



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 29 Absatz 1 des Patentgesetzes

ISSN 0433-6461

(11)

206 683

Int.Cl.³ 3(51) C 12 Q 1/04

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

(21) WP C 12 Q/ 2318 297

(22) 16.07.81

(45) 01.02.84

(71) siehe (73)
(72) SCHADE, WERNER, DR. SC. NAT.; LAUBE, KLAUS, DIPL.-BIOL.; SCHAMBACH, MARTIN;
JAEHRIG, ANNELORE, DR. RER. NAT.; DD;
KUNZ, ARTUR; STROBEL, BRIGITTE, DIPL.-ING., DD

(73) siehe (72)
(74) VEB KOMBINAT TECHN. GLAS ILMENAU ZENTRALES B F S 6300 ILMENAU POSTFACH 303

(54) VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUM NACHWEIS VON KONTAMINANTEN

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zum Nachweis von Kontaminanten in der Lebensmittelindustrie durch direkte Probenahme und Kultivierung der in den Proben enthaltenen Mikroorganismen. Ziel der Erfindung ist es, den arbeits- und gerätetechnischen Aufwand zu reduzieren, ohne die Sicherheit der Aussage zu verringern. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu entwickeln, nach dem die Bearbeitungszeit der Probe und die Zahl der Arbeitsschritte dadurch verringert werden, daß in einer Vorrichtung Entnahme- und Kultivierungssystem vereinigt sind. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß die Untersuchungsprobe mit Hilfe eines vorbestimmten Unterdruckes oder durch Kolben in das Kultivierungsgefäß gelangt, mit einem Nährmedium vermischt wird und während der Kultivierung bei Gasbildung durch die Untersuchungsorganismen äquivalente meßbare Mengen an Nährmedium-Keimsuspension ausfließen. Gleichzeitig nebeneinander sind Wachstum, Säurebildung und Gasbildung der Kontaminationsorganismen bewertbar. Die Kanüle des kombinierten Probenahme-Kultivierungsgefäßes ist dazu als Ansaug- und Auslaufstutzen ausgebildet. In einem gesondertem Glasgefäß sind außerhalb des Kultivierungsgefäßes ein oder mehrere feste Nährmedien vom flüssigen Nährmedium getrennt angeordnet. Figur 3

Anmelder:

Dr. Schade, Werner
Laube, Klaus
Schambach, Martin
Dr. Jährig, Annelore
Kunz, Artur
Strobel, Brigitte

Zustellungsbevollmächtigter:

VEB Institut Technisches Glas Jena
Zentrales Büro für Schutzrechte
6300 Ilmenau
Postfach 303

IPK: C 12 Q, 1/04

Verfahren und Vorrichtung zum Nachweis
von Kontaminanten

Anwendungsgebiet der Erfindung:

Das erfindungsgemäße Verfahren und die Vorrichtung zum Nachweis von
5 Kontaminanten dienen sowohl der Probenahme aus der Flüssigkeit als auch
der Kultivierung der in den Proben enthaltenen Mikroorganismen zur mikro-
biologisch-hygienischen Kontrolle in Betrieben der Lebensmittelindustrie
und ähnlicher Industriezweige.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen:

Zum Nachweis von Kontaminanten sind verschiedene Methoden bekannt, die zur Charakteristik der Keimbelastung eines Produktes oder eines Geräte- bzw. Anlagenteiles eine Aussage erlauben. Grundsätzlich erfolgt jedoch
5 der Nachweis in mehreren Arbeitsschritten.

Die Entnahme eines bestimmten Probevolumens einer Flüssigkeit oder Suspension im Laboratorium erfolgt aus einem Behälter mittels eines sterilen Gerätes (z. B. Pipette), um mit entsprechenden Anteilen der Probe Kulturen auf geeigneten festen und/oder flüssigen Nährmedien
10 anzulegen. Dieser Behälter kann z. B. eine Getränkeflasche oder ein Transportgefäß sein, in welches unter sterilen Bedingungen eine Probe außerhalb des Laboratoriums gefüllt wird. Eine Beurteilung der Probe mittels des mikroskopischen Bildes ist nur bei einer höheren Kontamination möglich. Durch die Anzahl der benötigten Geräte und den Kontakt
15 mit der Umgebungsluft besteht das Risiko einer Sekundärkontamination.

Zur Haltbarkeitskontrolle z. B. von Getränken ist der Nachweis der Kontaminanten auch in sehr geringer Zahl wichtig. Zu diesem Zweck wird ein größeres Probevolumen über eine Membran filtriert und diese auf einen festen Nährboden gebracht.

