



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑪ CH 661 285 A5

⑤① Int. Cl.⁴: C 12 Q 1/04
G 01 N 33/02

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑳ Gesuchsnummer:	3918/82	㉚ Inhaber:	VEB Pharmaglaswerk Neuhaus, Neuhaus am Rennweg (DD)
㉑ Anmeldungsdatum:	25.06.1982	㉛ Erfinder:	Schade, Werner, Dr., Berlin (DD) Laube, Klaus, Berlin (DD) Schambach, Martin, Neuhaus am Rennweg (DD) Jährg, Annelore, Dr., Berlin (DD) Kunz, Artur, Burkhardswalde (DD) Strobel, Brigitte, Dresden (DD)
㉓ Priorität(en):	16.07.1981 DD 231829	㉜ Vertreter:	Dr. Troesch AG Patentanwaltsbüro, Zürich
㉕ Patent erteilt:	15.07.1987		
㉗ Patentschrift veröffentlicht:	15.07.1987		

⑤④ **Verfahren und Vorrichtung zum Nachweis von Kontaminanten.**

⑤⑦ Zum Nachweis von Kontaminanten in der Lebensmittelindustrie werden keimhaltige Flüssigkeiten mittels eines sterilen Gerätes der Lebensmittelprobe entnommen, in einen Behälter mit geeigneten festen und/oder flüssigen Nährmedien eingebracht und die entsprechenden Bakterienkulturen untersucht. In einem kombinierten Probenahme-Kultivierungsgerät erfolgt nach dem Mischen der keimhaltigen Flüssigkeit mit einer ausgewählten Menge an Nährmedium die Kultivierung der Nährmedium-Keimsuspension über einen nach unten offenen Auslaufstutzen des Probenahme-Kultivierungsgerätes. Während der Kultivierung fließen bei Gasbildung durch die Untersuchungsorganismen äquivalente messbare Mengen an Nährmedium-Keimsuspension aus. In Verbindung mit Trübungs- und Farbänderungen des indikatorhaltigen Nährmediums können gleichzeitig in Analogwerten quantitative Aussagen zum Keimgehalt, zur Gasbildung, zur Gäraktivität und zur Säurebildung der Kontaminationsorganismen getroffen werden.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Nachweis von Kontaminanten in der Lebensmittelindustrie, bei dem keimhaltige Flüssigkeiten mittels eines sterilen Gerätes der Lebensmittelprobe entnommen und in einen Behälter mit geeigneten festen und/oder flüssigen Nährmedien eingebracht und die entsprechenden Bakterienkulturen untersucht werden, dadurch gekennzeichnet, dass in einem kombinierten Probenahme-Kultivierungsgerät nach dem Mischen der keimhaltigen Flüssigkeit mit einer ausgewählten Menge an Nährmedium die Kultivierung der Nährmedium-Keimsuspension über einen 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 Anspruch 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 zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, 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 bei der zu untersuchenden Flüssigkeit und als Auslaufstutzen für die bei der Gasbildung verdrängte Nährmedium-Keimsuspension ausgebildet ist und über einen sterilen Stopfen (13) in einem graduieren 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 Nährmittel (6) versehen ist.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Kontaminanten in der Lebensmittelindustrie, bei dem keimhaltige Flüssigkeiten mittels eines sterilen Gerätes der Lebensmittelprobe entnommen und in einen Behälter mit geeigneten festen und/oder flüssigen Nährmedien eingebracht und die entsprechenden Bakterienkulturen untersucht werden, sowie eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens, bestehend aus einem kombinierten Probenahme- und Kultivierungsgerät mit Kultivierungsgefäss, abbrechbarer Glasspitze, Kanüle und Abbrechring sowie flüssigem und festem Nährmedium.

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

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 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 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 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.

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 Kochsche Plattenverfahren.

