

40 Jahre Spiralplattieren

Dr. Andreas Lamanda, Dipl. phil. nat. Lars Bosshard¹, Dr. Rainer Lehmann¹

Die Bestimmung der Keimzahl setzt sich aus vielen einzelnen Arbeitsabläufen zusammen und gehört in vielen Labors zu den etablierten Routineprozeduren. 1973 setzte mit der Entwicklung des ersten Prototypen eines Spiralplattierers die Automatisierung des Verdünnungs- und des Ausplattier-Schrittes ein. Die Spiralplattierer wurden in den vergangenen vier Jahrzehnten immer weiter entwickelt und stellen heute eine gleichwertige Alternative zur klassischen seriellen Verdünnung inkl. Ausplattierung bei erheblich niedrigeren Kosten dar.

Die klassische serielle Verdünnung

Agarplatten werden in der Mikrobiologie in Routineprozeduren zur Bestimmung der Bakterienzellzahl eingesetzt, eine Methode, die 1880 im Zuge der Entwicklung von Wachstumsmedien von Robert Koch entwickelt worden ist. Auf der Oberfläche einer Agarplatte, die ein Wachstumsmedium aus Kohlehydraten, Peptiden, Salzen und Agar enthält, wird eine Probe, mit den für das menschliche Auge unsichtbaren Bakterien verteilt.

Da die Bakterien in diesem Milieu ideale Lebensbedingungen vorfinden, teilen sie sich so, dass aus jedem vorhandenen Bakterium ein für das bloße Auge sichtbarer Bakterienhaufen, eine so genannte Kolonie entsteht. Da jedes am Anfang in der Probe vorhandene Bakterium genau eine Kolonie bildet, kann man durch Auszählen der Kolonien die Lebendzellzahl an Bakterien in der ausplattierten Bakteriensuspension ermitteln. Damit sich die Kolonien nicht gegenseitig beeinflussen, werden nur Kolonien mit ausreichend hohem Abstand zueinander ausgezählt. Diese Bedingung ist in der Regel gegeben, wenn pro Agarplatte 30 bis 300 Kolonien vorhanden sind (Breed R. and Dotterer W., The number of colonies allowable on satisfactory agar plates. New York Agricultural Experimental Station Technical Bulletin No. 53, 1916). Die Herausforderung für den Experimentator besteht nun darin, die vorhandene Probe so zu verdünnen, dass nach der Inkubation eine auszählbare Anzahl Kolonien auf der Platte vorhanden ist. Bis 1973 behalf man sich damit, von der Ausgangssuspension eine serielle Verdünnung um den Faktor Zehn herzustellen. So wurden zum Beispiel, wie in Bild 1 gezeigt, fünf Verdünnungen von 1/10 bis 1/100'000 hergestellt und ausplattiert. Da in diesem Beispiel die Probe und die 1/10 bis 1/1000 Verdünnungen der Probe zu viele Kolonien enthalten, die 1/100'000 jedoch zu wenige, wird die 1/10'000 Verdünnung ausgezählt und die Anzahl gezählter Kolonien mit dem Faktor 10'000 multipliziert. Es ist durchaus möglich, dass eine Probe 10^{10} Keime

pro ml enthält und man die Verdünnung bis 10^{-8} durchführen muss. Sowohl das Verdünnungsmedium als auch das Medium für die Agarplatten müssen vorgängig hergestellt (autoklaviert) und kühl gelagert werden, was je nach der Anzahl Proben einen erheblichen Zeit, Material, Energie-Aufwand und Kostenaufwand darstellen kann.

durch das Aufbringen einer Archimedes Spirale (Bild 2) auf eine rotierende Agarscheibe ein ähnlicher Verdünnungseffekt erreichen lies, wie durch eine seriellen Verdünnung im Reagenzglas. Durch die Rotation der Agarplatte werden im Innern der Platte mehr μ l pro Millimeter aufgetragen als Aussen. Das Resultat ist eine serielle Verdünnung über fünf Grössenord-