20 Bei kulturellen Methoden kann jedoch ein befriedigendes Ergebnis frühestens nach drei- bis viertägiger Bebrütung festgestellt werden, da empfindliche Keime auf festem Nährboden langsamer wachsen als in Flüssigkeitskulturen. Letzteres gilt auch für das bekannte Koch'sche Plattenverfahren.

25 Eine Anfärbung der von Membranfiltern zurückgehaltenen Mikroorganismen und ihre anschließende Auszählung und Charakterisierung mittels des Mikroskopes ist nur an gut ausgerüsteten Arbeitsplätzen möglich und erfordert eine entsprechende Qualifikation. Außerdem kann in direkter Auszählung nur bedingt zwischen vitalen und toten Keimen unterschieden
30 werden.

Ein wesentlicher Nachteil herkömmlicher Methoden besteht weiterhin darin, daß außer dem Kontaminationsgrad nicht gleichzeitig auch charakteristische Eigenschaften der Kontaminationsorganismen (Gasbildung, Gäraktivität, Säurebildung, Wachstum unter anaeroben Bedingungen)
35 bestimmt werden können.

Für Keime, die in der Lebensmittelindustrie und in ähnlichen Industriezweigen Bedeutung besitzen, ist der gleichzeitige Nachweis einer Fähigkeit, unter aeroben Bedingungen Gas und Säure zu bilden sowie unter

anaeroben Bedingungen wachsen zu können, besonders wichtig.

Nach herkömmlicher Verfahrensweise wird die Gasbildung entweder qualitativ nachgewiesen oder es wird eine gesonderte Kultivierungsapparatur (z. B. Gärröhrchen) benötigt. Die herkömmlichen Verfahren belasten die 5 im Laboratorium Beschäftigten mit der Bereitstellung sterilisierter Geräte und der Nährmedienbereitstellung. Dadurch werden kleinere Arbeitsstätten höher belastet.

Des weiteren sind aus der Medizin zur Blutentnahme und weiteren Bearbeitung der Blutproben bestimmte Verfahren und Systeme bekannt. Nach 10 den Patentschriften US 35 36061 und DE-OS 2835101 besteht die Möglichkeit, an Kanülensysteme, die in die Vene der Patienten gestochen wurden, vorevakuierte Proberöhrchen anzuschließen, die entweder als Behälter zum Probetransport dienen oder die als Gefäße für biochemische Reaktionen bzw. Kultivierungsgefäße genutzt werden können. Nach DE-OS 15 2411651 wird innerhalb des Blutentnahmesystems eine Gasbildung durch eine druckempfindliche, gasundurchlässige Sperre angezeigt, eine Möglichkeit des Anschlusses zur Gasanalyse besteht.

Ein kombiniertes Blutentnahme- und Kultursystem zur Untersuchung von Bakteriämien nach DE-OS 3012056 erlaubt die gleichzeitige Kultivierung 20 auf festen und flüssigen Nährmedien, wobei das Blut über ein Entnahmesystem mengendosiert in ein mit Vakuum oder eine Gasfüllung versehenes Gefäß eines Blutkultursystems eingesaugt wird, dabei sowohl das flüssige Nährmedium als auch den festen Nährboden inokuliert. Ein pH-abhängiger Indikator macht die mit dem Wachstum verbundene Säurebildung sichtbar.

25 Die Bebrütung erfolgt in Schräglage des Systems, wobei die Entnahmekanüle mit einem sterilen Elastomerstopfen verschlossen bleibt. Diese Systeme sind jedoch nicht für den Bereich der Lebensmittelindustrie anwendbar.

Ziel der Erfindung:

30 Ziel der Erfindung ist es, ein Verfahren und eine Vorrichtung zur mikrobiologischen Untersuchung von Produkten und Gerätschaften der Lebensmittelindustrie und verwandter Zweige zu erarbeiten, denen die Nachteile der bisherigen Lösungen nicht anhaften und mit deren Hilfe quantitativ ein schneller, kombinierter Nachweis des Kontaminations- 35 grades und wesentlicher Eigenschaften der Kontaminanten auch bei Einsatz als Einweggefäße möglich ist.

Darlegung des Wesens der Erfindung:

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu entwickeln, das die mikrobiologische Kontrolle sicherer gestaltet bei gleichzeitiger Senkung des Arbeits- und Zeitaufwandes sowie eine Vorrichtung
5 zu schaffen, die alle notwendigen Funktionen der Probenahme und Kultivierung vereinigt, so daß bei Verwendung entsprechender flüssiger und/oder fester Nährmedien ein Nachweis von Kontaminanten in Flüssigkeiten bzw. von in Flüssigkeiten mittels bekannter Methoden suspendierter Mikroorganismen möglich ist.

