

Verpackungs-Rundschau

Literaturhinweis: Verpackungs-Rundschau **32** (1981) Nr. 11, Tech.-wiss. Beilage, Seiten 83 bis 86

Merkblätter für die Prüfung von Packmitteln

Herausgegeben von den Arbeitsgruppen der Industrievereinigung für Lebensmitteltechnologie und Verpackung e.V. am Fraunhofer-Institut für Lebensmitteltechnologie und Verpackung, Institut an der Technischen Universität München

Merkblatt 43

Bereitstellung von Stamm- und Gebrauchskulturen von Pilzen für mikrobiologische Prüfverfahren

Herausgegeben von der Arbeitsgruppe „Mikrobiologie der Packstoffe“

in Zusammenarbeit mit der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, DSM — Deutsche Sammlung von Mikroorganismen — Göttingen

1. Zweck und Anwendung

Einheitliches Vorgehen bei der Anzucht von Kulturen ist unbedingte Voraussetzung, reproduzierbare Resultate in mikrobiologischen Prüfverfahren zu erhalten. Erforderlich ist die Bereitstellung von einheitlichem Versuchsmaterial, die standardisierte Anzucht von Stamm- und Gebrauchskulturen und deren laufende Überwachung.

2. Kurzbeschreibung

Von offiziellen Kultursammlungen bezogene Pilzstämmen werden angezüchtet, auf Reinheit und die bekannten, typischen Stammerkmale untersucht. Anschließend werden zehnwöchige Stamm- und zweiwöchige Gebrauchskulturen gehalten, die auf Übereinstimmung mit dem Originalstamm geprüft werden müssen.

3. Sicherheitsmaßnahmen

Da eine Gefährdung nie mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, sollten alle Manipulationen mit dem lebenden Material unter Beachtung der Sicherheitsbestimmungen für mikrobiologische Laboratorien von entsprechend geschultem Personal durchgeführt werden¹.

Werden Kulturen und Zellmaterial nicht mehr benötigt, sind sie vor dem Vernichten im Autoklaven zu sterilisieren (mindestens 20 min bei 121 °C).

4. Anzucht und Kontrolle des Materials

4.1. Bezug der Kulturen

Als Ausgangsmaterial dienen Kulturen aus offiziellen Sammlungen, die entweder als Lyophilisat oder als Lebendkultur auf Schrägagar-Röhrchen bezogen werden können.

Die Kulturen sind durch Angabe einer taxonomischen Bezeichnung (Gattungs- und Artname) und einer Sammlungsnummer eindeutig gekennzeichnet. Nicht gekennzeichnetes Material soll nicht verwendet werden.

4.2. Anzucht der Prüfstämme

4.2.1. Lieferform: Lyophilisat

Ist den lyophilisierten Ampullen keine Anleitung zur Wiederbelebung des Materials beigelegt, kann im allgemeinen wie folgt vorgegangen werden:

4.2.1.1. Einfache, dickwandige Ampullen werden genau in der Mitte des Wattebausches mit einer Ampullenfeile angeritzt, mit einem alkoholgetränkten (70% v/v Ethanol) Lämpchen umwickelt und aufgebrochen. Es können auch konfektionierte Desinfektionstücher verwendet werden. Nach Entfernen der Watte unter sterilen Bedingungen wird das Lyophilisat mit Nährlösung (4.2.1.2) bedeckt und soll nach Wiederverschließen mit der Watte etwa 15 min stehen. Alternativ kann das lyophilisierte Material, sofern es durch leichtes Klopfen vom Glas gelöst werden kann, mit einer sterilisierten und befeuchteten Ose direkt in ein Röhrchen mit flüssigem Medium übertragen und nach etwa einer Stunde durch kräftiges Schütteln suspendiert werden.

¹ Berufsgenossenschaft für Gesundheitsdienst und Wohlfahrtspflege: Unfallverhütungsvorschrift, Medizinische Laboratoriumsarbeiten (VBG 114).

Die so, gegebenenfalls nach Aufrühren, erhaltene Suspension kann direkt zum Animpfen der Kulturen verwendet werden.

Die Anzucht der Stämme erfolgt, sofern nicht anders angegeben, auf mykologischen Standardmedien, wie Pilznährboden nach Sabouraud, Malzextrakt- oder Czapek-Dox-Medium (4.3.1.1).

4.2.1.2. Von Ampullen, die in einem inneren Röhrchen das Lyophilisat enthalten (double-vial-Methode), wird die Spitze durch Erhitzen und vorsichtiges Auftropfen von Wasser (Spritzflasche) gesprengt. Das Glas kann durch leichtes Klopfen entfernt und anschließend das innere Röhrchen mit der Kultur entnommen werden.

