

(12)

Patentschrift

(21) Anmeldenummer: A 1204/2002 (51) Int. Cl.⁷: C12Q 1/00
(22) Anmeldetag: 2002-08-09
(42) Beginn der Patentdauer: 2005-05-15
(45) Ausgabetag: 2005-12-15

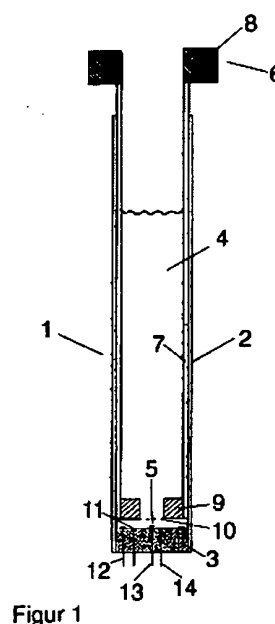
(56) Entgegenhaltungen:
JP 2002174636A
US 2002/0088712A1

(73) Patentinhaber:
PFÜTZNER HELMUT DR.
A-5640 BADGASTEIN, SALZBURG (AT).
FUTSCHIK KARL DR.
A-2344 MARIA-ENZERSDORF,
NIEDERÖSTERREICH (AT).

(72) Erfinder:
PFÜTZNER HELMUT DR.
BADGASTEIN, SALZBURG (AT).
FUTSCHIK KARL DR.
MARIA-ENZERSDORF,
NIEDERÖSTERREICH (AT).

(54) RASCHE MIKROORGANISMEN-DETEKTION

(57) Zur stark beschleunigten Detektion von Mikroorganismen in bebrüteter Meßzelle wäßriger Probenflüssigkeit wird ein kaskadenartiges Verfahren angegeben. Die Organismen werden durch ein Sinkmikrofilter in den Bodenbereich der Zelle getrieben. Hier werden sie mittels dielektrophoretischer Kräfte an einen Miniaturdetektor getrieben, um von ihm detektiert zu werden. Eine entsprechende Vorrichtung betrifft einen elektrischen Detektor, eine zweite einen optischen bei Einsatz eines Lichtleiters.



Die vorliegende Patentschrift behandelt ein Verfahren und entsprechende Vorrichtungen zur beschleunigten Detektion von Mikroorganismen in wäßrigem Medium.

5 Routinemäßige Bestimmungen des Keimgehaltes von Nahrungsmitteln, Getränken u.a. werden herkömmlicherweise mit Hilfe der Plattengußmethode vorgenommen. Abgesehen vom hohen
Arbeitsaufwand ergibt sich dabei der Nachteil sehr hoher Detektionszeiten T . Deutliche Verringerung sowohl des Arbeitsaufwandes als auch von T ergibt sich bei Einsatz neuartiger automa-
10 tisierter Methoden. Am häufigsten kommt dabei die sogenannte Impedanzmethode zum Einsatz, die bereits in die Normung (DIN) aufgenommen wurde. Die zu untersuchende Probe wird in einer Meßzelle bebrütet, die metallische Elektroden beinhaltet. Sind in der Probe Mikroorga-
nismen vorhanden, so führt deren Metabolismus zu - meist negativen - Veränderungen der an den Elektroden auftretenden elektrischen Impedanz Z , welche sich aus der sogenannten Me-
15 dienimpedanz und der Elektrodenimpedanz zusammensetzt. Das zur Detektion genutzte Detektionssignal s kann dabei z.B. als prozentuelle Impedanzabnahme definiert werden. Eine Alternative zur Impedanzmethode ist die Trübungsmethode. Sie basiert darauf, daß die bei Bebrü-
tung ansteigende Konzentration n der Organismen in unmittelbarer Weise zu einem Anstieg der Lichtabsorption A führt. Dabei kann als Detektionssignal s der prozentuelle Anstieg definiert
20 werden. Je größer nun die Anfangskonzentration n_A der Keime ist, umso kleiner fällt der entsprechende Wert von T aus, zu dem s einen vorgegebenen Grenzwert - von beispielsweise 5% - erreicht.

