

3 Sterilisation und Keimreduzierung

Mikroorganismen, besonders Bakterien, sind allgegenwärtig (ubiquitär); es gibt nahezu keinen Standort, den sie nicht besiedeln. Deshalb müssen Nährböden, Kulturgefäße und sonstige Geräte, die zur Kultivierung eines bestimmten Mikroorganismus verwendet werden sollen, in der Regel **steril** sein, d.h. sie müssen zunächst von allen lebenden Mikroorganismen befreit und anschließend vor erneuter **Kontamination** (= Einschleppung unerwünschter Mikroorganismen) geschützt werden. Das erste wird erreicht durch Sterilisation, das zweite durch konsequente Anwendung der sterilen Arbeitstechnik (s. S. 37 ff.).

Steril oder keimfrei bedeutet: frei von vermehrungsfähigen Mikroorganismen einschließlich deren Ruhestadien oder Dauerformen (z.B. Sporen). Unter Sterilisation versteht man folglich die Beseitigung oder Abtötung aller Mikroorganismen (sowie die Inaktivierung von Viren), wobei die abgetöteten Keime im sterilisierten Gut verbleiben können.

(Als Keime bezeichnet man ganz allgemein nicht näher definierte, vermehrungsfähige Mikroorganismen.)

Sterilität ist in der Regel die unbedingte Voraussetzung für mikrobiologisches Arbeiten. Sie ist im Prinzip ein absoluter Begriff; es gibt keine „teilweise“ oder „ausreichende Sterilität“, sondern nur die Wahl zwischen „steril“ und „unsteril“. In der Praxis wird Sterilität in dieser absoluten Bedeutung jedoch selten erreicht. Bei allen Sterilisationsverfahren muss man mit einer, wenn auch geringfügigen, **Kontaminationswahrscheinlichkeit** (Überlebenswahrscheinlichkeit) rechnen, die beim zuverlässigsten Verfahren, dem Autoklavieren, in der Größenordnung von 10^{-6} liegt, d.h. von 10^6 Keimen in einer Probe überlebt im Durchschnitt einer. Eine derart geringe Kontaminationsrate ist allerdings für die Praxis im Allgemeinen ohne Bedeutung.

Es gibt kein universelles Sterilisationsverfahren. Die Auswahl des Verfahrens hängt ab von den Eigenschaften des zu sterilisierenden Gutes, vor allem von seiner Beständigkeit gegenüber dem wirksamen Agens (s. Tab. 1), aber auch von Art und Umfang der Kontamination. Die einzelnen Verfahren sind durchaus nicht gleich wirksam. Wenn immer möglich, sollte man mit Hitze im rekontaminationssicheren Endbehälter sterilisieren, wobei das Autoklavieren die größte Sicherheit bietet.

Tab. 1: Einsatz der einzelnen Sterilisationsverfahren im Labor

I. Autoklavieren

a) im einwandigen Autoklav

- infektiöses Material (Vernichtungssterilisation)
- wässrige Lösungen mit nicht hitzeempfindlichen Substanzen (auch Aminosäuren außer Glutamin und Glutaminsäure)
- Nährböden (möglichst in kleinen Portionen [121 °C, 15 min]; bei synthetischen Nährböden Zucker getrennt autoklavieren [115 °C, 30 min], besser sterilfiltrieren)
- Geräte aus Metall, Glas, Polypropylen, Polymethylpenten (TPX), Polytetrafluorethylen (PTFE, Teflon)
- Membranfilter, komplette Filtrationseinheiten
- Siliconstopfen

Nur eine begrenzte Anzahl von Sterilisationen vertragen:

- Geräte aus Polycarbonat¹⁾ (max. 20 min bei 121 °C), Polysulfon¹⁾
- Gummistopfen

Tab. 1: Fortsetzung

b) im doppelwandigen Autoklav mit Vakuumpumpe

wie a), zusätzlich:

- leere Gefäße
- Absaugvorrichtungen
- Watte, Mull, Verbandstoffe
- Textilien
- Papier
- Schläuche, Handschuhe u.ä. aus Gummi (vertragen nur eine begrenzte Anzahl von Sterilisationen) und aus Silicongummi

II. Trockene Heißluft

- Geräte aus Metall, Glas, Porzellan, Polytetrafluorethylen (PTFE, Teflon), Polymethylpenten¹⁾ (TPX; nur 160 °C !), Polysulfon¹⁾ (nur 160 °C !), Silicongummi
- leere Metall-, Glas- und Porzellengefäße (jedoch ohne Watte-, Zellstoff- und Gummistopfen oder Gummidichtungen)
- Glaspipetten
- Paraffin

III. Sterilfiltration

- Lösungen mit hitzeempfindlichen Substanzen (z.B. Vitaminen, Proteinen, Glutamin, Glutaminsäure, Harnstoff, eventuell Zuckern)
- Gase

¹⁾ Der Kunststoff verliert durch wiederholtes Sterilisieren an mechanischer Festigkeit und soll dann keinen hohen mechanischen Belastungen (z.B. Zentrifugation, Vakuum) mehr ausgesetzt werden.

