung angepasst werden (siehe Abbildung 4). Damit ist es möglich z. B. entweder eine grobe Klassifizierung der vorhandenen Mikroorganismen durchzuführen oder aber quantitative Aussagen über das Vorhandensein spezieller Bakterienarten zu erhalten. Mit dieser Methode können auch Mikroorganismen sichtbar gemacht werden, die nicht kultivierbar sind und daher mit klassischen mikrobiologischen Verfahren nicht erfasst werden können.

Funktionsweise von FISH

Bei der FISH-Analyse wird das Zellmaterial auf einem Objektträger fixiert und anschließend wird die Zellwand chemisch für die Gensonden durchlässig gemacht. Die Gensonden sind wie bei der PCR spezifisch für die gesuchte Zielsequenz. Die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Gensonden lagern sich in den Zellen an die Zielstruktur an und können nun in einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden (siehe Abbildung 4).



1 2 3

*Abbildung 4: Funktionsweise von FISH: Bild 1: Phasenkontrastaufnahme einer Bierprobe. Bild 2: Alle **rot** leuchtenden Bakterien sind bierschädliche Milchsäurebakterien. Bild 3: Alle **grün** leuchtenden Bakterien gehören zur Art* Lactobacillus brevis *(© mit freundlicher Genehmigung der Fa. Vermicon GmbH).*

Der apparative Aufwand ist verhältnismäßig gering. Für die Analyse wird im Wesentlichen ein Fluoreszenzmikroskop benötigt, das je nach technischer Anforderung (Detektion eines oder mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe) 5.000–8.000 € kostet.

Vorteile von FISH

Der Vorteil dieser Methode liegt in der sehr einfachen Durchführung der Analyse und benötigt daher keine spezielle Qualifikation des Personals. Die Ergebnisse sind in wenigen Stunden (2–3 Stunden) verfügbar und eine quantitative Abschätzung

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

der nachgewiesenen Organismen ist durch Auszählen der Fluoreszenzsignale möglich. Dieses Verfahren ist aber nur bei lebenden Zellen anwendbar. Sind die nachzuweisenden Mikroorganismen nur in geringer Zahl in der Probe vorhanden muss eine Anreicherungskultur durchgeführt werden.

FISH eignet sich vor allem für jene Applikationen, bei denen ein begrenztes Spektrum an bekannten Mikroorganismen nachgewiesen werden soll und bei denen keine großen Probenzahlen bearbeitet werden müssen.

1.3.4 Durchflusszytrometrie

Funktionsweise und Anwendungsbereiche

Die Durchflusszytometrie stammt ursprünglich aus der medizinischen Diagnostik und hat in den letzten Jahren auch bei industriellen Anwendungen an Bedeutung gewonnen (ORMEROD 2000). Dieses Verfahren ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und zum Teil molekularen Eigenschaften von Partikeln (wie z. B. Zellen) in einem Flüssigkeitsstrom. Die Partikel werden in einem dünnen Flüssigkeitsstrom an einem optischen System, das aus einer Lichtquelle und mehreren optischen Sensoren besteht, vorbeigeführt. Durch die Messung des abgelenkten Streulichts können Rückschlüsse auf die Größe und Granularität der Zelle gezogen werden. Eine differenzierte Analyse, um welche Organismen es sich handelt, ist aber nur sehr eingeschränkt möglich. Das Verfahren eignet sich eher zur Feststellung einer Gesamtkeimzahl und den daraus abzuleitenden Parametern. Eine interessante Weiterentwicklung dieses Systems stellt die Koppelung dieses Verfahrens mit spezifischen, fluoreszenzmarkierten Nachweissystemen (Gensonden oder Antikörper) dar. Ähnlich wie bei der FISH-Analyse kann dadurch eine Identifizierung spezifischer Organismengruppen erfolgen. In einem Durchflusszytometer lassen sich bis zu 1.000 Zellen pro Sekunde sicher bestimmen – in Verbindung mit einem spezifischen Fluoreszenzsignal ist daher auch die Quantifizierung bestimmter Keime möglich.

Nachteil der Durchflusszytometrie

Jedoch ist die Probenmenge die untersucht werden kann beschränkt, da selbst leistungsstarke Zytometer nur eine Durchflussrate von 120 µl/min haben und die Messung von z. B. 1 ml Probe bis zu 10 Minuten dauern kann. Bei noch größeren Volumina ist eine Messung in einem akzeptablen Zeitraum eigentlich nicht mehr möglich.

Vorteile der Durchflusszytometrie

Die Vorteile der Durchflusszytometrie liegen in der einfachen Handhabung und der raschen Verfügbarkeit der Ergebnisse (sofern kleine Volumina zur Analyse ausreichen), vor allem wenn nur die Gesamtkeimzahl bestimmt werden soll. Eine Messung dauert dann nur wenige Minuten. Für eine differenzierte Analyse mittels fluoreszenzmarkierter Sonden ist aber wiederum eine Probenvorbereitung von ca. 3 Stunden und mehreren Arbeitsschritten nötig.

Die Anschaffungskosten für ein Durchflusszytometer liegen je nach technischer Ausstattung (nur Partikelmessung oder Kombination mit Fluoreszenzdetektion) bei 40.000–70.000 €. Das Problem der langen Messdauer bei einigen Anwendungen kann zum Teil durch Automatisierung kompensiert werden.

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

1.3.5 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Das Verfahren des Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) stellt zwar kein molekularbiologisches Nachweisverfahren in eigentlichen Sinn dar, hat aber im Bereich der modernen Schnellanalytik eine wichtige Bedeutung und sollte daher hier nicht unberücksichtigt bleiben.

Funktionsweise und Anwendungsbereiche

Mit Hilfe des ELISA-Verfahrens können Proteine, Bakterien und Viren, aber auch niedermolekulare Verbindungen wie Hormone, Toxine und Pestizide in einer Probe nachgewiesen werden (ENGVALL & PERLMAN 1971, DEVERGNE et al. 1981): Hierbei macht man sich die Eigenschaft von Antikörpern zu Nutze, spezifisch an den nachzuweisenden Stoff (Antigen) zu binden. Diese Antikörper werden zuvor mit einem Enzym markiert. Die durch das Enzym katalysierte Reaktion dient als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens. Das durch das Enzym gebildete Reaktionsprodukt kann üblicherweise durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemolumineszenz nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5). Die Signalstärke ist abhängig von der Antigenkonzentration, so dass ELISA-Tests auch für (semi)quantitative Nachweise verwendet werden können. Die Ergebnisse des Tests sind nach ca. 1–3 Stunden verfügbar. Neben der klinischen Diagnostik kommen ELISA-Tests im Lebensmittelbereich vor allem in der Allergen-Analytik zum Einsatz.

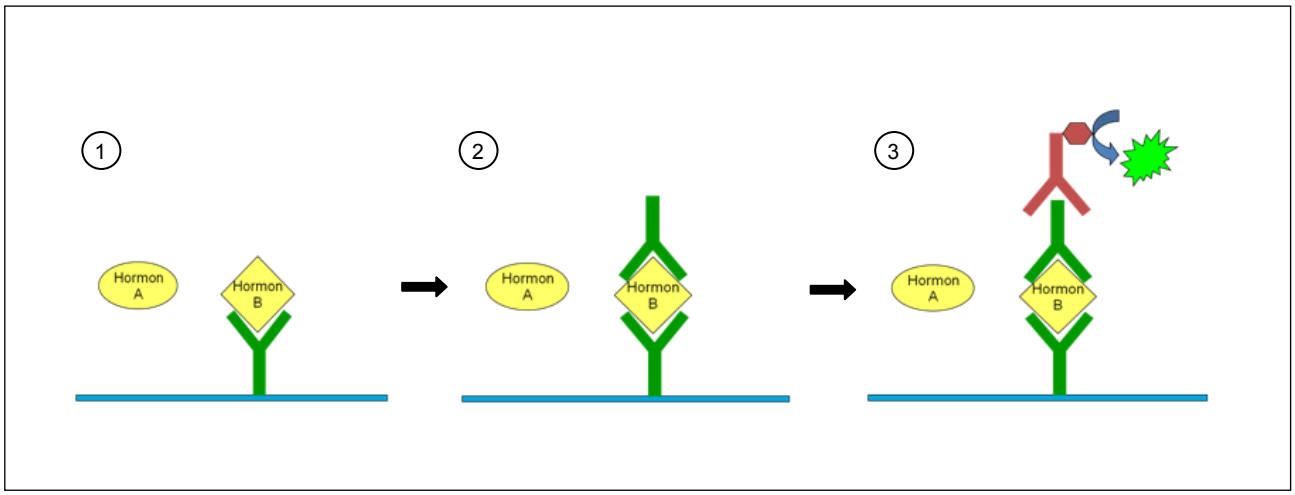


Abbildung 5: Schema eines so genannten „Sandwich"-ELISA. Schritt 1: Das zu detektierende Antigen bindet an den Antikörper. Schritt 2: Zur Erhöhung der Spezifität wird ein 2. Antikörper verwendet. Schritt 3: Ein mit dem Detektionssystem verbundener Antikörper bindet an den bestehenden Antigen-Antikörper-Komplex und vermittelt die Nachweisreaktion (Quelle: Umweltbundesamt).

Vorteile und Nachteile von ELISA

ELISA-Tests sind sehr leicht zu handhaben und können ohne besondere Qualifikation des Personals durchgeführt werden. Die Anschaffungskosten für ein Auslesegerät (Microplate-Reader) zur (semi)quantitativen Bestimmung liegen bei ca. 2.000–4.000 €. Wie bei der PCR kann auch das ELISA-Verfahren automatisiert und dadurch die Kosten gesenkt werden. Zu berücksichtigen ist aber, dass ELISA-Tests keine Flexibilität bei den Parametern zulassen und für jeden Analyten ein eigener Test durchgeführt werden muss.

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

Eine andere Form des immunologischen Tests sind so genannte „Lateral Flow Assays“ oder „Dip Sticks“, bei denen die Antikörperreaktion auf einem streifenförmigen Trägermaterial abläuft (z. B. Schwangerschaftstest). Das Ergebnis liegt für gewöhnlich innerhalb von wenigen Minuten vor, jedoch haben diese Tests eine deutlich niedrigere Sensitivität als z. B. das klassische ELISA-Verfahren (BOHAYCHUK et al. 2005).

1.3.6 Problem Probenaufbereitung

Bei DNA-basierten Methoden wird von allen Fachleuten einhellig die Probenvorbereitung bzw. -aufbereitung als eine der kritischsten Schritte gesehen. Hier besteht noch deutlicher Innovationsbedarf. Viele Fragestellungen hinsichtlich der mikrobiellen Analytik sind zurzeit durch das Fehlen quantitativer Aufschlussverfahren limitiert. Beispielweise muss für den PCR-Nachweis bei einer geringen Anzahl von pathogenen Keimen eine Anreicherungskultur (Dauer 1–2 Tage) durchgeführt werden, wodurch sich die Zeitersparnis bei der PCR-Analyse relativiert. Weiters ist bei einer Anreicherungskultur kein unmittelbarer Zusammenhang zur ursprünglichen Keimzahl gegeben und damit eine quantitative Bestimmung schwierig.

Zurzeit wird der PCR-Technik das größte Potenzial für den Einsatz in der modernen Analytik von biologischen Materialien zugeordnet. Durch zu erwartende technische Fortschritte dürfte diese Technik im Bereich der molekularbiologischen Analysen in den nächsten 10–15 Jahren dominieren.

Neben der Entwicklung neuer DNA Isolationsmethoden, bei denen das größte Innovationspotential gesehen wird, ist auch der kontinuierliche Fortschritt in der Automatisierung und Miniaturisierung des Analysenablaufs und der Gerätetechnik ein Umstand, der DNA-basierte Analysenmethoden zunehmend für die Routineanalytik interessant macht. Durch die Verringerung des Reaktionsvolumens und neuartiger Thermoelement in den PCR-Maschinen kann die Analysendauer bereits jetzt von ca. 2 Stunden auf 35 min reduziert werden (Fast-PCR). Die technische Entwicklung bei der Detektion der Fluoreszenzfarbstoffe lässt weiters eine verbesserte Sensitivität der Nachweissysteme und damit effizientere Analysen erwarten.

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

2 EINSATZ VOM MOLEKULARBIOLOGISCHEN METHODEN IN DER PROZESSKONTROLLE VON INDUSTRIEANLAGEN

2.1 Problemstellung Industrieprozesse

Einsatz und Bekämpfung von Mikroorganismen

Im Bereich der Prozesskontrolle konzentrieren sich die Fragestellungen im Zusammenhang mit molekularbiologischen Analysetechniken hauptsächlich auf den Bereich der Mikrobiologie. Mikroorganismen spielen hier entweder als problemverursachende Faktoren eine Rolle oder aber der industrielle Prozess an sich ist wie z. B. bei der Biogaserzeugung durch die Wirkung von Mikroorganismen bedingt. Im Bereich der mikrobiell verursachten Probleme steht zumeist die Identifizierung des Schadorganismus zum Zweck einer gezielten und effizienten Bekämpfung im Vordergrund. Neben der Absicht, durch eine derart gezielte Beseitigung des Problems die Kosten für einen Produktionsstillstand zu minimieren, spielen aber auch zunehmend gesetzliche Rahmenbedingungen, die z. B. den Einsatz von Bioziden regeln eine Rolle bei der Auswahl der ergriffenen Maßnahmen (z. B. VO (EG) Nr. 1451/2007). Moderne Analysemethoden bieten hier die Möglichkeit, den betreffenden Schadorganismus rasch zu identifizieren und entsprechende Maßnahmen zu ergreifen (z. B. mikrobiell induzierte Korrosion) oder aber eine Evaluierung durchgeführter Maßnahmen durch die Veränderungen im Organismenspektrum (z. B. Verdrängung Sulfat-reduzierender Bakterien durch Nitrat-reduzierende Bakterien mittels gezielter Nitrat-Applikation) durchzuführen.

