

Protokoll über die Verwendung von Nalgene Analytischen Filtertrichtern und Zellulosenitratmembranen zur Erfassung von Mikroorganismen bei Umwelt- und/oder Qualitätsprüfungen

Schlüsselwörter: Analytische Filter, Wasserqualität, Umweltprüfung, Filtertrichter, Zellulosenitratmembran, Oxoid™ Kulturmedien, Remel™ Kulturmedien, Protokoll, ISO 7704-1985, mikrobielle Erfassung

Kurzfassung

Analytische Filter und Filtertrichter werden routinemäßig zur Bestimmung der Keimzahl bei der Prüfung der Wasserqualität sowie zur Prüfung von flüssigen Produkten in der Lebensmittel- und Getränkeindustrie verwendet.

Thermo Scientific™ Nalgene™ Analytische Filtertrichter und Nalgene Zellulosenitrat-Membranfilter bieten hier in Verbindung mit Thermo Fisher™ Oxoid™ und Remel™ Kulturmedien eine vollständige und effiziente Lösung. Die sterilen, vormontierten analytischen Filtertrichter eliminieren zeitaufwändige Schritte der Sterilisation von wiederverwendbaren Trichtern und der Montage von Filtermembranen.

Die Funktionalität der Thermo Scientific Nalgene Analytischen Filter und Filtertrichter wurde anhand der mikrobiologischen Wiederfindung, wie in ISO 7704-1985 beschrieben, bewertet. Zusätzlich umfasst diese Studie die Prüfung der Flussraten der am häufigsten verwendeten Flüssigkeiten. Ein Protokoll, das den Richtlinien der ISO 7704-1985 für Membrantests folgt, wird zur Verwendung im Labor zur Verfügung gestellt.

Einführung

Filtration ist eine gängige Praxis bei der Prüfung der Wasserqualität und/oder der von Lebensmitteln und Getränken. Die kritischen Überlegungen bei der Erstellung eines Filtrationsprotokolls sind die Flussraten der getesteten Flüssigkeit und die mikrobielle Wiedergewinnungsrate.



Thermo Scientific™ Nalgene™ Analytischer Filtertrichter

Porengröße und Viskosität bestimmen die Durchflussrate einer Flüssigkeit durch eine Membran. Zur Bestimmung der Durchflussraten wird ein bekanntes Flüssigkeitsvolumen in eine Membranfiltereinheit gegeben und die Filtereinheit unter Vakuum gesetzt. Wenn das Vakuum angelegt wird, fließt die Flüssigkeit durch die Membran. Die Zeit, die das Volumen der Flüssigkeit benötigt, um durch die Membraneinheit zu fließen, wird als Durchflussrate bezeichnet.

Analytische Filter können in Verbindung mit agarhaltigen Wachstumsmedien zur Erfassung und Zählung von Mikroorganismen in Flüssigkeiten verwendet werden - auch bekannt als mikrobielle Wiederfindungsrate. Bei dieser Methode wird die interessierende Flüssigkeit durch eine Membran geleitet. Die Mikroben werden auf der Membran aufgefangen und auf eine Agarplatte mit Wachstumsmedium gegeben.

Im Allgemeinen wächst ein Bakterium zu einer koloniebildenden Einheit (KBE - engl. CFU) heran, die nach der Inkubation mit dem bloßen Auge gezählt werden kann. Wenn man das Volumen der gefilterten Flüssigkeit und die Anzahl der gezählten KBE kennt, kann eine Gesamtkonzentration der Mikroorganismen in der interessierenden Flüssigkeit geschätzt werden.

Vor dem Testen von Flüssigkeitsproben müssen analytische Filter auf ihre Leistungsfähigkeit geprüft werden. Die Norm ISO 7704-1985 für die Prüfung der Wasserqualität kann als Leitfaden bei der Bestimmung der mikrobiellen Rückhalteleistung von analytischen Filtern verwendet werden. Die Richtlinie wurde befolgt und es wurde ein Protokoll unter Verwendung der Nalgene Filtertrichter sowie Oxoid und Remel-Kulturmedien entwickelt. Die Anforderungen der ISO 7704 besagen insbesondere:

