

Roland Ernest Poms - Helmut Foißy

Modellversuche zur Nachweisbarkeit von GVO- Futtermitteln in Kuhmilch

Einleitung und Problemstellung

Nach der Einführung einer allgemeinen Etikettierungspflicht für gentechnisch veränderte Lebens- und Futtermittel in der Europäischen Union [1] und dem Verbot der Verwendung von GVOs in der biologischen Landwirtschaft ist die Frage aktuell, ob Futtermittel-DNA in Kuhmilch als Kontrollindikator dienen kann. Voraussetzung hierfür wäre, dass alimentäre DNA sowohl die Verdauungspassage als auch den Transport über die Blutbahn bis zur Milchdrüse zumindest anteilsweise soweit intakt übersteht, dass eine Aufreinigung aus der „Milch“ mit anschließender Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) möglich wird.

Zwar ist bekannt, dass freie DNA im sauren Milieu im Pansen der Kuh sowie im Dünndarm durch pankreatische Enzyme, wie Ribonukleasen, Desoxyribonukleasen und Phosphodiesterasen rasch hydrolysiert und somit zu kleinen DNA-Bruchstücken degradiert wird, bei durch Futtermittelbestandteile geschützter DNA scheint dies aber nicht generell so zu sein [2]. Alimentäre DNA könnte demnach durch Peyersche Plaques, besonders durchlässige Bereiche in der Dünndarmwand oder - im Falle von DNA-Fragmenten - durch die Darmmucosa insgesamt in die Lymph- und Blutbahn der Kühe diffundieren und somit in weiterer Folge auch in die Milch gelangen.. Diese Annahme wird durch Ergebnisse in einem Mäuse-Modell erhärtet, wonach alimentäre DNA noch bis 8 Stunden nach der Nahrungsaufnahme im Blut und in Organen nachgewiesen werden konnte [3]. Die Blut-Milch-Schranke könnte Futtermittel-DNA entweder gebunden an periphere Leukozyten, die beim Melkvorgang vom Eutergewebe in die Milch abgegeben werden, oder erneut durch Diffusion als freie DNA überwinden

Das Ziel unserer Arbeit war somit die Entwicklung eines optimierten DNA-Isolations-verfahrens aus der komplexen Matrix „Milch“ und die Untersuchung, ob DNA aus Soja und/oder Mais als Futtermittelkomponenten für Kühe im Blut und schließlich auch noch in der Milch nachweisbar sind. Als Ergänzung hierzu wurden auch Harn und Kot in die Studie miteinbezogen.

Zusätzlich sollte aber auch geprüft werden, wie leicht Verstaubungsvorgänge im Stall zu positiven DNA-Testergebnissen in der bereits ermolkenen Milch führen und inwieweit gängige

technologische Verfahrensschritte (Kühlung, Erhitzung, Fermentation) auf die Stabilität allfälliger Marker-DNA in Milch Einfluß nehmen.

Material und Methoden

Handelsüblicher Sojaschrot und hofeigene Maissilage wurden Kühen in Tagesrationen von ca. 7 kg beziehungsweise 33 kg während einer Woche verabreicht. In einem separaten Test wurde einer Kuh 1,5 mg gereinigte Soja-DNA intravenös appliziert, um den Verdauungstrakt bewußt zu umgehen, und Proben nach 2, 10, 30 und 60 Minuten entnommen. Bei beiden Versuchsanordnungen wurden während der gesamten Dauer in regelmäßigen Abständen Milch-, Blut-, Harn- und Kotproben gezogen und auf das Vorhandensein eines 118 bp Fragments des Soja-Lektin-Gens bzw. eines 226 bp Fragments des Mais-Invertase-Gens geprüft. Zur DNA-Anreicherung aus Milch wurden verschiedene Vorschläge auf ihre Brauchbarkeit geprüft und letztlich ein Isolationsverfahren gewählt und optimiert, das auf der Extraktion mit Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) und der Verwendung von Milchfraktionen nach Zentrifugation von 200 ml Milch beruht. Für die DNA-Isolation aus Blut, Harn und Kot wurden kommerziell erhältliche Kits (Quiagen, Promega) verwendet. Die DNA-Identifikation erfolgte, wie heute Stand der Technik, mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) mit nachfolgender elektrophoretischer Auftrennung der Amplifikate.

Der Verstaubungsversuch erfolgte mittels bewußt exponierter Milchprobe durch Aufstellen einer offenen Milchkanne für 2 Stunden in einer Entfernung von 10 m vom Futtertrog.

Stabilitätsprüfungen von DNA in Milch umfassten eine Kühlung bei 4 °C über einen Zeitraum von 22 Tagen, Tiefkühlung bei -22 °C über 300 Tage (wobei zwischenzeitlich mehrere Gefrier- und Tauschritte vorgenommen wurden), und Erhitzungen unter und auf 100°C. Der Einfluß einer Fermentation (vorwiegend durch Milchsäurebakterien) auf DNA wurde mittelbar über den Vergleich von siliertem und nicht-siliertem Mais geprüft.