Von großer praktischer Bedeutung ist der Nachweis von koliformen Keimen, die als Leitkeime dienen. Liegen hohe Anfangskonzentrationen n_A vor, so ist T zumindest im Falle der Impe-
25 danzmethode von der Größenordnung nur weniger Stunden, was in den meisten Fällen als akzeptabel gilt. Problematisch hohes T kann sich aber im Fall von nur schwach kontaminiertem Trinkwasser ergeben. Impedanzmethoden liefern das Ergebnis hier erst nach zehn, bei extrem niedrigem n_A erst nach zwanzig Stunden, was nachteilige Verzögerungen von Gegenmaßnahmen - bis hin zur Rückholung von schon ausgeliefertem Mineralwasser - bedeuten kann.

30 Zielsetzung des vorliegenden Verfahrens ist es, T wesentlich zu reduzieren, indem die Organismen in einem ersten Verfahrensschritt durch ein Sinkmikrofilter vertikal hin zum Zellenboden konzentriert werden, in einem zweiten durch Konzentrierelektroden unter Einsatz der Dielektrophorese in den Nahbereich eines Miniaturdetektors konzentriert werden und in einem dritten Schritt mittels des letzteren anhand des Detektionssignales s detektiert werden.

35 Näher im Detail betrachtet erklären sich die bei geringem n_A hohen Zeiten T damit, daß die im Probenvolumen V zunächst vorliegenden $N = n_A \cdot V$ Organismen im wesentlichen gleichverteilt sind. Diese Gleichverteilung bleibt auch bei der Zellteilung aufrecht, was für eine späte Veränderung von s verantwortlich ist. T wird also durch die homogene Keimdichte n bestimmt, und nicht durch die beim üblich hohen Probenvolumen u.U. schon rasch erreichte beträchtliche
40 absolute Keimzahl N , wie es den Zielen des vorliegenden Verfahrens entspricht.

Der Grundgedanke der Erfindung ist es, Organismen - und somit auch die entsprechenden Stoffwechselprozesse - im Nahbereich eines Miniaturdetektors im Rahmen eines kaskadenarti-
45 gen Prozesses zu konzentrieren, womit die Detektion - entsprechend verringerter Detektionszeit T - wesentlich beschleunigt erfolgt.

Erfindungsgemäß ist vorgesehen, die auf Mikroorganismengehalt zu untersuchende Flüssigkeitsprobe - vorzugsweise Trinkwasser - in eine zylindrische Meßzelle zu füllen. Das beigese-
50 tete Nährmedium wird dabei möglichst salzarm gehalten, um - als wesentliche Voraussetzung der Dielektrophorese - die resultierende elektrolytische Leitfähigkeit gering zu halten. Anschließend wird auf die Flüssigkeit ein Sinkfilter aufgesetzt, dessen zylindrische Randfläche mit der Innenwandung der Meßzelle in dichtem aber nur beschränkt reibenden Kontakt steht. Die Gesamt-
masse des Sinkfilters wird so gewählt, daß es mit vertretbarer - d.h. die Größenordnung der
55 Generationszeit der Organismen nicht überschreitender - Sinkzeit zum vollständigen Absinken

kommt. Als Alternative wird es manuell nach unten gedrückt. Das Sinkfilter besteht aus einem vorzugsweise als massiven Metallzylinder ausgeführten Ring, dessen Bodenfläche ein Mikrofilter aufspannt, das eventuell vorhandene Organismen zum Zellboden treibt und sie letztlich an ihm konzentriert. Mit Größenordnungen von 10 cm für die Gesamtflüssigkeitshöhe H und Bruchteilen eines Millimeters für die Höhe h des Bodenbereiches wird erreicht, daß die lokale Organismenkonzentration n bereits um zwei bis drei Größenordnungen gesteigert ausfällt.

Erfindungsgemäß wird der ebene Zellboden oder ein Teilbereich der Ringbodenfläche mit Konzentrierelektroden ausgestattet. Sie werden dazu eingesetzt, Organismen durch Dielektrophorese im Nahbereich des Detektors einzufangen bzw. sie näher an ihn heranzuführen, um die lokale Konzentration n um weitere zwei bis drei Größenordnungen zu steigern. Um eine repräsentative Probenmenge sicherzustellen, wird der Radius der Meßzelle - wie üblich - mit zumindest 5 mm angesetzt. Dem steht gegenüber, daß die Wirkweite dielektrophoretischer Bewegung im vorliegenden Fall auf weniger als ein Millimeter beschränkt ist. Diese Beschränkung ergibt sich daraus, daß zur Erzeugung ausreichend starker Felder erhebliche Stromdichten aufkommen, denen durch korrosionsbeständige, robuste Elektroden Elemente zu begegnen ist, was wiederum die Stärke der resultierenden Feldgradienten beschränkt.

