

Krankmachenden Keimen auf der Spur

MIT PRÄVENTIVEM SCREENING KÖNNEN MIT MIKROORGANISMEN
KONTAMINIERTEREBENSMMITTEL SCHNELL ENTDECKT WERDEN

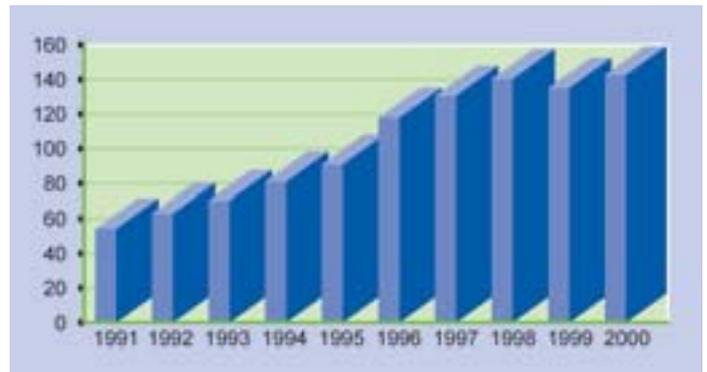
Mikroorganismen vermehren sich in falsch oder zu lange gelagerten Lebensmitteln rasend schnell – und bei Verzehr machen sie krank. Klassische mikrobiologische Nachweismethoden brauchen ein bis drei Tage, um die Keimzahlen zu ermitteln – zu lange, um das Ergebnis für den Einzelfall noch verwerten zu können. Wissenschaftler des Instituts für Lebensmittelwissenschaft haben Anwendungen für eine Methode entwickelt, die in zehn Minuten zu einer Aussage kommt – mit Hilfe des Leuchtkäfers.

Die Kontamination von Lebensmitteln mit pathogenen Mikroorganismen stellt eine wesentliche Gefahr für die Gesundheit der Verbraucher dar. Lebensmittel sind aufgrund ihrer chemischen und physikalischen Struktur ein idealer Nährboden für Mikroorganismen jeglicher Art.

Pathogene Mikroorganismen vermehren sich bei günstigen Temperaturen exponentiell.

Je länger ein Lebensmittel bei falschen Temperaturen gelagert wird, desto größer ist das Risiko, dass entsprechend hohe Keimzahlen erreicht werden, die zu einer Lebensmittelvergiftung führen können.

Trotz bemerkenswerter Leistungen der Wissenschaft in der Verbesserung der öffentlichen Gesundheit und der Reduzierung von Infektionskrankheiten in den vergangenen Jahrzehnten sterben weltweit jährlich etwa drei Millionen Menschen an den Folgen lebensmittelbedingter Infektionen. Studien belegen, dass jährlich circa 9000 Todesfälle allein in den USA zu verzeichnen sind. Darüber hinaus werden induzierte jährliche Kosten für den Sektor Gesundheit auf 6,5 bis 34,9 Mrd. US-Dollar und assoziierte Kosten für die Industrie auf 3,3 bis 5,1 Mrd. US-Dollar geschätzt (BUZBY UND ROBERTS, 1997).



Eine erste Schätzung des Robert-Koch-Instituts für die Zeit von 1994–1999 hat für die gesundheitliche Versorgung von Darminfektionen in Deutschland Gesamtkosten von 225 Millionen Euro jährlich ergeben. In dieser Berechnung sind die Kosten für ambulante Behandlung, Arbeitsausfall und häusliche Versorgung der betroffenen Patienten sowie Rückrufaktionen der Hersteller nicht inbegriffen. Aufgrund der beachtlichen Anzahl von nicht gemeldeten Erkrankungen sind deutlich höhere tatsächliche Kosten zu vermuten.

Ohne den ursächlichen Zusammenhang zwischen Vergiftungserscheinungen und mikrobiellen Lebensmittelvergiftungen und -infektionen zu kennen, gab es bereits im Mittelalter interessante, präventive Gesetzgebungen:

- 1319 in Utrecht: Fisch der gegen Abend nicht verkauft war, musste vernichtet werden.
- 1435 in Straßburg: Verdorbenes Fleisch oder Fleisch von kranken Tieren durfte ausschließlich an Krankenhäuser geliefert werden.