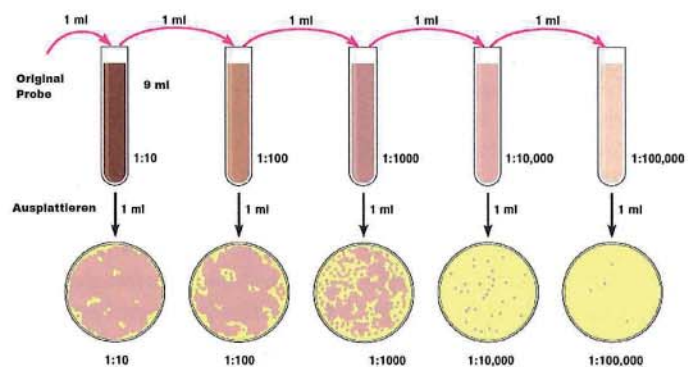


Bild 1 Serielle Verdünnung mit Reagenzröhrchen

Die Erfindung des Spiralplattierens 1973

Im Jahr 1973 revolutionierten J.E. Gilchrist und seine Kollegen mit ihrem wegweisenden Artikel «Spiral Plate Method for Bacterial Determination» die alt bewährte Methodik (Applied Microbiology, Feb 1973, p. 244-252). Die Autoren präsentierten eine damals völlig neue Methode zur seriellen Verdünnung von Bakterienkulturen, das Spiralplattieren. Damit liess sich der Einsatz an Material, Energie und Zeit auf einen Schlag um 80% reduzieren. Gilchrist zeigte in seinem Artikel, dass sich

nungen (Log-Einheiten) auf einer einzigen Agarplatte, siehe Bild 3. Die Autoren zeigten auf, dass Spiralplattieren den herkömmlichen Verdünnungsmethoden bezüglich der Resultate völlig ebenbürtig ist, dazu aber den Vorteil der teils massiven Einsparungen an Material und Zeit hat. Denn im Vergleich zur alt bekannten Verdünnung mit der «Reagenzglas Methode» lassen sich 4 von 5 Agarplatten einsparen und die Herstellung von RGs mit Verdünnungsmedium entfällt völlig. Im gleichen Artikel wurde der Prototyp eines Spiralplattierers vorgestellt, siehe Bild 4. Der noch

¹ Lebensmittelmikrobiologie, Institut für Lebensmittelwissenschaften, Ernährung und Gesundheit der ETH Zürich

«experimentell» wirkende Prototyp markierte den Startpunkt zur Entwicklung immer neuerer Geräte. Nach vierzig Jahren Weiterentwicklung sind Spiralplattierer heute in vielen Labors im Einsatz. Die Anwender kommen aus der Lebensmittelkontrolle, der Pharmazeutischen Industrie, medizinische Mikrobiologie, mikrobiellen Grundlagenforschung oder der Produktion von Schmierölen.

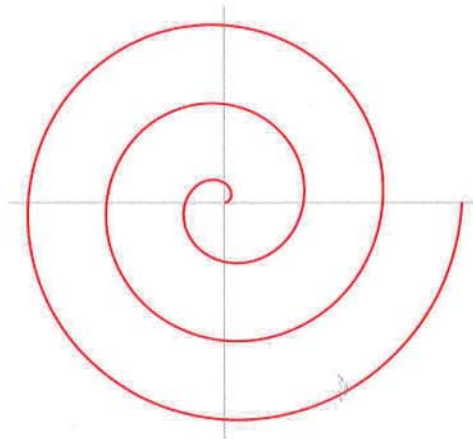


Bild 2 Archimedische Spirale
nach f: $\rightarrow (r\cos\delta, r\sin\delta) = (a\delta\cos\delta, a\delta\sin\delta)$