10 Das erfindungsgemäße Verfahren ist vorzugsweise zum Nachweis von Bakterien, Hefen und Schimmelpilzen geeignet, bei dem die flüssige Probe mengendosiert in ein mit Unterdruck und/oder einer speziellen Gasfüllung (z. B. CO₂, N₂) versehenes kombiniertes Probenahmekultivierungsgefäß eingesaugt wird und dabei mit dem flüssigen Nährmedium
15 vermischt wird.

In einem gesonderten Abschnitt der Vorrichtung können ein oder mehrere feste Nährmedien eingebracht sein, wodurch es möglich ist, daß die mit dem flüssigen Nährmedium vermischte Probe gleichzeitig das flüssige und das feste bzw. die festen Nährmedien inokuliert.

20 Bei einer bestimmten Temperatur und vertikaler Stellung des Gefäßes erfolgt die Kultivierung der Mikroorganismen, deren Wachstum durch Trübung des flüssigen Nährmediums bzw. durch kolonie- oder rasenförmiges Wachstum auf festen Nährmedien erkennbar ist.

Das Säurebildungsvermögen der kontaminierenden Mikroorganismen wird
25 sichtbar durch Farbänderung eines pH-abhängigen Indikatorsystemes, vorzugsweise Bromkresolgrün (3'.5'.3'''.5''-tetrabrom-m-kresolsulfonphthalein) oder Bromphenolblau-(Tetrabromphenolsulfonphthalein).

Erfindungsgemäß ist das Verfahren dadurch gekennzeichnet, daß eine Gasbildung der Mikroorganismen nachgewiesen wird, indem das Gefäß
30 in einem geeigneten Ständer in vertikaler Stellung mit der offenen Kanüle nach unten fixiert wird, so daß ein der Gasbildung adäquates Volumen der Nährmedium-Mikroorganismensuspension aus dem Gefäß verdrängt wird, das in einem kalibrierten, vorzugsweise sterilen, mit einem sterilen Wattestopfen verschlossenen Röhrchen bestimmt wird.

35 Erfindungsgemäß ist das Verfahren außerdem dadurch gekennzeichnet, daß gleichzeitig nebeneinander charakteristische Eigenschaften der Kontaminationsorganismen, wie z. B. Keimgehalt, Gasbildung, Gäraktivi-

tät oder Säurebildung ermittelt werden. Damit ist auch eine Prüfung der Gäraktivität der eingesetzten Produktionshefe mittels des Verfahrens möglich.

Für gesonderte Untersuchungen wird sowohl aus dem Auffangröhrchen als
5 auch nach der Kultivierung entweder vom flüssigen und/oder festen Nährmedium eine Probe entnommen.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung ist dadurch gekennzeichnet, daß die Kanüle des Probenahme-Kultivierungsgerätes gleichzeitig als Ansaugstutzen für die zu untersuchende Flüssigkeit und als Auslaufstutzen
10 für die bei der Gasbildung verdrängte Nährmedium-Keimsuspension ausgebildet ist, vorzugsweise einen Durchmesser < 3 mm besitzt und über einen sterilen Stopfen in einem graduierten Meßgefäß stehend gehalten wird. Außerdem ist die Vorrichtung dadurch gekennzeichnet, daß das Gefäß für ein oder mehrere feste Nährmedien außerhalb des Gefäßes für das
15 flüssige Nährmedium, vorzugsweise als abgeteiltes Gefäß neben dem vakuum- oder gasgefüllten Raum, angeordnet und mit einer Halterung für das feste Nährmedium versehen ist.

Die Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens und der Vorrichtung bestehen darin, daß es die Erfindung ermöglicht, einen gleichzeitigen
20 Nachweis von gasbildenden und säurebildenden Mikroorganismen darzustellen. Gegenüber dem bekannten vorgeschlagenen Verfahren wird sie dadurch mit Vorteil in der Gärungs- und Getränkeindustrie sowie ähnlichen Industriezweigen angewendet.

Entgegen bekannter Vorrichtungen ist das Anbringen einer gesonderten
25 Gasentnahmevorrichtung nicht notwendig, da die Gasbildung infolge des Austretens des Nährmediums durch den Probenahmestutzen angezeigt wird.

Gegenüber bekannter Verfahren können im Falle des Vorliegens gäraktiver Hefen bereits während des Bebrütens Proben zur weiteren Untersuchung entnommen werden.

30 Das System ist nicht nur zum Nachweis von Kontaminationskeimen, sondern auch zur Feststellung der Gäraktivität von Produktionshefen geeignet.

Der Körper für das feste Nährmedium ist außerhalb des Gerätes angebracht. Nach entsprechender Inokulation des festen Nährmediums wird der Nährboden stehend bebrütet. Eine Koloniebildung ist somit sofort erkennbar.