Verbesserung der Prozesskontrolle

Bei jenen Industrieprozessen, in denen Mikroorganismen gezielt zur Produktion eingesetzt werden, besteht die Möglichkeit, durch differenzierte mikrobielle Analysen die Steuerung der Prozesskontrolle zu verbessern. Das Ziel einer solchen Analytik ist einerseits die Produktivität zu erhöhen (z. B. bei der Produktion von Biogas) oder andererseits eine Stabilisierung des Prozesses (z. B. in Kläranlagen) zu gewährleisten. Für eine derartige Prozesskontrolle auf Basis mikrobieller Analysen ist eine genaue Kenntnis der Zusammenhänge zwischen Rohstoffen, Stoffumsetzung und der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft erforderlich. Diese Zusammenhänge sind bis dato erst in geringem Ausmaß bekannt. Zurzeit werden derartige Industrieanlagen vor allem durch verfahrenstechnische Erfahrungen auf Basis physikalisch-chemischer Parameter betrieben. Aktuelle Forschungsansätze konzentrieren sich aber zunehmend auf neue Ansätze in der Prozesskontrolle, bei denen eine differenzierte mikrobielle Zustandsbeschreibung der Anlage als einer der Steuerparameter dienen kann.

2.2 Spezifische Bedarfserhebung – Industrieprozesse

2.2.1 Kläranlagen

Grundlagen

Der Hauptteil der Abbauprozesse einer Kläranlage wird von Mikroorganismen vollzogen. In den so genannten Belebtschlammbecken werden die gelösten und dispergierten organischen Schmutzstoffe des Abwassers durch eine komplexe Gemeinschaft von Mikroorganismen (Biozönose) abgebaut und so aus dem Wasser

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

entfernt. Diese mikrobielle Gemeinschaft stellt ein dynamisches System dar, das auf jede Veränderung der Zusammensetzung der Abwässer reagiert und sich rasch in ihrer Zusammensetzung ändern kann. Eine solche Veränderung kann auch zum Wachstum unerwünschter Mikroorganismen führen. In der Fachliteratur wird vor allem die Bildung von so genanntem Bläh- bzw. Schwimmschlamm durch filamentöse Bakterien als eines der häufigsten Probleme in derartigen Anlagen genannt (KUNST et al. 2000).

Wissenschaftliche Untersuchungen haben in den letzten Jahren gezeigt, dass der Großteil des Stoffumsatzes durch Mikroorganismen erfolgt, die bisher noch unbekannt waren (WAGNER et al. 1993, KÄMPFER et al 1996, AMANN et al. 1998). Es muss daher davon ausgegangen werden, dass die bisher als charakteristisch angesehenen Leitorganismen (z. B. Nitrobacter) nur eine untergeordnete Rolle beim gesamten Stoffumsatz einer solchen Anlage einnehmen. Diese Erkenntnisse bieten ein neues Verständnis für Vorgänge und eröffnen neue Möglichkeiten zur besseren Steuerung solcher Anlagen.

Fachexpertise

chemisch-physikalische Prozesssteuerung

In der Praxis erfolgt die Prozessteuerung in modernen Kläranlagen über das kontinuierliche Monitoring der physikalisch-chemischen Parameter BSB5 (Biologischer Sauerstoffbedarf) und TOC (Gesamter organischer Kohlenstoff, total organic carbon) sowie den NH_4-, NO_3-, PO_4- und NO_2-Gehalt des Wassers. Eine permanente Überwachung der eingehenden Abwässer und des Klärvorgangs mittels Messsonden erlaubt nach Meinung der Fachleute eine ausreichende Beschreibung des Prozesszustands der Anlage. Da die gesetzlichen Grenzwerte (gemäß 91/271/EWG bzw. 98/15/EG) für das Klärwasser primär durch die erwähnten physikalisch-chemischen Parameter definiert sind, liegt auch der Fokus auf der entsprechenden Analytik. Zusätzlich wird ein ergänzendes Monitoring des mikrobiellen Zustands der einzelnen Klärstufen durchgeführt. Eine mikrobielle Zustandsbeschreibung des Klärguts mittels mikroskopischer Untersuchen und allfälliger Unterscheidung von Gram+/Gram– Bakterien erfolgt täglich, dient aber vor allem der Zusatzinformation und der Absicherung der Zustandsbeschreibung aufgrund der physikalisch-chemischen Parameter. So ist z. B. erfahrungsgemäß bei hohem Schwefel-Eintrag oder dem Absinken des Sauerstoffgehalts mit verstärkter Bildung von Blähschlamm durch filamentöse Bakterien zu rechnen. Bei Zufuhr kritischer Abwässer wird zwar auch auf die Entwicklung derartiger Bakterien geachtet, Gegenmaßnahmen werden aber erst bei Überschreiten eines kritischen Wertes – des so genannten Schlammindex (Schlammvolumen/Trockensubstanz) – eingeleitet. Als Gegenmaßnahmen kommt vor allem das mechanische Entfernen des Blähschlamms zur Anwendung.

Einsatz molekularbiologischer Analytik

FISH-Analyse für filamentöse Bakterien

Neben diesen etablierten Parametern werden aber zunehmend auch spezifische mikrobiologische Parameter für die Prozesskontrolle berücksichtigt. Speziell Probleme mit filamentösen Bakterien werden vermehrt mittels FISH-Analyse näher charakterisiert, um eine spezifischere Bekämpfung des Problems zu erzielen.

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

Entsprechende Systeme sind auf dem Markt und werden kommerziell angewendet (z. B. Vermicon GmbH[2]). Der apparative Aufwand ist, wie bereits in Kapitel 1.3.3 erläutert, verhältnismäßig gering. Beschränken sich die Maßnahmen, die bei auftretenden Problemen ergriffen werden auf konventionelle Methoden (z. B. mechanische Beseitigung des Blähschlamms), kann die bestehende Analytik als ausreichend angesehen werden.

Während aber die in Frage kommenden Schadorganismen z. B. bei der Bierproduktion begrenzt und sehr genau bekannt sind, stellt die Biozönose einer Kläranlage ein sehr komplexes biologisches System dar. Sollte die Analyse über die Erfassung allgemein bekannter Mikroorganismen hinausgehen und Informationen zur gezielten Prozesssteuerung mittels biologischer Parameter liefern, stellt dies entsprechend hohe Anforderungen an die Analytik.

Kenntnisse der biolog. Zusammenhänge verbessern

Voraussetzung für den Einsatz einer derartigen Prozesssteuerung ist aber ein besseres Verständnis der stofflichen Umsetzungen und der komplexen biologischen Zusammenhänge und Biozönosen in einer solchen Anlage. Grundlegende Arbeiten zu dieser Fragestellung wurden unter anderem von Prof. Michael Wagner von der Universität Wien durchgeführt (WAGNER et al. 1993, 2003, AMANN et al. 1998). Nach Einschätzung von Experten sollte es in Zukunft möglich sein, durch die Verfügbarkeit von biologischen Daten, wie sie die nachstehend beschriebenen Methoden liefern, eine gezieltere Zustandsbeschreibung der Anlage zu erhalten.

Anwendung von PCR

PCR stellt in diesem Zusammenhang eine sehr gute Möglichkeit dar, verschiedenste Parameter (in diesem Fall verschiedenste Mikroorganismen) parallel zu identifizieren und deren Anteil zu bestimmen. Durch die hohe Dichte an Mikroorganismen in einem Belebtschlammbecken bzw. Tropfkörper sind keinerlei zeitaufwendige Anreicherungskulturen wie bei diversen Anwendungen in der Getränkeindustrie (z. B. Bierherstellung) notwendig. Analyseergebnisse könnten in wenigen Stunden verfügbar sein. Bei Verwendung eines multiplex Real Time PCR-Ansatzes kann die gesamte Analyse innerhalb von ca. 3 Stunden abgeschlossen sein.

weiterer Forschungsbedarf bei der Chip-Technologie

Aufgrund der Komplexizität der Biozönosen, wie sie in Kläranlagen vorhanden sind, stellt die Chip-Technologie, mit der eine Vielzahl von Parametern parallel analysiert werden kann, einen geeigneten Ansatz für eine mikrobiell basierte Prozesskontrolle dar. Hier ist aber noch weiterer Forschungsaufwand notwendig, um die Zusammenhänge zwischen Stoffumsätzen und Organismengruppen besser zu definieren.

2.2.2 Mikrobiell induzierte Korrosion (MIC)

Grundlagen

Mikrobiell induzierte Korrosion (microbial induced/influenced corrosion – MIC) ist ein weit verbreitetes Phänomen (LUDENSKY 2003 JAVAHERDASHTI 2008). Unter MIC versteht man die Korrosion von Metallteilen, die mit wässrigen Lösungen in Kontakt stehen und die durch die metabolischen Prozesse von Mikroorganismen verursacht wird (VIDELA & HERRERA 2005). MIC tritt bei einer Vielzahl von Anwendungen auf, da Mikroorganismen auch unter extremen Umweltbedingungen existieren und wachsen können. So verursacht MIC z. B. Schäden in Anlagen zur Erdöl-/Erdgasförderung (siehe Abbildung 6) (ZHU et al 2003), in Rohrsystemen mit industriellem Nutzwasser (COETSER & CLOETE 2005) oder bei Aluminiumlegierungen von Flug-

Schadwirkung durch MIC

[2] http://www.vermicon.de

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

zeugtanks (JAVAHERDASHTI 2008). Die Schäden die MIC an amerikanischen Pipelines verursacht, werden von der National Association of Corrosion Engineers (NACE 2006) auf bis zu 13 Milliarden US$ geschätzt.

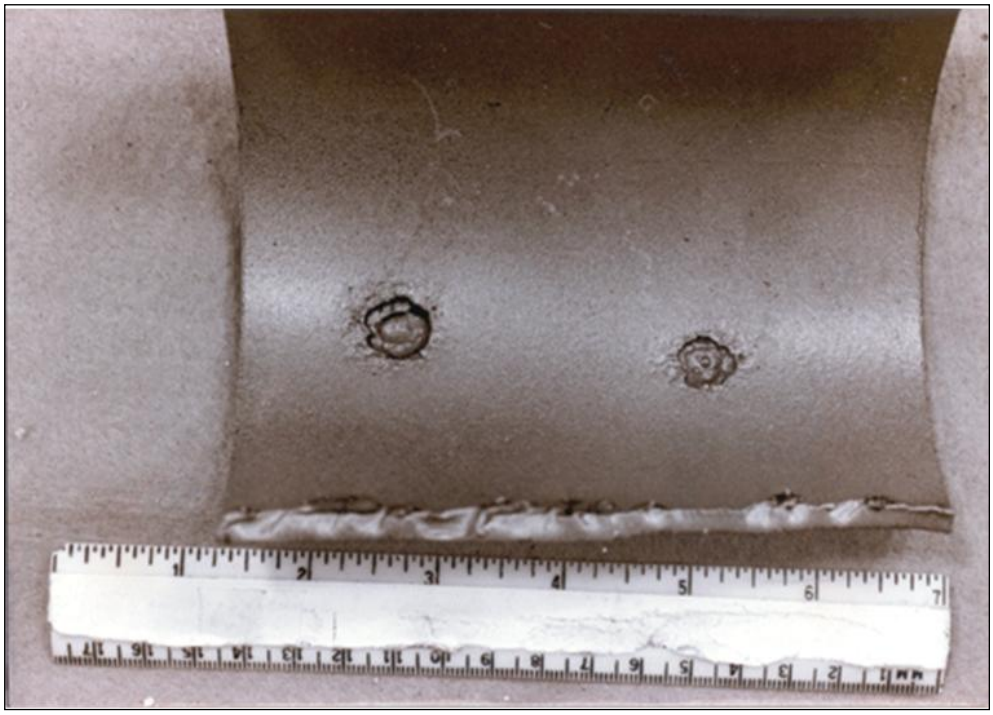


Abbildung 6: Mikrobiell induzierte Korrosion an einem Pipeline-Rohr (© mit freundlicher Erlaubnis des Petroleum Recovery Research Cente, New Mexico).

Wesentlich für die Wirkung von MIC ist die Bildung so genannter Biofilme, die eine dünne Schicht aus schleimigen Exopolysacchariden (EPS) darstellen und in die die Mikroorganismen eingebettet sind (WINGENDER et al. 1999). Diese EPS-Schicht schützt die Mikroorganismen einerseits gegen die Wirkung von Bioziden (GROPE et al. 1995) andererseits können sich korrosive Stoffwechselprodukte lokal konzentrieren und so substanzielle Schäden verursachen. Ein Phänomen das die Feststellung von MIC erschwert, ist die oft lokale Bildung von Biofilmen. Dadurch können sich Korrosions-„Hot Spots“ bilden, die sich der routinemäßigen Kontrolle entziehen. Ein weiteres Problem, das sehr oft zusammen mit MIC auftritt, ist das so genannte „Biofouling“, worunter das Wachstum von Bakterien und Pilzen zu verstehen ist, die zu Verstopfungen von Anlagenteilen (Wärmetauscher, Ventile, Filter) führen können (COETSER & CLOETE 2005, GILBRIDEA et al. 2006). Als Gegenmaßnahmen kommen vor allem mechanische Reinigungsverfahren oder die Behandlung mit Bioziden zum Einsatz.

Verursacher von MIC

Bei MIC können unterschiedliche Arten der Materialkorrosion unterschieden werden, die jeweils spezifische Organismengruppen zugeordnet werden. Als häufigste Verursacher von MIC treten folgende Organismengruppen auf:

- Säure-bildende Bakterien und Pilze,
- Sulfat-reduzierende Bakterien (H_2S-Bildner),
- Metall-reduzierende Bakterien,
- Metall-abbauende Bakterien.

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

Da die Art der Korrosion entsprechend der verschiedenen Organismengruppen unterschiedlich ist, stellt eine differenzierte, mikrobielle Analyse einen wesentlichen Schritt in der Problembehebung dar. Sollen über die bloße mechanische Reinigung des Systems auch gezieltere Maßnahmen zum Einsatz kommen (z. B. Biozidbehandlung) so kann die Identifizierung der betreffenden Mikroorganismen die Auswahl einer geeigneten Gegenmaßnahme (z. B. Wahl eines geeigneten Biozids) erleichtern und anschließend die rasche Überprüfung der Wirksamkeit der Gegenmaßnahme evaluiert werden.

