

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 44

Bereitstellung von Stamm- und Gebrauchskulturen von Bakterien 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 Bakterienkulturen ist unbedingte Voraussetzung, reproduzierbare Resultate in mikrobiologischen Prüfverfahren zu erhalten. Erforderlich ist die Bereitstellung von einheitlichem Versuchsmaterial durch standardisierte Anzucht von Stamm- und Gebrauchskulturen und deren laufende Überwachung.

2. Kurzbeschreibung

Von offiziellen Kultursammlungen bezogene Bakterienstämme werden angezchtet, auf Reinheit und die bekannten, typischen Stammerkmale untersucht. Anschließend werden vierwöchige Stamm- und einwöchige Gebrauchskulturen gehalten, die auf Übereinstimmung mit dem Original 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 Artnamen) und einer Sammlungsnummer eindeutig gekennzeichnet. Nicht gekennzeichnetes Material sollte nicht verwendet werden.

4.2. Anzucht der Prüfstämme

4.2.1. Lieferform: Lyophilisat

Ist den lyophilisierten Kulturen 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 unwickelt und aufgebrochen. Es können auch konfektionierte Desinfektionstücher verwendet werden. Nach Entfernen der Watte unter sterilen Bedingungen wird das Lyophilisat mit Nährlösung (4.3.1.2) bedeckt und soll nach Wiederverschließen mit der Watte etwa 15 min stehen. Die so, gegebenenfalls nach Aufrühren, erhaltene Suspension kann direkt zum Animpfen der Kulturen und für die Eingangskontrolle verwendet werden.

Die Anzucht der Stämme erfolgt, sofern nicht anders angegeben, auf Caseinpepton-Soja-mehlpepton-Agar oder Bouillon (siehe 4.3.1). Alternativ kann das lyophilisierte Material, sofern es durch leichtes Klopfen vom Glas gelöst werden kann, mit einer sterilisierten und befeuchteten Öse direkt in ein Röhrchen mit flüssigem Medium übertragen und nach etwa einer Stunde durch kräftiges Schütteln suspendiert werden.

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, weitergearbeitet.