Die Vorschriften waren einfach aber effektiv. In den industrialisierten Ländern, wie auch in Deutschland, nehmen lebensmittelbedingte bakterielle Erkrankungen trotz ständig gesteigener Hygienestandards weiterhin zu (Abbildung 1).

Die Gründe hierfür sind vielfältig. Eine Ursache ist sicher in der zunehmenden räumlichen und damit auch zeitlichen Trennung von Produktionsort und Distribution des Endproduktes an den Verbrauchern zu suchen.

- 1300 in Basel: Nicht verkaufter Fisch musste deklariert werden und durfte ausschließlich an Fremde verkauft werden.

Ein anschauliches Beispiel stellt hier die Verarbeitung von Krabbenfleisch dar.

Ein großer Teil des Fangs wird in Kühlcontainern in so genannte Niedriglohnländer nach Osteuropa oder Nordafrika transportiert, um dort manuell gepult zu werden. Der Transport allein dauert bis zu einer Woche ohne Berücksichtigung der Wartezeiten zwischen den Transporten. Nordseekrabben gehören zu den leicht verderblichen Le-

werden. Hierzu bedient man sich eines einfachen Vorganges aus der Natur, der Biolumineszenz.

Bei der Biolumineszenz handelt es sich um biologische Leuchterscheinungen als Spezialfall der Chemielumineszenz, die bei vielen Seetieren, Bakterien, Glühwürmchen, Pilzen, faulem Holz oder Laub sowie beim Meeresleuchten auftreten. Am besten untersucht ist die chemische Reaktion beim Leuchtkäfer. Biolo-

gisch gesehen dient es der Verführung und Anlockung der Männchen, die von den Weibchen mit ihrem leuchtenden Hinterleib über weite Distanzen angelockt werden. (Abbildung 2). Auch heute noch wird die Schlüsselsubstanz, die Luciferase, aus dem Abdomen gewonnen (Abbildung 3).

Das Leuchten der Leuchtkäfer lässt sich mittels der drei Schlüsselsubstanzen ATP, Luciferin und Luciferase auch in vitro erzeugen (Abbildung 4).



Abbildung 1 (linke Seite)
Entwicklung der Enteritis infectiosa (außer Salmonellose und Shigellose)

Abbildung 2 (links)
Lampyris noctiluca

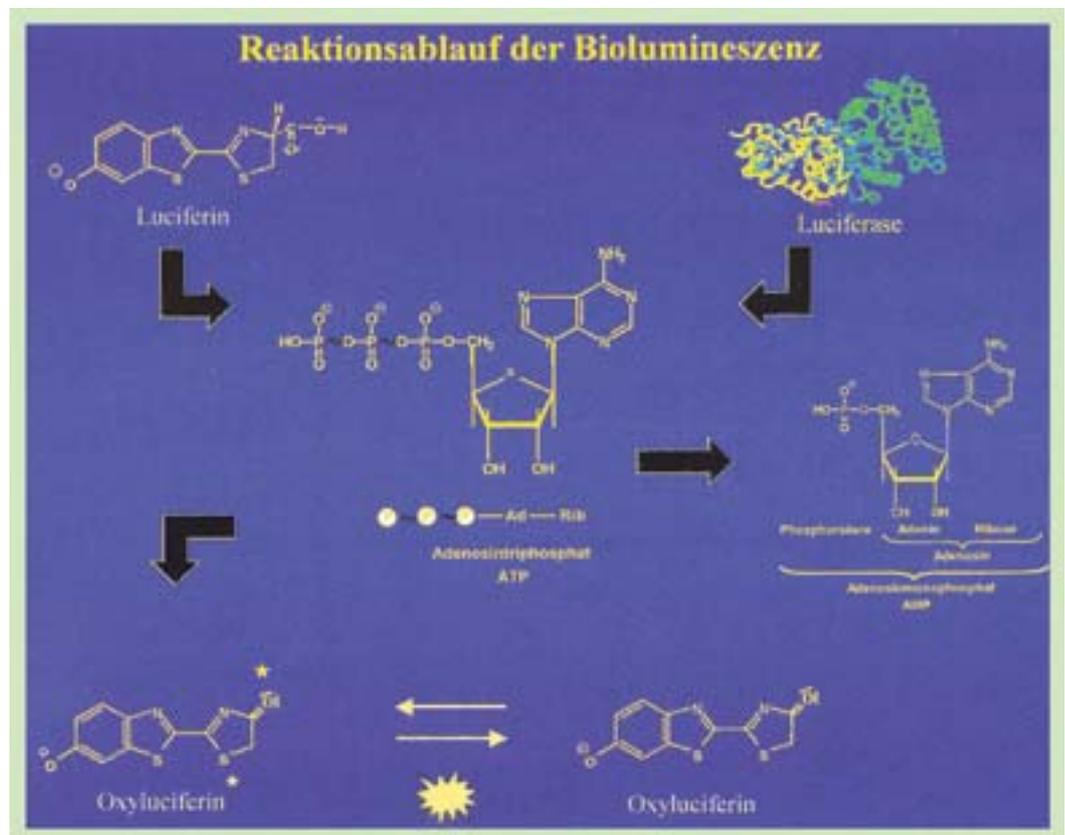
Abbildung 3
Gewinnung der Luciferase aus dem Abdomen der Leuchtkäfer