35 Ein weiterer Vorteil dieses Gerätes ist, daß gegenüber herkömmlichen Verfahren und Methoden kaum eine Kontamination des Probematerials auf-

treten kann, da die zu untersuchenden Medien durch direkte Entnahme z. B. durch Durchstechen von Membranen zwecks Probenahme erfolgt.

Ausführungsbeispiel:

Das erfindungsgemäße Verfahren und die Vorrichtung sollen nachfolgend 5 an Anwendungsbeispielen dargestellt und erläutert werden.

Es zeigen:

- Fig. 1 ein Schaubild über die Gasbildung der Keime in einem Erfrischungs-
getränk,
Fig. 2 ein Schaubild über die Gasbildung der Keime in einem Limonaden-
10 grundstoff,
Fig. 3 die erfindungsgemäße Vorrichtung für verschiedene Anwendungs-
möglichkeiten:
a offenes Gefäßsystem mit Kolben für flüssiges Nährmedium
b offenes Gefäßsystem mit Kolben für flüssiges und festes
15 Nährmedium
Fig. 4 a geschlossenes Gefäßsystem für flüssiges Nährmedium
b geschlossenes Gefäßsystem für flüssiges und festes Nährmedium.

Bei gleichzeitigem Nachweis von gärenden und säurebildenden Organismen in einem Erfrischungsgetränk muß vor der Untersuchung auf Kontaminanten 20 das Getränk, wie es allgemein bei mikrobiologischen Untersuchungen üblich ist, entkohlensäuert werden.

Die Untersuchungsprobe wird mit steriler Indikatorlösung versetzt, dabei findet der auch im Nährmedium des Entnahme- und Kultivierungssystems eingesetzte Indikator Anwendung. Der Probe wird soviel sterile n-Natron- 25 lauge zugefügt, bis die Farbe des Indikators umgeschlagen ist, da die vorhandene Säure weitgehend neutralisiert worden ist.

Der Ansaugstutzen des Entnahme- und Kultivierungsgerätes wird in die zu untersuchende Probe getaucht und die Verbindung zum Nährmediumbehälter hergestellt, der in ihm befindliche Unterdruck bewirkt ein Einströmen 30 der Untersuchungsflüssigkeit in das Nährmedium.

Das beimpfte Gerät wird vorsichtig geschwenkt, um eine innige Vermischung von Probe und Nährmedium zu sichern. Anschließend wird das beimpfte Gerät in vertikale Stellung gebracht und nach Abtropfenlassen von eventuellen Resttropfen mit dem offenen Ansaugstutzen nach unten auf ein 35 leeres steriles, mit einem sterilen Wattestopfen verschlossenes kalibriertes Meßgefäß gesetzt, wobei der Stutzen durch den Wattestopfen

hindurchgeht.

Die komplette Vorrichtung wird in einem Ständer stehend bei 30°C bebrütet.

Als Probe- und Entnahmesystem dient die in Figur 3 dargestellte Form 5 der erfindungsgemäßen Vorrichtung, wobei der Auslaufstutzen modifiziert ist und die Möglichkeit des Ansatzes eines kalibrierten graduierten Meßgefäßes für auslaufende Nährmedium-Keimsuspension besteht.

Täglich werden die Trübung des flüssigen Nährmediums, das Volumen der aus dem Probenahme-Kultivierungsgerät verdrängten Nährmedium-Keimsuspension sowie die Änderung des Farbtones des Indikators kontrolliert.

Ein Untersuchungsergebnis zeigt Figur 1.

Bei gleichzeitigem Nachweis von gärenden und säurebildenden Organismen in einem Limonadengrundstoff wird vor der Untersuchung der Grundstoff mit sterilem Wasser verdünnt, analog oben genannter Verfahrensweise mit steriler Indikatorlösung versetzt und der pH-Wert mittels steriler n-Natronlauge eingestellt. Die sich anschließenden Verfahrensschritte erfolgen wie oben genannt. Bei der Bestimmung der Keimbelastung ist der Verdünnungsfaktor zu berücksichtigen.

Ein Untersuchungsergebnis zeigt Figur 2.

Beim Nachweis coliformer Keime ist das Entnahme-Kultivierungssystem mit einem speziellen Nährmedium gefüllt, z. B. Gentiana-Galle-Laktose-Lösung. Die Vorbereitung der Proben sowie das Einfüllen der zu untersuchenden Flüssigkeit und das anschließende Bebrüten der Keime erfolgen ebenfalls wie beschrieben.

Durch einen Kolben oder durch den Unterdruck im System wird eine genau fixierte Probemenge in das Probenahme-Kultivierungsgerät gesaugt, z. B. 1 ml oder 5 ml. Nach der Bebrütung und Auswertung der Probe zeigt das Ergebnis bei ausbleibender Gasbildung einen Coliformentiter negativ in 1 ml oder 5 ml Probevolumen.

