

1963

Über die kontinuierliche Züchtung von
Mikro-organismen

F.P.NIINIVAARA und HARRIET SEDERHOLM

Zusammenfassung

In der Arbeit wird ein Überblick auf die Entwicklung, Gebrauchsmöglichkeiten, prinzipiellen Unterschiede, Vorteile und Nachteile der kontinuierlichen Mikrobenzüchtung gegeben.

Eigene Arbeiten bestehen aus Untersuchungen betreffend die kontinuierliche Züchtung von Mikrokokken im Gerät, wo die Lüftung der Nährlösung mittels einer Wasserstrahlpumpe durchgeführt wurde. Beim Durchlaufen durch die Wasserstrahlpumpe saugte die Nährlösung in sich kräftig feinverteilte Luft, wodurch ein gutes Wachstum des aeroben Organismus erreicht wurde.

Die Ausbeute an zentrifugierten, feuchten Bakterienmasse betrug durchschnittlich 1 g/100 ml Nährlösung. Das entwickelte Züchtungsverfahren eignet sich für Züchtungsvolumina von etwa 1 Liter bis 100 Liter.

Summary

The present paper includes a review of the continuous bacterial culture methods regarding their development, use, differences of principle, advantages and disadvantages.

Own investigations consist of experiments with micrococci by using a continuous culture method. The aeration of the culture medium is done effectively by forcing it through a water jet pump with the help of a flow inducer whereat it takes up air in the form of very finely divided air bubbles. In this way it is possible easily to satisfy the oxygen requirement of the aerobic organism and to gain strong growth. The average yield of bacteria was 1 g/100 cc of culture medium (wet weight after centrifuging). The method can be applied to a scale beginning from laboratory size up to a 100 l culture vessel.

Die Einführung eines neuen technologischen Verfahrens zur Elimination der Verunreinigung der Hautoberfläche von Schweinen mit Salmonellen.

V o n

dr. Georg Méhes und dr. Emil Nagy

Bei der Herstellung der in Form gepressten und der Dosenschinken wie auch bei den exportierten Halbschweinen ist die Verunreinigung der Hautoberflächen ein bedeutender Faktor. Die Untersuchungen des übernehmenden Staates wiesen oft hauptsächlich aus Reinfektion stammenden salmonellen der Hautoberflächen auf. In einheimischer Relation ist die Verunreinigung des Rohmaterials der Dosen- und gepressten Schinken, besonders aber der Wurstwaren seitens der Bakterienflora der Hautoberflächen bedeutend erhöht.

Es ist allgemein bekannt, dass die Hautoberfläche der geschlachteten Schweine vor, während und nach dem Verlauf der technologischen Vorgänge verunreinigt wird. Es spielen hier das Haarkleid, das länger gebrauchte Brühwasser, die Reibbürste zu den Hautoberflächen, die Hände und die Schutzkleidung der Arbeiter- derjenigen, die die Halbschweine aufhängen und ausschieben eine bedeutende Rolle.

Da die Aufhebung der Auswirkungen dieser Verunreinigungsquellen voraussichtlich eine längere Zeit braucht, wurde die Ausarbeitung eines Vorganges für Entkeimung der Hautoberflächen für nötig erachtet. Bei den behüteten Halbschweinen schien die Flammenbehandlung mit einer Propan-Butanlampe die zweckmässigste zu sein. Dapples spricht in seinem Rechenschaftsbericht auf dem Symposium in Nizza darüber dass die Flammenbehandlung der abgebrühten Schweine wenigstens zwei Minuten lang dauern muss, um praktisch sterile Hautoberflächen zu gewinnen. Inzwischen nimmt die Haut eine leicht bra-

une Farbe an.

E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n .

Im Laufe unserer Untersuchungen haben wir es für nötig erachtet festzustellen:

- a. Wie sich die Mikroflora qualitativ und quantitativ auf 1 cm² der Hautoberfläche der Halbschweine teilt - da zu diesen Problemen bisher keine inländischen Angaben zur Verfügung standen.
- b. In welcher Reihenfolge die festgestellte Bakterienflora im Laufe der Flammenbehandlung von den Kulturen verschwindet.
- c. welche die kürzeste Flammenbehandlungszeit ist, die - ohne physikalische und chemische Änderung - eine praktisch sterile Oberfläche ergibt.