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

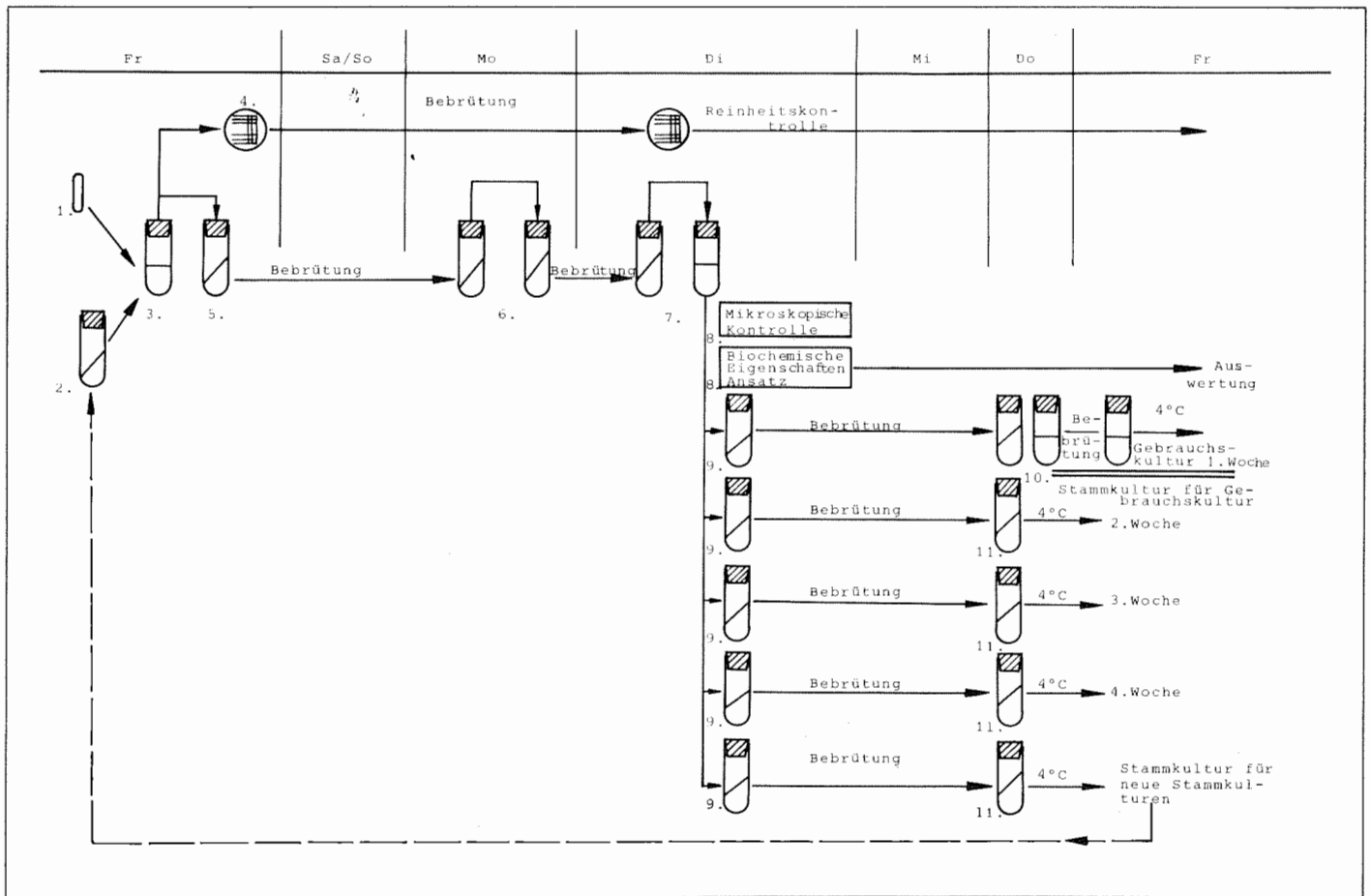


Bild 1: Herstellung von Stammkulturen; Eingangskontrolle.

1 = Lyophilisat, 2 = Lebendkultur, 3 = Suspension von 1 oder 2 in Nährlösung, 4 = Plattenausstrich, 5 = Übertragung auf Schrägagar-Röhrchen, 6 = Übertragung auf Schrägagar-Röhrchen, 7 = Herstellung

einer Suspension in H₂O, 8 = Eingangskontrolle, 9 = Übertragung auf Schrägagar-Röhrchen, 10 = Übertragung in Nährlösung, 11 = Lagerung der Stammkultur bei 4°C.

4.2.2. Lieferform: Lebendkultur

Werden die Prüfstämme als Schrägagarkultur geliefert, wird eine ausgeglühte und durch Eintauchen in sterilen Agar o. ä. wieder abgekühlte Impföse über die Kultur gezogen und das anhängende Zellmaterial in flüssigem Medium suspendiert. Dabei soll eine sichtbare Trübung des flüssigen Mediums entstehen.

4.3. Anzuchtbedingungen

4.3.1. Nährmedien und Lösungen

4.3.1.1. Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar

Zusammensetzung:

15 g Pepton aus Casein
5 g Pepton aus Sojamehl
5 g Natriumchlorid
12-15 g Agar-Agar
37-40 g

4.3.1.1.1. Bereitung:

Die angegebenen Mengen Nährstoffe werden einem Liter frisch destilliertem oder vollentsalztem Wasser zugesetzt, unter ausgiebigem Umschütteln gleichmäßig verteilt und 15 min gewicht. Die Lösung wird in vier 300-ml-Nährbodenflaschen umgefüllt. Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven 15 min bei 121 °C mit aufgesetzten Kapsenbergkappen. Der pH-Wert des gebrauchsfertigen Nährbodens soll bei 20 °C $7,4 \pm 0,2$ betragen.

4.3.1.1.1.1. Vorbereitung der Petrischalen:

Nach Abkühlen des Nährbodens auf ca. 45 °C werden in die 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.

4.3.1.1.1.2. 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. Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon

Zusammensetzung:

17 g Pepton aus Casein
3 g Pepton aus Sojamehl
5 g Natriumchlorid
2,5 g D (+) - Dextrose · H₂O
2,5 g di-Kaliumhydrogenphosphat
30 g

4.3.1.2.1. Bereitung:

Die angegebenen Mengen Nährstoffe werden einem Liter frisch destilliertem oder vollentsalztem 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 121 °C mit aufgesetzten Kapsenbergkappen. Der pH-Wert des gebrauchsfertigen Nährbodens soll bei 25 °C $7,3 \pm 0,3$ betragen. Ist dies nicht der Fall, muß mit 1 mol/l Natronlauge oder 1 mol/l Salzsäure eingestellt werden.