Bei der praktischen Umsetzung des Verfahrens wird die Stromdichte so dosiert, daß lokale thermische Effekte für die untersuchte Organismenart noch tolerierbar ausfallen. Die resultierenden lokalen Strömungseffekte erweisen sich dabei als Vorteil, indem sie eine Mitbewegung von Organismen bewirken. Letztere geraten damit letztlich in den Fangbereich der Dielektrophorese, was einer indirekten Vergrößerung der Wirkweite gleichkommt. Erfindungsgemäß ist als Option vorgesehen, die Strömungen durch im Bodenbereich wirksame aktive Elemente zu verstärken, wozu Heizdrähte, Ultraschallgeber oder auch Laserlichtimpulse eingesetzt werden können. Derartige Methoden können im übrigen auch die vertikale Konzentration unterstützen.

Prinzipiell wäre es möglich, die Wirkweite (theoretisch gesehen beliebig) zu vergrößern, indem ein aus vielen knapp benachbarten Einzelelektroden bestehendes Elektrodensystem eingesetzt wird, wie es bei dielektrophoretischen Wanderwellensystemen genutzt wird. Dabei fallen aber Mikroelektroden mit Abständen der Größenordnung der Zelldurchmesser an, d.h. von Mikrometern. Im Sinne eines wie hier angestrebten robusten Routineverfahrens mit großer Probenmenge wäre dies a priori inattraktiv - abgesehen von der Tatsache, daß ein mit so geringem Elektrodenabstand aufgebautes Feld auch in vertikaler Richtung nur einige μm wirksam wäre, während die effektive Raumhöhe h - Elektrodenebene bis Mikrofilter - im vorliegenden Fall typischerweise etwa 300 μm beträgt.

Bezüglich der Detektion ist erfindungsgemäß vorgesehen, einen Detektor im Nahbereich der Endkonzentration anzusetzen. Im Falle einer elektrischen Detektion ist ein Elektrodenpaar - oder zwei Elektrodenpaare gemäß der AT-Patentschrift Nr. 391.798 in jenem Bereich vorgesehen, in dem aufgrund maximaler Organismenkonzentration n maximale Konzentration auch von Stoffwechselprodukten auftritt. Als Alternative werden zur dielektrophoretischen Konzentration vorgesehene Elektroden für die Aufgabe der Detektion mitverwendet. Im Falle einer optischen Konzentration ist ein optischer Detektor - z.B. das Ende eines Lichtleiters - im Bereich maximaler Konzentration n vorgesehen. Die Lichtquelle kann im Sinne eines Reflexionsverfahrens ortsgleich ausfallen, im Sinne eines Durchlichtverfahrens kann sie z.B. von unten durch den Boden einer durchsichtigen Meßzelle erfolgen.

Die praktische Umsetzung des Verfahrens ist in Figur 1 anhand eines Beispiels einer entsprechenden Vorrichtung bei Einsatz der Impedanzmethode skizziert. Die aus Kunststoff gefertigte Meßzelle 1 besteht aus einem Zellrohr 2 und einem darin eingepreßten Zellboden 3. In der Zelle befindet sich eine Wasserprobe 4 mit schematisch - bereits konzentriert - angedeuteten Mikroorganismen 5. Die Zelle ist nur zu etwa zwei Drittel gefüllt, was die vertikale Aufsetzbarkeit des Sinkfilters 6 ohne Verkanten gewährleistet. Das - schon fast völlig abgesenkt skizzierte -

Sinkfilter besteht aus einem, dem Zellrohr 2 mit guter Passung, jedoch geringer Reibung entsprechenden, Filterrohr 7, einem Massenring 8 und einem Filterring 9, welcher das Mikrofilter 10 eben aufspannt. Letzteres weist für den vor allem anfallenden Einsatzbereich des Nachweises von koliformen Keimen eine Maschenweite von etwa 1 Mikrometer auf. Seine Absenkung bewirkt, daß die Organismen in den Zentralbereich der Deckfläche des Zellbodens 3 getrieben werden.