Abbildung 4
Reaktionsablauf der Biolumineszenz

bensmitteln, die nur eine begrenzte Zeit lagerfähig sind. Bereits nach dem Fang, dem Kochen und dem Kühlen ist der Keimgehalt von Nordseekrabben relativ hoch. Um sicherzustellen, dass die Krabben aus mikrobiologischer Sicht noch verzehrfähig sind, wäre eine Keimzahlbestimmung vor der Weiterverarbeitung oder dem Verkauf sinnvoll.

Eine mikrobiologische Kontrolle mit klassischen Methoden erfordert einen Zeitraum von mindestens ein bis drei Tagen. Aufgrund dieser Zeitspanne sind so überwiegend nur retrospektive Aussagen zu treffen. Wegen der kurzen Umschlagzeiten bei der Lebensmittelproduktion wird daher nach Systemen gesucht, die eine schnelle Aussage ermöglichen.

Die zurzeit schnellste mikrobiologische Schnellmethode beruht auf dem ATP-Nachweis. Durch die quantitative Bestimmung des ATP (Adenosin 5-Triphosphat) kann indirekt die Keimzahl bestimmt



Da sich ATP als Energieträger in allen Zellen befindet, also auch in Mikroorganismen, lässt sich über diese Lichtreaktion die Menge an ATP und somit auch die Anzahl an Mikroorganismen bestimmen.

Voraussetzung für die Keimzahlbestimmung über den Nachweis von ATP ist das Herauslösen des ATP aus den Zellen, da es nur extrazellulär nachgewiesen werden kann. Gleichzeitig muss verhindert werden, dass zelleigene Enzy-

Somit stellt dieses System eine schnelle Methode dar, um einerseits den Keimgehalt und andererseits als Hygienekontrollmaßnahme auch Verunreinigungen bei der Lebensmittelproduktion nachzuweisen.

Problematisch gestaltet sich allerdings gerade bei der Untersuchung von Lebensmitteln der Gehalt an ATP in den somatischen Zellen, sowie an störenden Substanzen, die die Lichtreaktion negativ beein-

Ein anderes Einsatzgebiet wäre die Kontrolle von Schlachtierkörpern. Es ist in der Praxis üblich, aus dem Schlachtierkörper Proben auszustanzen und diese mit dem Plattenverfahren auf ihre Keimzahl zu untersuchen. Bis zum Vorliegen der Ergebnisse vergehen bis zu drei Tage. Die hier vorgestellten Verfahren erlauben eine nichtdestruktive Probenahme und liefern bereits nach zehn Minuten die gewünschten Ergebnisse.

Abbildung 5
Probenahme am Schlachtierkörper mittels Tupfer



Abbildung 6 (rechts)
Probenahme mittels Abspültechnik

me das durch spezifische Reagenzien freigesetzte ATP abbauen.

Der Nachweis des ATP als Indikator für die Anzahl an Zellen beruht auf dem enzymatischen Abbau von Adenosintriphosphat zu Adenosinmonophosphat.

In dieser exergonischen Reaktion, die durch das aus Leuchtkäfern gewonnene Enzym Luciferase katalysiert wird, wird die freiwerdende chemische Energie in Lichtenergie umgewandelt. Die Messung der freigesetzten Photonen erfolgt in einem Luminometer; in der Regel über einen Integrationszeitraum von zehn Sekunden.