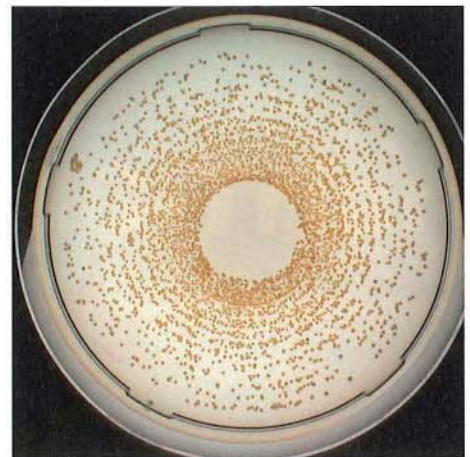


Bild 3 Spiralplattierte Bakterienkolonien nach der Bebrütung

Spiralplattieren 2013

Die 1973 nach der Methode von Gilchrist erhaltenen Keimzahlen waren gut reproduzierbar, aber oft etwas höher (ca. 10%) als die mit der konventionellen Methode erhaltenen Werte. Gilchrist erklärte diese leichte Abweichung als Folge einer Vielzahl von Parametern, welche die Ausplattierung beeinflussen können (Grösse der Spritze, Geschwindigkeit mit der der Kolben gedrückt wird usw.). Indem er die Versuche von fünf «neutralen Testpersonen» wiederholen liess, schloss er sich selber als Fehlerquelle aus. Gilchrist's Prototyp brachte die erwähnte Einsparung an Material, Zeit und Kosten, benötigte aber immer noch zwei Minuten für eine Plattierung und die Reinigung des Teflon Stylus war recht umständlich. Im Vergleich dazu benötigen die neueste Generation von Spiralplattieren nur noch rund 30 Sekunden für eine Plattierung und die Reinigung läuft entweder voll automatisch oder ist gar nicht nötig, weil Einweg Pipettenspitzen zum Einsatz kommen. Für einen vollen Verdünnungszyklus (10 Logeinheiten) inkl. Vorverdünnung, Ausplattieren und Reinigung des Stylus (Auftrageröhrchens) benötigt ein Gerät 220 Sekunden. Lars Bosshard vom Labor für Lebensmittelmikrobiologie der ETH Zürich hat unter der Leitung von Dr. Rainer Lehmann einen Spiralplattierer der neuesten Generation unter die Lupe genommen, siehe Bild 5. Dieses Gerät ist in der Lage eine Vorverdünnung um fünf Logein-

heiten der zu bestimmenden Lösung durchzuführen. Jede der so erhaltenen Verdünnungsstufen kann ausplattiert werden und somit um weitere fünf (10 cm Teller) oder 7 (15 cm Teller) Logeinheiten verdünnt werden.

Lars Bosshard führte einen statistischen Vergleich (Lineare Regression und Bland-Altman-plot) der klassischen Methodik mit der Spiral-Methodik durch. Dabei wurden Suspensionen von Staphylococcus aureus und Klebsiella pneumoniae der Zelldichte 5×10^2 bis 5×10^5 cfu/ml, nach der klassischen und der Spiral-Methodik verdünnt und verglichen. Für die Staphylococcus aureus Proben wurde eine sehr gute Übereinstimmung gefunden und für Klebsiella pneumoniae wurde kein statistisch relevanter Unterschied zwischen den beiden Methoden gefunden. Die heutigen Spiralplattierer sind der manuellen Methode völlig ebenbürtig, sparen aber viel Zeit, Energie und Geld. Die Uniformität der Kolonien-Muster ist bei der automatischen Kolonienzählung von Vorteil, Gilchrist hatte dies schon 1973 vorhergesehen.

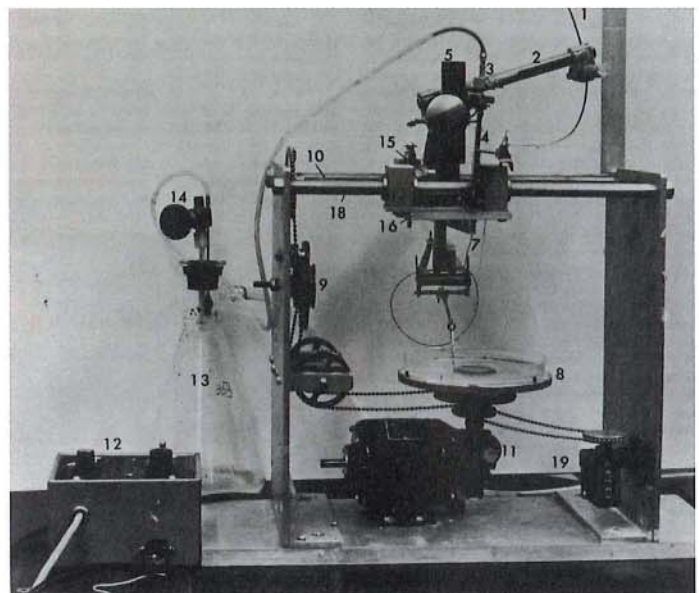


Bild 4 Der von J.E. Gilchrist und Kollegen entwickelte Prototyp Spiralplattierer



Bild 5 EasySpiralDilute Spiralplattierer mit vollautomatischer Vorverdünnung