Wie Figur 2 im näheren Detail veranschaulicht, umfaßt das Elektrodensystem beim gezeigten Beispiel vier Einzelelektroden 11, 12, 13, 14 mit durch den Zellboden 3 geführten Kontaktdrähten bzw. -stiften. Ein Ziel der Vorrichtung ist es, bei Annäherung des Filters 10 an den Bodenbereich möglichst viele Organismen a priori in das Zentrum zu lenken, um sie dielektrophoretisch einzufangen und zu binden. Dies wird einerseits dadurch erzielt, daß der Filterring 9 gegenüber dem Außendurchmesser nur etwa halben Innendurchmesser aufweist, womit die mit dem Absinken verbundene Lokalströmung die Organismen in das Zentrum drängt. Darüber hinaus liegt die Ausgangsspannung des Hochfrequenzgenerators 15 an den beiden Ringelektroden 11 und 12, wobei 11 erhaben ausgeführt ist und damit die Höhe h des Bodenbereiches definiert. Mit einer Frequenz der Größenordnung von kHz erzeugen die beiden Elektroden ein elektrisches Feld im peripheren Bodenbereich, das hierhin driftende - bzw. auch im Sinne des Anwachsens der Kultur neu entstehende - Organismen im Sinne der negativen Dielektrophorese aus dem Bereich zumindest teilweise verdrängt. Unterstützt durch thermische Strömungen und auch durch Eigenbewegung geraten damit zunehmend viele Organismen in den Einflußbereich der über den Hochfrequenzgenerator 16 mit Spannung versorgten zentralen Elektroden 13 und 14. Der von ihnen erzeugten Feldstärke kommt eine Frequenz der Größenordnung 1 MHz zu. Damit kommt es zur positiven dielektrophoretischen Wirkung. Dies bedeutet, daß erfolgreich eingefangene Organismen in die Bereiche maximalen Feldgradientens gelenkt werden. Damit landen sie letztlich an der Oberfläche der beiden Elektroden 13 und 14, dem eigentlichen Zielgebiet des gesamten Konzentrationsverfahrens.

Mit dem weiter oben erwähnten Zellradius R von 5 mm getroffenen geometrischen Verhältnissen ergeben sich der Abstände der Elektroden 11 und 12 bzw. 13 und 14 zu annähernd 1 mm, was hinsichtlich der Wirkweite einen Maximalwert darstellt. Erfindungsgemäß ist vorgesehen, diese Abmessungen des Elektrodensystems auch dann nicht anzuheben, wenn Meßzellen von größerem R zum Einsatz kommen. In der Peripherie befindliche Organismen bleiben so zwar ungenutzt, bei festgehaltener Höhe h führt dies aber zu keiner Verlängerung der Detektionszeit T , da die Ausbeute der elektrischen Konzentration ja unverändert ausfällt. Vielmehr ergibt sich sogar eine Verringerung von T , wenn entsprechend der Erhöhung von R auch eine - naheliegende - Erhöhung der Flüssigkeitshöhe H erfolgt, da die vertikale Konzentration wirksamer ausfällt. So eignet sich das Verfahren auch zum - in der Norm vorgesehenen - Nachweis einzelner Keime in 100 ml umfassenden Proben von Trinkwasser. In diesem Fall ist allerdings vorzusehen, daß im Rahmen der Filterabsenkung kein Verlust an Organismen auftritt. Erfindungsgemäß wird dies durch Einsatz eines Mikrofilters 10 von nur 0,45 μm Maschenweite und optimaler Passung des Sinkfilters 6 erzielt, wobei die erschwerte Absenkung vorzugsweise manuell oder mechanisch unterstützt erfolgt.

Bei der abgebildeten Variante erfolgt die Erfassung der Impedanz Z mittels der auch zur Felderzeugung genutzten Elektroden 13 und 14. Genutzt werden Wechselwirkungen der entstehenden Metabolite mit den Elektrodenoberflächen - bzw. die durch sie bedingte lokale Veränderung der Medienleitfähigkeit, wobei sich eine Meßfrequenz der Größenordnung 1 kHz anbietet. Z wird durch das über eine HF-Sperre 17 angeschlossene Impedanzmeßgerät 18 und den daran liegenden Rechner 19 ermittelt. Über eine durch einen Kalibriervorgang ermittelte Kalibrierkurve wird T schließlich in bekannter Vorgangsweise in die gesuchte Anfangskonzentration n_A umgesetzt.