Die Vorrichtung zum Nachweis von Kontaminanten besteht bekannterweise aus dem Kultivierungsgefäß 1 mit einer über einen Abbrechring 7 abbrechbaren Glasspitze 2 und Kanüle 3. Diese Kanüle 3 ist gleichzeitig als Ansaugstutzen für die zu untersuchende Flüssigkeitsprobe und als Auslaufstutzen für die bei der Gasbildung verdrängte Nährmedium-Keimsuspension ausgebildet. Sie besitzt vorzugsweise einen Durchmesser < 3 mm und wird nach der Kultivierung über einen sterilen Stopfen 13 in einem graduierten Meßgefäß 4 stehend gehalten.

Im Kultivierungsgefäß 1 befindet sich flüssiges Nährmedium 5, während außerhalb dieses Gefäßes 1 ein Glasgefäß 10 für ein oder mehrere feste

- 8 - 231829 7

Nährmedien 6 angeordnet ist. Dieses Gefäß 10 befindet sich vorzugsweise als abgeteiltes Gefäß neben dem vakuum- oder gasgefüllten Raum 9 und ist mit einer Halterung 11 für das feste Nährmedium 6 versehen. Zur Keimuntersuchung des bebrüteten festen Nährmediums 6 erfolgt die 5 Probenahme aus dem Glasgefäß 10, indem dieses am Abbrechring 8 geöffnet wird.

Anspruch

1. Verfahren zum Nachweis von Kontaminanten in der Lebensmittelindustrie wobei keimhaltige Flüssigkeiten oder Flüssigkeiten, in welche Keime zum Zwecke der Untersuchung mittels bekannter Methoden eingebracht werden, in einem kombinierten Probenahme-Kultivierungsgerät mit einer ausgewählten Menge an Nährmedium vermischt werden, dadurch gekennzeichnet, daß die anschließende Kultivierung der Nährmedium-Keimsuspension über einem nach unten offenen Auslaufstutzen des Probenahme-Kultivierungsgerätes erfolgt, während der Kultivierung bei Gasbildung durch die Untersuchungsorganismen äquivalente meßbare Mengen an Nährmedium-Keimsuspension ausfließen und dabei in Verbindung mit Trübungs- und Farbänderungen des indikatorhaltigen Nährmediums gleichzeitig in Analogwerten quantitative Aussagen zum Keimgehalt, zur Gasbildung, zur Gäraktivität und zur Säurebildung der Kontaminationsorganismen getroffen werden.
2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß in einem gesonderten Teil des Kultivierungsgefäßes ein oder mehrere feste Nährmedien zusätzlich eingebracht sind, nach Einführung der zu untersuchenden Flüssigkeit ein kolonie-/rasenförmiges Wachstum der Untersuchungskeime auf diesen festen Nährböden erfolgt und nach der Kultivierung Proben zur mikroskopischen Kontrolle und/oder weiteren Untersuchung sowie zur Fortzucht von Organismen entnommen werden.
3. Vorrichtung zum Nachweis von Kontaminanten, bestehend aus einem kombinierten Probenahme- und Kultivierungsgerät mit Kultivierungsgefäß, abbrechbarer Glasspitze, Kanüle und Abbrechring sowie flüssigem und festem Nährmedium, dadurch gekennzeichnet, daß die Kanüle (3) gleichzeitig als Ansaugstutzen für die zu untersuchende Flüssigkeit und als Auslaufstutzen für die bei der Gasbildung verdrängte Nährmedium-Keimsuspension ausgebildet ist, vorzugsweise einen Durchmesser ≈ 3 mm besitzt und über einen sterilen Stopfen (13) in einem graduierten Meßgefäß (4) stehend gehalten ist.
4. Vorrichtung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß außerhalb des Kultivierungsgefäßes (1) für das flüssige Nährmedium (5) ein Glasgefäß (10) für ein oder mehrere feste Nährmedien (6), vorzugsweise als abgeteiltes Gefäß neben dem vakuum- oder gasgefüllten Raum (9) angeordnet und mit einer Halterung (11) für das feste Nährmedium (6) versehen ist.