Die Untersuchungen wurden an solchen Hautoberflächen der Schweinehälften gemacht, die nach den technologischen Prozessen unmittelbar ins Kühlhaus transportiert werden sollten. Das Untersuchungsmaterial wurde grösstenteils vermittels mit physiologischer Lösung befeuchteten Wattetupfers gewonnen. Die zu untersuchende Oberfläche wurde mit einer 4 x 4 cm grossen, ausgeschnittenen Schablone umgrenzt, später wurden die Wattetupfer mit grundlichem Abreiben in eine 100 ml physiologische Lösung gestellt.

Es wurden 3 verschiedene Stellen der Schweinehälften geprüft:

1. Die äussere Seite des Oberschenkels,
2. Die Haut der Bauchwand, die Zitzen und ihre benachbarte runzlige Oberfläche,
3. Der Übergang von der Schulter zum Hals und die vordere Seite der Schulter.

wir begannen die laboratorischen Untersuchungen mit einer Verdünnung der die Wattetupfer enthaltenden physiologischen Lösung von

1:100.000. Vom 3, 4. und 5. Glied der Verdünnungsreihe machten wir eine aerobe Keimzählung nach der Kochschen Methode, ausserdem entnahmen wir der Grundlösung eine Menge von 0.25 ml und verbreiteten sie auf Drigalski- und phenolrot- brillantgrünen Nährboden. Zur Feststellung der haemolysierenden Eigenschaft der Mikroben verbreiteten wir ebenfalls 0.25 ml der Grundlösung auf einer Traubenzuckerblutagarplatte. Zur Spezifikation der Salmonellen brachten wir 1 ml der Grundlösung auf Kaufmann-Brierbauerschen Anreicherungs-nährboden und nach einer Inkubation bei 37°C durch 24 Stunden wurde diese Lösung auf Drigalski- und phenolrot- brillantgrünem Nährboden verbreitet. Für die Bestimmung der Anzahl der fakultativen Anaerobier machten wir eine Verdünnungsreihe von 1:100.000 in Kitt-Tarozzi Leberbouillon, für diejenige der obligaten Anaerobier dagegen nur eine von 1:100. Diese letztere wurde dann 30 Minuten lang bei 80°C warmbehandelt.

Wie gesagt wurden zuerst die Reibungen den zur Untersuchung bestimmten Schweinehälften in nativem Zustand entnommen, später wurden diese mit einer Propan-Butanlampe geflammt. Wegen der Bestimmung der minimalen Abflammungszeit wurden die ersten Untersuchungen nach 15, die folgenden nach 20, bzw. nach 30 Sekunden Abflammen gemacht.

Nach der Flammenbehandlung entnahmen wir der nächsten Nachbarschaft ein neues Untersuchungsmaterial nach der gleichen Methode.

Die solcherweise erhaltenen Keimzahlen wurden auch mit der Abdruckmethode kontrolliert. Zu den Abdrücken wurden 4 x 4 cm grosse, flache, polierte, mit Stielen versehene und warm sterilisierte Stahlplatten gebraucht, die während der Untersuchungen mit einem Spiritus-Brenner immer wieder entkeimt wurden. Ausser den mit Wattetupfern untersuchten Stellen entnahmen wir auch Muster der Rücken-

haut, der Lende, dem Rist, der Brusthaut und der Gegend hinter den Schultern. Mit dem gewonnenen Material wurden dann Drigalski-, phenolrot-brillantgrüne, Gelatin-, und Dextrosepferdeblutagarplatten geimpft und dreimal 24 Stunden lang bei 37 - 32 °C, respektive auf Zimmertemperatur gebrütet. Die ausgewachsenen Kolonien wurden, bezogen auf 1 cm², gezählt, ihr Vorkommen nach Bakterienarten wurde in Prozentzahlen festgestellt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden in Tabellen zusammengefasst. Die Tabelle N^o 1 zeigt die zusammengefassten Resultate der mit Wattetupfer gemachten Untersuchungen. Auf Tabelle N^o 2 sind die Keimzahlen von 1 qcm der Abdruckpreparate zu beobachten, sowie auch die prozentige typenmässige Zerteilung der Bakterienarten in Relation zur Gesamtzahl der Kolonien.