Einsatz molekularbiologischer Analytik

Eine häufig eingesetzte Technik zur Feststellung vom MIC sind Sensoren, die durch die Trübung eines optischen Fensters die Bildung von Biofilmen messen und so indirekt Rückschlüsse für das Auftreten von MIC zulassen (z. B. Onvida GmbH[3]). Derartige Sensoren geben aber keinen Aufschluss darüber, welche Mikroorganismen für die Bildung des Biofilms verantwortlich sind.

Anwendung von PCR- und FISH-Analytik …

Geeignete Analyseverfahren wären in diesem Zusammenhang PCR und FISH-Analyse. Beide Technologien sind bei einem klar umgrenzten Organismenspektrum einfach und mit hoher Spezifität einsetzbar. PCR-Verfahren werden bereits vereinzelt durch spezialisierte Analytikdienstleister angeboten (Gas Technology Institute, USA).

Der Einsatz von DNA-Chips ist denkbar und eröffnet ein breites Analysespektrum, dürfte aber für die im Zusammenhang mit MIC auftretenden Fragestellungen einen zu großen Entwicklungs- sowie Durchführungsaufwand darstellen.

Immunologisch-biochemische Analysemethoden wie ELISA oder Dip-Sticks sind wegen der Notwendigkeit zur Differenzierung mehrerer Organismengruppen für diese Anwendung nur begrenzt geeignet.

… insbesondere bei differenzierterer Analyse

Da die Problematik von MIC vor allem bei großen industriellen Anlagen von Relevanz ist, gehen die Anstrengungen bei der Analytik von MIC-bedingter Problemen eher in die Richtung einer prozessorientierten Kontrolle dieses Phänomens. In den vergangenen Jahren wurden verstärkt Anstrengungen unternommen, entsprechende Messsonden zu entwickeln, die eine kontinuierliche Überwachung der Anlage erlauben (BRITE/EURAM Projekt „Microbiologically influenced corrosion of industrial materials“). Die Messverfahren dieser Sonden basieren zumeist auf physikalisch-chemischen Parametern. Molekularbiologische Analysen werden in Zukunft zwar verstärkt eingesetzt werden, jedoch vor allem dort, wo eine weiterführende differenziertere Analyse zur Bekämpfung der auftretenden Probleme notwendig erscheint.

[3] http://www.onvida.com

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

2.2.3 Erdölindustrie

Grundlagen

Mikrobiell verursachte Probleme sind in der Erdölförderung und -verarbeitung seit langem bekannt. Das Wachstum von schleimbildenden Bakterien, Mikrobiell-induzierte Korrosion (MIC) oder die Versauerung durch Schwefel-reduzierende Bakterien verursachen immer wieder Schwierigkeiten im Förderprozess oder bei Transport und Lagerung bestimmter Erdölprodukte.

Probleme durch Biofilme

Vor allem bei so genannten Mitteldestillaten (Diesel, Heizöl) kann es zu Problemen beim Transport (z. B. Schiff) oder bei längerer Lagerung kommen. Durch Kondensation wird ein Wasserfilm an den Tankwänden gebildet, der durch seine höhere Dichte am Tankboden eine Schicht unter dem Kraftstoff bildet. An der Grenzfläche von Wasser und Kraftstoff und den inneren Oberflächen von Tanks (Biofilm) leben und vermehren sich die Mikroorganismen. Kommt es zu einer signifikanten Vermehrung (Biofouling) kann es zur Verstopfung von Leitungen und Filtern kommen oder die Kontamination wird auf nachgeschaltete Bereiche der Anlage übertragen (COETSER & CLOETE 2005).

Gegenmaßnahmen sind mit erheblichem Aufwand verbunden. Zumeist muss der Tank auf einen Minimalstand abgelassen und danach Tank und Füllung mit Bioziden behandelt werden. Da die Mikroorganismen durch das Biozid zwar abgetötet aber nicht aufgelöst werden, stellt die betreffende Charge immer noch ein Problem dar. In der Praxis wird versucht, durch eine strenge Qualitätssicherung mit regelmäßigen Kontrollen derartige Kontaminationen auf ein Minimum zu reduzieren.

H_2S-Bildung durch Sulfat-reduzierende Bakterien

Ein weiteres Problem, das vor allem bei der Erdölförderung auftritt, stellt die Aktivität von anaeroben Sulfat-reduzierenden Bakterien dar. Das gebildete H_2S stellt nicht nur eine Geruchsbelästigung dar, sondern ist auch hoch toxisch. Es verursacht Korrosionsschäden an Metallteilen und kann Schwefel-abhängige Qualitätsparameter des geförderten Erdöls bzw. Erdgases beeinflussen.

Fachexpertise

Flutwasseraufbereitungskonzept

Nach Meinung von ExpertInnen der OMV stellen mikrobielle Kontaminationen bei der Erdölförderung in Österreich kein Problem dar. Mit einem speziellen Flutwasseraufbereitungskonzept, das zusammen mit der Universität für Bodenkultur entwickelt wurde, können die mikrobiologischen Probleme in diesem Bereich weitgehend kontrolliert werden.

In Gegensatz zu früheren Verfahren, bei denen Biozide zur Vermeidung von Kontaminationen zum Einsatz gekommen sind, wird das Flutwasser, das in die Lagerstätte zurückgepumpt wird, jetzt einer physikalisch-mechanischen Aufbereitung mit angeschlossener mikrobieller Reinigung unterzogen. Eine differenzierte mikrobielle Analyse des Flutwassers bzw. die Überprüfung der Biozidwirksamkeit wird nicht mehr durchgeführt.

Bei anderen Förderbedingungen, bei denen z. B. Meerwasser in die Lagerstätten gepumpt werden muss, haben die oben genannten Probleme eine größere Bedeutung. Hier ist für die Auswahl eines geeigneten Biozids eine differenzierte Analyse der Organismengruppen notwendig.

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

Als drittes Hauptproblem in Zusammenhang mit Erdölprodukten wird die bereits in Kapitel 2.2.2 behandelte mikrobiell induzierte Korrosion von Rohrleitungen und Tanks genannt.

Einsatz molekularbiologischer Analytik

Keimzahlbestimmung durch IP 385-Test

Die bisherige Analytik bei mikrobiellen Kontaminationen von Mitteldestillaten wird vor allem mit klassischen mikrobiologischen Techniken durchgeführt. Der für die Petrochemie relevante IP 385-Test ist eine Bestimmung der Gesamtkeimzahl mittels Plattentest und macht je nach Kontaminationsgrad eine Inkubation von bis zu sieben Tagen notwendig. Dieses Verfahren lässt keine Differenzierung der Mikroorganismen zu und erfasst auch nur aerobe Keime, erlaubt also keine Erfassung von z. B. Sulfat-reduzierenden Bakterien. Daneben gibt es eine Vielzahl spezifischer Kultivierungsverfahren, mit denen auch Organismenklassen wie Sulfat-reduzierende Bakterien nachgewiesen werden können. Wie bei allen Verfahren, die auf Kultivierung basieren, benötigen diese Nachweise eine längere Zeit und erfassen nicht alle relevanten Mikroorganismen.

International tätige Dienstleistungslabors bieten speziell für die Erdölindustrie abgestimmte Analysepakete bei mikrobiellen Problemen an (z. B. Danish Technological Institute[4]). Hier kommen bereits vielfach moderne molekularbiologische Analysen (PCR, 16S rDNA Sequenzierung etc.) zur Anwendung. Diese Verfahren werden aber nach Auskunft von ExpertInnen eher in Fällen eingesetzt, bei denen es zu spezifischen Problemen bei einer Anlage kommt, um die Ursachen zu identifizieren und Gegenmaßnahmen zu evaluieren. (z. B. Verdrängen von Sulfat-reduzierenden Bakterien durch Nitrat-reduzierende Bakterien mittels Nitrat-Injektionen in die Bohrlöcher bei Off-Shore-Förderung; DUNSMORE et al. 2006).

Einsatz eines DNA-Chips

Da man im Zusammenhang mit mikrobiellen Problemen bei der Ölförderung mit einem breiten Organismenspektrum zu tun hat, die zum Teil aufwendige Kultivierungsverfahren (anaerobe Kulturen) benötigen, kann der Einsatz eines DNA-Chips hier eine wesentliche Vereinfachung der Differenzierung bringen. Derartige Analysen lassen sich auch in kleinen Labors mit entsprechender Infrastruktur durchführen. Die Anforderungen an das Laborpersonal sind allerdings bei dieser Technologie, wie in Kapitel 1.3.2 dargelegt, hoch. Aufgrund dieses Umstands kann man davon ausgehen, dass derartige Analysen extern in spezialisierten Laboratorien durchgeführt werden würden.

[4] http://www.teknologisk.dk

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

2.2.4 Biotreibstoffe

2.2.4.1 Biogasproduktion

Grundlagen

Biogasanlagen gehören neben Kläranlagen zu jenen Industrieanlagen, in denen die Wirkung von Mikroorganismen den eigentlichen prozessbestimmenden Faktor darstellt. In Zuge der Diskussion über erneuerbare Energiequellen wird der Biogasproduktion eine zentrale Rolle zugeschrieben (INDINGER et al. 2006). Vor allem bei Produktion von Biogas aus pflanzlicher Biomasse wird noch ein großes ungenutztes Potenzial zur Verfahrensverbesserung gesehen, besonders wenn ausschließlich nachwachsende Rohstoffe wie Gras- oder Maissilage eingesetzt werden (mündl. Mitt. DI Roland Kirchmayr).

großes ungenutztes Potenzial vorhanden

Zurzeit erfolgt die Prozesskontrolle in vielen Biogasanlagen durch den sehr allgemeinen Parameter der volumsbezogenen Gärraumauslastung und die entsprechende Zufuhr von Rohstoffen oder durch Input-Output-Analyse (BRAUN 1982, RECKNAGEL et al. 2003). Beide Verfahren basieren sehr stark auf Erfahrungswerten und lassen eine nur unspezifische Prozesssteuerung zu. Verschiedene Forschungsprojekte zur Untersuchung von Prozessoptimierungen über ein besseres Verständnis der mikrobiellen Stoffwechselvorgänge sind im Laufen. So wird zurzeit in einem konkreten Projekt am Institut für Umweltbiotechnologie der Universität für Bodenkultur der Einfluss der mikrobiologischen Aktivität auf die Biogasproduktion in Relation zu verschiedenen Prozessparametern untersucht.

derzeit nur unspezifische Prozesssteuerung

Fachexpertise

Nach Meinung der Fachleute sollte es in Zukunft möglich sein, durch gezielte Beeinflussung der mikrobiellen Zusammensetzung eine spezifische Prozesskontrolle zu unterstützen. Für eine derartige Kontrolle der mikrobiellen Zusammensetzung müssen aber geeignete Analysemethoden entwickelt werden, die eine einfache und aussagekräftige Charakterisierung des mikrobiellen Status der Anlage erlauben. Dies können sowohl physikalisch-chemische Parameter sein, die die Entwicklung einer für die Methanbildung günstigen Biozönose bedingen, oder aber mikrobielle Parameter selbst, die charakteristisch für einen Prozesszustand sind. Aufgrund solcher Analysen ist es denkbar, die Biogasproduktion durch gezielte Maßnahmen in die jeweils gewünschte Richtung zu steuern.

Einsatz molekularbiologischer Analytik

Aus heutiger Sicht sind es vor allem Methoden mit hoher paralleler Analyseleistung, die sich für eine derartige Zustandsbeschreibung eignen.

Wie bereits im Kapitel 2.2.1 bei der möglichen Anwendung in Kläranlagen beschrieben, bietet die PCR-Technik die Möglichkeit, verschiedenste Parameter (in diesem Fall verschiedenste Mikroorganismen) parallel zu identifizieren und deren Anteil zu bestimmen. Die hohe Dichte an Mikroorganismen in einem Biogasreaktor lässt die direkte Isolierung der DNA aus der Probe zu, wodurch sich die Analysedauer deutlich verkürzt und Analyseergebnisse in wenigen Stunden verfügbar wären.

Einsatz der PCR …

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

… und von DNA-Chips

Ein weiterer Ansatz für eine Analysemethode mit hohem Durchsatz wäre in diesem Fall die DNA-Chip-Technologie. Durch die bereits erwähnte hohe Dichte an Mikroorganismen im Biogasreaktor wäre sogar ein direkter Nachweis der artspezifischen DNA denkbar.

Zu berücksichtigen ist, dass zurzeit Biogasanlagen mit einen Minimum an Zustandsparametern betrieben werden. Die Implementierung einer solchen analysebasierten Prozesssteuerung würde den Aufbau eines speziellen Labors benötigen. Als Alternative dazu sind externe Labors, die die entsprechende Analyseleistung anbieten können, denkbar. Derartige Mechanismen zur Prozesssteuerung könnten vor allem in größeren Anlagen zur Anwendung kommen. Wieweit sich die Kontrolle dieser Prozessparameter für kleine Anlagen – wie sie in dieser Sparte sehr zahlreich existieren – rentiert, bleibt abzuwarten.

2.2.4.2 Bioethanolproduktion

Grundlagen

Fehlgärung durch mikrobielle Kontaminationen

Bei der Bioethanolproduktion wird durch alkoholische Gärung mit Hilfe von Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) aus zucker- bzw. stärkehaltigen Rohstoffen (Mais, Getreide, Zuckerrüben) Ethanol hergestellt. Im Gegensatz zur Herstellung alkoholischer Getränke muss aber bei der Herstellung von Ethanol für industrielle Zwecke nicht so viel Augenmerk auf Hygiene gelegt werden. Mikrobielle Kontaminationen spielen aber auch hier eine Rolle, da es durch das übermäßige Wachstum von unerwünschten Mikroorganismen zu Fehlgärungen kommen kann (als hauptsächliche Verursacher solcher Fehlgärungen treten hier Milchsäure- (*Lactobacillus spp.*) und Essigsäurebakterien (*Acetobacter spp.*) sowie Wildhefen auf). Die Bildung von Milch- und Essigsäure beeinflusst die Vitalität der Gärhefe negativ, während Wildhefen um die verfügbaren Nährstoffe konkurrieren, was in beiden Fällen eine Verringerung der Ethanolausbeute zur Folge hat.

