



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤① Int. Cl.³: C 12 M 1/04
B 65 D 81/32



Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑪

632 528

⑳① Gesuchsnummer: 16176/77

⑳② Anmeldungsdatum: 29.12.1977

⑳③ Priorität(en): 11.01.1977 GB 00967/77

⑳④ Patent erteilt: 15.10.1982

④⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 15.10.1982

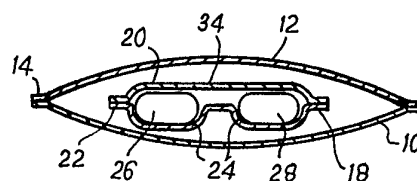
⑦③ Inhaber:
Oxoid Limited, Basingstoke/Hants (GB)

⑦② Erfinder:
Derwent Swaine, Basingstoke/Hants (GB)
Henry Keith Spong, Basingstoke/Hants (GB)
Brian Michael Lewin, Basingstoke/Hants (GB)

⑦④ Vertreter:
Dietlin, Mohnhaupt & Cie, Genève

⑤④ Vorrichtung zur Erzeugung einer nicht-toxischen Atmosphäre für die Züchtung anaerober Mikroorganismen.

⑤⑦ Die Vorrichtung weist eine geschlossene Hülle (10) aus inertem Werkstoff auf, die an einer Stelle (32) zwecks Zutritt von Flüssigkeit ins Innere der Hülle durchschnitten werden kann. Im Inneren der Hülle (10) befindet sich ein geschlossener Beutel (18 - 24), der zum Teil (20) aus einer gas- und flüssigkeitsdurchlässigen Membran besteht. Im Beutel sind in der Nähe der Membran (20) Stoffe (26, 28) angeordnet, die mit einer Flüssigkeit reagierend die gewünschte Atmosphäre erzeugen. Durch die Wahl der Fläche und Durchlässigkeit der Membran (20) kann die Bildungsgeschwindigkeit der Atmosphäre festgelegt werden.



PATENTANSPRÜCHE

1. Vorrichtung zur Erzeugung einer nichttoxischen Atmosphäre für die Züchtung anaerober Mikroorganismen, gekennzeichnet durch eine geschlossene Hülle (10) aus inertem Werkstoff, die zwecks Zutritt von Flüssigkeit ins Innere an einer Stelle durch örtliche Zerstörung geöffnet werden kann; durch einen verschlossenen Beutel (18) im Inneren der Hülle, wobei ein Teil des Beutels aus einer gas- und flüssigkeitsdurchlässigen Membran (20) besteht; und durch Substanzen (26, 28, 30) im Inneren des Beutels (18) und in der Nähe der Membran, die mit einer Flüssigkeit unter Erzeugung der genannten Atmosphäre reagieren können, wobei die Fläche und Durchlässigkeit der Membran so gewählt sind, dass eine Regelung der Geschwindigkeit des Flüssigkeitszutritts und damit der Bildungsgeschwindigkeit der Atmosphäre erzielt wird.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Beutel (18) in Form einer separaten flachen Packung im Innern der Hülle angeordnet ist, deren eine Hauptfläche aus flüssigkeitsdichtem Werkstoff und deren andere Hauptfläche (20) aus der Membran besteht.

3. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Membran einen Luftdurchsatz von 3,05 bis 30,5 Liter Luft pro cm² und Minute ermöglicht.

4. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Membran einen Luftdurchsatz von 9,15 bis 18,3 Liter Luft pro cm² und Minute ermöglicht.

5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die gaserzeugenden Substanzen solche sind, die Wasserstoff und Kohlendioxid entwickeln.

6. Vorrichtung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die wasserstoffentwickelnde Substanz Natriumborhydrid und die kohlendioxidentwickelnden Substanzen Natriumbicarbonat zusammen mit einer festen organischen Carbonsäure sind, wobei die Substanzen in solchen Mengenverhältnissen vorliegen, dass bei der Umsetzung mit Wasser eine saure Lösung entsteht.

7. Vorrichtung nach Anspruch 6, zur Verwendung in einem Dreiliterbehälter, dadurch gekennzeichnet, dass 0,015 bis 0,075 Mol Natriumborhydrid sowie 0,01 bis 0,05 Mol Natriumbicarbonat und 0,01 bis 0,05 Mol wasserfreie Weinsäure vorliegen.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf eine gaserzeugende Vorrichtung, die eine nichttoxische Atmosphäre für die Züchtung von Mikroorganismen entwickelt, d.h. eine Vorrichtung, die zur Anaerobiose unter steuerbaren Bedingungen ein vorher festgelegtes Volumen von Gasen entwickeln kann.

