

Lena Hausdorf, Antje Fröhling, Oliver Schlüter und Michael Klocke, Potsdam-Bornim, sowie Holger Adamzig und Antje D. Walter, Berlin

Hygieneüberwachung per Chip

Prozessbegleitende Detektion von human- und phytopathogenen Mikroorganismen bei der Aufbereitung von Frischeprodukten

Kontaminationen von Frischeprodukten mit human- und phytopathogenen Mikroorganismen führen zu hohen Lagerverlusten und zur Gefährdung der menschlichen Gesundheit. Mikrobiologische Untersuchungen zur Keimbelastung sind zeitaufwändig und können somit häufig nicht prozessbegleitend bei der Aufbereitung von Frischeprodukten eingesetzt werden. Die Entwicklung eines On-Chip-Systems zur Detektion von Schaderregern basierend auf molekularbiologischen und durchflusszytometrischen Technologien bietet die Möglichkeit, die nachfolgenden Prozessschritte effektiv dem Kontaminationsgrad der Frischeprodukte anzupassen.

Dipl.-Ing. Antje Fröhling und Dr. Oliver Schlüter sind Mitarbeiter der Abteilung Technik im Gartenbau, Dipl.-Biol. Lena Hausdorf und Dr. Michael Klocke sind Mitarbeiter der Abteilung Bioverfahrenstechnik am Leibniz Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V., Max-Eyth-Allee 100, 14469 Potsdam; e-mail: lhausdorf@atb-potsdam.de.
Dipl.-Ing. Holger Adamzig ist Mitarbeiter der ELBAU Elektronik Bauelemente GmbH Berlin, Abteilung Prozesstechnologie. Dipl.-Ing. Antje D. Walter ist Mitarbeiterin der Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung m.b.H., Anwenderzentrum für Mikrotechnik, Berlin.

Schlüsselwörter

PCR, Durchflusszytometrie, Lebensmittel, Gemüse, Pathogene

Keywords

PCR, flow cytometry, food, vegetables, pathogens

Nach der Ernte sind landwirtschaftliche Produkte wie Gemüse und Obst mehr oder weniger stark mit anhaftender Erde und somit auch mit einer wechselnden Anzahl von Mikroorganismen verunreinigt [1]. Mikrobiologische Oberflächenkontaminationen auf Gemüse und Salat können zum Teil erhebliche Lebensmittelvergiftungen hervorrufen [2].

Mikrobielle Belastung von Gemüsewaschwasser

Im Laufe der Aufarbeitung werden die landwirtschaftlichen Produkte daher verschiedenen Reinigungsschritten unterzogen. Hierbei stehen der ökonomische Aufwand für die Reinigung einerseits und der Wunsch des Verbrauchers nach möglichst wenig und schonend behandelter Ware andererseits stets im Konflikt mit einer optimalen mikrobiologischen Hygienisierung. Jüngste Untersuchungen, welche am Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB) durchgeführt wurden, zeigen in der Praxis eine Belastung, zum Beispiel von Reinigungsstufen bei der Möhrenproduktion, mit bis zu 10^6 Kolonie bildenden Einheiten je ml Washwasser (KBE/ml), wobei hauptsächlich gramnegative Bakterien detektiert wurden. Auch im Falle eines Spinat verarbeitenden Betriebes wurden mit 10^7 KBE je ml Washwasser ebenfalls hohe Keimzahlen gefunden. Eine molekulargenetische Analyse der mikrobiellen Diversität in

den Washwasserproben ergab, dass rund 43 % der ermittelten DNA-Sequenzen potenziellen Krankheitserregern zuzuordnen sind [3], wie zum Beispiel Vertretern der Gattungen *Pectobacterium*, *Clostridium* und *Pseudomonas*. Beispielsweise können verschiedene Arten von *Pectobacterium* als Erreger von Fäulniskrankheiten bei Obst und Gemüse fungieren. Auch die Gattungen *Pseudomonas* und *Clostridium* umfassen neben anderen auch verschiedene human- und phytopathogene Arten.