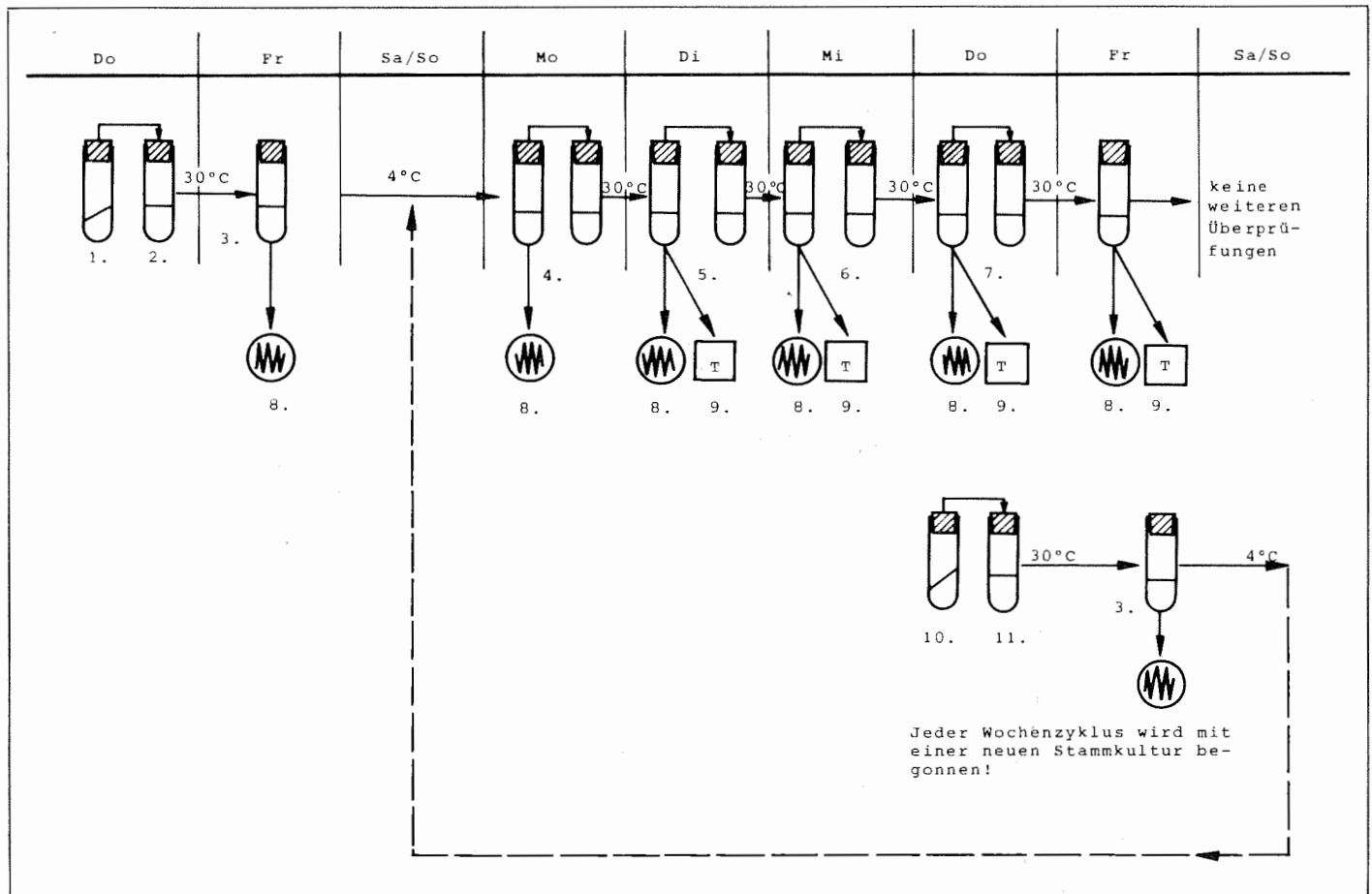


Bild 2: Anzucht der Gebrauchskulturen; Reinheitskontrollen.

1 = Stammkultur, 2 = Beimpfung der Vorkultur, 3 = nach etwa 24stündiger Bebrütung kalt stellen, 4-7 = Überimpfung der Gebrauchskultur, 8 = Ausstrich für Reinheitskontrollen, 9 = Verwendung der zuvor über-

impften Kulturen zu Prüfzwecken, 10 = neue Stammkultur, 11 = Beimpfung der Vorkultur.

Die Bouillon ist bei 4°C aufzubewahren, eine Lagerzeit von 14 Tagen darf nicht überschritten werden.

4.3.1.3. Physiologische Kochsalzlösung

8,5 g Natriumchlorid, reinst

4.3.1.3.1. Bereitung:

Die angegebene Menge wird in 1000 ml frisch destilliertes oder vollentsalztes Wasser, das einen pH-Wert nicht unter 6 haben soll, gegeben und gelöst. Die frisch angesetzte Lösung wird auf drei Nährbodenflaschen verteilt und 15 min bei 120°C sterilisiert. Die Lösung muß bei Lagerung bei Zimmertemperatur innerhalb von acht Tagen verbraucht werden. Wird sie bei +4°C gelagert, darf eine Lagerzeit von 14 Tagen nicht überschritten werden. Es ist auch möglich, diese Lösung über Membranfilter zu sterilisieren.