Fachexpertise

Mikrobiologische Analysen sind bei der Bioethanolproduktion von geringerer Relevanz. Das Auftreten von Fehlgärungen durch *Lactobacillus spp.* oder *Acetobacter spp.* wird im Bedarfsfall durch die Bestimmung von Milch- und Essigsäure mittels physikalisch-chemischer Verfahren (HPLC) nachgewiesen. Die mikrobiologischen Analysen beschränken sich auf die Bestimmung der Hefezellzahl und mikroskopischer Vitalfärbung, um einen generellen Überblick über den mikrobiellen Zustand des Fermentationsprozesses zu erhalten.

In den USA, wo die Bioethanolproduktion eine bedeutende Rolle spielt, wird jedoch zunehmend auf eine mikrobielle Kontrolle der Fermentation geachtet, um die Kosten für die Stehzeiten eines Fermenters zum Zweck der Dekontamination so gering wie möglich zu halten (SKINNER & LEATHERS 2004).

Einsatz molekularbiologischer Analytik

Einsatz von PCR und FISH

Für die Früherkennung einer sich etablierenden Fehlgärung würden sich vor allem PCR- oder FISH-Analyse am besten eignen, da mit beiden Techniken nicht nur eine Identifikation des Schadorganismus möglich ist, sondern durch eine quantitative Abschätzung auch das Ausmaß einer Kontamination und damit eines möglichen

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

Produktionsverlustes abgeschätzt werden kann. Die Identifikation ist in diesem Zusammenhang besonders wichtig, da der Einsatz von Antibiotika z. B. bei einer Hefekontamination wirkungslos ist.

2.2.4.3 Biodieselproduktion

Grundlagen

Bei Biodiesel treten ähnliche Probleme auf wie sie zuvor schon bei Dieselöl (siehe Kapitel 2.2.3) erwähnt wurden. Eine Studie der Universität Oldenburg (Arbeitsgruppe Allgemeine Mikrobiologie) beschäftigt sich mit der Lagerfähigkeit von reinem Rapsölmethylester und von unterschiedlichen Mischungen aus herkömmlichem Diesel und Biodiesel im Hinblick auf mikrobielles Wachstum. Dabei wurde in Einzelfällen eine Verzehnfachung der bakteriellen Keimzahl gegenüber herkömmlichem Diesel gemessen. Bei höheren Anteilen von Rapsölmethylester im Diesel und im reinen Biodiesel wird insbesondere das Wachstum von Pilzen gefördert. In Einzelfällen bilden diese Pilze in reinem Biodiesel bis zu zehnmal mehr Biomasse als in herkömmlichem Diesel. Neben dem Biodiesel selbst bildet dessen Rohstoff – das Rapsöl – ebenfalls ein Substrat für mikrobielles Wachstum.

erhöhte Kontamination durch Bakterien und Pilze

Fachexpertise

Laut Biodiesel Vienna GmbH spielen, ähnlich wie bei Bioethanol, mikrobielle Kontaminationen in der Praxis kaum eine Rolle.

Einsatz molekularbiologischer Analytik

Für die Anwendbarkeit moderner Analysemethoden gilt gleiches wie bereits bei Mitteldestillaten (Diesel, Heizöl) aus Mineralölproduktion ausgeführt wurde (siehe Kapitel 2.2.3).

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

3 EINSATZ VOM MOLEKULARBIOLOGISCHEN METHODEN IN DER LEBENSMITTELANALYTIK

3.1 Problemstellung Lebensmittelanalytik

In vielen Branchen, insbesondere in der Bier-, Getränke-, Trinkwasser- und Lebensmittelindustrie, ist die hygienische und mikrobiologische Sicherheit eine stetige Herausforderung. Die hygienischen Anforderungen sind vom Gesetzgeber klar vorgegeben, die KundInnen erwarten darüber hinaus aber zunehmend eine gleich bleibende Qualität des Produkts im Hinblick auf Aussehen, Geruch oder Geschmack. Eine strenge Anlagenhygiene und eine laufende mikrobiologische Kontrolle sind somit wichtige Voraussetzungen für die Sicherung des Produktionsbetriebes.

In diesem Zusammenhang spielt der Zeitfaktor eine wichtige Rolle. Herkömmliche mikrobiologische Testverfahren benötigen mehrere Tage (GRACIAS & MCKILLIP 2004). Bis zum Vorliegen der Testergebnisse kann die Qualität unbemerkt über Tage hinweg negativ beeinflusst worden sein. Die Ware bis zum Vorliegen der Analyseergebnisse auf Sperrlager zu legen verursacht hohe Kosten und verlangt große Lagerkapazitäten. Die Minimierung des Risikos einer Kontamination im laufenden Produktionsprozess, eine etwaige Produktrückholung und die damit verbundenen Kosten machen eine möglichst schnelle Überprüfung der einzuhaltenden Qualitätsparameter notwendig. Durch den Nachweis der Ursache (zumeist Mikroorganismen) in einer frühen Phase der Produktion können solche Probleme leichter kontrolliert werden. Die Anforderungen an die Analyselabors bezüglich der raschen Verfügbarkeit der Messergebnisse sind daher in den genannten Branchen am dringendsten.

möglichst rasche Analyseergebnisse notwendig

Unterscheiden lassen sich hier drei große Bereiche:

- Klassische Lebensmittelhygiene (HACCP-Systeme, einschlägige amtliche Richtlinien zur Lebensmittelhygiene).
- Fragestellungen zu Produktionsprozessen, die sich auf spezifische Qualitätsmerkmale (Beeinträchtigung z. B. von Aussehen, Geruch oder Geschmack) des Produkts beziehen.
- Frage nach der Authentizität von Lebensmitteln.

Für den ersten Bereich, der in der Qualitätssicherung eine zentrale Rolle einnimmt, gibt es bereits moderne Analysemethoden, die den Anforderungen nach schnellen Prüfergebnissen nachkommen. So kann der Nachweis typischer humanpathogener Keime wie *Escherichia coli*, *Salmonella* oder *Listeria* mittels PCR-Verfahren deutlich verkürzt werden (2 Tage vs. 3–7 Tage; ELLIS & GOODACRE 2001).

Im Bereich der Überprüfung und Kontrolle von produktspezifischen Qualitätskriterien (z. B. Geschmacks- oder Geruchsbeeinträchtigungen durch unerwünschte Fermentationsprozesse) gibt es in einigen Branchen (z. B. Brauereien) bereits Beispiele für neuartige biologische Analyseverfahren wie z. B. PCR und FISH. In den meisten Fällen werden derartige Fragestellungen aber noch mittels physikalisch-chemischer oder klassischer mikrobieller Analytik bearbeitet, die aber im Regelfall erst ansprechen, wenn das Problem bereits aufgetreten ist.

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

Herkunfts- und Echtheitskontrolle der Produkte

Daneben spielt die Herkunftskontrolle von Rohstoffen für die Lebensmittelindustrie eine immer größere Rolle (siehe auch Kapitel 3.2.3). Durch die dynamische Entwicklung im internationalen Handel und der zunehmenden Verbreitung geschützter Bezeichnungen für regionale Produkte (PDO – Protected Denomination of Origin bzw. g.g.A. – geschützte geografische Angabe) gewinnen Fragen der Rückverfolgbarkeit (Produktechtheit bzw. Ursprungszertifikate) immer mehr an Bedeutung. Aber auch der Schutz hochwertiger Produkte vor Verfälschung ist gefordert. Bekannte Beispiele sind die Vermischung von hochwertigem Basmati-Reis mit billigeren Langkorn-Reissorten (siehe Kapitel 3.2.3.2) oder von Arabica-Kaffeesorten mit *Coffea robusta*-Bohnen (siehe Kapitel 3.2.3.1). Neben klassischen Verfahren wie Isotopenanalyse und verschiedenen Arten der Spektroskopie werden zunehmend molekularbiologische Verfahren entwickelt und angewendet. (REID et al. 2006).

PCR- und ELISA-Allergentests

Durch die Zunahme an allergischen Erkrankungen gewinnt der Bereich der Allergenanalytik in letzter Zeit immer mehr an Bedeutung. Da Allergene auch in geringsten Mengen wirksam sind, müssen die analytischen Verfahren eine besonders hohe Sensitivität aufweisen. Durch den verbreiteten Einsatz von PCR- und ELISA-Tests sind hier bereits moderne Analysemethoden, die diesen Anforderungen gerecht werden, im Einsatz.

GVO-Nachweis

Im Bereich des Nachweises von gentechnisch veränderten Bestandteilen in Lebens- und Futtermitteln spielen molekularbiologische Analysemethoden eine zentrale Rolle und sind auch in der entsprechenden EU-Verordnung (VO (EG) Nr. 1829/2003) verankert. Mit zunehmender Zahl der in der EU zugelassenen genetisch veränderten Organismen (GVO) steigen die Anforderungen an eine schnelle und kostengünstige Analytik in diesem Bereich (HOLST-JENSEN et al. 2003).

3.2 Spezifische Bedarfserhebung Lebensmittelanalytik

3.2.1 Getränkeerzeugung

3.2.1.1 Bierproduktion

Grundlagen und Fachexpertise

bakterielle Kontaminationen

In der Brauindustrie sind verschiedene Probleme bzw. Qualitätskriterien im Zusammenhang mit Mikroorganismen bekannt. Im Bereich der mikrobiellen Kontaminationen sind es vor allem milchsäurebildende Bakterien wie *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus sp*. oder *Pectinatus sp*. die zur geschmacklichen Beeinträchtigung des fertigen Produkts führen (PRIEST & STEWART 2006). Mit der Entwicklung moderner Produktionsanlagen und einer zunehmenden Automatisierung der Produktionsabläufe konnten deutliche Verbesserungen in der Hygiene erzielt und Probleme mit bierschädlichen Mikroorganismen reduziert werden. Kontaminationen mit den genannten Bakterien stellen aber immer noch ein großes Problem bei der Biererzeugung dar. Kritische Bereiche hinsichtlich möglicher Kontaminationen mit qualitätsmindernden Mikroorganismen sind vor allem der Beginn des Gärvorgangs und die Weiterführung des Produkts in die jeweils nächsten Produktionsschritte über Rohre und Ventile.

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

Problembereich Abfüllanlage

Besonders kritisch sind hier laut Aussagen von Fachleuten die Abfüllanlagen. Diese müssen regelmäßig gereinigt und desinfiziert werden. Gleichzeitig erfolgen kontinuierliche Kontrollen der Rohstoffe (Malz, Hefe), des Gärguts während jedes Produktionsschrittes sowie des Abwassers der Reinigungsschritte. Die Analysen dienen einerseits der direkten Qualitätskontrolle und andererseits dazu, um bei auftretenden Problemen die Kontaminationsquelle identifizieren und beseitigen zu können.

Einsatz molekularbiologischer Analytik

Qualitätskontrolle durch Betriebslabors

Mit Ausnahme von Kleinbrauereien (microbreweries) besitzt jede mittlere bis große Brauerei ein entsprechendes Analyselabor, in dem neben verschiedenen physikalisch-chemischen Analysen auch grundlegende mikrobiologische Untersuchungen durchgeführt werden. Zu den Hauptaufgaben dieser Betriebslabors zählen neben der Kultivierung der zur Gärung verwendeten Hefestämme eine kontinuierliche Überprüfung des Gärguts auf die bereits genannten Bierschädlinge. Die Analyse erfolgt meist mittels Kultivierung der gezogenen Proben auf speziellen Agar-Nährböden im Plattentestverfahren. Die Auswertung dieser Platten erfolgt nach drei bzw. fünf Tagen.

Bio-Monitoring-Systeme

Diese lange Analysedauer ist nach Meinung von Fachleuten ein großer Nachteil der bisherigen Analysemethoden, da bis zum Vorliegen der Testergebnisse die Qualität des Produktes über Tage hinweg beeinträchtigt werden kann. In größeren Brauereien kommen neuerdings vermehrt so genannte Bio-Monitoring-Systeme zum Einsatz. Bei diesen Systemen wird mit Hilfe von optischen Messsonden die Bildung von Biofilmen erfasst und aufgezeichnet (TAMACHKIAROW 2005). Wird ein vorgegebener Schwellenwert überschritten, schlägt das System Alarm. Entsprechende Systeme sind am Markt und werden bereits angewandt (z. B. Onvida GmbH[5]). Die Bio-Monitoring-Systeme geben allerdings keine differenzierten Informationen über die Art der vorhandenen Mikroorganismen, sondern lassen nur indirekte Rückschlüsse auf ein mögliches Kontaminationsrisiko zu. Als Konsequenz auf das Anschlagen des Monitoring-Systems kann entweder eine zusätzliche Analyse erfolgen oder es werden – wie im Regelfall üblich – vorgegebene Maßnahmen (z. B. Reinigung und Desinfektion der Abfüllanlage) ergriffen.

Biolumineszenz-Nachweis von ATP

Ähnliches gilt auch für ein weiteres Testsystem, das auf dem Nachweis von Adenosintriphosphat mittels Biolumineszenz basiert. Der Nachweis von ATP ist ein deutlicher Hinweis auf das Vorhandensein von Mikroorganismen, gibt aber keine Informationen über die Art der Kontamination. Dieses Verfahren ist eher dazu geeignet z. B. die Effizienz eines Reinigungsschritts durch die Abwesenheit von mikrobiellem ATP zu kontrollieren.

Einsatz der FISH-Analyse

Ein entsprechend leistungsfähiges Analyseverfahren liegt in Form der so genannten FISH-Analyse (siehe Kapitel 1.3.3) für bierschädigende Bakterien vor. Dieses Verfahren erlaubt in wenigen Stunden (~ 3 Std.) eine differenzierte Analyse der vorhandenen Kontamination. Ist die Keimzahl aber gering, muss auch bei diesem Verfahren eine Anreicherungskultur vorangestellt werden, die 2–3 Tage Zeit beansprucht. Entsprechende Systeme sind auf dem Markt und werden kommerziell angewendet (Vermicon GmbH[6], easyProof GmbH[7]). Der apparative Aufwand ist ver-

---

[5] http://www.onvida.de/

[6] http://www.vermicon.de

[7] http://www.easyproof.de

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

hältnismäßig gering (Fluoreszenzmikroskop) und kann in die vorhandene Laborinfrastruktur integriert werden. Die methodischen Anforderungen dieser Technik sind ebenfalls gering, so dass die Analyse durch geschultes Laborpersonal durchgeführt werden kann.

