

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene (Direktor: Prof. Dr. U. Göbel) der Medizinischen Fakultät (Charité) der Humboldt-Universität zu Berlin

Anoxomat- und Gas-Pak-System im Vergleich bei der Anzucht von anaeroben und mikroaerophilen Bakterien

H. Briedigkeit

Der von der Firma MART angebotene Anoxomat evakuiert und beschickt Anaerobiotöpfe in einem automatisierten Arbeitsgang, in den gleichzeitig ein Dichtigkeits- und ein Katalysatorrest integriert sind. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, die Effektivität des Geräts mit der des Gas-Pak-Verfahrens zu vergleichen. Dazu wurde das Wachstum von 100 Bakterienstämmen in einem durch das Anoxomat-System erzeugten anaeroben bzw. mikroaerophilen Milieu in Anaerobiotöpfen geprüft. Als Vergleich dienten Wachstumskontrollen, in denen das entsprechende Milieu durch kommerzielle Gas-Pak-Systeme erzeugt wurde.

Material und Methoden

Für die automatisierte Herstellung des anaeroben Milieus wurden die mit beimpften Kulturschalen gefüllten Anaerobiotöpfe mittels Anoxomat mit einem Gasgemisch aus 85% Stickstoff, 10% Wasserstoff und 5% Kohlendioxid entsprechend den Angaben des Herstellers beschickt. Die Entfernung des Restsauerstoffs erfolgte dabei automatisch über das Gerät durch dreimaliges Evakuieren und Wiederauffüllen der Töpfe, in die vor dem Verschluß ein reaktiver Katalysator und ein Teststreifen (Anaerotest, MERCK) zur Kontrolle der Bildung und Aufrechterhaltung des anaeroben Milieus eingelegt wurden.

Ein mikroaerophiles Milieu wurde durch einmaliges Evakuieren mit anschließender Gasfüllung ohne Einlegen eines Katalysators erreicht.

Für die Herstellung der anaeroben bzw. mikroaerophilen Atmosphäre durch kommerzielle Gas-Pak-Systeme wurden pro Anaerobiotopf ein AnaeroGen-Beutel (OXOID) für die anaerobe Kultur bzw. ein Gas Generating Kit (OXOID) für die mikroaerophile Kultur eingelegt.

Von den insgesamt 100 Bakterienstämmen wurden 80 im anaeroben und 20 im mikroaerophilen Milieu geprüft. Die Anzucht der Bakterien erfolgte auf Columbia-Agar. Dazu wurde der Nährboden mit 1ml einer Keimsuspension überflutet und die überschüssige Flüssigkeit sofort wieder abgesaugt. Die in Vorversuchen ermittelte Ausgangskonzentration der Keimsuspension wurde so gewählt, daß nach der Inkubation der beimpften Platten zählbare Einzelkolonien entstanden.

Die Auswertung der immer parallel mit beiden Verfahren angesetzten Plattenansätze erfolgte mit wenigen Ausnahmen nach 48stündiger Inkubation bei 37°C. Beurteilt wurden die Zahl und die Größe der gewachsenen Kolonien, außerdem eventuell vorhandene Farb- und Formunterschiede. Die Koloniegröße wurde aus dem Mittelwert von 10 repräsentativen unter einem Stereo-Lupen-Mikroskop mit integrierter Meßskala ausgemessenen Kolonien gebildet.

Ergebnisse

Anzahl und Art der untersuchten Stämme sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Anoxomat- und Gas-Pak-System im Vergleich: Wachstum von anaeroben und mikroaerophilen Bakterien

	Koloniezahl		Koloniegröße	
	Anoxomat	Gas-Pak	Anoxomat	Gas-Pak
Anaerobe Kulturen				
<i>Bacteroides fragilis</i> (17)	348	372	1,6	2,0
<i>Bacteroides vulgatus</i> (9)	100	86	1,8	1,9
<i>Bacteroides capillosus</i> (2)	72	66	3,8	4,5
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (2)	57	62	2,8	2,7
<i>Bacteroides distasonis</i> (1)	96	80	2,2	1,5
<i>Bacteroides eggerthii</i> (1)	56	44	2,9	2,3
<i>Bacteroides caccae</i> (1)	68	60	3,1	2,1
<i>Prevotella intermedia</i> (4)	722	790	2,6	2,9
<i>Prevotella bivia</i> (7)	311	245	2,6	2,9
<i>Prevotella oralis</i> (5)	201	182	2,0	2,2
<i>Prevotella buccae</i> (4)	293	305	1,0	1,0
<i>Prevotella melaninogenica</i> (1)	152	152	2,1	2,4
<i>Prevotella disiens</i> (1)	440	400	1,2	1,1
<i>Porphyromonas endodontalis</i> (1)	40	92	1,0	1,4
<i>Porphyromonas gingivalis</i> (2)	2320	1720	1,0	1,4
<i>Fusobacterium nucleatum</i> (2)	422	356	2,3	2,8
<i>Veillonella</i> spp. (7)	142	127	1,6	1,6
<i>Peptostreptococcus magnus</i> (2)	73	83	1,9	1,9
<i>Peptostreptoc. asaccharolyticus</i> (1)	1400	440	1,6	1,5
<i>Peptostreptococcus prevotii</i> (3)	145	91	1,5	1,7
<i>Clostridium perfringens</i> (1)	240	200	3,8	4,1
<i>Clostridium beijerinicki</i> (1)	152	152	2,1	2,4
<i>Clostridium difficile</i> (1)	84	104	3,1	2,2
<i>Actinomyces odontolyticus</i> (2)	1000	480	1,0	1,5
<i>Propionibacterium acnes</i> (2)	540	460	1,2	1,4
Mikroaerophile Kulturen				
<i>Actinobacillus actinomycetemc.</i> (2)	2074	2084	0,8	0,8
<i>Lactobacillus</i> spp. (4)	140	166	1,4	0,9
<i>Eikenella corrodens</i> (1)	128	104	0,8	0,9
<i>Streptococcus intermedius</i> (1)	360	360	2,2	1,7
<i>Streptococcus mitis</i> (1)	320	240	1,8	1,6
<i>Streptococcus salivarius</i> (1)	96	96	2,2	2,7
<i>Haemophilus influenzae</i> (5)	155	152	2,5	2,0
<i>Capnocytophaga gingivalis</i> (1)	400	200	2,2	3,2
<i>Barthoneilla</i> (1)	400	400	0,06	0,05
<i>Propionibacterium acnes</i> (1)	200	160	1,0	0,5
<i>Helicobacter pylori</i> (1)	560	1040	0,1	0,07
<i>Helicobacter cinaedi</i> (1)	160	200	1,0	0,9