- 5 (oder mehr) Wiederholungsproben sind für jede getestete Membranfilter-Charge erforderlich
- Für den statistischen Vergleich werden mindestens 200 Kolonien benötigt - idealerweise 25 bis 100 pro Platte
- Membranen, die eine Wiederauffindung mit $\geq 80\%$ der Kontrollplattenzählungen ergeben, gelten als akzeptabel

Methoden und Ergebnisse

Um die Durchflussrate zu bestimmen, wurden verschiedene in Laboren und/oder der Lebensmittel- und Getränkeindustrie übliche Flüssigkeiten für die Messungen ausgewählt: Maisöl, Bier, Traubensaft, tryptische Sojabrühung, phosphatgepufferte Lösung mit Tween, phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) und entionisiertes Wasser. Fünf Exemplare von jedem Nalgene Analytischen Filtertrichter wurden mit jeweils 250 ml Flüssigkeit getestet. Die Flüssigkeit wurde abgemessen und in 250 ml-Filtertrichter mit Zellulosenitratmembranen mit Porengrößen von 0,45 μm und 0,2 μm gefüllt. Ein Vakuum von $\geq 27''$ Hg wurde angelegt und die Zeit gemessen, die die gesamte Flüssigkeit benötigt hat, um durch die Membran zu fließen. Die Durchflussrate wurde durch Teilen des Flüssigkeitsvolumens durch die benötigte Zeit in Sekunden berechnet (Tabelle 1).

Tabelle 1: Eigenschaften der Filtermembran und mittlere Durchflussraten (ml/s) (n=5 pro Einheit)

Eigenschaften der Filtermembran			
Kat.-Nr.	Nalgene Analytische Filtertrichter		
	147-2045	145-2045	145-2020
Membrandurchmesser (mm)	47	47	47
Porengröße (μm)	0,45	0,45	0,2
Gefilterte Flüssigkeiten		Mittlere Durchflussrate $\pm s$ (ml/sec)	
Maisöl	0,23 \pm 0,003	0,23 \pm 0,004	0,08 \pm 0,001
Bier	2,3 \pm 0,8	3,2 \pm 0,1	0,5 \pm 0,4
Traubensaft	3,7 \pm 0,6	4,3 \pm 0,9	1,4 \pm 0,4
Tryptische Sojabrühung	6,1 \pm 1,1	6,3 \pm 1,5	1,3 \pm 0,7
Phosphatpuffer mit Tween®	8,2 \pm 0,2	8,7 \pm 0,2	3,1 \pm 0,1
Phosphat-gepufferte Salzlösung	8,8 \pm 0,5	9,5 \pm 0,3	3,6 \pm 0,1
Deionisiertes Wasser	10,3 \pm 0,7	8,4 \pm 0,2	3,6 \pm 0,2

Um festzustellen, ob die Nalgene analytischen Filtertrichter und Membranen den Normen ISO 7704-1985 entsprechen, wurde die prozentuale mikrobielle Wiederfindung mit der Membranfiltermethode bestimmt. *Escherichia coli* (ATCC # 11775), *Enterococcus faecalis* (ATCC # 19433) und

Saccharomyces cerevisiae (ATCC # 7754) wurden aufgrund ihrer Relevanz bei der Prüfung der Wasserqualität und in der Lebensmittel- und Getränkeindustrie als repräsentative Mikroorganismen für die Analyse ausgewählt.

Im Allgemeinen wird eine Probe in die Thermo Scientific Nalgene Analytischen Filtertrichter (n=10) gegeben, Vakuum angelegt und die Probe durch die Filtermembran gezogen. Alle in der Probe enthaltenen Mikroben werden auf der Filtermembran zurückgehalten. Die Membran wird aus dem Trichter entnommen und mit dem entsprechenden Kulturmedium bebrütet. Für diesen Test wurde *Escherichia coli* (ATCC # 11775) auf einer Oxoid Platte mit Count-Agar angezüchtet, *Enterococcus faecalis* (ATCC # 19433) auf einer Oxoid Platte mit Trytone Soja-Agar und *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC # 7754) auf einer Remel Platte mit Sabouraud's Dextrose-Agar (Tab. 2). Nach der Inkubationszeit wurden alle gewachsenen KBE gezählt und die prozentuale Wiederauffindungsrate berechnet.