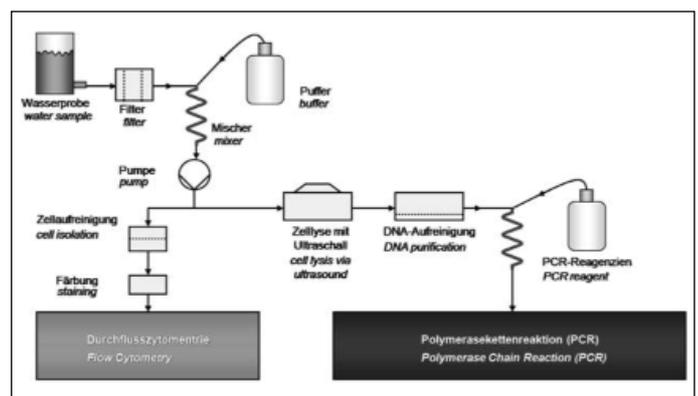
Entwicklung eines On-Chip-Systems

Im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten Forschungsverbundes ProSenso.net 2 sollen Lösungen für ein effektives Monitoring des Hygienestatus entwickelt werden, welche es ermöglichen, speziell das Auftreten von solchen potenziell human- oder phytopathogenen Mikroorganismen zu ermitteln. Durch ein entsprechendes Monitoring-System können dann die nachfolgenden Verarbeitungsschritte effektiv auf den jeweiligen Kontaminationsgrad mit Schad- und Verderberregern angepasst werden.

Basierend auf zellbiologischen und molekularen Techniken werden derzeit am ATB hochspezifische Nachweisverfahren für die gefundenen Pathogene erarbeitet, welche die Grundlage für die Entwicklung eines miniaturisierten On-Chip-Systems bilden (Bild 1). Die Konstruktion dieses On-Chip-Systems

Bild 1: Schema des On-Chip-Systems zur Detektion von Pathogenen im Washwasser während der Gemüsewäsche

Fig. 1: Scheme of the on-chip system for the detection of pathogens in water used to wash vegetables during postharvest processing



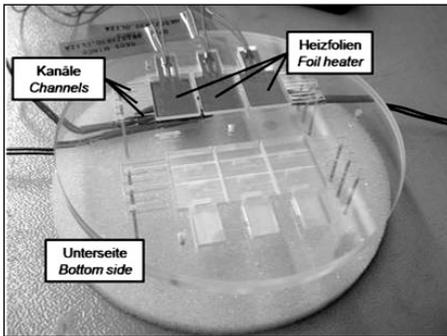


Bild 2: Prototyp der miniaturisierten PCR-Einheit des On-Chip-Systems

Fig. 2: Preliminary model of the miniaturised PCR unit of the on-chip system

erfolgt in Zusammenarbeit mit dem Anwendungszentrum für Mikrotechnik (AZM) an der Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung m.b.H. (BESSY) und der Firma ELBAU GmbH Berlin als industriellem Partner.

Probennahme und -analytik im automatisierten System

Essentiell für das Aufspüren von Krankheitserregern ist, dass das Messsystem in der Lage ist, in kürzester Zeit Proben zu nehmen und zu bearbeiten. In der praktischen Anwendung muss ein Analyseergebnis vorliegen, bevor das Gemüse im Verpackungsbereich angekommen ist, damit eine eventuell notwendige Anpassung des Aufbereitungsverfahrens vorgenommen werden kann.

Deshalb soll das zurzeit von den Projektteilnehmern entwickelte On-Chip-System in der Lage sein, vollautomatisch und parallel zur Gemüsewäsche Proben des Waschwassers zu entnehmen und weiter zu verarbeiten. Nach verschiedenen Probenaufarbeitungsschritten sollen die relevanten Zellfragmente der Mikroorganismen einer Einheit zur miniaturisierten Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) zugeführt werden (Bild 2), die eine gezielte Untersuchung der Waschwasserproben auf die Existenz potenzieller Erreger ermöglichen soll. Im Falle einer starken Keimbelastung des Waschwassers kann dann beispielsweise vor der Verpackung ein Hygienisierungsschritt eingefügt werden. Somit wird gewährleistet, dass nur hygienisch einwandfreie Produkte die Betriebe verlassen.

Molekularer Nachweis von pathogenen Mikroorganismen

Mikroorganismen besitzen häufig nur wenige und meistens zeitaufwändig zu ermittelnde Merkmale, welche eine Unterscheidung zwischen pathogenen und nicht-pathogenen Stämmen erlauben. Die genetische Erbinformation der Mikroorganismen bietet dagegen

eine Vielzahl von artspezifischen Informationen, welche die Entwicklung von spezifischen Nachweisverfahren erlauben, etwa mittels PCR [4, 5]. Die hierfür benötigten Marker werden zurzeit am ATB entwickelt und getestet, so unter anderem für *Pectobacterium* sp. (Bild 3).

Eine Variante der PCR stellt die quantitative Real-Time-PCR (Q-PCR) dar. Diese Methode ermöglicht nicht nur eine Bestimmung der Arten innerhalb weniger Minuten, sondern gleichzeitig auch eine Quantifizierung. Hierbei sind die Primer mit fluoreszierenden Farbstoffen verknüpft, und nach jeder enzymatischen Reaktion wird die Fluoreszenz gemessen. Anhand der Dauer, bis die Fluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert erreicht, können Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge der DNA gezogen werden [6]. Entsprechende Verfahren wurden zum Nachweis von verschiedenen zuvor in Waschwasser gefundenen Bakterienarten entwickelt und befinden sich derzeit in der Erprobungsphase.