Einsatz des PCR-Verfahrens

Ein weiteres leistungsstarkes Analyseverfahren stellt die PCR dar. In den letzten Jahren wurden spezifische Nachweissysteme für relevante Bakteriengruppen entwickelt (PRIEST & STEWART 2006). Im Zuge des 5. Forschungs-Rahmenprogramms der Europäischen Union wurde ein Forschungsprojekt durchgeführt, das die Entwicklung entsprechender PCR-Verfahren für die praktische Anwendung im Routinebetrieb zu Thema hatte. Die Ergebnisse dieses Projekts werden kommerziell in Form von PCR-Kits und Analysedienstleistungen verwertet (PIKA Weihenstephan GmbH[8]). Vorteil der PCR-Methode ist die Möglichkeit, in einem einzelnen Analysedurchlauf verschiedene Organismengruppen parallel zu testen.

Der apparative Aufwand für PCR-Verfahren ist höher einzustufen als für fluoreszenzmikroskopische Verfahren. Weiters stellen PCR-Verfahren höhere Anforderungen an die Kompetenz des analytischen Personals.

Die angeführten Methoden werden in größeren Brauereien in der Praxis angewendet. Die Routineanalysen erfolgen aber weiterhin mittels klassischer Verfahren, da in dieser Branche vor allem eine prozessorientierte Qualitätssicherung (Einhaltung der Hygienevorschriften, entsprechende Reinigungsabläufe etc.) zur Vermeidung von Gärproblemen angewendet wird. Nur im Fall von speziellen Fragestellungen oder dem konkreten Verdacht auf das Vorhandensein eines Bierschädlings werden diese modernen Verfahren zur Identifizierung herangezogen.

3.2.1.2 Fruchtsaftproduktion

Grundlagen und Fachexpertise

Bei Fruchtsäften und fruchthaltigen Getränken stellen hauptsächlich Mikroorganismen, die zu geschmacklichen Beeinträchtigungen (Milch-Essigsäure-Bildner, *Alicyclobacillus spp.*) führen, ein Problem dar. Humanpathogene Keime spielen in diesen Zusammenhang keine Rolle, da diese nur in nicht pasteurisierten Produkten auftreten. Die Durchlaufzeiten bei Fruchtsaft-produzierenden Betrieben sind im Schnitt sehr kurz (einige Tage), daher kommt der Eingangskontrolle der Rohstoffe eine entscheidende Bedeutung zu. Als mikrobiologische Qualitätskriterien werden für gewöhnlich die Gesamtkeimzahl, das Auftreten von milchsäure- und essigsäurebildenden Bakterien, Schimmelpilzen sowie gärfähigen Hefen bestimmt.

Eingangskontrolle der Rohstoffe

Ein weiterer Aspekt, der von ExpertInnen verschiedenster Branchen genannt wurde, ist die Vermeidung von allergenen Substanzen in den Produkten. Durch das vermehrte Auftreten allergener Erkrankungen gewinnt die Allergenanalytik zunehmend an Bedeutung. Hier kommen bereits vorwiegend moderne Analysemethoden (PCR, ELISA) zum Einsatz. Da die Frage des Allergengehalts oft bereits für die Anlieferung/Annahme der Rohstoffe entscheidend ist, wird hier von ExpertInnen die Notwendigkeit für noch schnellere und noch einfachere Nachweisverfahren, die vor Ort durchgeführt werden können, unterstrichen.

PCR- und ELISA-Allergentests

[8] http://www.pika-weihenstephan.de

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

Einsatz molekularbiologischer Analytik

Der Nachweis der relevanten Organismengruppen erfolgt in den meisten Fällen mit klassischen mikrobiellen Kultivierungsverfahren. Hier besteht eine Diskrepanz zwischen den kurzen Durchlaufzeiten des Produkts und der Dauer dieser Analyseverfahren. In den meisten Bereichen stellen mikrobiologische Analysen zwar kein Kriterium für die Freigabe der Produktionscharge dar, der Druck des Handels und der KonsumentInnen machen aber eine Minimierung der Produktausfälle notwendig. Ähnlich wie bereits in vorangegangen Kapitel ausgeführt, würde auch hier eine schnelle Verfügbarkeit der Analysedaten die Möglichkeit schaffen, frühzeitig Gegenmaßnahmen (Pasteurisierung) bei auftretenden Kontaminationen einzuleiten und dadurch den eventuellen Verlust einer Produktionscharge zu verhindern.

PCR- und FISH-Verfahren sowie Durchflusszytometrie

Da es sich – ähnlich wie bei der Biererzeugung – zumeist um klar definierte Schadorganismen(gruppen) handelt, würden sich vor allem die PCR- und die FISH-Analyse am besten eignen. Kommerzielle Kits zum Nachweis der genannten Schadorganismen mittels FISH-Analyse sind bereits am Markt (z. B. Vermicon GmbH[9]). Ein weiteres Verfahren, das in diesem Zusammenhang zum Einsatz kommen kann, ist die Durchflusszytometrie. Dieses Verfahren kann zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl eingesetzt werden oder aber durch die Koppelung mit einem fluoreszenzmarkierten System in Analogie zur FISH-Analyse auch zur spezifischen Identifizierung von Keimen herangezogen werden.

Nach Auskunft eines Experten eines großen österreichischen Fruchtsaftherstellers liegen aber die Kosten für neue Analyseverfahren (z. B. Durchflusszytometrie) ca. 2- bis 3-mal höher als bei herkömmlichen Kultivierungsverfahren. Der Aufbau einer PCR-Analyse-Einheit wurde in diesem Betrieb in Betracht gezogen, jedoch wegen der höheren Anschaffungskosten und der Notwendigkeit von hochqualifiziertem Personal nicht umgesetzt.

Für den Bereich Fruchtsäfte gilt – wie generell für die Getränkeindustrie – dass vor allem eine prozessorientierte Qualitätssicherung (Einhaltung der Hygienevorschriften, entsprechende Reinigungsabläufe etc.) zur Vermeidung von mikrobiellen Kontaminationen angewendet wird. Die durchgeführten Analysen werden vor allem zur Überprüfung der Wirksamkeit dieses Qualitätssicherungssystems herangezogen und zumeist nicht zur aktiven Freigabe der Produktionschargen.

3.2.2 Molkereiprodukte

Grundlagen und Fachexpertise

Bestimmung des Gesamtkeimzahl

Mikrobiologische Untersuchungen spielen in der Milchwirtschaft eine große Rolle. Routinemäßig wird vor allem die Gesamtkeimzahl bestimmt, da sich daraus eine generelle Aussage über die Hygiene der Rohmilch, aber auch der entsprechenden Milchprodukte ableiten lässt. Pathogene Keime spielen außer bei der Käseerzeugung aus Rohmilch nur eine untergeordnete Rolle, da in so gut wie allen Fällen nur pasteurisierte Milch zur Weiterverarbeitung herangezogen wird. Regelmäßige Kontrollen sämtlicher Produktionsanlagen auf betriebsinterne Kontaminationsquellen (z. B. Missachtung der Hygienevorschriften durch die MitarbeiterInnen) sind üblicherweise integraler Bestandteil jedes Qualitätssicherungskonzeptes entsprechender Betriebe. Durch die Pasteurisierung und eine strenge Prozesskontrolle können mikrobielle Probleme bei Frischmilch auf ein geringes Maß reduziert werden.

[9] http://www.vermicon.de

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

Hefe- und Pilzkontaminationen

Kontaminationen mit Hefen oder Schimmelpilzen stellen aber bei fermentierten Produkten (Joghurt, Buttermilch, Sauermilch) ein wichtiges Thema dar. Gärfähige Hefen verderben nicht nur das Produkt, sondern führen durch die Gasbildung zum Platzen der Verpackung.

pathogene Keime – Listerien

Bei der Verarbeitung von Rohmilch (z. B. Käseerzeugung) spielt die Keimbelastung eine wesentlich wichtigere Rolle. Hier ist auch die Thematik pathogener Keime von Relevanz. Vor allem Listerien (*Listeria monocytogenes*) stellen ein Problem dar, da diese ubiquitär vorkommen und daher jederzeit im Produktionsprozess auftreten können. Aus diesem Grund müssen regelmäßig Analysen auf das Vorhandensein von Listerien durchgeführt werden.

Neben den unerwünschten Mikroorganismen spielen aber jene Bakterien, die zur Herstellung fermentierter Milchprodukte (Joghurt, Sauermilch, Käse usw.) benötigt werden eine große Rolle. Da die Reinhaltung solcher Bakterienkulturen aufwendig ist und besondere Hygienemaßnahmen erfordert, werden derartige Starterkulturen zumeist nicht im eigenen Betrieb kultiviert, sondern von spezialisierten Herstellern bezogen.

Einsatz molekularbiologischer Analytik

Mikrobielle Analysen werden zumeist in den Betriebslabors der Unternehmen durchgeführt. Zum Einsatz kommen nach wie vor großteils klassische Kultivierungsverfahren. Die Analysedauer beträgt ca. 4–5 Tage, wobei eine aktive Freigabe nur bei einigen kritischen Produkten (Schlagobers, Produkte mit Getreideanteil, Kaffeeobers) erfolgt (mündl. Mitt. DI Kammerer, NÖM AG).

PCR- und FISH-Analyse für Hefen und Pilze

Wie bereits in den beiden vorangegangenen Kapiteln stellen auch hier PCR- und FISH-Analyse alternative Testverfahren dar. Vor allen bei der Detektion von Hefen und Schimmelpilzen, die in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung sind, könnte durch den Einsatz dieser Methoden die Analysedauer auf ca. zwei Tage reduziert werden (das Anlegen einer 24-Stunden-Anreicherungskultur ist auch in diesem Fall notwendig).

Nachteile dieser Methoden

Problematisch sind bei einem solchen Ansatz aber die praktische Handhabung der Probenaufbereitung (DNA-Extraktion) und die Analysekosten, da in großen Molkereibetrieben im Gegensatz zur Bier- oder Fruchtsaftproduktion oft mehrere hundert Proben täglich untersucht werden.

Ähnliche Probleme limitieren auch den potenziellen Einsatz der FISH-Technologie. In diesem Fall ist vor allem der verhältnismäßig geringe Probendurchsatz bei mikroskopischen Verfahren der limitierende Faktor. Weiters liegen die Kosten mit ca. 10–15 € pro Analyse weit über denen eines Kultivierungsverfahrens.

Durchfluss-zytometrie

Ein Verfahren, das die notwendige hohe Durchsatzrate für diese Anwendung bewältigen kann, stellt die Durchflusszytometrie dar. Die Kosten sind aber auch für dieses Verfahren wie bereits in Kapitel 3.2.1.2 erwähnt, deutlich höher als bei klassischen Analyseverfahren.

Für die Evaluierung der Reinigung von Anlagenteilen wird die bereits in Kapitel 3.2.1.1 erwähnte ATP-Bioluminiszenz-Messung herangezogen.

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

„Milch-Chip“

Für Fragestellungen, bei denen eine umfassende Analyse verschiedener Organismenklassen von Interesse ist (Erfassung von Schadbakterien, Hefen, Schimmelpilzen, Probiotischen Bakterien), kann der Einsatz eines spezifischen DNA-Chips zielführend sein. Ein derartiger „Milch-Chip“ wurde im Zuge eines Projektes vom Zentrum für Angewandte Gensensorik der Universität Bremen entwickelt und getestet. Das nachstehend zitierte Fazit dieses Projektes zeigt aber deutlich, dass die Anwendung der Chip-Technologie den Anforderungen im Routinebetrieb bis jetzt nicht gerecht werden kann:

“... trotz erfolgreicher Ausarbeitung eines Verfahrens, das erstmals die Simultan-Analyse diverser Mikroorganismen und deren genetischer Eigenschaften in Starterkulturen und Milchprodukten mit Hilfe der DNA-Mikroarray-Technologie erlaubt, wird die Milchindustrie dieses Verfahren angesichts des enormen Kostendrucks und des derzeitigen Preisverfalls bei den bisherigen Analyseverfahren innerhalb der nächsten 5 Jahre vermutlich noch nicht einsetzen …“ (Auszug aus dem Fazit des Projektberichtes AZ 13053/26, DEUTSCHE BUNDESSTIFTUNG UMWELT 2006).

Eine ähnliche Einschätzung der Anwendungsrelevanz wie für den „Milch-Chip“ kann auch für die PCR-Analyse angenommen werden, wobei berücksichtigt werden muss, dass die PCR die Möglichkeit der Automatisierung und damit hoher Durchsatzraten bietet. Ein praktischer Einsatz im Routinebetrieb dürfte aber am ehesten für die Durchflusszytometrie realistisch sein.

3.2.3 Authentizität von Rohstoffen

Grundlagen und Analytik

Herkunfts- und Echtheitskontrolle

Mit der Zunahme des globalen Handels gewinnt die Herkunftskontrolle von Rohstoffen für die Lebensmittelindustrie vor allem unter dem Aspekt der Rückverfolgbarkeit zunehmend an Bedeutung (VO (EG) Nr. 178/2002). Aber auch der Schutz hochwertiger Produkte vor Verfälschung oder Produktpiraterie ist zunehmend ein Thema. Vorzugsweise betrifft diese Thematik höherpreisige Produkte, bei denen eine Verfälschung lukrativ erscheint. Neben Bereichen mit bedeutenden Handelsvolumina wie Reis oder Kaffee betrifft dies aber auch Luxusartikel wie exotische Fischspezialitäten oder Nischenprodukte wie Kürbiskernöl. Bei der Thematik der Herkunftszertifikate sind es primär physikalisch-chemische Verfahren wie Isotopenanalyse und spektroskopische Verfahren, die angewendet werden. Während aber eine Isotopenanalyse 2–3 Wochen dauert, liegt mit Hilfe von DNA- oder Proteinbasierten Methoden ein Ergebnis schon nach wenigen Tagen vor. Molekularbiologische Verfahren eignen sich vor allem für die Identifizierung von Nahrungsmittelbestandteilen.