Aus den Tabellen ist festzustellen, dass wir auf der Hautoberfläche der Halbschweine nach der Beendigung des technologischen Verfahrens mit der Kochschen Plattengussmethode eine Menge von $3 \cdot 10^4 - 18 \cdot 10^6$ der aerob saprophyten Keime vorfanden. Die Zahl fakultativer Anaerobier bewegte sich zwischen $10^2 - 10^5$. Der Durchschnittswert der Aerobier war $2.8 \cdot 10^6$, der fakultativen Anaerobier aber 10^3 . 0.25 ml der von den ungeflamten Schweinoberflächen stammenden und auf Drigalski und phenolrot-brillantgrünen Nährboden zerstreuten Grundlösung wies meistens die folgenden Bakterienarten auf : E. coli, E.c. intermedia, einige Arten der Streptokokken und B. pyocyaneus. Dieselbe Quantität der Grundlösung geimpft auf Traubenzuckerblutagarplatte ergab nach Zerstreung eine Anzahl von 80 - bis zu unzählbaren Kolonien, meistens von Streptokokken, deren 10 % haemolysierende Eigenschaften aufwies. Die zweithäufigsten Bakterien sind die Staphylokokken, etwas geringer die gram-negativen Stäbchen.

Die Anzahl der aeroben sporeuartigen Saprophyten spielt nur eine untergeordnete Rolle.

Aus unmittelbarer Zerstreuung waren Salmonellen auf phenolrot-brillantgrünen Nährboden nur in einem einzigen Falle erweislich. Auf dem oben erwähnten und dem Drigalskischen Nährboden beobachteten wir des öfteren Kulturen, die sich den Salmonellen ähnlich entwickelten, diese haben sich aber während der weiteren Untersuchungen als *E.c. intermedia* oder als Bakterien der pyocyaneus-Gruppe herausgestellt.

Während des Abflammungsverfahrens sahen wir, dass die Flammenbehandlung von 15 Sekunden nur eine unbedeutende Verminderung der Menge der Bakterien zeitigte. Die Erhöhung der Abflammungsdauer auf 20 Sekunden ergab auf den glatten Oberflächen praktisch sterile Verhältnisse, auf den gerunzelten Hautoberflächen Bauchwandhaut war sie unverlässlich.

Wir sind also zur Abflammung von 30 Sekunden übergegangen, die sich als für die Praxis vollkommen genügend erwies. Nachher haben wir auf dem Drigalskischen und dem phenolrot-brillantgrünen Nährboden insgesamt achtmal sporadische Bakterienentwicklungen beobachtet. Die in übrigen ausserordentlich empfindliche Blutagarplatte zeigte sich in den meisten Fällen steril, oder aber wurde nur in ganz wenigen Fällen die Entwicklung von Streptokokken bzw. Staphylokokken oder von gram-negativer Mikroflora beobachtet.

Die mit dem Kochschen Plattengussverfahren erzielten Keimzahlwerte bewegten sich in den meisten der Fälle unter zweihundert, der Durchschnittswert sämtlicher ausgeführter Untersuchungen betrug 4.000 aerobe Saprophytenkeime. Die Keimzahl fiel also im Vergleich zur Zahl vor der Abflammung von der Millionengrößenordnung

auf die Tausendergrössenordnung zurück. Die Zahl der auf fakultativ anaerobe Weise sich entwickelnden Keime erreichte in einem einzigen Falle den Wert von 10^3 , der Durchschnittswert betrug 10^1 . Die Züchtung von obligaten anaeroben Bakterien gelang in keinem Falle.

Unter den sich während der vor der Abflämmung gemachten qualitativen bakteriologischen Untersuchung entwickelnden Keimen kamen nach der Abflämmung in den Kulturen - wo es überhaupt noch eine Entwicklung gab - in erster Linie die Streptokokken heraus, in viel geringerer Anzahl die Staphylokokken, ungefähr dieselbe Menge von gram-negativer Mikroflora, und nur vereinzelt konnten wir die Erscheinung der gram-positiven Mikroflora in den Kulturen beobachten.