Charakterisierung von Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Q-PCR kann ohne weitere Modifikationen keine Unterscheidung zwischen lebenden und abgestorbenen Pathogenen getroffen werden. Daher wird in Ergänzung zu dieser Methode ebenfalls die Eignung der Durchflusszytometrie zur Einbindung in die mikrobielle Analyse von Waschwasser geprüft.

Die Durchflusszytometrie wird auch als kontinuierliche Fluoreszenzmikroskopie bezeichnet, mit der morphologische und physiologische Eigenschaften von Einzelzellen mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen gemessen werden können [7]. Je nach Art der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe ist es möglich, zwischen lebenden, geschädigten und toten Bakterien zu unterscheiden. Dabei

liegt der Vorteil gegenüber den herkömmlichen mikrobiologischen Methoden in der Zeitersparnis und Genauigkeit der Durchflusszytometrie, es können also auch Bakterien detektiert werden, die mit herkömmlichen Methoden nicht erfasst werden.

Zurzeit werden am ATB Messprotokolle für die gefundenen Pathogene entwickelt, die eine Quantifizierung des Hygienisierungserfolges ermöglichen.

Literatur

Bücher sind mit • gezeichnet

- [1] Rudi, K., S.L. Flateland, J.F. Hanssen, G. Bengtsson and H. Nissen: Development and evaluation of a 16S ribosomal DNA array-based approach for describing complex microbial communities in ready-to-eat vegetable salads packed in a modified atmosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (2002), no. 3, pp. 1146-1156
- [2] Smith DeWaal, C., and F. Bhuiya: Outbreak Alert! Center for Science in the Public Interest, 2007
- [3] Hausdorf, L., A. Fröhling, O. Schlüter and M. Klocke: Detection of *Arcobacter* during post-harvest processing of vegetables. *Applied and Environmental Microbiology* (2008), submitted for review
- [4] Klocke, M., A. Knäpik und K. Mundt: Den Bakterien auf der Spur: Marker-gestützte Detektion von Starterkulturen für die Grünfütter-Silierung. *Agrartechnische Forschung* 10 (2004), H. 6, S. 98-104 und *LANDTECHNIK* 59 (2004), H. 6, S. 332-333
- [5] Klocke, M., and K. Mundt: Development of a 16S rDNA-targeted PCR assay for monitoring of *Lactobacillus plantarum* and *Lact. rhamnosus* during co-cultivation for production of inoculants for silages. *Letters in Applied Microbiology* 39 (2004), no. 3, pp. 267-273
- [6] Klocke, M., K. Mundt, C. Idler, J. McEniry, P. O'Kiely and S. Barth: Monitoring *Lactobacillus plantarum* in grass silages with the aid of 16S rDNA-based quantitative real-time PCR assays. *Systematic and Applied Microbiology* 29 (2006), no. 1, pp. 49-58
- [7] • Shapiro, H.M.: *Practical Flow Cytometry*. 4th Edition, 2003

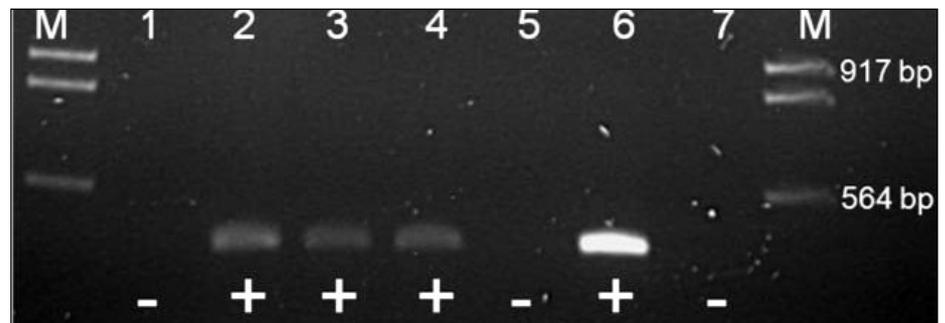


Bild 3: PCR-basierter Nachweis von *Pectobacterium* sp. in Waschwasserproben aus der Spinatverarbeitung. Erwartete Amplikonlänge war ca. 560 bp. Trinkwasser für die Wäsche (1), Wäsche 1 (2), Wäsche 2 (3), Wäsche 3 (4), Blanchierwasser (5) Positivkontrolle (6), Negativkontrolle (7)

Fig. 3: PCR-based detection of *Pectobacterium* sp. in spinach washing water. Expected amplicon size was approx. 560 bp. Drinking water for the wash (1), wash water 1 (2), wash water 2 (3), wash water 3 (4), blanching water (5), positive control (6), negative control (7)