Ergebnisse und Diskussion

Das für Milch optimierte DNA-Isolationsverfahren (Abb.1) mit CTAB und die Aufarbeitung von Fraktionskonzentraten aus zentrifugierter Rohmilch (Magermilchpulver, Rahm, Zentrifugenschlamm) liefert durch Erfassung sowohl freier als auch an Zellen gebundener DNA der Rohmilch hohe Ausbeuten und Reinheiten (Tab.1). Damit konnte die Nachweisgrenze von bisher 1 ng Futtermittel-DNA/ml Rohmilch auf bis zu 1 pg (10^{-12} g) abgesenkt werden (Abb.2).

Die Fütterungsversuche ergaben, dass weder Soja-DNA noch Mais-DNA in Milch während der intensiven Fütterungsphase nachweisbar waren. Auch im Blut und Harn verlief der Test negativ, lediglich im Kot waren Spuren von Futtermittel-DNA identifizierbar.

Nach intravenöser Verabreichung von Soja-DNA konnte das spezifische Soja-Fragment nur 2 min nach der Applikation nachgewiesen werden (Abb.3). Bereits nach 10 min war keine Marker-DNA mehr ersichtlich, obwohl die verabreichte DNA-Menge - umgerechnet auf das Blutvolumen des Versuchstieres mit etwa 60 Liter - die DNA-Nachweisgrenze um mehr als das 250fache übertraf. Erwartungsgemäß war daher auch der Soja-DNA-Nachweis in den nächsten Gemelken dieser Kuh negativ.

Demgegenüber ist Verstaubung von Futtermitteln naturgemäß durchaus in der Lage, im Wege postsekretorischer Kontamination positive Futtermittel-DNA-Tests in Milch zu liefern.

Marker-DNA erwies sich als kältestabil, hitzeinstabil ab etwa 100 °C und empfindlich gegenüber Fermentation. Letzteres ist aus der starken Degradierung von silierter Mais-DNA deduzierbar, wobei hierfür offensichtlich die niedrigeren pH-Werte und der Abbau durch bakterielle Enzyme verantwortlich sind.

Zusammenfassung

Diese Arbeit zeigt, dass auch bei Aufnahme großer Kraftfuttermittelmengen durch Kühe die Futtermittel-spezifische DNA in kurzer Zeit durch Verdauung im Magen-Darm-Trakt und Verstoffwechslung im Blut so stark abgebaut wird, dass die Nachweisgrenze der derzeit aktuellen PCR-Analytik unterschritten wird. Da bereits das Blut Marker-DNA-frei ist, kann kaum erwartet werden, dass die Milch ein positives Testergebnis liefert, was unsere Tests auch bestätigten.

Eine postsekretorische Kontamination von Milch über den Weg der Verstaubung eines unzulässigerweise im „gentechnikfreien“ Stall gelagerten GVO-Futtermittels kann jedoch – nicht überraschend - zu einem positiven Ergebnis von Marker-DNA in Milch führen.

Technologische Behandlungsschritte, wie hohe Erhitzung und Fermentation (deduziert aus einer Silagegärung) , nicht aber Kühlung und Pasteurisierung, vermögen die in Milch enthaltene DNA zu degradieren, was deren Indikatorfunktion selbst dann noch in Frage stellen würde, wenn ein Transfer von Futtermittel-DNA bis in die Milch nachweisbar wäre.

Somit bleibt auf der Basis vorliegender Versuche und der angewandten Methoden die Erkenntnis, dass eine Passage von (transgener) Futtermittel-DNA in Milch nicht oder aber in so geringem Maße erfolgt, dass sie als Indikator in diesem Lebensmittel für den unerlaubten Einsatz bestimmter Kraftfuttermittel in der Tierernährung ungeeignet ist.

Literatur

[1] Ausländisches Lebensmittelrecht, EG-Vorschriften, 1999: 2. Ausgabe, Behr's Verlag, Hamburg. Herausgeg. von Centrale Marketing Gesellschaft der Deutschen Agrarwirtschaft mbH., Bonn.

[2] McAllan, A.B., 1982: The fate of nucleic acids in ruminants. Proc. Nutr. Soc. 41:309-317.

[3] Schubbert R., Renz D., Schmitz B., Doerfler W., 1997: Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 961-966.

Autoren:

Dipl.-Ing. Roland Ernest Poms und **Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. Helmut Foißy**, Institut für Milchforschung und Bakteriologie, Universität für Bodenkultur Wien (<http://www.boku.ac.at>)

Forschungsprojekt (1144/99) des Bundesministeriums für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft

Abbildung 1: DNA-Isolation aus den Fraktionen der Rohmilch