Statt dem Einsatz einer HF-Sperre 17 ist erfindungsgemäß als Variante vorgesehen, die beiden Elektroden 13 und 14 über Relais nur kurzzeitig an den Impedanzmesser 18 zu schalten, ohne

daß die lokale Bindung der Organismen in wesentlicher Weise verloren geht. Eine andere Variante besteht darin, zwischen den Elektroden 13 und 14 eine weitere Ringelektrode vorzusehen, die ausschließlich zur Detektion - gemeinsam mit der Zentralelektrode 14 - genutzt wird. Erfahrungsgemäß ist auch an einer derartigen zusätzlichen Elektrode eine positiv-dielektrophoretische Wirkung zu erwarten, was sich damit erklärt, daß der Ring als eine relativ starken Gesamtstromanteil aufnehmende, passive Strombrücke fungiert.

Figur 3 zeigt eine mögliche Variante für optische Detektion. Dabei ist die schon erwähnte Möglichkeit illustriert, die zur elektrischen Konzentration und zur Detektion benötigten Komponenten nicht am Zellboden 3 anzuordnen, sondern an der unteren Deckfläche des Filterringes 9, welcher im skizzierten Fall mit einer Bohrung sehr geringen Durchmessers versehen wird. In der Bohrung wird in abgedichteter Weise das Ende eines kabelartigen Verbundes 20 angeordnet, welcher entsprechend der Detailansicht in Figur 4 aus drei Komponenten besteht: (i) einem zentral angeordneten Lichtleiter 21, (ii) Stromleitern 22 zur Einspeisung des zur positiven Dielektrophorese benötigten Hochfrequenzstromes und optional (iii) elektrisch isolierende Fasern 23 zur Zugentlastung. Der Lichtleiter 21 endet vorzugsweise planar mit der unteren Deckfläche des Filterringes 9. Die Stromleiter 22 hingegen sind um etwa 300 µm verlängert ausgeführt und ragen somit in den Bodenbereich hinein bis hin zum Zellboden. Erfindungsgemäß sind die Enden V-förmig mit einem Öffnungswinkel der Größenordnung 30 Grad nach außen gebogen. Somit ergibt sich ein vertikal nach oben gerichteter Gradient der elektrischen Feldstärke E . Damit wird erreicht, daß im Bodenbereich befindliche Organismen dielektrophoretisch an die als Detektor fungierende Endfläche des Lichtleiters 21 getrieben werden. Im skizzierten Fall ist eine durchsichtige Meßzelle 1 vorgesehen, welche von einer unter der Meßzelle angeordneten Lichtquelle 24 bestrahlt wird. Letztere kann dabei für eine größere Anzahl von Zellen Verwendung finden. Die Konzentration von Organismen an der Endfläche des Lichtleiters 21 führt zu erhöhter Absorption A und somit zur Verringerung der detektierten Lichtintensität, wobei auch Fluoreszenz- oder Lumineszenzmethoden genutzt werden können. Letztlich wird über die Lichtleiterelektronik 25 ein Detektionssignal s abgeleitet, welches vom Rechner 19 weiterverarbeitet wird.

Gegenüber der klassischen Trübungsmethode ergibt das hier beschriebene Verfahren wesentlich verkürzte Detektionszeit T , wozu drei Mechanismen beitragen: (1) die Konzentration durch das Sinkfilter, (2) die dielektrophoretische Konzentration und (3) der Umstand, daß das Detektionssignal s nicht aus einer Streuung an Organismen resultiert sondern aus einer "Abdeckung" der Lichtleiterendfläche durch hier stark konzentrierte Organismen. Während die Trübungsmethode eine a priori klare Probenflüssigkeit voraussetzt, bleibt die Wirksamkeit des vorliegenden Verfahrens auch bei eingeschränkt trüben Proben aufrecht.