Das Wachstum vieler Mikroorganismen wird behindert, wenn sie atmosphärischen Bedingungen ausgesetzt werden. Daher muss für das Wachstum der Mikroorganismen eine besondere Apparatur verwendet werden, in die ein nichttoxisches Gas eingeleitet werden muss, damit das Wachstum der Mikroorganismen aufrechterhalten wird. Beispielsweise benötigen Mikroorganismen aus der Klasse der Gonokokken, Meningokokken und Brucella zum guten Wachstum beträchtlich höhere Konzentrationen an Kohlendioxid, als in der normalen Luft enthalten ist. Andere Mikroorganismen, nämlich anaerobe Organismen wie die Bazillen des Wundstarrkrampfes, des Gasbrandes, der Fleischvergiftung sowie die Bakterioide benötigen zum Wachstum die Abwesenheit von Sauerstoff. In der Kulturapparatur muss man daher nichttoxische Atmosphären schaffen, um das Wachstum der gewünschten Mikroorganismen aufrechtzuerhalten.

In der US-PS 3 246 959 wird eine Vorrichtung zur Erzeugung einer nichttoxischen Atmosphäre zur Verwendung bei der Züchtung anaerober Mikroorganismen beschrieben, und diese Vorrichtung weist eine Hülle aus inertem Werkstoff mit einer ersten, flüssigkeitsaufnehmenden Kammer und einer zweiten, gaserzeugenden Kammer auf, die Material zur Erzeugung der gewünschten gasförmigen Atmosphäre enthält, wenn es mit einer Flüssigkeit gemischt wird, wobei ein Docht zwischen den beiden Kammern vorgesehen ist, durch welchen Flüssigkeit langsam aus der ersten Kammer in die zweite Kammer treten kann, sowie ein Kanal, durch welchen das erzeugte Gas aus der zweiten Kammer in die erste Kammer und dann in die Atmosphäre gelangt. Diese Vorrichtung wird in Tätigkeit gesetzt, indem man die erste Kammer aufbricht und ein bestimmtes Volumen einer Flüssigkeit, im allgemeinen Wasser, einbringt.

Derartige Vorrichtungen sind seit einigen Jahren in Großbritannien handelsüblich. Verwendet man die Vorrichtung zur Erzeugung einer Atmosphäre aus Wasserstoff und Kohlendioxid, so enthält die zweite Kammer eine Tablette aus Natriumborhydrid und eine Tablette aus Bicarbonat und Säure. Die Mengen an Borhydrid und Bicarbonat sind so gewählt, dass ausreichende Mengen an Wasserstoff entstehen, die mit etwa vorhandenem Sauerstoff reagieren können und weiterhin eine reduzierende Atmosphäre im anaeroben Behälter schaffen, und zusätzlich mit mindestens 4 Vol.-% an Kohlendioxid. Diese bekannte Vorrichtung hat jedoch zwei wesentliche Nachteile.

Kohlendioxid ist für viele anaerobe Organismen wesentlich oder günstig, und es besteht die Meinung, dass eine Konzentration von 8 bis 10% in der Atmosphäre günstig ist. Kürzlich wurde jedoch gezeigt (J. appl. Bact., 1975, 39, 167-173), dass die von der handelsüblichen Vorrichtung erzeugte tatsächliche Kohlendioxidmenge veränderlich ist und viel weniger als 4 Vol.-% liefert. Dies kommt augenscheinlich daher, dass das Wasser mit dem Natriumborhydrid unter Erzeugung von Wasserstoff und einer Natriumhydroxidlösung reagiert. Durch diese alkalische Lösung wird die Bicarbonat-tablette nicht leicht angegriffen; beim Angriff löst sich eine grosse Menge des erzeugten Kohlendioxids auf und trägt zur gewünschten Atmosphäre nichts bei.

Der zweite Nachteil der bestehenden Vorrichtung liegt darin, dass die Wasserdurchlässigkeit des Dochtes der einzige Faktor ist, der die Geschwindigkeit des Wassereintritts in die zweite Kammer regelt.

