

Transport von Umweltproben unter Cryobedingungen

Heinz Rüdel*, Martin Weingärtner*,
Roland Klein**, Alois Deutsch**

*Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie
(Fraunhofer IME), Auf dem Aberg 1, 57392 Schmallenberg

** Universität Trier, FB VI – Biogeographie, 54296 Trier

Inhaltsverzeichnis

1	Umweltprobenbank des Bundes	2
2	Zielsetzung dieser Richtlinie	2
3	Durchführung des Transports.....	2
	3.1 Cryobedingungen.....	2
	3.2 Sicherheitshinweise für den Umgang mit Flüssigstickstoff	2
	3.3 Rechtliche Grundlage.....	3
	3.4 Vorbereitungen.....	3
	3.5 Material und Gerätschaften.....	3
	3.6 Durchführung des Transports	4
	3.7 Einlagerung am Zielort	4
	3.8 Reinigungsvorschrift.....	4
4	Dokumentation.....	4
5	Literatur	4

Verfahrensrichtlinien für Probenahme, Transport, Lagerung und chemische Charakterisierung von
Umwelt- und Humanproben

März 2015, V 3.0.1

1 Umweltprobenbank des Bundes

Die Umweltprobenbank des Bundes (UPB) ist ein Instrument der Umweltbeobachtung des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit (BMUB) unter fachlicher und administrativer Koordinierung des Umweltbundesamtes (UBA). Die UPB sammelt ökologisch repräsentative Umweltproben sowie Humanproben, lagert sie ein und untersucht sie auf umweltrelevante Stoffe.

Grundlage des Betriebs der UPB sind spezifische Verfahrensrichtlinien (UMWELTBUNDESAMT) sowie die Konzeption der UPB (BMU 2008).

Die Langzeitlagerung erfolgt unter Bedingungen, die eine Zustandsveränderung oder einen Verlust chemischer Eigenschaften über einen Zeitraum von mehreren Jahrzehnten weitestgehend ausschließen. Damit stellt das Archiv Proben für die retrospektive Untersuchung solcher Stoffe bereit, deren Gefährdungspotential für die Umwelt oder die menschliche Gesundheit heute noch nicht bekannt ist.

Umfassende Informationen zur UPB sind unter www.umweltprobenbank.de verfügbar.

2 Zielsetzung dieser Richtlinie

Diese Vorschrift gilt für biologische Umweltproben wie z.B. Brassermuskulatur, Fichtentriebe, Buchenblätter sowie abiotische Proben wie Boden und Schwebstoff. Für die Lagerung in der UPB werden die meisten Proben zum Zeitpunkt der Probenahme vor Ort eingefroren.

Ausnahmen hiervon sind z.B. Rehlebern, Tauben- und Silbermöweneier sowie Regenwürmer. Die speziellen Transportbedingungen dieser Proben bis zur Cryokonservierung sind in der jeweiligen Richtlinie zur Probenahme und Probenbearbeitung beschrieben.

Für alle Proben gilt, dass die einmal begonnene Tiefkältekette nicht mehr unterbrochen werden darf. Der weitere Transport, die Lagerung sowie Zerkleinerung und Homogenisierung des Probenmaterials finden deshalb unter Cryobedingungen (Temperatur unterhalb von ca.

-130°C) unter Beachtung spezieller Sicherheitsbestimmungen statt.

Der besonders hohe Anspruch an Qualitätssicherung ergibt sich aus der außergewöhnlichen Bedeutung der Proben als Archivmaterial. Repräsentativität und Reproduzierbarkeit der Proben sind Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der Untersuchungsergebnisse in Zeit und Raum.

Ziel dieser Richtlinie ist die Bereitstellung von Informationen zum sicheren Transport von temperaturempfindlichen Proben unter Cryobedingungen unter Beachtung der Arbeitssicherheitsvorschriften und ohne Minderung der Probenqualität.

Die Richtlinie umfasst nur den Straßentransport, nicht aber den Versand von Probenmaterial mit Paketdiensten bzw. Speditionen.