Dann wird, wie unter 4.2.1.1 beschrieben, weiter gearbeitet.

4.2.2. Lieferform: Lebendkultur

Werden die Prüfstämme als Schrägagarkultur geliefert, wird im Fall sporenbildender Pilze eine ausgeglühte und durch Eintauchen in sterilen Agar o. ä. wieder abgekühlte Impföse über die Kultur gezogen und das anhängende Sporen/Myzel-Gemisch direkt zum Animpfen der Kultur verwendet.

Reine Myzelkulturen werden durch Ausstechen eines kleinen, myzeldurchwachsenen Agarblöckchens (Kantenlänge etwa 2-3 mm) zum Animpfen verwendet.

4.3. Anzuchtbedingungen

4.3.1. Nährmedien

4.3.1.1. Nähragar

4.3.1.1.1. Pilznährboden nach Sabouraud, modifiziert:

Zusammensetzung:

5 g Pepton aus Casein, tryptisch verdaut
5 g Pepton aus Fleisch, tryptisch verdaut
10 g D(+)-Dextrose · H₂O
10 g Maltose · H₂O
10-15 g Agar-Agar
40-45 g

4.3.1.1.2. Malzextrakt-Agar:

Zusammensetzung:

30 g Malzextrakt
3 g Pepton aus Sojamehl
10-15 g Agar-Agar
43-48 g

4.3.1.1.3. Czapek-Dox-Agar:

Zusammensetzung:

30 g Saccharose
3 g Natriumnitrat
0,5 g Magnesiumsulfat
0,5 g Kaliumchlorid
0,01 g Eisen(II)-sulfat
1,0 g di-Kaliumhydrogenphosphat
10-13 g Agar-Agar
45-48 g

4.3.1.1.4. Bereitung:

Die angegebenen Mengen Nährstoffe werden einem Liter frisch destilliertem oder voll entsalztem Wasser zugesetzt und unter ausgiebigem Schütteln gleichmäßig verteilt. Anschließend wird im Dampftopf bis zur vollständigen Lösung gekocht und in vier 300-ml-Nährbodenflaschen umgefüllt. Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven 15 min bei 120 °C mit aufgesetzten Kapsenbergkappen. Der pH-Wert der fertigen Nährmedien (4.3.1.1.1 und 4.3.1.1.2) soll $5,6 \pm 0,1$, bezogen auf eine Meßtemperatur von 20 °C, betragen. Falls erforderlich, wird der pH-Wert des Nährmediums mit 1 mol/l Natronlauge oder 1 mol/l Salzsäure eingestellt. Der pH-Wert des Nährmediums 4.3.1.1.3 beträgt $7,3 \pm 0,1$.

4.3.1.1.4.1. Vorbereitung der Petrischalen:

Nach Abkühlen des Nährbodens auf ca. 45 °C werden in sterilen Petrischalen jeweils etwa 10 ml des flüssigen sterilen Nährbodens unter sterilen Bedingungen eingegossen und der Nährboden erstarren gelassen. Sofort nach dem Eingießen wird der Petrischalendeckel aufgelegt. Die Petrischalen mit Nährboden sind bei + 4 °C aufzubewahren, eine Lagerzeit von 14 Tagen darf nicht überschritten werden. Kondenswasserbildung auf dem Deckel der Petrischale ist zu vermeiden.

4.3.1.1.4.2. Vorbereitung der Reagenzgläser:

Nach Abkühlen des Nährbodens auf ca. 45 °C werden in die sterilen Reagenzgläser jeweils etwa 10 ml des flüssigen sterilen Nährbodens unter sterilen Bedingungen eingegossen und sofort mit sterilen Zellstoffstopfen verschlossen. Die Reagenzgläser werden so gelegt, daß der Nährboden mit schräger Oberfläche erstarrt. Sie sind bei + 4 °C aufzubewahren, eine Lagerzeit von 14 Tagen darf nicht überschritten werden.