Die Züchtung von Salmonellen gelang uns ausser dem schon erwähnten Fall ausschliesslich vermittels des zusammengesetzten Anreicherungsverfahrens. Nach der Anreicherung der Verdünnungsflüssigkeit kamen in keinem einzigen Falle Salmonellen auf. Die in sieben Fällen erfolgreiche Salmonellenzüchtung wurde nur dadurch möglich, dass die Tupfer statt der Einlegung in die Verdünnungsflüssigkeit unmittelbar in die Anreicherungsflüssigkeit gelegt worden sind. Von den sieben Fällen stammten 6 von Oberflächen, die von der Abflämmung waren, einer aber von einer Oberfläche nach der Abflämmung.

Teils um die Ergebnisse der mit dem Reibungsverfahren gewonnenen Muster zu kontrollieren, teils aber um die Verteilung der sich entwickelnden Bakteriumflora auf der Körperoberfläche zu studieren, entnahmen wir sechs verschiedenen Stellen von 6 behäuteten Schweinehälften Abdrücke, zuerst in nativem Zustande, dann nach der

vermittels Butangases vorgenommenen Flammenbehandlung.

Bei Besichtigung der 2. Tabelle können wir uns überzeugen, dass die Ergebnisse des Abdruckverfahrens mit denen der mit Tupfern gemachten Untersuchungen übereinstimmen. Diese Ergebnisse unterstützen zugleich unsere Feststellung, dass das Abflammungsverfahren an den Hautoberflächen der Schweine eine den praktischen Erfordernissen entsprechende Keimarmut bzw. Sterilität sichert. Der Vorteil des Abdruckverfahrens gegenüber dem wattetupferverfahren besteht darin, dass man viel grössere Oberflächen abtasten kann und somit die dadurch erzielten Ergebnisse die wirkliche Lage besser zeigen und gleichsam eine kartenmässige Aufnahme der zu untersuchenden Oberflächen ermöglichen.

Bei den von den nicht abgeflamten Oberflächen gewonnenen Abdruckkulturen entwickelten sich auf einem cm^2 der Gelatin-agarplatte durchschnittlich ungef. 150, auf der Blut-agarplatte ungef. 185 Kolonien je cm^2 . Selbst die von Natur aus hindernd wirkenden selektiven Nährböden zeigten eine bedeutende Entwicklung, wie dies aus der Tabelle leicht ersichtlich ist. Die nach der Abflammung genommenen Abdruckpräparate erwiesen sich praktisch als steril. Unter den 120 Kulturen waren 108 vollkommen steril, in 12 Fällen sahen wir eine schwache Entwicklung. /2 bis 6 Kolonien/.

Von den nicht abgeflamten Oberflächen haben sich auf den Drigalski- und auf den phenolrot-brillantgrünen Platten in grösster Anzahl die den Milchzucker und die Saccharose auflösenden /zersetzenden/ Kolonien entwickelt, /Drigalski: 59 %, phenolrot-brillantgrüne Platten 34 %/ und nur in 22 %-en der Fälle die den Milchzucker und die Saccharose nicht auflösenden /nicht zersetzenden/ Kolonien. Letztere haben sich bei der Identifikation als E.c. intermedia bzw.

B. pyocyaneus erwiesen. Von den Abdruckpräparaten konnten wir in keinem einzigen Falle Salmonellen aufzeigen.

Auf der Gelatin-agarplatte und auf der Blut-agarplatte erschienen in allen Fällen ohne Ausnahme die Streptokokken und die Staphylokokken.

In einer etwas kleineren Anzahl kamen die gram-negativen und in noch geringerer Anzahl die gram-positiven Stäbe vor. Auf dem Drigalskischen Nährboden machten die Streptokokken 21 % sämtlicher vorgekommener Kolonien aus, auf phenolrotem Nährboden 39 %, auf Agarplatten und Blutagarplatten 27 - 27 %. Bei Staphylokokken gestaltete sich dieses Verhältnis folgendermassen: Drigalski 7 %, phenolroter Boden 18 %, Agarplatte 28 %, Blutagarplatte 18 %. Gram-negative Mikroflora war auf der Agarplatte zu 20 %, auf der Blutagarplatte zu 18 % vorhanden. Die gram-positiven Sporenstäbe wuchsen auf dem phenolrot-brillantgrünen Nährboden zu 3 %-en, auf der Agarplatte zu 16 %-en, auf der Blutagarplatte zu 18 %-en aus.