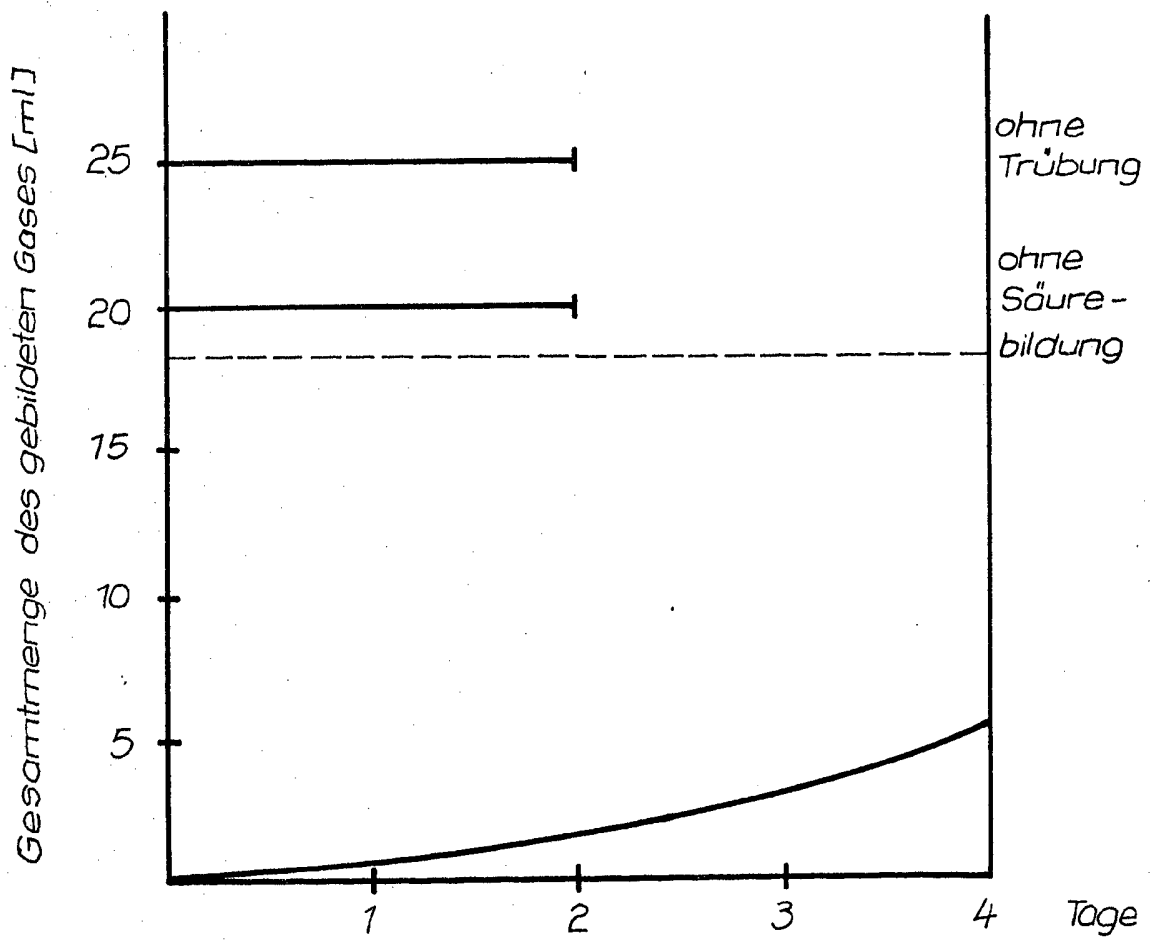


Fig. 1