Echtheitszertifikate von Nahrungsmitteln werden in den letzten Jahren von der Lebensmittelindustrie immer öfters nachgefragt – im Vergleich zu den klassischen Fragestellungen bezüglich Produktqualität nimmt aber dieser Bereich noch einen geringen Teil ein und beschränkt sich derzeit primär auf den privaten Bereich. Amtliche Kontrollen zur Authentizität von Lebensmitteln sind zwar gesetzlich nicht vorgeschrieben, werden aber bei Verdachtsfällen und Schwerpunktaktionen der Lebensmittelbehörde immer wieder durchgeführt. Ein aktuelles Forschungsprojekt mit den Titel „Tracing the origin of food“ (TRACE), das im Zuge des 6. Forschungsrahmenprogramms der EU durchgeführt wird, beschäftigt sich mit der Entwicklung neuer Technologien im Zusammenhang mit der Auslobung von PGI (Protected Geographical Indication bzw. geschützte geografische Angabe – g.g.A.) und PDO

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

(Protected Denomination of Origin bzw. geschützte Ursprungsbezeichnung – g. U.). Dabei sollen unter anderem standardisierte DNA- und Protein-basierte Methoden für die Anwendung in Routinelabors entwickelt werden.

Nachstehend sollen an einigen Beispielen die Möglichkeiten einer Authentizitätsprüfung mittels molekularbiologischer Methoden dargestellt werden.

3.2.3.1 Kaffee

Kaffee zählt zu jenen Produkten, bei denen Echtheitszertifikate bereits seit längerem eine Rolle spielen. Um die Verfälschung von hochwertigen Arabica-Kaffeesorten mit minderwertigen *Coffea robusta*-Bohnen zu erkennen, werden unterschiedliche Methoden (z. B. HPLC, GC-MS) angewendet. Seit einigen Jahren wird bei Kaffee auch ein PCR-gestütztes Verfahren zur Erstellung eines genetischen Fingerabdrucks (ISSR-PCR) verwendet, mit der die beiden Kaffeesorten nicht nur unterschieden werden können, sondern auch deren Verhältnis zueinander abgeschätzt werden kann (ZELTZ et al. 2005).

3.2.3.2 Reis

Die Vermischung (beabsichtigt oder unbeabsichtigt) von hochwertigem Basmati-Reis mit billigerem Langkornreis ist ein häufig beobachteter Umstand. Da Basmati-Reis einen doppelt so hohen Preis erzielt als normaler Langkornreis und geringere Einfuhrgebühren in der EU hat, ist für Importeure und KonsumentInnen die Frage nach der Reinheit dieses Produkts von Wichtigkeit. Auch bei dieser Fragestellung haben sich PCR-basierte Methoden als Standard etabliert und werden von Analysedienstleistern für die Routineanalytik angeboten (z. B. Eurofins Medigenomix GmbH).

3.2.3.3 Tierartendifferenzierung

Die breiteste Anwendung im Bereich der Authentizitätsprüfung finden molekularbiologische Methoden bei der Tierartendifferenzierung. Bei Fleisch- und Wurstwaren ist es für die VerbraucherInnen nicht möglich, die auf dem Etikett angegebenen Tierarten zu verifizieren oder pflanzliche Eiweißzusätze (z. B. Soja) zu erkennen (MEYER et al. 1996, CALVO et al. 2002). Besondere Relevanz hat diese Thematik im Zuge der BSE-Krise bei der Identifizierung von Risikomaterial in Lebensmitteln erlangt.

Bei dieser Art der Analytik kommen vor allem ELISA-Tests und PCR-Verfahren zur Anwendung, mit denen eine eindeutige Differenzierung z. B. von Rind, Schaf, Schwein, Huhn, Pferd oder Fisch möglich ist. Verfeinerte PCR-Methoden wie DNA-Fingerprinting können auch zur Identifizierung spezifischer Tierrassen und damit auch zur Herkunftskontrolle (z. B. Identifizierung Aberdeen Angus Rindfleisch) herangezogen werden (z. B. Eurofins Medigenomix GmbH).

3.2.3.4 Kürbiskernöl

Auch für spezielle Produkte mit einer geringeren Verbreitung am Markt sind Analysemethoden, die die Echtheit des Produkts beweisen, von Bedeutung – wie das Beispiel des steirischen Kürbiskernöls zeigt. Gerüchte um die Verwendung von chinesischen Kürbiskernen für die Produktion können mühsam aufgebaute

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

Vermarktungsschienen leicht zunichte machen. So wurde von der Montanuniversität Leoben ein Verfahren entwickelt, das aufgrund der Spurenelemente im Öl die Bestimmung der Herkunftsregion zulässt. Obwohl bis jetzt noch nicht vorhanden, ist auch der Einsatz von speziellen PCR-Techniken, wie sie bereits zuvor bei Kaffee genannt wurden, für die Identifizierung der typischen steirischen Kürbissorten denkbar.

3.2.3.5 Fischprodukte

Einer der Faktoren, die die Qualität und den Preis eines Fischprodukts bestimmen, ist die Art des verwendeten Fisches. Hier konzentriert sich die Fragestellung einerseits auf die Herkunft (Wildfang vs. Zucht) und andererseits auf verarbeitete Produkte, bei denen eine morphologische Differenzierung der verwendeten Fischsorte(n) nicht mehr möglich ist. Bei der Frage nach der Herkunft werden zurzeit vor allem Isotopenmethoden angewendet (EU-Forschungsprojekt *„Confirmation of the origin of farmed and wild salmon and other fish“ G6RD-CT-2001-00512 COFAWS)*. Bei der Identifizierung von Fischarten stellen PCR-basierte Methoden die zuverlässigsten Analysen dar (KLOSSA-KILIA et al. 2002, COMESANA et al. 2003, TRAUTNER 2006). Mit entsprechenden PCR-Verfahren können selbst Beluga-, Osiestra- und Sevruga-Kaviar eindeutig identifiziert werden (REHBEIN et al. 1997).

3.2.4 Nachweis gentechnisch veränderter Bestandteile

Grundlagen und Analytik

Nachweis von GVOs

Weltweit nimmt der Anbau gentechnisch veränderter Pflanzen zu. In vielen Ländern existieren bereits einschlägige Richtlinien zur Zulassung und zum Inverkehrbringen solcher Produkte. Zur Information der KonsumentInnen müssen in Europa Produkte, die gentechnisch veränderte Organismen (GVOs) enthalten oder aus ihnen hergestellt sind, gekennzeichnet werden (VO (EG) Nr. 1829/2003). Da ein Schwellenwert von 0,9 % existiert, besteht die Notwendigkeit, sowohl die Art des GVO als auch dessen Menge in einem Produkt feststellen zu können. Der Nachweis von GVOs stellt einen besonderen Fall dar, da hier molekularbiologische Techniken bereits die wichtigsten und zum Teil einzigen Nachweisverfahren darstellen. Zurzeit basieren die meisten dieser Verfahren auf Real Time PCR-Technologie (siehe Kapitel 1.3.1). Wenn durch die genetische Veränderung neue Proteine in der Pflanze gebildet werden, können auch immunologische Tests (ELISA, Lateral Flow Assay) eingesetzt werden. Eine verlässliche Quantifizierung ist aber zurzeit nur mit PCR-Techniken möglich.

Durch die stetig steigende Anzahl an zugelassenen GVOs werden die Herausforderungen für die Umsetzung der einschlägigen Bestimmungen (amtliche Kontrolle, Überprüfung spezifischer Produktionsschienen) ständig größer. Um diese Kontrollen im Rahmen der vertretbaren Kosten durchführen zu können, müssen neue Technologien für kostengünstige Analysen für diese Anwendung entwickelt werden. Zurzeit liegen die durchschnittlichen Kosten für den Nachweis gentechnisch veränderter Bestandteile in einen Produkt bei 120–220 €. Ein Nachweis aller zurzeit in der EU zugelassenen GVOs würde im Bereich von 500 € liegen. Hier wird von allen Beteiligten die Notwendigkeit für günstigere Testverfahren hervorgehoben.

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

DNA-Chip-Verfahren

Erste Schritte in diese Richtung wurden mit der Entwicklung eines GMO-Chip™ gesetzt. Der von der Fa. Eppendorf Deutschland[10] entwickelte DNA-Chip erlaubt den parallelen Nachweis mehrerer genetischer Elemente, die häufig in GVOs eingesetzt werden. Da GVOs aber auch in geringeren Mengen als dem gültigen Grenzwert von 0,9 % nachgewiesen werden müssen, ist bei dieser Technik eine vorherige Signalverstärkung mittels PCR notwendig. Dieses Verfahren erleichtert die Identifizierung von GVOs erheblich, liegt aber mit Kosten von 150 € pro Analyse noch im Bereich der bisherigen Analysen.

Ein Ansatz, der vom Institut für Gesundheit und Konsumentenschutz der Gemeinsamen Forschungsstelle der Europäischen Kommission entwickelt wurde, basiert auf dem Einsatz einer vorgefertigten PCR-Plattform (96-well Platten). Der Großteil der Nachweisreagenzien liegt in kleinen Reaktionsgefäßen vor, die mit der Proben-DNA gefüllt werden können und in denen anschließend eine Real Time PCR durchgeführt wird. Neben dem Nachweis über das Vorhandensein eines GVOs lassen sich bei der Real Time PCR auch quantitative Aussagen treffen.

Einsatzvon Nanotechnologie

Vollkommen neue Ansätze erhofft man sich durch Fortschritte in der Nanotechnologie, wie sie bei der modernen Genomforschung bereits zum Einsatz kommt. Auf dem Gebiet der Sequenzierung von ganzen Genomen wurden in den letzten Jahren einige bemerkenswerte technische Fortschritte gemacht, die in Zukunft auch in der GVO-Analytik Anwendung finden könnten.

3.2.5 Nachweis von Allergenen

Grundlagen und Analytik

Einsatz von ELISA-Tests

Mit der Zunahme allergischer Reaktionen spielt der Nachweis von Allergenen für die Nahrungsmittelsicherheit eine immer größere Rolle. Bezüglich der Analytik treffen die zuvor schon bei der GVO-Analytik genannten Aspekte auch weitgehend auf diesen Bereich zu. Allergene werden zurzeit mittels PCR oder ELISA/Lateral flow assay nachgewiesen. ELISA-Tests sind im Bereich der Allergenanalytik stärker verbreitet als in der GVO-Analytik, da sie einfach durchzuführen sind und auch mit begrenzter Laborinfrastruktur durchgeführt werden können. Die Kosten für die genannten Analysemethoden bewegen sich in vergleichbaren Größenordnungen, dementsprechend gehen auch hier die Forderungen der AnwenderInnen in Richtung kostengünstigere Analysen.

[10] http://www.eppendorf-biochip.com/int/index.php?l=251&action=products&contentid=176

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

4 ÖKONOMISCHE EINSCHÄTZUNG MOLEKULARBIOLOGISCHER ANALYSEMETHODEN

Im Folgenden sollen einige ökonomische Aspekte im Zusammenhang mit der Anwendung molekularbiologischer Analysen erläutert werden. Die Kosten bzw. die Kosteneinsparung durch derartige Verfahren hängen sehr von den spezifischen Anforderungen der jeweiligen Branche ab. In manchen Bereichen werden sehr viele Proben auf eine begrenzte Anzahl von Parametern untersucht – hier wird durch die Möglichkeit einer Automatisierung eine wesentliche Kostenreduktion möglich sein. In anderen Bereichen müssen mehrere biogene Parameter bestimmt werden, dies aber in möglichst kurzer Zeit, um eine aktive Freigabe der Produktionscharge zu ermöglichen. Hier müssen eventuelle Mehrkosten bei der Analyse einer Kostenreduktion im Lagerbereich gegenübergestellt werden. Ein weiterer Aspekt ist die Vermeidung von Produktverfälschungen oder die Falschdeklaration bei Produkten mit geschütztem Ursprung und Ähnlichem. Hier stehen zwar nicht unmittelbare Einsparungen der Produktionskosten im Vordergrund, der Verlust des Kundenvertrauens hat aber direkten Einfluss auf den Absatz eines solchen Produkts.

Welche Analysemethode bei den verschiedenen Anwendungen am zielführendsten ist, wurde bei der Behandlung der einzelnen Anwendungen bereits im Speziellen erörtert. Um aber über die technische Eignung einer Analysemethode hinaus auch eine Einschätzung für die Anwendbarkeit in der Praxis bzw. einen Vergleich zu herkömmlichen Analyseverfahren zu erhalten, sollen im Folgenden grobe Anhaltspunkte für die Kosten der einzelnen Verfahren gegeben werden. Zu berücksichtigen ist, dass es sich hierbei nur um die unmittelbaren Materialkosten handelt und weiter reichende betriebswirtschaftliche Aspekte wie z. B. Abschreibungskosten wegen der individuellen Gegebenheiten im Einzelfall nicht berücksichtigt werden konnten. Zum Bereich der Personalkosten wurden von den interviewten Betrieben zumeist keine Angaben gemacht da auch dieser Bereich einer großen betrieblichen Variabilität unterliegt und in der nachstehenden Kosteneinschätzung nur eingeschränkt behandelt werden konnte.

PCR-Verfahren

Bezüglich der Entwicklungskosten eines PCR-Verfahrens müssen verschiedene Szenarien unterschieden werden.

Anschaffungskosten

Wird bei der PCR ein Real Time-Verfahren gewählt (ist momentan als Stand der Technik anzusehen), ist mit Anschaffungskosten von 25.000–30.000 € zu rechnen. Hinzu kommen noch einige Laborkleingeräte zur Probenaufbereitung, bei denen man mit zusätzlichen Kosten von 6.000–8.000 € rechnen muss.