4.3.1.2. Nährlösungen

4.3.1.2.1. Pilznährlösung nach Sabouraud, modifiziert:

Zusammensetzung:

5 g Pepton aus Casein, tryptisch verdaut
5 g Pepton aus Fleisch, tryptisch verdaut
10 g D(+)-Dextrose · H₂O
10 g Maltose · H₂O
30 g

4.3.1.2.2. Malzextraktlösung:

17 g Malzextrakt

4.3.1.2.3. Bereitung:

Die angegebenen Mengen Nährstoffe werden einem Liter frisch destilliertem oder voll entsalztem Wasser zugesetzt. Anschließend wird im Dampftopf bis zur vollständigen Lösung gekocht und in vier 300-ml-Nährbodenflaschen umgefüllt. Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven 15 min bei 120 °C mit aufgesetzten Kapsenbergkappen. Der pH-Wert des gebrauchsfertigen Nährbodens soll bei 20 °C $5,6 \pm 0,1$ betragen. Ist dies nicht der Fall, muß mit 1 mol/l Natronlauge oder 1 mol/l Salzsäure eingestellt werden. Die Lösungen müssen bei Lagerung bei Zimmertemperatur innerhalb von acht Tagen verbraucht werden.

Werden sie bei + 4 °C gelagert, darf eine Lagerzeit von 14 Tagen nicht überschritten werden. Es ist auch möglich, diese Lösungen über Membranfilter (Porengröße ca. 0,2 µm) zu sterilisieren.

4.3.2. Bebrütung

4.3.2.1. Temperatur

Sofern im Einzelfall nicht anders angegeben, erfolgt die Bebrütung der Kulturen bei $(22 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

4.3.2.2. Dauer

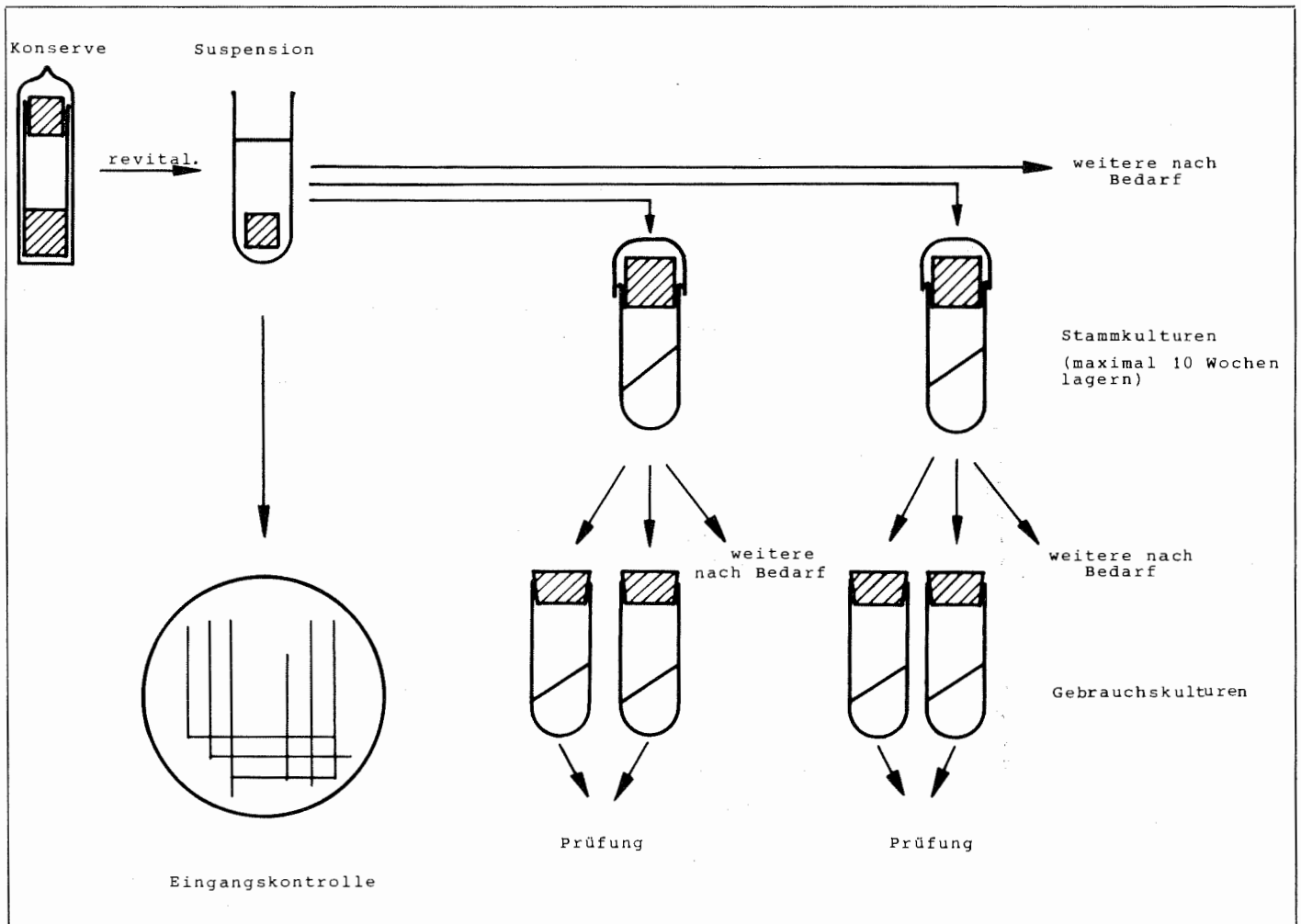
Die Dauer der Bebrütungszeit ist abhängig von der Entwicklungsgeschwindigkeit des Pilzes, sie kann zwischen drei und 16 Tagen variieren. Als Richtwert können zehn Tage angenommen werden.