Es wurde nun nach Lösungen gesucht, den erstgenannten Nachteil auszuschalten, indem man die Reaktion derart ablaufen lässt, dass das pH der entstehenden Lösung sauer ist und vorzugsweise unterhalb 5,0 liegt. Die Reaktion von Wasser mit Natriumborhydrid ist jedoch bedeutend heftiger unter sauren als unter alkalischen Bedingungen, so dass es bei sauren Bedingungen erforderlich und nicht nur erwünscht ist, die Zutrittsgeschwindigkeit des Wassers in die zweite Kammer genau steuern zu können.

Die vorliegende Erfindung schafft nun eine Vorrichtung zur Erzeugung einer nichttoxischen Atmosphäre zur Anwendung bei der Züchtung anaerober Mikroorganismen, und diese Vorrichtung ist gekennzeichnet durch eine geschlossene Hülle aus inertem Werkstoff, die zwecks Zutritt von Flüssigkeit ins Innere an einer Stelle durch örtliche Zerstörung geöffnet werden kann; durch einen verschlossenen Beutel im Inneren der Hülle, wobei ein Teil des Beutels aus einer gas- und flüssigkeitsdurchlässigen Membran besteht; und durch Substanzen im Inneren des Beutels und in der Nähe der Membran, die mit einer Flüssigkeit unter Erzeugung der genannten gasförmigen Atmosphäre reagieren können, wobei die Fläche und Durchlässigkeit der Membran so gewählt sind, dass eine Regelung der Geschwindigkeit des

Flüssigkeitszutritts und damit der Bildungsgeschwindigkeit der Atmosphäre erzielt wird.

Diese Vorrichtung ist zur Erzeugung einer Atmosphäre aus Wasserstoff und Kohlendioxid besonders gut geeignet, kann jedoch auch grundsätzlich zur Erzeugung anderer Atmosphären verwendet werden, beispielsweise Wasserstoff oder Kohlendioxid oder Stickstoff oder Acetylen. Zur Erzeugung einer Atmosphäre aus Wasserstoff und Kohlendioxid bestehen die Substanzen im Beutel vorzugsweise aus Natriumborhydrid sowie einem Bicarbonat und einer festen organischen Carbonsäure in solchen Mengenverhältnissen, dass bei der Reaktion mit Wasser eine saure Lösung entsteht. Die Chemikalien zur Erzeugung anaerober Atmosphären sind bekannt und sollen nicht näher beschrieben werden.

Die Hülle kann aus einem biegsamen Kunststoff oder einem Laminat aus Aluminium mit einem Kunststoff bestehen.

Vorzugsweise hat der Beutel die Form einer getrennten, flachen Packung, deren eine Hauptfläche aus flüssigkeitsdichtem Material und die andere Hauptfläche aus der Infusionsmembran besteht. Das flüssigkeitsdichte Material ist zweckmässig eine Blase aus Kunststoff, die so geformt ist, dass sie eine oder mehrere Tabletten aus gaserzeugenden Substanzen aufnehmen kann.

Die erfindungsgemässe Vorrichtung unterscheidet sich von der bekannten Vorrichtung gemäss US-PS 3 246 959 durch das wichtige Merkmal, dass die Membran sowohl den Zutritt für Flüssigkeit in den Beutel als auch das Ausströmen von Gas aus dem Beutel ermöglicht. Dadurch erhält man eine automatische Steuerung der Gaserzeugungsgeschwindigkeit, wie weiter unten näher beschrieben wird.

Die Membran sollte aus einem Werkstoff bestehen, der gegenüber den verwendeten Chemikalien inert ist und ausreichende Festigkeit aufweist, dass er bei der Gaserzeugung nicht reisst. Papier kann verwendet werden, wenn es genügend fest ist. Auch sind gewebte oder nicht gewebte Textilgebilde geeignet. Besonders vorteilhaft sind solche Membranen, wie sie gewöhnlich für Teebeutel Verwendung finden.