B e s p r e c h u n g :

Aus unseren Untersuchungen dürfen wir diese Schlussfolgerungen ziehen:

1. Beim Züchtungsverfahren konnten wir nach der Beendigung des technologischen Verfahrens an den Hautoberflächen der behäuteten Schweinehälften zahlreiche aerobe und fakultativ anaerobe Saprophytenkeime nachweisen. Die Keime waren in der Reihenfolge der Häufigkeit des Vorkommens Streptokokken, /ung. 10 %-e hämolysierend/ Staphylokokken, gram-negative und gram-positive stabförmige Saprophytenkeime. Die Verunreinigung der Oberflächen betrug auf ein cm^2 gerechnet im Durchschnitt $2.8 \cdot 10^6$ Keime. Salmonellen wurden unmittelbar durch Verbreitung aus der Verdünnungsflüssigkeit einmal, vermittels

des zusammengesetzten Anreicherungsverfahrens in acht Fällen nachgewiesen. Die auf den Hautoberfläche nachgewiesenen Salmonellen können bei den für den Export bestimmten Schweinen Gegenstand der Reklamation bilden.

2. Durch die an je einer Körperhälfte während 30 Minuten präzise vorgenommene Butangasabflammung ergeben sich praktisch fast sterile Oberflächen. Durch die Abflammung verminderte sich die auf 1 cm^2 gerechnete Keimzahl von mehreren Millionen auf die Grossenordnung von Tausenden oder es wurde Sterilität erreicht.

3. Die während der angegebenen Zeitdauer stattfindende Abflammung zeitigt an den Hautoberflächen entweder keine sichtbare Farbenveränderung oder nur eine gänzlich unwesentliche.

4. Auf Grund der günstigen Ergebnisse dieser Untersuchungen wäre es wünschenswert die Hautoberflächen der behüteten Schweinehälften nach den schlachtungstechnologischen Prozessen 30 Sekunden lang abzuflammen.

5. Bei den zu Exportzwecken gebrauchten behüteten Schweinehälften ist es zweckmässig, die Abflammung eine Stunde vor der Einwaggonierung vorzunehmen. Wenn das Aufladungpersonal die Hygienevorschriften genügend beobachtet, kommen nach der Flammenbehandlung keine Verunreinigungen mehr vor.

6. Auf Grund unserer Untersuchungen scheint es begründet zu sein, die importierten behüteten Halbschweine ebenfalls auf obige Weise abzuflammen, und zwar in aufgetauten Zustände. Dadurch wird nicht nur das verhindert, dass neue Salmonellenstämme bei uns einheimisch werden, sondern es wird auch erreicht, dass solche fakultativ pathogene Keime zugrunde gehen, deren krankheitsverursachende Fähigkeiten nicht ganz klargestellt sind. /Coli, Citro-

bacter, Kloakengruppe./

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die Autoren machten die Oberflächenverunreinigung der behüteten Schweinehälften zum Gegenstande von quantitativen und qualitativen Untersuchungen. Ihre Untersuchungen nahmen sie an den Hautoberflächen der durch die schlachtungstechnologischen Prozesse durchgegangenen Schweine vor, und zwar teils mit der Wattetupfermethode, teils aber vermittels der Abdruckmethode. Bei den Untersuchungen wurden je cm^2 der Hautoberflächen in der Grössenordnung von $28 \cdot 10^5$ aerobe und in der Grössenordnung von $10^{4,3}$ fakultativ anaerobe Saprophytenkeime erwiesen. Nach der 30 Sekunden dauernden Flammenbehandlung mit einer Butangaslampe verringerte sich auf den untersuchten Oberflächen die Zahl der aeroben Keime auf $4 \cdot 10^3$ und die der fakultativ anaeroben auf 10^1 .

Salmonellen konnten vermittels des zusammengesetzten Anreicherungsverfahrens achtmal, vermittels der Verbreiterung unmittelbar aus der Verdünnungsflüssigkeit einmal gezüchtet werden.

Auf Grund der vorgenommenen Untersuchungen halten es die Autoren für notwendig, die zum Export gelangenden und die aus dem Import stammenden behüteten Schweinehälften mit dem Butangas abzuflammen.