4.4. Lagerung der Kulturen

Optimal entwickelte Kulturen werden im Fall von Stammkulturen maximal 10 Wochen, im Fall von Gebrauchskulturen maximal 14 Tage bei $(4 \pm 1) ^\circ\text{C}$ gelagert. Stammkulturen müssen vor dem Austrocknen geschützt werden.

4.5. Eingangskontrolle

In der Eingangskontrolle soll die Kultur ab Lyophilisat bzw. ab Lebendkultur auf Reinheit, spezifische Art- und eventuell Stammcharakteristika untersucht werden. Dabei muß die Kultur frei von Fremdfunktionen und einheitlich sein (vergleiche 8.). Anschließend werden, soweit möglich, morphologische und biochemische Merkmale überprüft.



Arbeitschema gemäß Abschnitt 5.

Bei positivem Ausgang der Überprüfung dient die Kultur als Ausgangsmaterial zur Anlage der Stamm- und Gebrauchskulturen.

Bei negativem Ergebnis ist die Sammlung, von der der Stamm bezogen worden war, zu benachrichtigen.

5. Herstellung von Stammkulturen

Unter Stammkulturen werden Lebendkulturen auf festen Nährböden verstanden, die als Ausgangsmaterial für die wöchentlichen Gebrauchskulturen dienen. Sie stammen direkt von einem Lyophilisat bzw. einer Lebendkultur einer offiziellen Sammlung von Mikroorganismen, die die Eingangskontrolle bestanden haben.

Die Schrägagar-Röhrchen eines geeigneten Mediums (4.3.1.1) mit Kulturen im optimalen Reifezustand (4.3.2) werden unter Beachtung des Austrocknungsschutzes maximal 10 Wochen bei $(4 \pm 1) ^\circ\text{C}$ gelagert.

Nach Ablauf dieser Zeit wird mit neuem Basismaterial gestartet (vergleiche das Arbeitsschema im Bild).

6. Herstellung von Gebrauchskulturen

Gebrauchskulturen auf Schrägagar, Petrischalen o.ä. dienen unmittelbar der Herstellung von Sporen- oder Myzelsuspensionen bzw. können direkt für Prüfzwecke verwendet werden. Sie haben ihren Ursprung in Stammkulturen, aus denen sie entsprechend dem aktuellen Bedarf so angesetzt werden, daß sie im optimalen Reifezustand vorliegen. Sie werden nach Gebrauch umgehend vernichtet (siehe 3.).

7. Zwischenkontrolle

Neben der umfassenden Eingangskontrolle müssen alle Kulturen laufend auf Reinheit und Übereinstimmung mit dem Original überprüft werden.

8. Verfahren zur charakterisierenden Untersuchung von Schimmelpilzen

8.1. Mikroskopisches Präparat (Adhäsionspräparat)

8.1.1. Material

8.1.1.1. Nähragar nach 4.3.1.1.

8.1.1.2. Hohlgeschliffene Objektträger (24×76) und große Deckgläser (24×40)

8.1.1.3. Objektträgerhalter und Pinzette

8.1.1.4. Kleiner Pinsel und Vaseline

8.1.1.5. Feuchte Kammer, z. B. rechteckige Präparatengläser mit Deckel (ausgestattet mit feuchtem Zellstoff bzw. Filterpapier auf dem Boden liegend und mit zwei, darüber im geringen Abstand parallel verlaufenden Glasstäben als Objektträgerbank; Glasstäbe an der seitlichen Wandung des Präparatenglases, z. B. mit Knetmasse, fixiert).

8.1.2. Durchführung

8.1.2.1. Einen hohlgeschliffenen Objektträger sterilisieren, indem er ausreichend durch die Bunsenbrennerflamme gezogen wird (Objektträgerhalter).

Den Objektträgerhalter mit dem sterilisierten Objektträger (Hohlseite nach oben) vor sich auf den Tisch stellen.