Bei der praktischen Umsetzung des Verfahrens wird im allgemeinen eine größere Anzahl von gleichzeitig untersuchten Meßzellen anfallen. In bekannter Weise werden sie z.B. in einem Thermoschrank, einem Wasserbad oder einem Thermoblock untergebracht. Zur Verwaltung wird - wie bei bekannten ähnlichen Verfahren - ein Multiplexersystem, z.B. unter Einsatz von Relais, vorgesehen. Insbesondere bei elektrischer Detektion kann aber auch ein mechanisch bewegtes Förderbandsystem zum Einsatz kommen, wie es in der AT-Patentschrift Nr. 409.190 beschrieben ist.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur raschen Detektion von Mikroorganismen in einer bebrüteten Meßzelle wäßriger Probenflüssigkeit *dadurch gekennzeichnet*, daß die Organismen 5 in einem ersten Verfahrensschritt durch ein Sinkmikrofilter 6 vertikal hin zum Zellenboden 3 konzentriert werden, in einem zweiten durch Konzentrierelektroden 11-14 unter Einsatz der Dielektrophorese in den Nahbereich eines Miniaturdetektors gelenkt werden und in einem dritten Schritt mittels des letzteren detektiert werden.

2. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 *dadurch gekennzeichnet*, daß das Sinkfilter einen Ring 9 aufweist, dessen Bodenfläche ein Mikrofilter 10 aufspannt, das eventuell vorhandene Organismen zum Zellboden treibt.
- 5 3. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 *dadurch gekennzeichnet*, daß der ebene Zellboden oder ein Teilbereich der Ringbodenfläche mit den Konzentrier-elektroden ausgestattet ist, die positiv- oder negativ-dielektrophoretische Gradientenfelder aufbauen und so beeinflussen, daß sie in den Nahbereich des Miniaturdetektors getrieben werden.
- 10 4. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 *dadurch gekennzeichnet*, daß im Bodenbereich durch aktive Geber Flüssigkeitsströmungen erzeugt werden, um die Wirkweite der Dielektrophorese zu erhöhen.
- 15 5. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 *dadurch gekennzeichnet*, daß als Miniaturdetektor zwei Elektroden 13,14 eingesetzt sind, zwischen denen die elekt-rische Impedanz erfaßt wird oder daß ein optischer Detektor eingesetzt ist und die lokale Lichtabsorption erfaßt wird.