Solche Membranen sind in einem weiten Bereich von Durchflussgeschwindigkeiten für Gase und Flüssigkeiten handelsüblich, beispielsweise von der Firma James R. Crompton & Bros. Ltd., Elton Papers Mills, Bury, Lancaster. Membranen, die zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung besonders geeignet sind, sind solche, die eine Durchflussgeschwindigkeit zwischen 3,05 und 30,5 Liter Luft pro cm² und Minute (100–1000 cu.ft./sq.ft. × min) ermöglichen. Vorzugsweise werden solche Membranen verwendet, deren Luftdurchsatz 9,15–18,3 Liter pro cm² und Minute (300 bis 600 cu.ft./sq.ft. × min) beträgt, insbesondere etwa 12,2 Liter/cm² × min (400 cu.ft./sq.ft. × min). Wenn die Membranfläche verkleinert werden muss, ist es im allgemeinen erforderlich, die Membran dünner zu machen und umgekehrt. Während die Dicke der Membran offensichtlich einen Einfluss ausübt, wurde weiterhin gefunden, dass die Geschwindigkeit des Flüssigkeitseintritts in den Beutel weiterhin in beträchtlichem Masse durch den Aufbau des darin erzeugten Gasdruckes beeinflusst wird. Demgemäss tritt zunächst eine erste Menge an Flüssigkeit durch die Membran in den Beutel und reagiert mit den darin befindlichen Substanzen unter Erzeugung eines Gases, welches einen Druck aufbaut, wodurch der Zufluss weiterer Flüssigkeit in den Beutel verzögert wird, bis das Gas aus dem Beutel entwichen ist. Aus diesen Gründen ist es bevorzugt, dass die Fläche der Membran, die einen Zutritt zum Inneren des Beutels ermöglicht, begrenzt wird, und die restliche Fläche des Beutels sollte aus einem flüssigkeits- und gasdichten Material bestehen. Das oben geschilderte Prinzip des beobachteten Ventileffektes,

der oben beschrieben wurde, ist jedoch auch dann ausreichend definiert, wenn die Tabletten in einem Beutel gebracht werden, der vollständig aus der Membran besteht. In manchen Fällen kann es nämlich durchaus vorteilhaft sein, wenn man die Beutelhülle vollständig aus der Membran bildet.

Anaerobe Behälter mit einem Nenninhalt von 3 Litern sind handelsüblich und mit einem Palladiumkatalysator versehen, der die Entfernung von Sauerstoff aus der Atmosphäre durch Reaktion mit Wasserstoff ermöglicht. Geeignete Chemikalien zur Erzeugung einer Atmosphäre aus Wasserstoff und Kohlendioxid in einem solchen Behälter sind beispielsweise 0,015 bis 0,075 Mole Natriumborhydrid oder einer äquivalenten Menge eines anderen Wasserstoff erzeugenden Materials; 0,01 bis 0,05 Mol Natriumbicarbonat oder eine äquivalente Menge eines anderen Kohlendioxid erzeugenden Materials; sowie 0,01 bis 0,05 Mol wasserfreier Weinsäure oder eine äquivalente Menge einer anderen festen organischen Carbonsäure. Es wurde gefunden, dass diese Substanzen zweckmässig in Form von Tabletten vorliegen sollten, wovon die eine das Borhydrid und das Bicarbonat und eine oder zwei andere die organische Säure enthalten. Es ist natürlich auch möglich, das Bicarbonat mit der Säure zu mischen.

Eine praktische Ausführungsform der erfindungsgemässen Vorrichtung soll nun als Beispiel unter Bezugnahme auf die Zeichnung erläutert werden, worin zeigen:

Fig. 1 eine Draufsicht auf die Vorrichtung, wobei die Vorderseite der Hülle entfernt ist, um das Innere sichtbar zu machen; und

Fig. 2 einen Querschnitt entlang der Linie A–A in Fig. 1.

Die Hülle besteht aus zwei Folien 10, 12 aus einem Laminat aus Aluminiumfolie und Polyäthylen, die an den vier Rändern bei 14 miteinander heissversiegelt sind. Die Heissiegegnien erstrecken sich nach innen von der Mitte der langen Seiten der Hülle bei 16, damit ein Beutel in der unteren Hälfte der Hülle festgehalten wird. Dieser Beutel besteht aus einer Blase 18 aus gas- und flüssigkeitsdichtem PVC und einer Membran 20, die damit an den vier Rändern 22 versiegelt ist. In die Blase 18 sind drei kreisförmige Mulden 24 eingepresst, die drei Tabletten 26, 28 und 30 aufnehmen, wobei diese Tabletten durch die Membran 20 in ihrer Lage festgehalten werden.

Die Tabletten 26, 28 und 30 bilden die gaserzeugenden Substanzen und sind folgendermassen zusammengesetzt:

Tablette 26	
Natriumborhydrid	0,9 g
Natriumbicarbonat	1,2 g
Polyäthylenglycol 6000	0,1 g
Talk	0,1 g

Tabletten 28 und 30	
Weinsäure	2,0 g
Sprengmittel (Weinsäure/Natriumbicarbonat)	0,1 g
Magnesiumstearat	0,1 g

Die beiden Tabletten 28 und 30 haben die gleiche Zusammensetzung.

