

Dekontamination von CO₂-Begasungsbrutschränken

A. HEIDEMANN, Roßdorf*, H. KRANEFELD, Karben*

Key words: Sterilisation, Zellkulturtechnik, CO₂-Begasungsbrutbank, UV/Ozon-Sterilisation

Zusammenfassung

Das getestete UV/Ozon-Sterilisationsgerät der Firma IBK Industriebedarf GmbH ermöglicht eine wirtschaftliche, nicht umweltbelastende Dekontamination (Desinfektion) von Zellkultur-Brutschränken.

Bei prophylaktischer und kontinuierlicher Anwendung im Abstand von 1–2 Wochen sind die Brutschränke *immer wieder keimfrei und die durchschnittliche Keimbelastung ist wesentlich verringert*.

Da eine Kontamination von Kulturen direkt abhängig ist von der Keimbelastung des Brutschrankes und der Inkubationszeit, ist durch die regelmäßige Keimabtötung auch ein Befall von Kulturen wesentlich vermindert.

Einleitung

Beim biologischen Arbeiten ist die Kontamination (Befall mit Bakterien und Pilzen) von Kulturen ein Störfaktor, welcher zur Wiederholung aufwendiger Arbeitsschritte führt oder aber auch den Verlust teurer nicht reproduzierbarer Stammkulturen bedeutet.

Bekanntes Verfahren zur Entkeimung (Reinigung) von Kulturen zeigen oft nicht den gewünschten Erfolg bzw. haben nicht zu akzeptierende Nebenwirkungen.

Da eine Kontamination von einer Vielzahl von Parametern verursacht werden kann, ist es eine logische Schlussfolgerung, die Kontaminationsrisiken einzuengen bzw. auszuschalten.

** Dr. Albrecht Heidemann, CCR, Cytotest Cell Research GmbH,
In den Leppsteinwiesen 19, W-6101 Roßdorf

** Dipl.-Ing. Helmut Kranefeld, IBK, Industriebedarf GmbH,
Ramonvillestraße 2, W-6367 Karben 1

Ein großes Kontaminationsrisiko ist die Inkubation in Begasungsbrutschränken.

Hier herrschen ideale Wachstumsbedingungen, nicht nur für die Zellkulturen, sondern auch für Pilze und Bakterien.

Bei noch so sorgfältigem Arbeiten unter sterilen Bedingungen ist eine Kontamination dieser Brutschränke nicht zu vermeiden, da durch das Öffnen Luftkeime eindringen. Ein Befall der Kulturen durch diese Keime ist auch durch Antibiotika und Fungizide nicht vollständig auszuschließen.

Kultivierungsbedingungen („Handling“) und Keimbelastung der Laboratmosphäre beeinflussen diese Kontamination.

Zwar stellt sich mit der Kontamination eines Brutschrankes nicht sofort auch ein Befall der Kulturen ein, er wird jedoch von der Art der Kulturgefäße und von der Zeit bestimmt.

Da der Zeitfaktor (Inkubationszeit) meist festliegt, ist das Risiko einer Kontamination der Kulturen – rein statistisch gesehen – direkt abhängig von der Keimbelastung des Brutschrankes.

Es gilt also die Keimbelastung des Brutschrankes zu vermindern.



Abb. 1: Sterizon UV3 mit Steuergerät

Bisherige Verfahren zur Dekontaminierung und Keimreduzierung

Wischdesinfektion

Die handelsüblichen Mittel sind entweder in ihrer Wirkung beschränkt oder aber zellschädigend.

Diese Mittel können z. B. in Fugen und Ritzen verbleiben oder auch von Kunststoffen absorbiert und nach und nach abgegeben werden.

Nicht zugängliche Stellen bleiben unbehandelt.

Die Wischdesinfektion ist sehr aufwendig und arbeitsintensiv und muß regelmäßig 1–3 mal pro Monat durchgeführt werden.

Kupfersalze

Kupfersalze verhindern im Befeuchtungswasser zwar eine Verkeimung, greifen aber Metalle an, so daß man mit Glas- oder Kunststoffschalen arbeiten muß.

Eine Verkeimung des Innenraumes ist nicht zu verhindern.

Ähnlich verhält es sich mit anderen fungiziden und bakteriziden Mitteln als Wasserzusatz.

UV-Strahler

UV-Strahler werden oft als begleitende Maßnahme zur Wischdesinfektion eingesetzt. Eine Keimtötung ist nur in den bestrahlten Zonen möglich.