Sollte ein bereits anerkanntes PCR-Nachweisverfahren in einem bestehenden Labor mit entsprechender Infrastruktur (PCR) etabliert werden, so sind die Kosten gering. In einem solchen Fall kann mit einer Entwicklungszeit von ca. einem Monat und Materialkosten von ca. 500–800 € gerechnet werden.

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

Für die Entwicklung eines neuen Nachweises bzw. einer neuen Anwendung muss ein gewisser Forschungsanteil berücksichtigt werden. Dieser kann je nach bereits vorhandenem Wissensstand zeitlich zwischen wenigen Monaten bis zu einem Jahr betragen, die eigentliche Entwicklung und Optimierung des Nachweisverfahrens kann mit weiteren 4–5 Monaten veranschlagt werden. Daraus ergeben sich geschätzte Gesamtkosten von 60.000–200.000 €.

Sollte dieses Nachweisverfahren bis zu einem vermarktungsfähigen Produkt (z. B. in Form eines Test-Kit) gebracht werden, ist mit einer weiteren Entwicklungszeit von 5–8 Monaten zu rechnen. In diesem Zusammenhang ist auch zu berücksichtigen, dass für kommerzielle Produkte meist ein aufwendiger Validierungsprozess notwendig ist, um zu garantieren, dass das betreffende Testsystem robust genug ist, um in jedem anderen Labor verlässliche Ergebnisse zu liefern. Eine entsprechende Kostenabschätzung ist in diesem Fall sehr schwierig.

laufende Kosten

Die laufenden Kosten bei einem etablierten PCR-Analyseverfahren können mit ca. 2,70–4,20 € je PCR-Reaktion inklusive Probenaufbereitung (DNA-Extraktion) veranschlagt werden. Kommerzielle DNA-Extraktionskits bilden für eine Anwendung in der Produktprüfung die beste Wahl, da sie neben einem standardisierten Verfahren in den meisten Fällen auch die schnellste Variante darstellen. Im Vergleich dazu muss bei klassischen Kultivierungen im Plattenverfahren mit Kosten von 0,50–0,90 € pro Platte kalkuliert werden. Weiters ist zu berücksichtigen, dass für PCR-Verfahren zumeist höher qualifiziertes Personal nötig ist.

Die laufenden Kosten sind bei PCR-Verfahren aber sehr stark von der Probenzahl abhängig. Bei entsprechendem Probendurchsatz können arbeitsintensive Bereiche wie Probenaufbereitung und Ansatz der Reaktionsgemische automatisiert und so deutlich Personalkosten gespart werden.

ELISA- und Lateral Flow Assay-Verfahren

ELISA und Lateral Flow Assays bieten breite Anwendungsmöglichkeiten und sind wegen der einfachen Handhabung ideal für den Einsatz in Betriebslaboratorien geeignet. Wegen der tendenziell hohen Entwicklungskosten werden diese Testverfahren zumeist von Analysefirmen entwickelt und als Test-Kits kommerziell vertrieben. Die Kosten für einen ELISA-Test liegen je nach Anwendung zwischen 2,00 € und 5,00 € pro Analyse. Die Probenaufbereitung ist zumeist sehr einfach, in vielen Fällen können flüssige Proben direkt in das Testverfahren eingesetzt werden. Dementsprechend gering sind die Kosten für diesen Arbeitsschritt. Eine Kostenreduktion durch Automatisierung ist möglich, macht aber nur bei sehr großen Probenzahlen (> 200/Tag) Sinn, da das übliche Analyseformat von 96 Proben/Testdurchlauf auch bei manueller Bearbeitung in angemessener Zeit abgearbeitet werden kann. Wenn eine quantitative Analyse durchgeführt werden soll, wird ein Auslesegerät (Microplate Reader) benötigt. Die Kosten für ein derartiges Gerät belaufen sich auf 2.000–4.000 €.

FISH-Verfahren

Fluoreszenz *in Situ* Hybridisierung-Analysen dienen zumeist der spezifischen Identifizierung von Mikroorganismen innerhalb einer etablierten mikrobiellen Analytik, die oft auf klassischen Kultivierungsmethoden basiert. Dementsprechend wird sich die Anzahl der Analysen in einem betreffenden Labor in Grenzen halten. Der apparative

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

Aufwand für ein geeignetes Fluoreszenzmikroskop ist verhältnismäßig gering – die Kosten liegen bei 5.000–8.000 €. Die Kosten für eine Analyse sind bei Verwendung eines kommerziellen Kits aber mit 10–15 € verglichen mit anderen Verfahren sehr hoch. Steht im Labor entsprechendes personelles Knowhow zu Verfügung, kann man davon ausgehen das die Materialkosten um 40–60 % gesenkt werden können. Eine Automatisierung ist bei dieser Anwendung nicht möglich.

Chip-Technologie

Obwohl von den analytischen Möglichkeiten her als eine Methode mit hohem Potenzial einzustufen, konnte sich diese Technologie in der Routineanalytik noch nicht durchsetzten. Die Gründe hierfür liegen vor allem in den sehr hohen Entwicklungskosten (der in Kapitel 3.2.2 erwähnte „Milch-Chip“ wurde neben der Beteiligung privater Firmen mit 400.000 € durch die Deutsche Stiftung Umwelt gefördert), die sich in den hohen Kosten für den Analyse-Chip widerspiegeln. Die Kosten für ein kommerzielles System, das bereits in der GVO-Analytik (GMO-Chip™, Eppendorf GmbH) zum Einsatz kommt, belaufen sich auf ca. 160 € pro Probe. Dazu kommen Anschaffungskosten für das Auslesegerät von 15.000–30.000 €. Eine Automatisierung der Analyse ist zwar möglich, würde aber nur bei hohen Probenzahlen sinnvoll sein.

Durchflusszytometrie

Dieses Verfahren kann für eine Vielzahl von Anwendungen benützt werden, weist aber die in Kapitel 1.3.4 erwähnten technischen Einschränkungen bezüglich des Probenvolumens auf. Die Handhabung benötigt keine spezielle Qualifikation des Personals und dauert nur wenige Minuten für die Messung, sofern geringe Probenvolumina ausreichend sind. Die Kosten für eine Analyse ohne fluoreszenz-basierter Identifizierung sind vernachlässigbar, da keine Materialkosten anfallen. Bei Anwendung einer fluoreszenz-basierten Differenzierung von Keimen ist mit Kosten von 5–10 € pro Analyse zu rechnen. Die Anschaffungskosten für ein Durchflusszytometer liegen bei 40.000–70.000 €.

Zusammenfassung

höhere Kosten der molekularbiologischen Verfahren

Der Vergleich der Analysekosten zwischen klassischen Kultivierungsverfahren und molekularbiologischen Analysen zeigt, dass moderne Methoden immer noch höhere Kosten verursachen. Diese Differenz in den Analysekosten ist im Wesentlichen der Grund, warum bei den meisten in dieser Studie befragten Unternehmen molekularbiologische Analyseverfahren noch eine geringe Rolle spielen. Zumeist wird die einfache Routineanalytik in den Betriebslabors durchgeführt – für spezielle Fragestellungen, die den Einsatz moderner Analysemethoden erfordern, werden die Proben an spezialisierte Labors geschickt.

Potenzial zur Automatisierung nützen

Ökonomisch interessant sind molekularbiologische Analysen vor allem dort, wo das Potenzial zur Automatisierung genützt werden kann. Dadurch können im Bereich der Personalkosten Einsparungen erzielt werden. Klassische Verfahren sind zwar oft mit weniger qualifiziertem Personal durchführbar, die Arbeitsschritte sind aber schwer automatisierbar und müssen daher vom Laborpersonal händisch durchgeführt werden.

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

Eine Automatisierung der Analyse ist aber nur bei hohem Probendurchsatz rentabel. Daher sind moderne Methoden in der Routineanalytik vor allem für große Produzenten von Interesse oder in Sparten, bei denen ein Großteil der Produktion in den Export geht und/oder das Produkt in einem hochpreisigen Segment angesiedelt ist. Entsprechend werden in Österreich noch kaum moderne Analyseverfahren eingesetzt, während z. B. in Dänemark in großen fleischverarbeitenden Betrieben entsprechende Methoden bereits routinemäßig zur Anwendung kommen. Ähnliche Einsparungseffekte können aber auch von kleineren Unternehmen durch Auslagerung derartiger Analysen an externe Dienstleistungslaboratorien erzielt werden.

keine rechtliche Gleichstellung

Neben den Kostengründen spielen aber auch noch andere Faktoren bei der Anwendungsakzeptanz molekularbiologischer Testmethoden eine Rolle. In einigen Bereichen sind derartige Verfahren den klassischen Kultivierungsverfahren rechtlich noch nicht gleichgestellt. Beispielsweise werden in Europa beim Nachweis von pathogenen Keimen mittels PCR die Ergebnisse nur im Zusammenhang mit einer kulturmorphologischen Bestätigung der Testresultate vor Gericht anerkannt (mündl. Mitt. von Prof. Martin Wagner, Veterinärmedizinische Universität Wien).

Ein weiterer Aspekt der die Akzeptanz moderner Methoden beeinflusst ist der Umstand, das nicht nur mikrobielle Parameter in Zuge der Qualitätssicherung erhoben werden, sondern oft noch eine Reihe physikalisch-chemischer Messgrößen bestimmt werden müssen. Diese Analysen können ebenfalls mehrere Tage dauern, wodurch eine verkürzte Analysedauer in mikrobiologischen Bereich kaum Vorteile bringt.

optimierte Prozesssteuerung von Industrieanlagen

Eine Einschätzung des ökonomischen Vorteils einer besseren Prozesssteuerung von Industrieanlagen (z. B. Kläranlagen oder Biogasanlagen) mittels molekularbiologischen Analysen ist zum jetzigen Zeitpunkt noch schwer abschätzbar. Unter dem Gesichtspunkt der Diskussion um erneuerbare Energieformen stellen aber Aspekte der Prozessoptimierung in Bereichen wie Biogasproduktion oder Biotreibstoffe einen wichtigen Ansatzpunkt dar. Hier ist aber durch weiterführende wissenschaftliche Untersuchungen ein besseres Verständnis für die Zusammenhänge bei der stofflichen Umsetzung in derartigen Anlagen zu schaffen.

Einige grundsätzliche Überlegungen bezüglich der möglichen Auswirkungen solcher Analysen auf die betrieblichen Kosten von Industrieanlagen sollen noch angeführt werden:

Kläranlagen

In einer Kläranlage führt jede Abweichung vom Optimalbetrieb zu erhöhten Energiekosten, da die Abwässer länger in den Klärbecken verbleiben müssen oder mehr Luft in die Becken gepresst werden muss. Kommt es zu Problemen wie z. B. Blähschlammbildung, muss dieser entweder aufwendig umgewälzt oder in andere Klärbecken umgepumpt werden. Kann das Problem mit betriebsinternen Maßnahmen nicht beseitigt werden, muss der Blähschlamm sogar entnommen, getrocknet und in Verbrennungsanlagen entsorgt werden, was erhebliche Kosten verursacht. Besonders für kleinere Kläranlagen spielt eine optimale Prozesskontrolle eine wesentliche Rolle, da es hier bei Problemen auch zum Kippen der gesamten Anlage kommen kann. In diesem Fall sind die verursachten Kosten beträchtlich, da man je nach Größe der Anlage mit ca. einer Woche Stillstand rechnen muss.

Biogasproduktion

Bei der Biogasproduktion ist es vor allem die Erhöhung der Gasausbeute, die als ökonomischer Faktor bei einer verbesserten Prozesssteuerung im Vordergrund steht. Hier wird von Fachleuten noch ein signifikantes Potenzial zur Prozessoptimierung gesehen.

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

5 RESÜMEE

Im Zuge der Recherchen und der durchgeführten Interviews zeigte sich, dass in den letzten Jahren für viele Bereiche entsprechende Analysemethoden entwickelt wurden. Einige dieser Methoden existieren nur in Form wissenschaftlicher Projekte, in anderen Fällen mündeten die Ergebnisse aus Forschungsprojekten – zum Beispiel des europäischen Forschungsrahmenprogrammes – in die Entwicklung kommerziell anwendbarer Analyseverfahren.

bereits eingesetzte Verfahren

Die am häufigsten eingesetzten Verfahren sind – bedingt durch ihre einfache Handhabung – ELISA-Tests und Durchflusszytometrie. Die PCR bietet zwar eine hervorragende Sensitivität sowie große Flexibilität im Analysespektrum, ist aber wegen der aufwendigen Analyseprozedur in Betriebslaboratorien noch wenig verbreitet. PCR-Verfahren werden zurzeit vor allem von Analysedienstleistern zum spezifischen Nachweis von Allergenen, GVOs und pathogenen Keimen eingesetzt. Die Chip-Technologie hat sich wegen des Knowhows, das für die Durchführung notwendig ist, sowie wegen der hohen Entwicklungskosten bis jetzt in der Routineanalytik nicht etabliert. Neben der technischen Eignung eines Verfahrens für eine spezifische Anwendung spielen die Kosten derartiger Analysen eine wichtige Rolle.

Kosten

Moderne Methoden bieten zwar viele Vorteile, sind aber unter den Bedingungen eines ständig steigenden Preisdrucks im Verhältnis zu klassischen Methoden noch immer zu teuer. Verstärkt wird dieser Umstand dadurch, dass derartige Analysen zumeist von höher qualifiziertem Personal durchgeführt werden müssen. Eine Einsatzmöglichkeit wird vor allem dort gesehen, wo durch einen hohen Probendurchsatz eine Automatisierung des Analysevorgangs und damit eine Reduktion der Personalkosten möglich ist. Dies trifft vorzugsweise auf große Betriebslaboratorien oder externe Analysedienstleister zu. Einige Bereiche wie z. B. die GVO-Analytik sind jedoch auf molekularbiologische Verfahren angewiesen.

kürzere Analysedauer

Die verkürzte Analysedauer wird zwar durchwegs als positiv gesehen, da aber in den wenigsten Fällen eine aktive Freigabe der Produktionschargen erfolgt, werden Analysen meist zum Monitoring der qualitätssichernden Maßnahmen im Produktionsprozess eingesetzt. Welchen Mehrwert die rasche Verfügbarkeit der Messergebnisse hat, muss im Einzelfall für den jeweiligen Produktionsprozess beurteilt werden.