4.3.2. Bebrütungsdauer und -temperatur

Sofern im Einzelfall nicht anders angegeben, erfolgt die Bebrütung der Kulturen bei 30°C. Die Dauer der Bebrütung soll für Stammkulturen 48 Stunden, für Gebrauchskulturen 16-24 Stunden betragen. Nur die erste, sechzehn Stunden vorbebrütete Wochenkultur wird über das Wochenende bei etwa 4°C aufbewahrt.

4.4. Eingangskontrolle

In der Eingangskontrolle soll die Kultur ab Lyophilisat bzw. Lebekkultur auf Reinheit, spezifische Art- und evtl. Stammcharakteristika untersucht werden. Dabei muß ein Ausstrich der Kultur aus der ab Lyophilisat oder Lebekkultur hergestellten Suspension visuell frei von Fremdinfektionen und einheitlich sein. Anschließend werden, soweit möglich, morphologische und biochemische Merkmale überprüft. Zu dieser Prüfung wird

die zur Beimpfung der Stammkulturen hergestellte Suspension (vergleiche 5.) verwendet.

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 (vgl. Bild 1)

Unter Stammkulturen werden Lebekkulturen auf festen Nährböden verstanden, die als Ausgangsmaterial für die wöchentlichen Gebrauchskulturen dienen. Sie stammen direkt aus einer offiziellen Sammlung von Mikroorganismen, die die Eingangskontrolle bestanden haben. Jede Stammkultur wird nur einmal für die Herstellung von Gebrauchskulturen oder für die Eingangskontrolle verwendet.

Ein Schrägagar-Röhrchen (4.3.1.1.2) wird aus der ab Lyophilisat (4.2.1) oder aus der ab Lebekkultur (4.2.2) hergestellten Suspension unter Verwendung einer Öse beimpft. Nach einer Bebrütung von 72 Stunden bei 30°C wird aus dieser Kultur auf ein frisches Schrägagar-Röhrchen übertragen, das 24 Stunden bebrütet wird.

Zur Herstellung von Stammkulturen wird Zellmaterial dieses Röhrchens in steriler physiologischer Kochsalzlösung (4.3.1.3) suspendiert, so daß eine deutliche Trübung entsteht. Mindestens fünf Schrägagar-Röhrchen werden mit dieser Suspension beimpft, 48 Stunden bebrütet und unter Beachtung des Austrocknungsschutzes maximal vier Wochen bei etwa 4°C gelagert.

Nach Ablauf dieser Zeit können bis längstens sechs Monate neue Stammkulturen aus einer vierwöchigen Stammkultur an-

gelegt werden. Parallel hierzu ist das Verfahren der Eingangskontrolle zu wiederholen.

6. Herstellung von Gebrauchskulturen (vgl. Bild 2)

Gebrauchskulturen sind 16- bis 24stündige Kulturen im Flüssig-Medium. Sie werden wöchentlich von einer neuen Stammkultur abgeimpft und (mit Ausnahme der ersten Vorkultur) täglich weiter überimpft. Hierzu wird eine Ose Material übertragen. Parallel mit den täglichen Überimpfungen der Gebrauchskulturen werden Ausstriche auf Agarplatten (4.3.1.1.1.1) gemacht, um Reinheit und Homogenität der Kultur visuell überprüfen zu können. Zeigt sich bei dieser Kontrolle eine Kontamination, so ist die Gebrauchskultur zu verwerfen, und es muß auf eine reine Stammkultur zurückgegriffen werden.

7. Maximal zulässige Einsatzzeitspannen für verschiedene Kulturen

Die aus einer Sammlung bezogenen lyophilisierten Kulturen können in ungeöffnetem Zustand bei etwa 4 °C über mehrere Jahre gelagert werden.

Für andere Kulturen sind folgende Einsatzzeitspannen zu berücksichtigen:

- gelieferte Lebkulturen 4 Wochen,
- angelegte Stammkulturen 4 Wochen,
- Gebrauchskulturen 1 Tag.

Nach einem Zeitraum von sechs Monaten sollen alle Prüfstämme durch neue Sammlungskulturen ersetzt werden.

8. Verfahren zur charakterisierenden Untersuchung von Bakterien

Hierzu wird auf die Literatur verwiesen.

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 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:

Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar:
Becton, Dickinson (BBL) 11043
OXOID CM 131

Caseinpepton-Sojamehlpepton-Nährlösung:
Becton, Dickinson (BBL) 117 68
OXOID CM 129