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 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) 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 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 den Patentschriften OS 35 36061 und DE-OS 2 835 101 besteht die Möglichkeit, an Kanülensysteme, die in die Vene der Patienten gestochen wurden, vor-evakuierte Proberöhrchen anzuschliessen, die entweder als Behälter zum Probetransport dienen oder die als Gefässe für biochemische Reaktionen bzw. Kultivierungsgefässe genutzt werden können. Nach DE-OS 2 411 651 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 3 012 056 erlaubt die gleichzeitige Kultivierung auf festen und flüssigen Nährmedien, wobei das Blut über ein Entnahmesystem men-

gendosiert 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.

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

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 Kontaminationsgrades und wesentlicher Eigenschaften der Kontaminanten auch bei Einsatz als Einweggefäße möglich ist.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zum Nachweis von Kontaminanten in der Lebensmittelindustrie zu entwickeln, bei dem keimhaltige Flüssigkeiten mittels eines sterilen Gerätes der Lebensmittelprobe entnommen und in einem Behälter mit geeigneten festen und/oder flüssigen Nährmedien eingebracht und die entsprechenden Bakterienkulturen untersucht werden, sowie eine Vorrichtung 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.

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 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.

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 kontaminierten Mikroorganismen wird 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 in einem kombinierten Probenahme-Kultivierungsgerät nach dem Mischen der keimhaltigen Flüssigkeit mit einer ausgewählten Menge an Nährmedium die Kultivierung der Nährmedium-Keimsuspension über einen 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.

Damit ist auch eine Prüfung der Gäraktivität der eingesetzten Produktionshefe mittels des Verfahrens möglich.

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

Die erfindungsgemäße Vorrichtung ist dadurch gekennzeichnet, dass die Kanüle gleichzeitig als Ansaugstutzen für die bei der zu untersuchenden Flüssigkeit und als Auslaufstutzen für die bei der Gasbildung verdrängte Nährmedium-Keimsuspension ausgebildet ist und über einen sterilen Stopfen in einem graduieren Messgefäß stehend gehalten ist.

Das Gefäß für ein oder mehrere feste Nährmedien ist ausserhalb des Kultivierungsgefäßes für das flüssige Nährmedium ein Glasgefäß für ein oder mehrere feste Nährmedien, vorzugsweise als abgeteiltes Gefäß neben dem vakuum- oder gasgefüllten Raum angeordnet und mit einer Halterung für das feste Nährmedium versehen.

Die Vorteile des erfindungsgemässen Verfahrens und der Vorrichtung bestehen darin, dass es die Erfindung ermöglicht, einen gleichzeitigen 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 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.

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. Ein weiterer Vorteil dieses Gerätes ist, dass gegenüber herkömmlichen Verfahren und Methoden kaum eine Kontamination des Probenmaterials auftreten 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 an Anwendungsbeispielen dargestellt und erläutert werden. Es zeigen:

Fig. 1 ein Schaubild über die Gasbildung der Keime nach Tagen in einem Erfrischungsgetränk, wobei keine Trübung und keine Säurebildung auftreten.

Fig. 2 ein Schaubild über die Gasbildung der Keime nach Tagen in einem Limonadengrundstoff und eine andere Keimart, wobei keine Trübung und keine Säurebildung auftreten.

Fig. 3 die erfindungsgemäße Vorrichtung für verschiedene Anwendungsmöglichkeiten: a) offenes Gefässsystem mit Kolben für flüssiges Nährmedium, b) offenes Gefässsystem mit Kolben für flüssiges und festes 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 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-Natronlauge zugefügt, bis die Farbe des Indikators umgeschlagen ist, da die vorhandene Säure weitgehend neutralisiert worden ist.

Der Ansaugstutzen des Entnahme- und Kultivierungsgesäßes wird in die zu untersuchende Probe getaucht und die Verbindung zum Nährmediumbehälter hergestellt, der in ihm befindliche Unterdruck bewirkt ein Einströmen 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 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 Fig. 3 dargestellte Form 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 der Farbton des Indikators kontrolliert. Ein Untersuchungsergebnis zeigt Fig. 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.