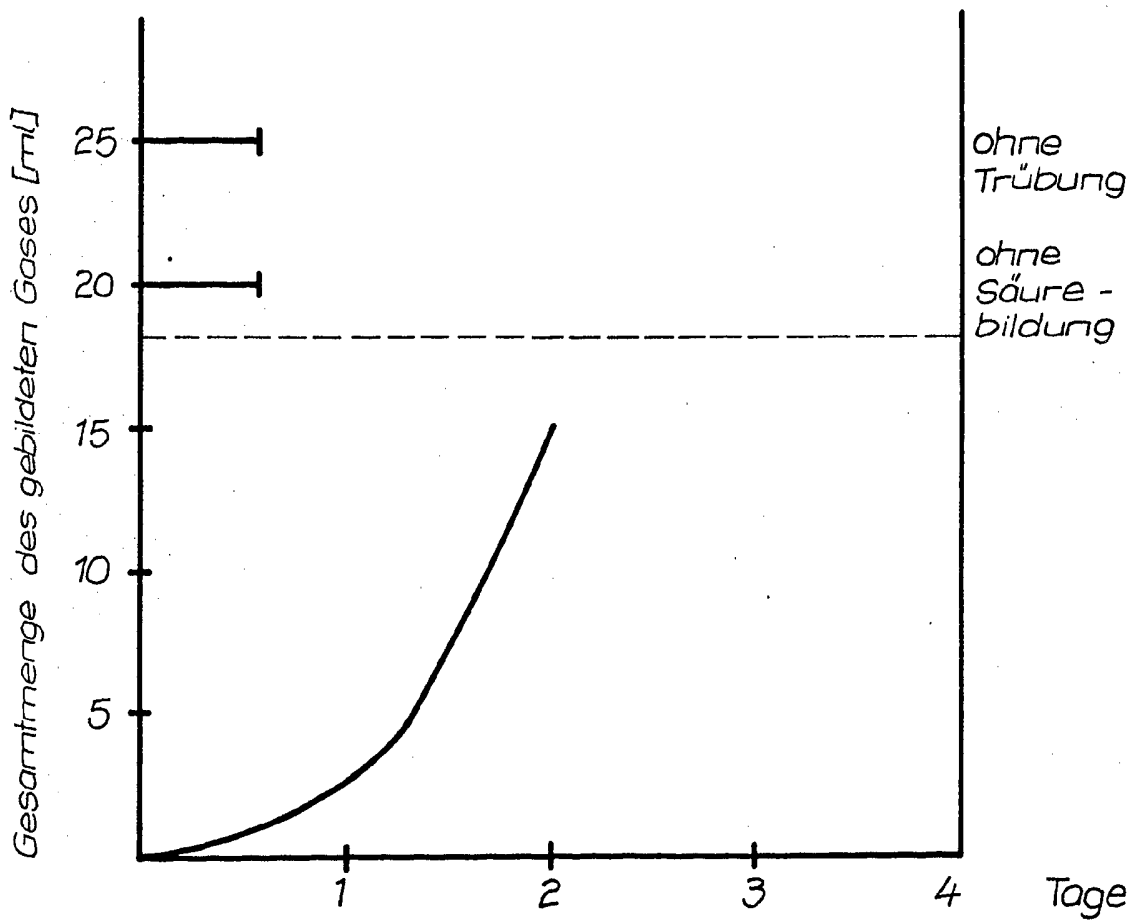


Fig. 2

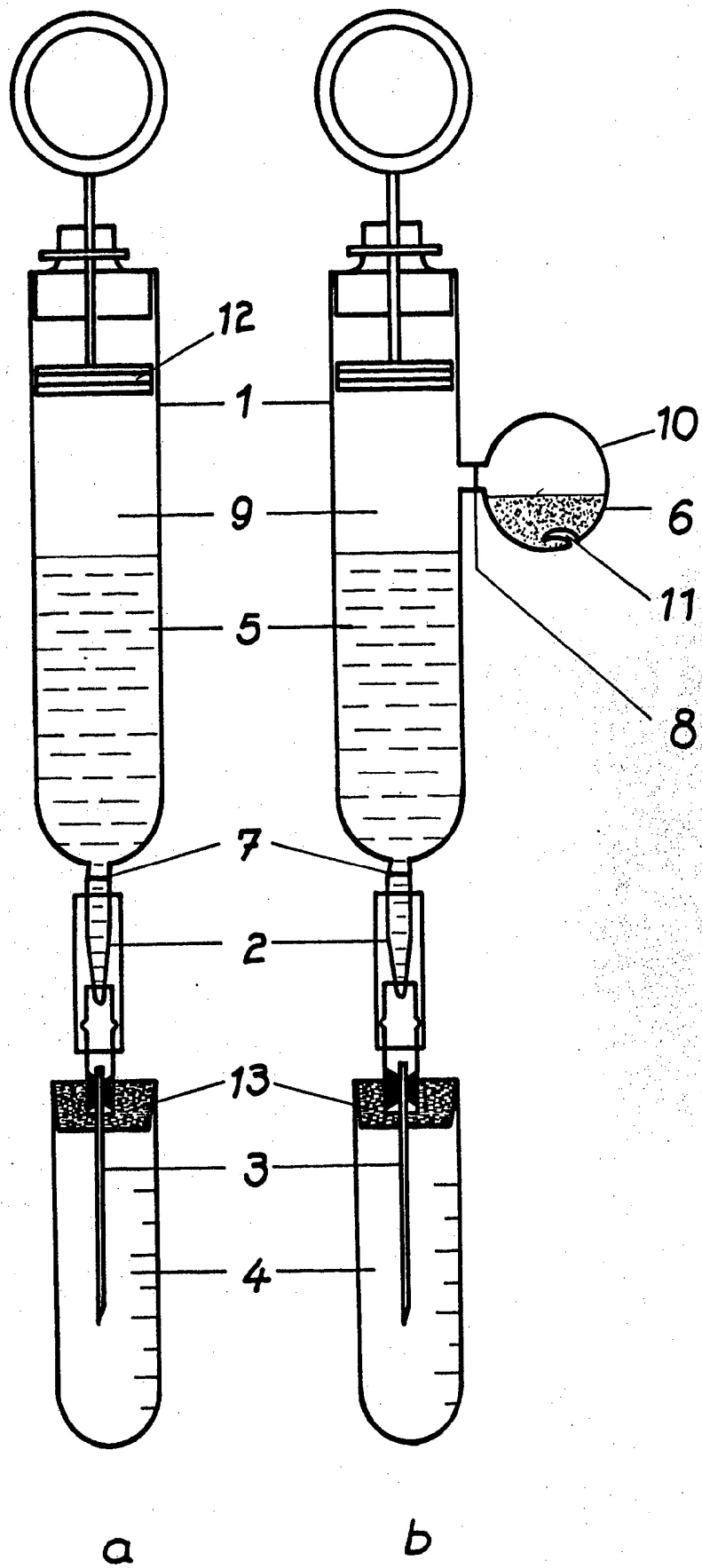