Heißluft-Sterilisation

Die Heißluft-Sterilisation bei 80–180°C ist bei einigen Begasungsbrutschränken möglich. Optimal und wirkungsvoll ist die Sterilisationsmöglichkeit jedoch nur bei 180°C. Diese Geräte sind jedoch sehr teuer.

Das kombinierte UV/Ozon-Sterilisationsverfahren

Gerätebeschreibung

Das UV/Ozon-Sterilisationsgerät besteht aus dem separaten Steuerungsteil und der eigentlichen (über ein Flachkabel verbundenen) Sterilisationseinheit mit den UV/Ozon-Strahlern.

Das Steuergerät beinhaltet alle für die Funktion nötigen elektrischen Komponenten wie Relais, Sicherheitsschalter, Timer für die Vorgabe der Dekontaminations- und Ozon-Abbauzeit und Meldeleuchten, die den jeweiligen Betriebszustand anzeigen.

Das Flachkabel, das das Steuergerät mit der Sterilisationseinheit verbindet, läßt sich leicht zwischen die Türdichtung klemmen (Abb. 1).

Die Sterilisationseinheit besteht aus einem Grundkörper zur Aufnahme von drei speziellen UV-Strahlern mit je einer Leistung von 15 Watt, die im Wellenbereich <200nm Ozon erzeugen.

Nach Ablauf der Dekontaminationszeit schaltet das Steuergerät automatisch auf Ozon-Abbau.

Im Inneren der Sterilisationseinheit befindet sich ein Platin/Palladium-Katalysator und ein Ventilator. Über den Katalysator wird die Ozonatmosphäre mittels eines Ventilators geleitet und das Ozon wird abgebaut.

Ozonzmessung

Da Ozon ein hochtoxisches Gas ist, (MAK-Wert = 0,1 ppm) wurden aus Sicherheitsgründen (für Personal- und Zellkulturen) die Ozon-Konzentrationen im Raum (während der Ozon-Behandlung) und im Brutschrank (nach erfolgtem Ozonabbau) gemessen.

Nach ca. 15 Min wurden im Schrankinneren ca. 50 ppm Ozon gemessen. Nach ca. 30 Min, d.h. nach der Ozon-Stabilisation wurden permanent über die gesamten Dekontaminationsphase ca. 60 ppm Ozon gemessen (Abb. 2).

Nach dem einstündigen Ozonabbau wurde bei ungeöffneter Tür die folgenden Ozon-Restgas-Konzentrationen gemessen:

- Mitte Innenraum maximal 0,05 ppm
- direkt über der Wasseroberfläche maximal 0,07 ppm

Nach dem Öffnen der Tür, d.h. nach erfolgtem Luftaustausch konnte im Innenraum und über der Wasseroberfläche kein Ozon mehr nachgewiesen werden.

Während der Dekontaminationszeit wurde zu keinem Zeitpunkt außerhalb des Brutschrankes - auch nicht direkt an der Kabeldurchführung - eine Ozonkonzentration gemessen, die größer als 0,02 ppm war.

Alle Ozon-Messungen wurden mit „Dräger-Meßröhrchen“

Typ 10 A (Meßbereich: 10–300 ppm) und Typ 0,05 B (Meßbereich: 0,05–1,4 ppm) durchgeführt.

Test/Dekontaminationsnachweis

Ziel

Ziel des Tests sollte sein, die Keimzahl von Luftkeimen (Pilze) und die Verbreitung und Vermehrung in einem UV/Ozon behandelten und einem unbehandelten Begasungsbrutschrank zu analysieren.

Versuchsanordnung

Hierzu wurden die in der Laboratmosphäre natürlich vorkommenden Keime genutzt. Entsprechend der praxisnahen Handhabung wurden die Brutschränke 5 mal täglich für 1 Min geöffnet.

In den beiden Brutschränken mit einem Innenraum von je ca. 200 Liter wurden die Temperatur mit 37°C, der CO₂-Gehalt mit 5% und die Luftfeuchte mit 95% konstant gehalten.