Die unterschiedlichen Keimarten nach Fig. 1 und Fig. 2 entwickeln unterschiedliche Gasmengen und besitzen unterschiedliche Trübung und Säurebildung.

Fig. 1 stellt eine Keimart mit wenig Gasbildung (nach 4 Tagen 5 ml) und einer späteinsetzenden Trübung dar. Fig. 2 stellt eine Keimart mit wenig Trübung, aber starker Gasbildung (nach 2 Tagen 15 ml) und Säurebildung, dar. Die gasbildende Keimmenge im System ist ein Massstab für die aus dem System ausgelaufene bzw. ausgetriebene Menge der zu untersuchenden Flüssigkeit.

Ein Untersuchungsergebnis zeigt Fig. 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 Glaspitze 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 Messgerät 4 stehend gehalten.

Im Kultivierungsgefäß 1 befindet sich flüssiges Nährmedium 5, während ausserhalb dieses Gefässes 1 ein Glasgefäß 10 für ein oder mehrere feste 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 Probenahme aus dem Glasgefäß 10, indem dieses am Abbrechring 8 geöffnet wird.

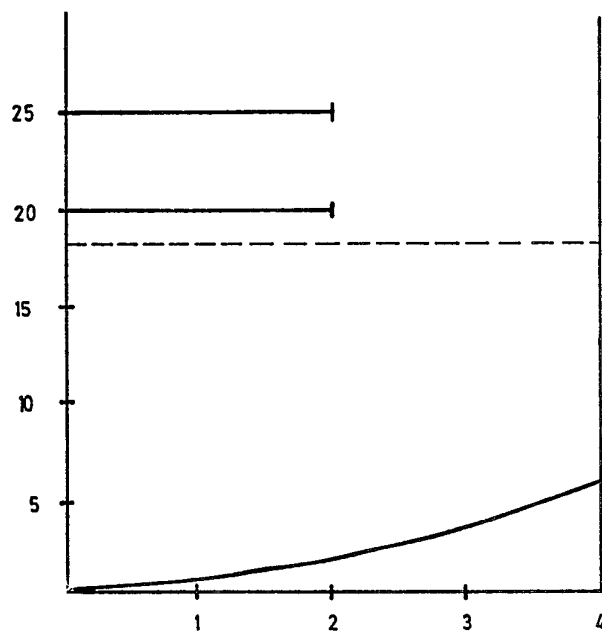


FIG. 1

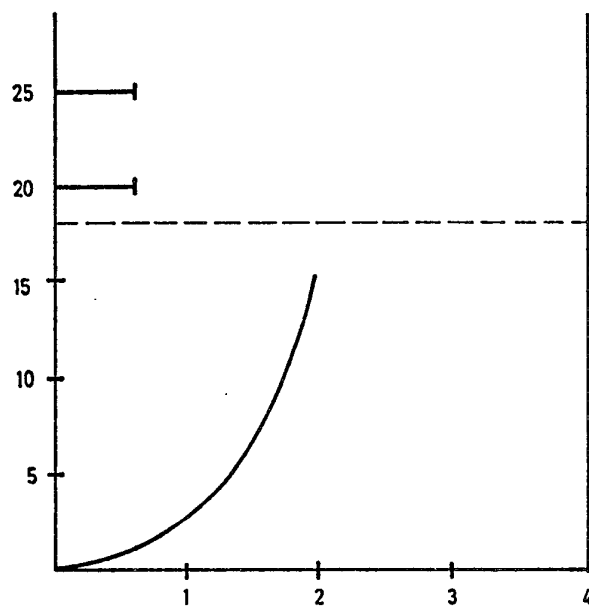


FIG. 2

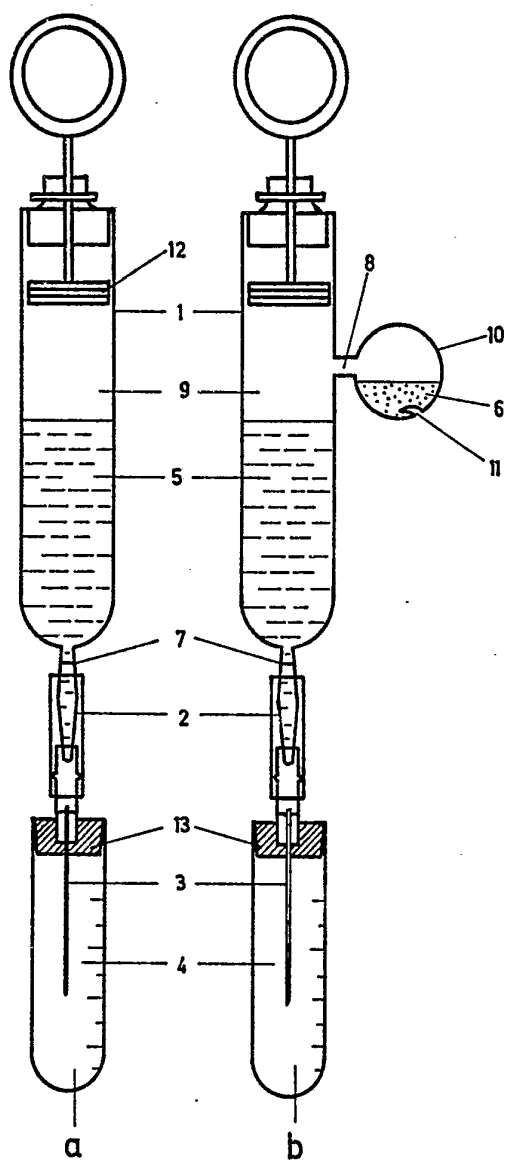


FIG. 3

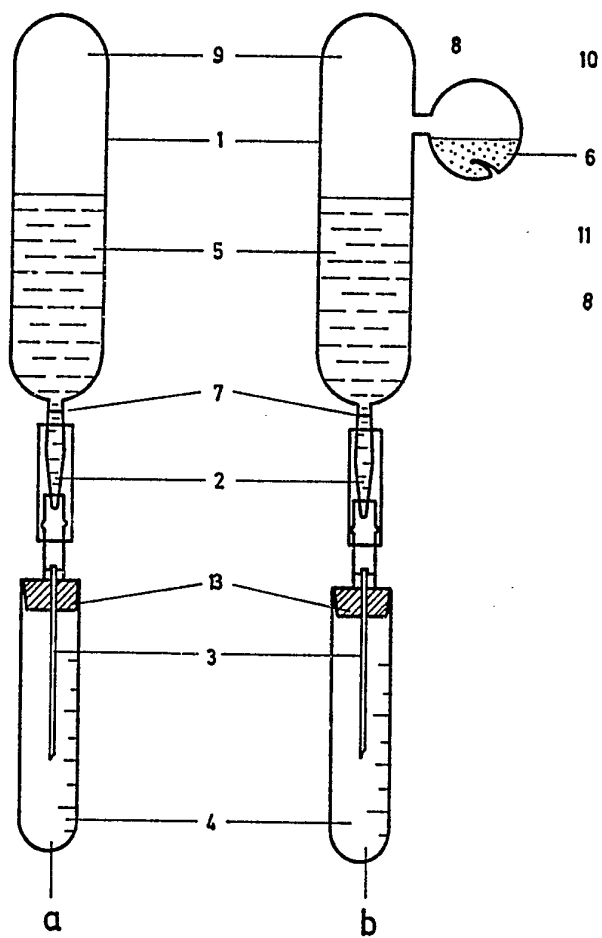


FIG. 4