3 Durchführung des Transports

3.1 Cryobedingungen

Cryobedingungen herrschen bei Temperaturen von unter ca. -130°C (ca. < 140 K). Die Temperatur liegt damit unter der Glasübergangstemperatur des Wassers. Es erfolgt keine Rekristallisation von Eis und damit kein weiteres Wachstum von Eiskristallen (BURDEN 1999). So ist sichergestellt, dass in den Proben chemische Prozesse minimiert sind und morphologische Veränderungen z.B. durch weiteres Eiskristallwachstum verhindert werden. Bei Lagerung in der Gasphase über Flüssigstickstoff wird außerdem durch den verdampfenden Stickstoff im Probenlagerbehälter eine Inertgasatmosphäre erzeugt, die Veränderungen der Proben durch Sauerstoff aus der Umgebungsluft (Oxidationsprozesse) weitgehend verhindert.

3.2 Sicherheitshinweise für den Umgang mit Flüssigstickstoff

Flüssigstickstoff ist tiefkalt, wirkt bei Verdampfung erstickend und es besteht bei Kontakt Gefahr der Haut- und Gewebeschädigung.

Beim Umgang mit Flüssigstickstoff sind die Ausführungen des Sicherheitsdatenblatts nach Artikel 31 REACH-Verordnung zu beachten (REACH 2006).

Bei Verwendung von Flüssigstickstoff in geschlossenen Räumen ist eine ausreichende Belüftung sicherzustellen. Beim Transport von Flüssigstickstoff in Fahrzeugen muss neben ausreichender Belüftung eine Überwachung mit einem Sauerstoffsensoren erfolgen (s. auch Kap. 3.3).

3.3 Rechtliche Grundlage

Rechtliche Grundlage für den Transport von flüssigem Stickstoff zu Kühlzwecken in Fahrzeugen bildet Abschnitt 5.5.3 des „Europäischen Übereinkommens über die internationale Beförderung gefährlicher Güter auf der Straße (GGVSEB 2009)“. Fahrzeuge mit Stoffen, die zu Kühl- und Konditionierungszwecken während der Beförderung verwendet werden, unterliegen nur den Vorschriften dieses Abschnitts. Diese sind zwingend zu beachten.

3.4 Vorbereitungen

Der Transportbehälter (vakuumisolierter Edelstahlbehälter mit Deckel aus Isolationsmaterial) ist rechtzeitig vor dem Transport herunter zu kühlen.

Die Proben sind im vorgekühlten Transportbehälter auf einer Plattform in geeigneten Behältern oder Gestellen gesichert gegen Umfallen so zu lagern, dass sie nicht direkt mit dem Flüssigstickstoff in Berührung kommen.

Die Probengefäße müssen laut GGVSEB so beschaffen sein „...dass eine Gasentlastung zur Verhinderung eines Druckaufbaus, der zu einem Bersten der Verpackung führen könnte, ermöglicht wird“.

Vor Durchführung des Transports sind die Mitarbeiter hinsichtlich der Auflagen der GGVSEB zu unterweisen.

3.5 Material und Gerätschaften

Für den Transport unter Cryobedingungen werden nachfolgend aufgeführte Geräte benötigt:

- Für die Kühlung mit Flüssigstickstoff geeigneter, isolierter Transportbehälter mit geeigneten Lagergestellen für die Proben. Kennzeichnung: UN 1977 Stickstoff, tiefgekühlt, flüssig; Gefahrzettel Nr. 2.2 (Gasflasche auf grünem Grund).

- Vorratsbehälter mit Flüssigstickstoff zur Kühlung (bei Transport im geschlossenen Zustand Zulassung als Druckbehälter für den Straßentransport notwendig), Gefahrgut-Kennzeichnung: UN 1977 Stickstoff, tiefgekühlt, flüssig; Gefahrzettel Nr. 2.2 (Gasflasche auf grünem Grund).
- Peilstab zum Messen der Füllhöhe des Flüssigstickstoffs.
- Geeignetes Thermometer/Thermoelement zur Temperaturüberprüfung.
- Feuerlöscher (bei Fahrzeugen bis 3,5 t zulässiger Gesamtmasse 2 kg und bei Fahrzeugen von mehr als 3,5 t bis 7,5 t zulässiger Gesamtmasse 4 kg Pulverlöscher; Brandklassen A, B, C; mit gültiger Prüfplakette).

Transportbehälter, die Flüssigstickstoff als Kühlmittel enthalten, dürfen nur in gut belüfteten Fahrzeugen befördert werden (z.B. zusätzliche Deckenlüftung im abgetrennten Laderaum).

An jedem Zugang zum Transportfahrzeug ist ein Warnkennzeichen anzubringen (Stickstoff, tiefgekühlt, flüssig, als Kühlmittel; mit bildlichen Hinweis auf die Gefahr des Sauerstoffmangels).