Zum Gebrauch wird die Ecke der Hülle bei 32 abgeschnitten und die Hülle in einen drei Liter fassenden anaeroben Behälter gebracht. Man pipettiert nun 20 ml Wasser in den Schlitz 32 und schliesst den Behälter schnell. Das Wasser fliesst in der Hülle nach unten und durch die Membran 20 zu den Tabletten 26, 28 und 30, mit denen das Wasser reagiert, und das Eindringen in den Beutel findet mit einer geregelten, langsamen Geschwindigkeit statt, so dass sich

langsam Wasserstoff und Kohlendioxid entwickeln. Die Hülle bleibt im Behälter während der ganzen Dauer des Versuchs. Wenn der Behälter einen Nutzinhalt von mehr als 3 Litern aufweist, kann man zwei oder mehrere Hüllen benutzen.

Es ist selbstverständlich möglich, zahlreiche Veränderungen bei dieser Ausführungsform vorzunehmen. Beispielsweise kann die Gasentwicklung besser geregelt werden, wenn man die Membran 20 mit der Blase 18 zwischen und um die Tabletten herum versiegelt, beispielsweise bei 34 (siehe

Fig. 2). Die gasentwickelnden Substanzen können auch in anderer Form vorliegen, beispielsweise als zwei oder vier oder noch mehr Tabletten, die in einer Reihe oder in einem Quadrat oder noch anders angeordnet sein können. Das gasentwickelnde Material kann auch in Form von Körnchen oder Pulver vorliegen. Ein Vorteil des Merkmals, dass sämtliche gaserzeugende Substanzen in der Nähe der Membran angeordnet sind, besteht darin, dass sie alle mit dem zufließenden Wasser mit einer vorhersehbaren und regelbaren Geschwindigkeit reagieren.

FIG. 1

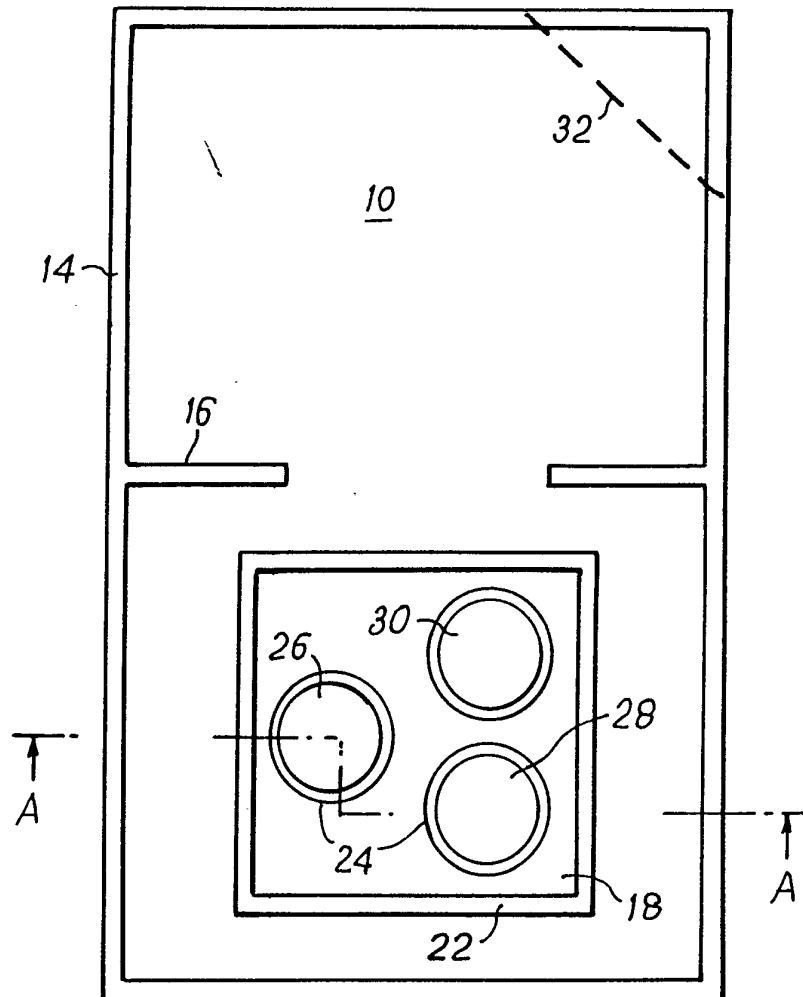


FIG. 2