(n) = Anzahl der Stämme

Beim Vergleich der beiden Verfahren blieben auf Grund von Voruntersuchungen Abweichungen bis zu 15% sowohl bei der Anzahl der gebildeten Kolonien als auch der Koloniegröße unberücksichtigt.

Anaerobe Kulturen: Im anaeroben Milieu wurde das Wachstum von 25 Spezies (insgesamt 80 Stämme) mit beiden Verfahren parallel geprüft. Für die Auswertung wurden innerhalb der Spezies Mittelwerte gebildet. Bei 13 Spezies (52%) war die Anzahl der gewachsenen Kolonien unter Berücksichtigung der oben angegebenen Fehlerbreite mit beiden Verfahren identisch. 9 mal (36%) waren im Anoxomat-Verfahren mehr, 3 mal (12%) weniger Kolonien als in den Gas-Pak-Töpfen gewachsen.

Die Koloniegröße war bei 15 Spezies (60%) identisch. 4 mal (16%) waren die Kolonien in den mittels Anoxomat beschickten Töpfen, 6 mal (24%) im Gas-Pak-Milieu größer (Tabelle 2).

Mikroaerophile Kulturen: Im mikroaerophilen Milieu war die Zahl der gebildeten Kolonien in der Hälfte der Fälle mit beiden Verfahren identisch, 4 mal (33%) im Anoxomat-Verfahren und 2 mal (17%) im Gas-Pak-Verfahren höher. Die durchschnittliche Größe der Kolonien war 4 mal (33%) identisch, 6 mal (50%) waren die Kolonien im Anoxomat-Verfahren und 2 mal (17%) im Gas-Pak-Verfahren größer (Tabelle 2).

Tabelle 2: Ergebnisse der Vergleichsuntersuchungen über das Wachstum von 80 anaeroben und 20 mikroaerophilen Bakterienstämmen im Anoxomat- (A) und im Gas-Pak-(G)-Verfahren

		Anaerob	mikroaerophil
Koloniezahl	identisch in beiden Verfahren	52%	50%
	höher im Anoxomat-Verfahren	36%	33%
	höher im Gas-Pak-Verfahren	12%	17%
Koloniegröße	identisch in beiden Verfahren	60%	33%
	größer im Anoxomat-Verfahren	16%	50%
	größer im Gas-Pak-Verfahren	24%	17%

Das optische Bild der Bakterienkolonien war bis auf geringe Farbunterschiede bei den *B. vulgatus*-Stämmen in beiden Verfahren identisch.

Die Indikatorstreifen zur Anzeige des anaeroben Milieus waren mit beiden Methoden zur gleichen Zeit nach ca. 2 Stunden entfärbt.

Mit den parallel verwendeten Töpfen der Firmen MART und OXOID ergaben sich bei Vergleichsuntersuchungen keine Unterschiede in der Ausbildung des anaeroben Milieus und im Wachstum der Bakterien.

Diskussion

Die vorliegenden Vergleichsuntersuchungen zeigen, daß sowohl das Anoxomat- als auch das Gas-Pak-Verfahren im anaeroben und im mikroaerophilen Milieu gute Wachstumsbedingungen für Bakterien bieten. In ca. der Hälfte der Fälle war die Anzahl der gebildeten Kolonien, im anaeroben Milieu auch die Größe der Kolonien, in beiden Ansätzen innerhalb der Schwankungsbreite von 15% identisch.

Sowohl anaerob als auch mikroaerophil wuchsen in einem Drittel der Fälle mehr Kolonien in den Anoxomat- als in den Gas-Pak-Töpfen. Die anaerob angezüchteten Kolonien waren in den Gas-Pak-Töpfen zum Teil etwas größer, wahrscheinlich als Folge des weniger dichten

Wachstums. Im mikroaerophilen Milieu gab es diese Korrelation nicht, d.h. im Anoxomat-Milieu wuchsen häufiger mehr und größere Kolonien.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß es zwischen beiden Verfahren keine qualitativen Unterschiede gibt. In keinem Fall wurde ein Ausbleiben des Wachstums mit einem der beiden Verfahren beobachtet. In der quantitativen Ausbeute scheint das Anoxomat-Milieu etwas günstigere Bedingungen zu bieten.