Als Indikation für die Keimzahl dienten pro Brutschrank:

- 12 Schalen mit Nähragar, gleichmäßig im Brutschrank auf drei Ebenen verteilt
- je 1 Abklatschpräparat von beiden Seitenwänden und von der Rückwand

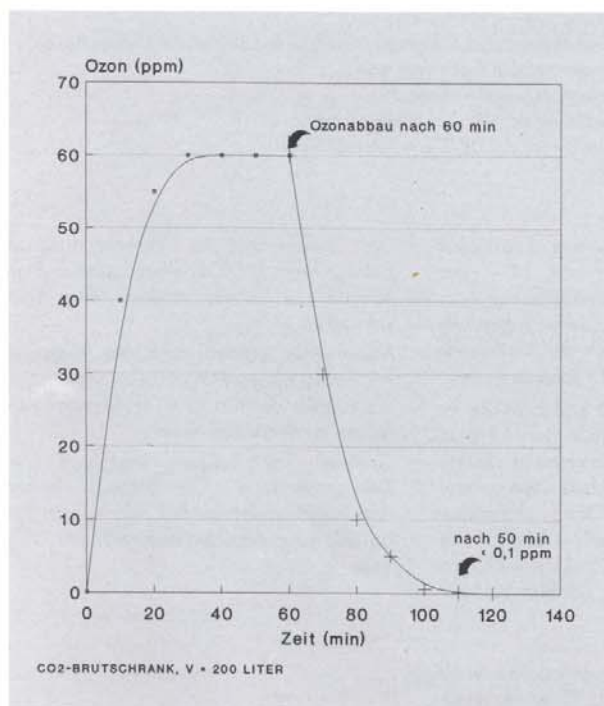


Abb. 2: Ozonzuf- und -abbau

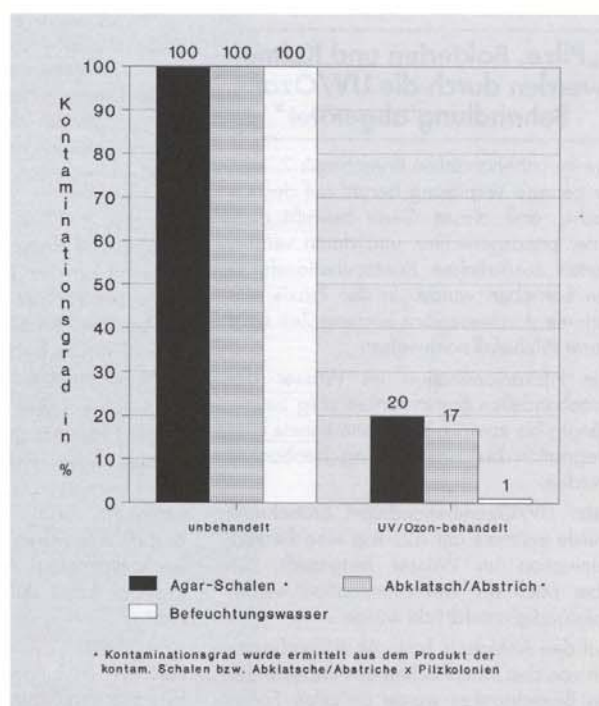


Abb. 3: Durchschnittlicher Verkeimungsgrad im CO₂-Brutschrank

STERILISATION

- 3 Abstriche von unzugänglichen Stellen, die nicht von der UV-Strahlung erfaßt wurde.
- Direkte Keimzahlbestimmung im Befuchtungswasser (5 Petrischalen pro Bestimmung).

Zeitlicher Ablauf

Nach der Grundreinigung der beiden Brutschränke und Versorgung mit sterilem, entmineralisiertem Wasser wurde der Test-Brutschrank mit dem UV/Ozon-Sterilisationsgerät zusätzlich dekontaminiert

- Dekontaminationszeit: 2 Stunden
- Ozon-Abbauzeit: 1 Stunde

Danach erfolgte dann nochmals eine Keimzahlbestimmung für den UV/Ozon behandelten Test-Brutschrank 1 (Tab. 1).

An allen weiteren Untersuchungstagen (42 Tage) erfolgte die Keimzahlbestimmung für den Test-Brutschrank jeweils vor und nach der UV/Ozon-Dekontamination (Tab. 1).

Auswertung/Ergebnisse

Nach der Wischdesinfektion war in beiden Brutschränken eine leichte Kontamination im Wasser und auf den Metalloberflächen im Inneren der Brutschränke festzustellen. Nach zusätzlicher UV/Ozon-Behandlung verschwand auch diese Kontamination.

Der UV/Ozon-behandelte Test-Brutschrank war steril (Tab. 1, 1. Tag).