Die gemessene Lichtintensität (ausgedrückt in relativen Lichteinheiten – RLU) ist proportional zu der vorhandenen Menge an ATP, und diese wiederum korreliert mit der Anzahl an lebenden Mikroorganismen bzw. dem Gehalt an organischen Rückständen.

flussen. Entsprechend müssen Applikationen für die einzelnen Lebensmittel entwickelt und statistisch mit der standardisierten mikrobiologischen Untersuchung verglichen und verifiziert werden.

Im Folgenden sollen einige Applikationen vorgestellt werden, die im Institut für Lebensmittelwissenschaft bearbeitet wurden.

Für die Keimzahlbestimmung von Nordseekrabben konnte so eine Korrelation von $r = 0,93$ im Vergleich zum Standardverfahren erzielt werden. Wesentlich bedeutender ist allerdings die kurze Nachweiszeit von ungefähr zehn Minuten, die falls erforderlich ein schnelles Reagieren erlaubt.

So kann vermieden werden, dass hoch verkeimte, gesundheitsgefährdende Krabben in den Handel kommen oder weiterverarbeitet werden (WERLEIN, 1999).

Alternativ zur destruktiven Probenahme wurde ein Tupferverfahren (Abbildung 5) mit anschließender Filtration zur Erniedrigung der Nachweisgrenze sowie ein Abspülverfahren (Abbildung 6) mit anschließender Filtrationskaskade entwickelt.

Beide Verfahren zeigten in der Praxis vergleichbar gute Ergebnisse in der Handhabung sowie in der Korrelation mit dem Standardverfahren.

Die kurzen Nachweiszeiten ermöglichen so bereits während des Schlachtprozesses Kontaminationsquellen aufzuzeigen und zu beseitigen (WERLEIN, 1997; WERLEIN, 2001).

Aber auch bei der Produktion von Getränken ist dieses Verfahren bei der Wareneingangskontrolle oder Endproduktkontrolle einsetzbar. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist, dass positive Ergebnisse erst ab einer Keimzahl von 10^3 Kbe/g erzielt werden können. Allerdings detektiert das Verfahren

auch Mikroorganismenwachstum über den ATP-Gehalt, welches mit üblichen Methoden nicht nachweisbar ist. So kann der lebensmittelproduzierende Betrieb bei auffälligen Proben entsprechende Untersuchungen einleiten und so eventuell gesundheitsgefährdende Produkte frühzeitig erkennen.

Abschließend sei noch Max von Pettenkofer (1818–1901) zitiert, der Begründer der wissenschaftlichen Hygiene, Schüler und Freund Liebig's, erster ordentlicher Professor für Hygiene, der die Aufgabe der Hygiene poetisch und äußerst treffend beschreibt:

Die Kunst zu heilen kann viele Leiden lindern, doch schöner ist die Kunst, die es versteht, die Krankheit am Entstehen schon zu hindern.

Literatur

- Buzby, J. C. und Roberts, T. (1997): Economic costs and trade impact of microbial foodborne illness. *World Health statist. Quart.*, 50, 57–66.
- Werlein, H.-D. (1999) Mikrobiologische Qualitätskontrolle von Nordseekrabben mittels der ATP-Biolumineszenz. In: Proc. 40. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen, 29.09.–01.10.1999.
- Werlein, H.-D. (2001) Comparison of destructively and rinsing gained samples to determine TVC of pig carcasses by bioluminescence. *Meat Science*, 59 (2), 165–168.
- Werlein, H.-D. (1997) Schnelldachweis der mikrobiellen Belastung von Fleisch und Schlachtierkörperoberflächen mittels der Biolumineszenztechnologie. *Rundschau für Fleischhygiene und Lebensmittelüberwachung*, 49 (6) 123–127.



**Dr. rer. nat.
Hans-Dieter Werlein**

Jahrgang 1959, ist Leiter des Fachgebietes Hygiene und Mikrobiologie des Instituts für Lebensmittelwissenschaft der Universität Hannover.



**Dipl. Berufspäd.
Carolin Kütemeyer**

Jahrgang 1974, ist wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Lebensmittelwissenschaft der Universität Hannover, Abteilung Lebensmitteltechnik und Qualitätsmanagement.