Fig.3

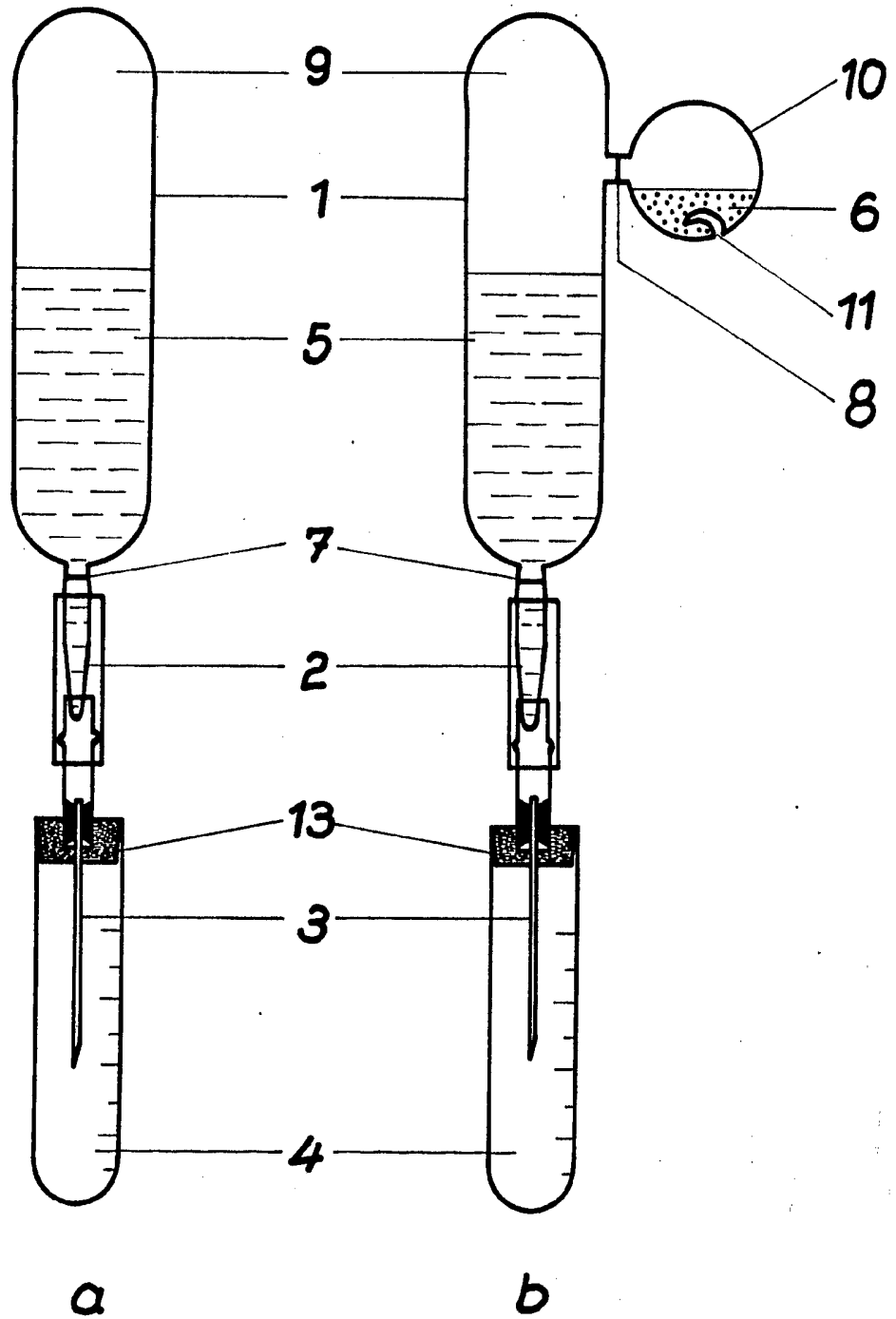


Fig.4