„Pilze, Bakterien und Keime werden durch die UV/Ozon-Behandlung abgetötet“

Die im unbehandelten Brutschrank 2, relativ geringe Verpilzung beruht auf der Tatsache, daß dieses Gerät bewußt nicht unter praxisgerechten und damit verbundenen zusätzlichen Kontaminationsfaktoren betrieben wurde. In der Praxis läßt sich meist in wesentlich kürzerer Zeit sichtbarer Pilzbefall nachweisen.

Die Pilzkontamination im Wasser des unbehandelten Brutschrankes stieg zeitabhängig bis zum 21. Tag, dann konnte eine Stagnation bis zum 42. Tag beobachtet werden.

Beim UV/Ozon-behandelten Brutschrank wurde erstmals am 42. Tag eine Pilzkontamination im Wasser festgestellt, die aber nach der Dekontamination wieder vollständig unterdrückt wurde.

Auf den Abklatsch- bzw. Abstrichpräparaten von den Innenflächen des unbehandelten Brutschrankes wurde an allen Tagen (außer am 7. und 35. Tag) eine Pilzkontamination gefunden. Beim UV/Ozon-

Tab. 1: Pilz-Wachstum im CO₂-Brutschrank

Tag	Brutschrank 1 UV/Ozon-behandelt			Brutschrank 2 unbehandelt		
	von 12 Schalen „A“	von Abklat. „B“	Wasser „C“	von 12 Schalen „A“	von 6 Abklat. „B“	Wasser „C“
1 V	-	1/1	1	-	4/9	1
1 N	-	5/kW	-	-	2/kW	-
7 V	2/6	2/4	kW	5/6	2/3	8
7 N	10/kW	4/kW	-	7/kW	4/kW	-
14 V	1/7	2/4	kW	1/1	1/4	80
14 N	11/kW	4/kW	-	11/kW	5/kW	-
21 V	1/1	6/kW	kW	2/6	2/11	260
21 N	11/kW	-	-	10/kW	4/kW	-
28 V	1/1	6/kW	kW	3/10	2/2	200
28 N	11/kW	-	-	9/kW	4/kW	-
35 V	12/kW	6/kW	kW	3/8	2/4	243
35 N	-	-	-	9/kW	4/kW	-
42 V	1/4	6/kW	8	4/7	3/6	261
42 N	11/kW	-	-	8/kW	3/kW	-
	-	6/kW	kW	-	-	-
	-	-	-	-	-	-

Spalte „A“ gibt die Anzahl der kontaminierten Schalen und die Zahl der Pilzkolonien an. Kontaminierte Schalen wurden durch neue ersetzt.

Spalte „B“ gibt die Anzahl der kontaminierten Abklatsche/Abstriche und die Zahl der Pilzkolonien an. Kontaminierte Schalen wurden durch neue ersetzt.

Spalte „C“ gibt die Pilz-Kolonienzahl pro ml Wasser an.

„V“ gibt den Wert jeweils vor der UV/Ozon-Behandlung an.

„N“ gibt den Wert jeweils nach der UV/Ozon-Behandlung an.

„kW“ = kein Wachstum (0)

behandelten Brutschrank war eine Kontamination an den Tagen 1, 7, 14 – allerdings nur vor der Dekontamination – zu beobachten. An allen anderen Tagen war sowohl vor als auch nach der Sterilisation keine Kontamination mit Pilzen zu finden.

Im unbehandelten Brutschrank wurde an jedem Untersuchungstag in den 12 Petrischalen eine Pilzkontamination festgestellt. Jeweils 1 bis 5 Schalen waren kontaminiert. Beim UV/Ozon-behandelten Brutschrank waren jeweils 1 bis 3 Schalen kontaminiert. Am 35. Untersuchungstag war keine der 12 Schalen kontaminiert.

Das in den beiden Brutschränken ermittelte Pilz-Wachstum (Tab. 1) wurde nochmals in Abbildung 3 graphisch gegenüber gestellt.

Der durchschnittliche Verkeimungsgrad beträgt beim UV/Ozon-behandelten Brutschrank nur 1/5 des unbehandelten Brutschrankes.

Mittlerweile wurden auch die Versuche mit Erfolg abgeschlossen, um Sicherheitswerkbanken der Klasse II, mit diesem Verfahren zu dekontaminieren.

Generell kann dieses Verfahren der Dekontamination (Desinfektion) immer dort angewendet werden, wo es sich um geschlossene Arbeitssysteme handelt.