Prozessoptimierung

Im Bereich der Prozesskontrolle können molekularbiologische Messverfahren einen wichtigen Beitrag zur Prozessoptimierung liefern. Dazu ist aber noch wissenschaftlicher Forschungsaufwand nötig, um ein besseres Verständnis der Zusammenhänge zwischen komplexen mikrobiellen Gemeinschaften und den stofflichen Umsätzen zu gewinnen.

rechtliche Hindernisse

Hinderlich für den verbreiteten Einsatz molekularbiologischer Analysen wirkt sich auch aus, dass in manchen Bereichen moderne Analysen den traditionellen Verfahren gesetzlich nicht gleichgestellt sind. So werden in der EU Ergebnisse von Pathogenkeim-Bestimmungen, die mittels PCR erhalten wurden, nur im Zusammenhang mit einer kulturell-morphologischen Bestätigung des Testergebnisses vor Gericht anerkannt.

Die Einschätzung der Anwendbarkeit hängt stark von den spezifischen Fragestellungen des jeweiligen Produktionsprozesses ab. Derzeit werden von Fachleuten vor allem der PCR-Technologie die größten Potenziale für die Routineanalytik zugeschrieben. Durch technische Entwicklungen sollte diese Methodik in den nächsten 10–15 Jahren, ähnlich wie schon bei der Qualitätssicherung im medizinischen

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

Bereich, fixer Bestandteil bei Analysen im industriellen Bereich sein. Traditionelle Kultivierungsverfahren werden aber vor allem für mittlere Betriebe weiterhin eine Option zur Kontrolle der mikrobiellen Parameter darstellen.

Tabelle 1 gibt eine Übersicht der molekularbiologischen Analyseverfahren für verschiedene Anwendungsbereiche sowie die relevanten Aspekte für eine praktische Umsetzung.

Tabelle 1: Vor- und Nachteile molekularbiologischer Analysemethoden und deren mögliche Anwendungsgebiete.

Analyse-verfahren	**Vorteile**	**Nachteile**	**Anwendung bei**
PCR	hohe Sensitivität hohe Selektivität Ergebnis in 3–4 Std. Automatisierung möglich	Probenaufbereitung aufwendig qualifiziertes Personal notwendig	Authentizität von Rohstoff Nachweis Allergene Nachweis GVO Kläranlagen Mikrobiell induzierte Korrosion (MIC) Erdölindustrie Biotreibstoffe (-gas) Getränkeerzeugung Molkereiprodukte
FISH	hohe Selektivität einfache Durchführung Ergebnis in 2–3 Std.	geringere Sensitivität geringer Probendurchsatz	Getränkeerzeugung Kläranlagen Biogas
CHIP	Analyse vieler Parameter gleichzeitig definieren komplexer mikrobieller Systeme möglich	Probenaufbereitung aufwendig qualifiziertes Personal notwendig hohe Kosten geringer Probendurchsatz	Kläranlagen Biogas (Erdölindustrie)
ELISA	hohe Sensitivität hohe Selektivität Ergebnis in 1–2 Std. einfache Durchführung Automatisierung möglich	geringe Flexibilität (für jeden Analyten eigener Nachweis-Kit erforderlich)	Nachweis Allergene Nachweis GVO Authentizität von Rohstoff
Durchfluss-zytometrie	einfache Durchführung Ergebnis in 10 min bis 3 Std. (je nach Anwendung)	nur Analyse von kleinen Volumina sinnvoll geringe Selektivität	Getränkeerzeugung Molkereiprodukte

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

6 LITERATURVERZEICHNIS

AMANN, R.; LEMMER, H. & WAGNER, M.; (1998): Monitoring the community structure of wastewater treatment plants: a comparison of old and new techniques. *In:* FEMS Microbiology Ecology, 25: 205–215.

BOHAYCHUK, V.M.; GENSLER, G.E.; KING, R.K.; WU, J.T.; & MCMULLEN, L.M. (2005): Evaluation of detection methods for screening meat and poultry products for the presence of foodborne pathogens. *In:* Journal of Food Protection, 68: 2637–47.

BRAUN, R. (1982): Biogas – Methangaerung Organischer Abfallstoffe. Springer Verlag, Wien.

CALVO, J. H.; RODELLAR, C.; ZARAGOZA, P. & OSTA, R. (2002): Beef- and Bovine-Derived Material Identification in Processed and Unprocessed Food and Feed by PCR Amplification. *In:* J. Agric. Food Chem., 50: 5262–5264.

COETSER, S. E. & CLOETE, T. E. (2005): Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems. *In:* Critical Reviews in Microbiology. http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713400901~db=all~tab=issueslist~branches=31 - v31 31: 213–232.

COMESANA, A. S.; ABELLA, P. & SANJUAN, A. (2003): Molecular identification of five commercial flatfish species by PCR-RFLP analysis of a 12S rRNA gene fragment. *In:* Journal of the Science of Food and Agriculture, 83: 752–759.

DEVERGNE, J.C.; CARDIN, L.; BURCKARD, J. & VAN REGENMORTEL, M.H. (1981): Comparison of direct and indirect ELISA for detecting antigenically related cucumoviruses. *In:* J. Virol. Methods, 3: 193–199.

DUNSMORE, B.; YOULDON, J.; THRASHER, D. R. & VANCE, I. (2006): Effects of nitrate treatment on a mixed species, oil field microbial biofilm. *In:* Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 33: 454–462.

ELLIS, D. I. & GOODACRE, R. (2001): Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of muscle foods: current status and future trends. *In:* Trends in Food Science & Technology, 12: 414–424.

ENGVALL, E. & PERLMAN, P. (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *In:* Immunochemistry, 8: 871–874.

GILBRIDEA, K.A.; LEEB, D.-Y. & BEAUDETTE, L.A. (2006): Molecular techniques in wastewater: Understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. *In:* Journal of Microbiological Methods, 66: 1–20.

GRACIAS, K. S. & MCKILLIP, J. L. (2004): A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food. *In:* Can. J. Microbiol. 50: 883–890.

GROPE, S.; WINGENDER, J. & TRÜPER, H. G. (1995): Characterization of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from technical water systems. *In:* Journal of Applied Bacteriology, 79: 94–102.

HOLST-JENSEN, A.; RØNNING, S.B.; LØVSETH, A. & BERDAL, K.G. (2003): PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *In:* Anal. Bioanal. Chem., 375: 985–93.

INDINGER, A.; LEUTGÖB, K.; LUTTER, E.; MADER, S.; NEMESTOTHY, K.; PEHERSTORFER, N.; PROIDL, H.; SATTLER, M.; TRETTER, H. & VEIGL, A. (2006): Vorstudie für einen nationalen Biomasseaktionsplan für Österreich, Österreichische Energie Agentur.

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

JAVAHERDASHTI, R. (2008): Microbiologically Influenced Corrosion. An Engineering Insight. Springer Verlag, London.

KÄMPFER, P.; ERHART, R.; BEIMFOHR, C.; BÖHRINGER, J.; WAGNER, M. & AMANN, R. (1996): Characterization of bacterial communities from activated sludge: Culture-dependent numerical identification versus in situ identification using group- and genus-specific rRNA-targeted oligonucleotide probes. *In:* Microbial Ecology, 32: 101–121.

KLOSSA-KILIA, E.; PAPASOTIROPOULOS, V.; KILIAS, G. & ALAHIOTIS, S. (2002): Authentication of Messolongi (Greece) fish roe using PCR-RFLP analysis of 16s rRNA mtDNA segment. *In:* Food Control, 13: 169–172.

KUNST, S.; HELMER, C. & KNOOP, S. (2000): Betriebsprobleme auf Kläranlagen durch Blähschlamm, Schwimmschlamm, Schaum. *In:* Handbuch zur Identifizierung und Bekämpfung fädiger Bakterien. Springer Verlag, Berlin.

LASHKARI, D.A.; DERISI, J.L.; MCCUSKER, J.H.; NAMATH, A.F.; GENTILE, C.; HWANG, S.Y.; BROWN, P.O. & DAVIS, R.W. (1997): Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. Proc Natl Acad Sci USA, 94: 13057–13062.

LUDENSKY, M. (2003): Control and monitoring of biofilms in industrial applications. *In:* International Biodeterioration & Biodegradation, 51: 255–263.

MEYER, R.; CHARDONNENS, F.; HÜBNER, P. & LÜTHY, J. (1996): Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: Detection of soya in processed meat products. *In:* Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung, 203: 339–344.

MORGAN, D.; FREEDMAN, R.; DEPEW, C. & KRAFT, W. (1987): Growth of Campylobacter pylori in Liquid Media. *In:* Journal of Clinical Microbiology, 25: 2123–2125.

MOZOLA, M., (2006): Genetics-Based Methods for Detection of Salmonella spp. in Foods. *In:* Journal of AOAC International 89, 517–529.

MULLIS, K.B. (1997): System for automated performance of the polymerase chain reaction. *In:* United States Patent 5,656,493, August 12, 1997.

NACE – National Association of Corrosion Engineers (2006): International annual conference, San Diego.

ORMEROD, M.G. (2000): Flow cytometry – A practical approach. Oxford University Press, Oxford, UK.

PRIEST, F. G. & STEWART, G. G. (2006): Handbook of Brewing. CRC Press, London.

DEUTSCHE BUNDESSTIFTUNG UMWELT (2006): Projekt AZ 13053/26 „Optimierung von DNA Arrays zur Analyse von Milch und Milchprodukten“. http://www.dbu.de/PDF-Files/13053-26.pdf.

RECKNAGEL, H.; SPRENGER, E. & SCHRAMEK, E.R. (2003): Energie aus Biomasse. R.Oldenbourg Verlag, München.

REHBEIN, H.; KRESS, G. & SCHMIDT, T. (1997): Application of PCR-SSCP to Species Identification of Fishery Products. *In:* J. Sci. Food Agric., 74: 35–41.

REID, L. M.; O'DONNELL, C. P. & DOWNEY, G. (2006): Recent technological advances for the determination of food authenticity. *In:* Trends in Food Science & Technology, 17: 344–353.

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B. & ERLICH, H.A. (1988): Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *In:* Science, 239: 487–491.

SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R.W. & BROWN, P.O. (1995): Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270: 467–470.

SKINNER, K. & LEATHERS, T.D. (2004): Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *In:* Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 31: 401–408.

TAMACHKIAROW, A. (2005): Mikrobiologie im Auge. *In:* Brauindustrie, 9: 78–81.

TRAUTNER, J. (2006): Rapid identification of European and Northamerican eel by polymerase chain reaction. *In:* Inf. Fischereiforsch., 53: 49–51.

VIDELA, H. A. & HERRERA, L. K. (2005): Microbiologically influencedcorrosion: looking to the future. *In:* International Microbiology, 8: 169–180.

WAGNER, M.; AMANN, R.; LEMMER, H. & SCHLEIFER, K.H. (1993): Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *In:* Appl. Environ. Microbiol., 59: 1520–1525.

WAGNER, M.; HORNY, M. & DAIMSZ, H. (2003): Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. *In:* Current Opinion in Microbiology, 6: 302–309.

WINGENDER, J.; NEU, T. & FLEMMING, H.-C. (1999): What are bacterial extracellular polymeric substances? *In:* Bacterial extracellular polymeric substances. Springer Verlag, Heidelberg, Berlin. pp. 1–19.

ZELTZ, P.; SCHNEIDER, S.; VOLKMANN, J. & WILLMUND, R. (2005): Herkunftskontrolle von Wildkaffee aus dem äthiopischen Regenwald mit Hilfe des genetischen Fingerabdrucks. *In:* Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 101 (3): 89–92.

ZHU, X. Y.; LUBECK, J. & KILBANE, J. J. (2003): Characterization of Microbial Communities in Gas Industry Pipelines. *In:* Applied and Environmental Microbiology, 69: 5354–5363.

Rechtsnormen und Leitlinien

VO (EG) Nr. 178/2002: Verordnung des Europäischen Parlaments und des Rates vom 28. Januar 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit. ABl. Nr. 31/1.

VO (EG) Nr. 1451/2007: Verordnung der Kommission vom 4. Dezember 2007 über die zweite Phase des Zehn-Jahres-Arbeitsprogramms gemäß Artikel 16 Absatz 2 der Richtlinie 98/8/EG des Europäischen Parlaments und des Rates über das Inverkehrbringen von Biozid-Produkten. ABl. Nr. 325/3.

VO (EG) Nr. 1829/2003: Verordnung des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über genetisch veränderte Lebensmittel und Futtermittel. ABl. Nr. L 268/1.

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

© Umweltbundesamt, Wien; download unter www.umweltbundesamt.at und www.biologiezentrum.at

umweltbundesamt

Umweltbundesamt GmbH
Spittelauer Lände 5
1090 Wien/Österreich

Tel.: +43-(0)1-313 04
Fax: +43-(0)1-313 04/5400

office@umweltbundesamt.at
www.umweltbundesamt.at

Moderne molekularbiologische Technologien spielen in immer mehr Bereichen der angewandten Analytik eine Rolle. Vielfach sind diese Methoden präziser und die Ergebnisse rascher verfügbar. Die vorliegende Studie gibt einen Überblick über die Anwendungsmöglichkeiten derartiger Verfahren bei der Qualitätssicherung von Produkten sowie bei der Steuerung und Optimierung von industriellen Anlagen im Zusammenhang mit biogenen Prozessen. Es werden die Vor- und Nachteile der einzelnen Verfahren erläutert und eine Kostenabschätzung für deren Einsatz in der Routineanalytik gegeben.

ISBN 978-3-99004-026-3

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Publikationen des Umweltbundesamtes, Wien

Jahr/Year: 2009

Band/Volume: REP_228

Autor(en)/Author(s): Narendja Frank

Artikel/Article: Anwendungsbereiche molekularbiologischer Analytik. Vorstudie zur Anwendbarkeit molekularbiologischer Analytik im Zusammenhang mir der Qualitätssicherung von Produkten. 1-44