Tabelle 2: In dieser Studie verwendete Schlüsselmaterialien und Mikroorganismen

Hauptmaterialien	
Beschreibung	Kat.-Nr.
Mikroorganismen	
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11775)	R19201
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433)	R19077
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 7754)	Interne Bestandskultur
Medien	
Oxoid Platte mit Count Agar	CM0325B
Oxoid Platte mit Trytone Soja-Agar	CM0131B
Remel Platte Sabouraud's Dextrose Agar	R454462
Zubehör	
Nunc Petrischalen	263991
Fisherbrand™ L-förmiger Zellschaber	14665231
Fisherbrand Einweg-Impfösen	22363600
Nalgene Vakuum-Verteilstation	DS0345-0001
Nalgene wiederverwendbarer Filterhalter	300-4000
Nalgene Analytischer Filtertrichter, grau, mit schwarzem Gitter	147-2045
Nalgene Analytischer Filtertrichter, weiß, mit schwarzem Gitter	145-2045
Nalgene Analytischer Filtertrichter, weiß	145-2020
Nalgene Membrane zu Messung der Wasserqualität, grau	DS0205-6045
Nalgene Membrane zu Messung der Wasserqualität, weiß	DS0205-4045

Protokoll für die prozentuale mikrobielle Rückgewinnung unter Verwendung der Membranfiltermethode:

1. Bereiten Sie die dehydrierten Oxoid- und Remel-Nährböden nach den Anweisungen des Herstellers vor. Dispensieren Sie den geschmolzenen Agar nach der Dampfsterilisation in sterile Thermo Scientific™ Nunc™ Petrischalen mit einer Mindesttiefe von 3 mm. Sobald der Agar verfestigt ist, lagern Sie die Petrischalen bei 4 °C bis zum Versuchsbeginn.
2. Bereiten Sie eine Übernachtskultur des Organismus in den geeigneten Medien vor. Am nächsten Tag bestimmen sie die Konzentration der Übernachtskultur und verdünnen sie auf 25-100 KBE pro Filterprobe in 50 ml sterilem entionisiertem Wasser. Bereiten Sie eine Probe für die Filtration und eine für die Standard-Gießplatte vor.
3. Zur Vorbereitung der Ausgießplatte die in Schritt vorbereitete 50 ml Probe in eine sterile Petrischale geben und mit dem für diese Probe geeigneten Medium abdecken. Lassen Sie die Platte erstarren und inkubieren Sie sie dann umgekehrt mit dem Agar auf der Oberseite bei der entsprechenden Temperatur.
4. Befestigen Sie die analytischen Nalgene Filtertrichter an der Vakuum-Verteilerleiste und schalten Sie das Vakuum ein. Die vorbereitete(n) 50 ml Probe(n) aus Schritt 2 in die einzelnen Filtertrichter geben.
5. Spülen Sie die Trichter mit 20-30 ml sterilem deionisiertem Wasser nach, um alle Proben abzuwaschen, die möglicherweise an den Seiten der Filtereinheit zurückgehalten werden.
6. Nachdem die Probe filtriert wurde, wird die Filtermembran mit einer sterilen Pinzette von der Filtereinheit auf die Oberfläche des vorbereiteten Agars übertragen. Seien Sie vorsichtig, um ein Einfangen von Luftblasen zwischen der Membran und der Agaroberfläche zu vermeiden.
7. Nach entsprechender Inkubation zählen Sie die Kolonien auf der Membran und auf der Ausgießplatte. Berechnen Sie die prozentuale Wiederfindungsrate R, anhand der folgenden Gleichung:

$$R = m_m / m_c \times 100$$

Dabei ist
 m_m die Anzahl an Kolonien auf dem Membranfilter
 m_c der Mittelwert der Anzahl der Kolonien der Ausgießplatten

Die Ergebnisse zeigen, dass die prozentuale Wiederauffindung bei Verwendung der Thermo Scientific Nalgene Analytischen Filtertrichter und Zellulosenitrat-Membranfilter zwischen 81 und 100% liegt (Abb. 1). *Saccharomyces cerevisiae* hatte eine 100%-ige Wiederfindungsrate, während *Escherichia coli* zwischen 89 und 100% und *Enterococcus faecalis* je nach verwendetem Filter zwischen 81 und 100% Wiederfindung lag. Gemäß der ISO 7704-1985 Normen für die Prüfung der Wasserqualität validiert eine Wiederfindungsrate $\geq 80\%$ die getestete Filtermembran. Somit belegen die oben genannten Ergebnisse, dass die Thermo Scientific Nalgene Analytischen Filtertrichter und Membranen zur Prüfung der Wasserqualität nach den Normen ISO 7704-1985 geeignet sind.