Folgende Probengefäße werden verwendet:

- Glasfläschchen (z.B. 20 mL-Szintillations-Vials der Fa. PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim); gefertigt aus hochwertigem Glas mit folgenden Standardmaßen: Höhe ca. 60 mm, Durchmesser ca. 25 mm; die Schraubdeckel bestehen aus Kunststoff und sind an der Innenseite mit einer Metallfolie beschichtet. Die Fläschchen werden nicht fest zugedreht, um zu vermeiden, dass die Verdampfung evtl. enthaltenen Flüssigstickstoffs bei einer Temperaturerhöhung zu einer Explosion führt.
- Glasflaschen, 100 mL-Volumen, aus Borosilikatglas, mit Kunststoffschraubdeckeln.
- Edelstahlbehälter mit Edelstahldeckeln und Edelstahlspangen für den Transport noch nicht homogenisierter Proben.
- Cryovials (wie sie z.B. für Blutplasmaproben verwendet werden), bei ausschließlicher

Lagerung in der Gasphase fester Verschluss möglich.

3.6 Durchführung des Transports

Beim Probentransport müssen die erforderlichen Cryotemperaturen eingehalten werden. Die Temperaturkontrolle erfolgt z.B. mittels mobiler oder fest installierter Temperatursonde und einem Thermologger mit digitaler Anzeige. Dieser ermöglicht darüber hinaus die Dokumentation der Temperaturbedingungen während des gesamten Probentransports.

Das Einfrieren frisch gewonnener, warmer Proben verbraucht relativ viel flüssigen Stickstoff, was häufigere Kontrollen und u.U. ein Nachfüllen erfordern.

3.7 Einlagerung am Zielort

Am Zielort werden die Proben in einen bereitgestellten, vorgekühlten Cryolagerbehälter umgeladen.

3.8 Reinigungsvorschrift

Werden die Cryotransportbehälter nach dem Transport auf Raumtemperatur erwärmt, sollten sie anschließend ausgewaschen werden. Die Reinigung soll eine Gesundheitsgefährdung durch mikrobiellen Befall verhindern. Nach gründlicher Trocknung der Behälter, werden die Deckel aufgesetzt. Zur Vermeidung von Schimmelbildung durch Kondensationswasser dürfen die Deckel nicht dicht verschlossen werden.

4 Dokumentation

Für jeden Transport ist eine Liste mit Probandaten, ein Probenbegleitschein bzw. ein Übergabeprotokoll mitzuführen und anschließend zu archivieren. Form und Inhalt der Begleitscheine können im Einzelfall variieren. Für den Transport zwischen verschiedenen Institutionen ist das Mitführen eines Übergabeprotokolls zwingend. Das Dokument muss mindestens folgende Angaben enthalten:

- Abgebende Institution (Kontaktdaten).
- Empfänger der Proben (Kontaktdaten).

- Probenliste und -beschreibung einschließlich UPB-Code.
- Datum und Ort der Übergabe.
- Unterschriften von Empfänger und Vertreter der abgebenden Institution.

5 Literatur

BMU (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Hrsg.) (2008): Umweltprobenbank des Bundes – Konzeption (Stand: Oktober 2008); www.umweltprobenbank.de

BURDEN, D. W. (1999): Issues in Contamination and Temperature Variation in the Cryopreservation of Animal Cells and Tissues. Revco Technologies, Asheville, NC 28806 (USA), Application Note 99-08.

GGVSEB (2009): Innerstaatliche und grenzüberschreitende Beförderung gefährlicher Güter auf der Straße, mit Eisenbahnen und auf Binnengewässern (Gefahrgutverordnung Straße, Eisenbahn und Binnenschifffahrt - GGVSEB) in der Fassung der Bekanntmachung vom 22. Januar 2013 (BGBl. Teil I Nr. 4, S. 110-159).

REACH (2006): Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH), zur Schaffung einer Europäischen Chemikalienagentur, zur Änderung der Richtlinie 1999/45/EG und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 793/93 des Rates, der Verordnung (EG) Nr. 1488/94 der Kommission, der Richtlinie 76/769/EWG des Rates sowie der Richtlinien 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/EG und 2000/21/EG der Kommission.

UMWELTBUNDESAMT: Umweltprobenbank des Bundes - Verfahrensrichtlinien. Herausgeber: Umweltbundesamt, <http://www.umweltprobenbank.de/de/documents/1002>.