20

Hiezu 3 Blatt Zeichnungen

25

30

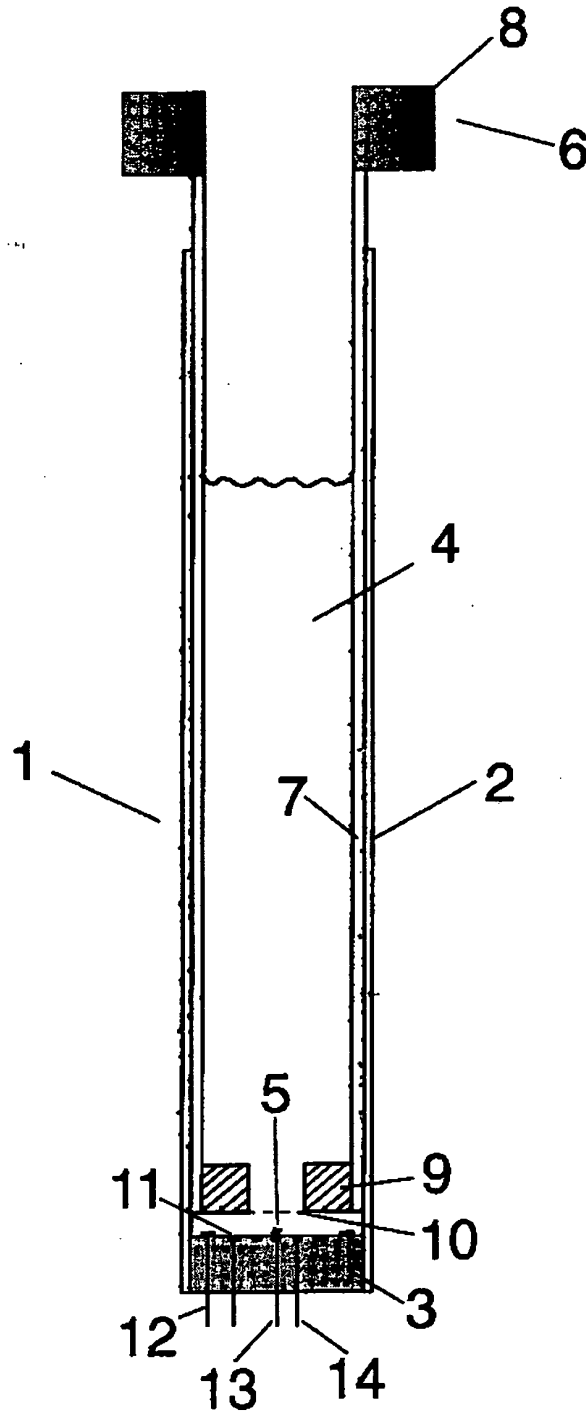
35

40

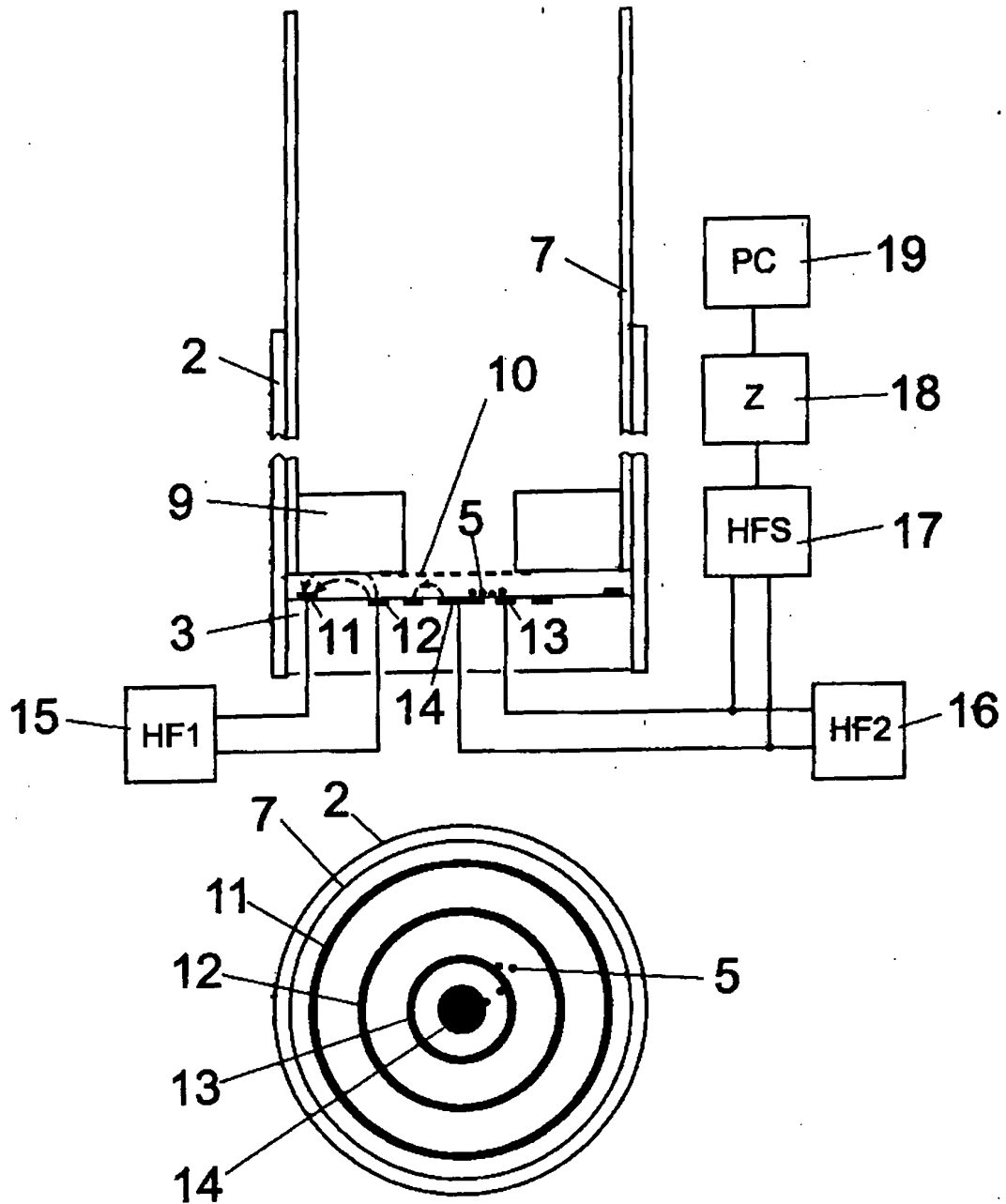
45

50

55



Figur 1



Figur 2