Schlussfolgerung

Die oben berechneten Durchflussraten der Nalgene Analytischen Filtertrichter und Membranen können als Richtlinie verwendet werden, um zu bestimmen, wie sich eine Flüssigkeit während der Filtration verhält. Das Protokoll, das unter Verwendung von Nalgene Analytischen Filtertrichtern

und Membranen sowie Oxoid oder Remel Kulturmedien bereitgestellt wird, kann zur Bestimmung der prozentualen mikrobiellen Rückgewinnung einer Membran verwendet werden. Die Normen der ISO 7704-1985 für die Prüfung der Wasserqualität wurden als Richtlinie bei der Bestimmung der mikrobiellen Retentionsleistung der Nalgene Analytischen Filtertrichter und Oxoid und Remelin Kulturmedien verwendet. Da mehr als 80% der koloniebildenden Einheiten vom Filter zurückgehalten wurden, entsprechen die verwendeten Materialien und das bereitgestellte Protokoll der Norm und können verwendet werden, wenn die ISO 7704-1985-Normen für die Prüfung der Wasserqualität zugrunde gelegt werden.

Die vorgelegten Daten sind eine zuverlässige Schätzung der Produktleistung zum Zeitpunkt der Durchführung des Tests. Diese Daten stellen keine Garantie oder Befürwortung der Eignung für einen bestimmten Zweck dar. Thermo Fisher empfiehlt Ihnen dringend, das Produkt in Ihrer eigenen Anwendung zu validieren.

Leistungsvergleich Nalgene Analytische Filterprodukte - Mikrobielle Rückgewinnungsrate

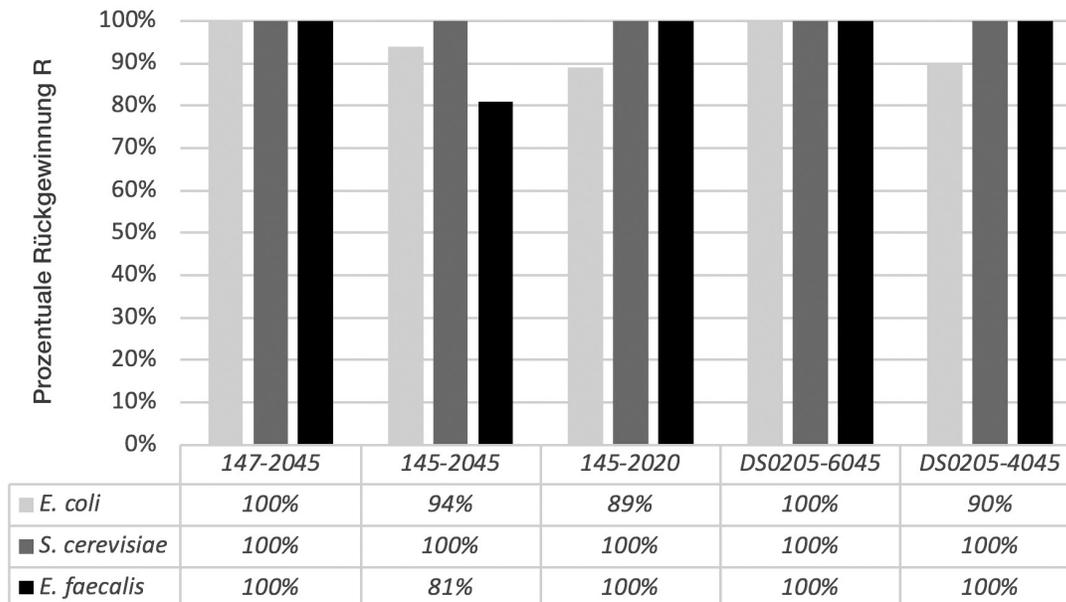


Abb. 1: Die prozentuale Rückgewinnung R für die getesteten Nalgene analytischen Filterprodukte

Weitere Informationen: [thermofisher.com/analyticalfiltration](https://www.thermofisher.com/analyticalfiltration)