8.1.2.2. Danach ein Deckgläschen mit einer Pinzette in Ethanol tauchen, den Alkohol abbrennen lassen und sofort einen Tropfen mit geschmolzenem, auf 50 °C abgekühlten Nähragar (mit steriler Impföse Nährboden 1-3 × entnehmen) in die Mitte des Deckgläschens geben.

8.1.2.3. Mit steriler Impföse sehr wenig Sporenmateriale von der zu überprüfenden Pilzkultur entnehmen und auf den Agartropfen in die Mitte impfen.

8.1.2.4. Den Hohlraum des sterilisierten Objektträgers vorsichtig anhauchen und umgehend das Deckgläschen sorgfältig über den Hohlraum des Objektträgers setzen, indem der beimpfte Agartropfen in der Mitte dieses Hohlraumes zwischen Deckglas und Objektträger zu liegen kommt.

Mit einem kleinen, sauberen Pinsel Vaseline auf drei Seiten des Deckglases zum Fixieren auf den Objektträger bringen.

8.1.2.5. Das fertige Präparat sogleich in die feuchte Kammer auf die Glasbank überführen, Deckel wieder auf das Präparatenglas setzen und bei etwa 22 °C die Objektträgerkulturen bebrüten. Vom dritten Tag an täglich mikroskopisch kontrollieren, bis die typischen Wuchsformen des Pilzes deutlich erkennbar sind.

Merkmale:

Entwicklung des Myzels innerhalb und außerhalb des Agartropfens.

Wuchsformen und Sporen besonders im Luftraum zu erkennen. Diese Objektträgerkultur kann mikroskopisch gut untersucht werden.

8.2. Riesenkolonie

8.2.1. Material

8.2.1.1. Nähragar nach 4.3.1.1.

8.2.1.2. Impfnadel

8.2.2. Durchführung

8.2.2.1. Platten wenden, so daß Deckel unten liegt.

8.2.2.2. Ausgeglühte Impfnadel in sterile, flüssige Nährlösung (4.3.1.2) tauchen, dann mit der nun klebrigen Spitze Sporen von der Kultur entnehmen.

8.2.2.3. Boden der Petrischale abheben mit Agarschicht nach unten hängend, von unten mit der mit Sporen versehenen Impfnadelspitze — vorsichtig nach oben geführt — die Mitte der Fläche in einem Punkt beimpfen; ein Vibrieren der Nadel ist wegen möglicher Streubeimpfung zu vermeiden.

8.2.2.4. Kultur hängend bei etwa 22 °C bebrüten, täglich kontrollieren.

Merkmale:

Wachstumsgeschwindigkeit (Durchmesser der Kolonie am 3., 5. usw. Tag), Form der Pilzkolonie, Färbung, Zeich-

nung der Oberfläche und der Kolonieunterseite und evtl. Verfärbung des Substrates, Exsudatbildung in der Kolonie usw.

Die Riesenkolonie kann zusätzlich auch noch auf Czapek-Dox-Agarplatten angelegt werden.

9. Prüfbericht

Im Prüfbericht sind unter Hinweis auf dieses Merkblatt anzugeben:

- Stammsammlung
- Sammlungsnummer
- Nährmedien
- Datum der Animpfung der ersten Kultur
- Ergebnis der Untersuchung auf Reinheit
- Prüfer
- Ort

10. Anmerkungen

10.1. Mikroorganismen können von der DSM — Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Griesebachstr. 8, 3400 Göttingen, bezogen werden.

10.2. Die Nährmedien können auch aus Trocken-Nährböden hergestellt oder fertig zubereitet (Fertigplatte, Einwegröhrchen) in den Zusammensetzungen, wie beschrieben, bezogen werden. Trockennährmedien werden nach den Vorschriften des Herstellers aufgelöst, gekocht und sterilisiert.

10.3. Die Herstellercodes sind wie folgt:

Malzextrakt-Agar:

Merck 5398

Becton, Dickinson (BBL) 11403

Difco B112

OXOID CM 59

Malzextrakt-Nährlösung:

Merck 5397

Becton, Dickinson (BBL) 11406

Difco B113

OXOID CM 57

Pilznährboden nach Sabouraud, modifiziert:

Merck 7662

Becton, Dickinson (BBL) 11591

Difco B110

OXOID CM 41a

Pilznährlösung nach Sabouraud:

Merck 5399

Becton, Dickinson (BBL) 10986

Difco B429

Czapek-Dox-Agar:

Merck 5460

Difco B339

OXOID CM 97