3.1 Abtötung durch Hitze

Die Abtötung von Mikroorganismen durch Hitze beruht in erster Linie auf der Denaturierung der Zellproteine und – bei trockener Hitze – auf der Oxidation intrazellulärer Bestandteile. Mikroorganismen werden durch feuchte Hitze schon bei niedrigeren Temperaturen abgetötet als durch trockene Hitze. Sie sind jedoch auch gegenüber ein und demselben Abtötungsverfahren unterschiedlich anfällig. Der Grad der **Empfindlichkeit** und das **Ausmaß der Abtötung** sind abhängig von

- der Art der Mikroorganismen
- ihrem Alter und Funktionszustand (vegetative Zellen oder Sporen)
- den Milieubedingungen (z.B. dem pH-Wert)
- der Ausgangskeimzahl.

Die Abtötung einer Mikrobenpopulation geschieht nicht schlagartig, sondern folgt einer Wahrscheinlichkeitsfunktion. Die Zahl der überlebenden Zellen nimmt in der Regel **exponentiell** mit der Zeit ab, d.h. in gleichen Zeitspannen stirbt immer der gleiche Prozentsatz der jeweiligen Ausgangskeimzahl ab. Daraus folgt: Je höher die Ausgangskeimzahl (der Grad der Kontamination), desto länger (oder höher) muss erhitzt werden. Entsprechendes gilt auch für die anderen Verfahren der Sterilisation und Keimreduzierung.

Zur Charakterisierung des **Wirkungsgrades** der Hitzesterilisation und anderer Sterilisationsverfahren gegenüber einem bestimmten Mikroorganismus verwendet man häufig den *D*-Wert.

Tab. 2: Die Abtötung von Mikroorganismen durch feuchte Hitze (nach Wallhäußer, 1987, 1995, verändert)¹⁾

Temperatur (°C)	Einwirkungszeit	abgetötete Mikroorganismen	D-Wert (von Leitkeimen)
61,5 ²⁾	30 min	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Brucella</i> , <i>Listeria</i> , pathogene Streptokokken	$D_{61,5^\circ\text{C}} = 2 - 3 \text{ min}$
72 ²⁾	15 s	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , Rickettsien	$D_{72^\circ\text{C}} = 1 - 2 \text{ s}$
80	30 min	} die meisten vegetativen Bakterien, Hefen und Schimmelpilze	
100	5 min		
100	15 – 30 min	} Sporen von <i>Bacillus anthracis</i>	
105	5 min		
115 – 134	15 min	Sporen von <i>Clostridium perfringens</i> und <i>C. sporogenes</i>	$D_{115^\circ\text{C}} = 2,8 - 3,6 \text{ min}$ $D_{121^\circ\text{C}} = 0,8 - 1,4 \text{ min}$
121	15 min	Sporen von <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ³⁾ sowie nahezu aller anderen Endosporenbildner	$D_{121^\circ\text{C}} = 1,5 - 3,3 \text{ min}$
134	3 min	Sporen von <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ³⁾	$D_{134^\circ\text{C}} = 10 - 15 \text{ s}$

¹⁾ Wallhäußer, K. H. (1987), BTF Biotech-Forum 4, 90 – 97; Wallhäußer, K. H. (1995), Praxis der Sterilisation – Desinfektion – Konservierung, 5. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

²⁾ = Niederpasteurisierung

³⁾ früher: *Bacillus stearothermophilus*

Der *D*-Wert (= dezimale Reduktionszeit) ist die Zeit, die erforderlich ist, um unter genau festgelegten Bedingungen, z.B. bei einer bestimmten Temperatur, die Ausgangskeimzahl um eine Zehnerpotenz, d.h. um 90 %, herabzusetzen.

Die verwendete Temperatur wird als tiefgestellter Index hinter dem *D* angegeben, z.B. $D_{100^\circ\text{C}}$ = dezimale Reduktionszeit bei 100 °C.

Vegetative Zellen von Mikroorganismen werden meist schon bei relativ niedrigen Temperaturen rasch abgetötet; sehr hitzeresistent sind dagegen die **Endosporen** der endosporenbildenden Bakterien, z.B. der Gattungen *Bacillus* und *Clostridium* (s. Tab. 2; Tab. 5, S. 15). Da man es in der Sterilisationspraxis gewöhnlich mit Mischpopulationen unbekannter Zusammensetzung zu tun hat, muss das verwendete Verfahren auf die Abtötung der resistentesten Formen in der Population ausgerichtet sein, und das sind normalerweise die bakteriellen Endosporen.

3.1.1 Feuchte Hitze

3.1.1.1 Autoklavieren (Dampfsterilisation)

Das einzige **zuverlässige Sterilisationsverfahren** mit feuchter Hitze und zugleich die sicherste Sterilisationsmethode überhaupt ist das Autoklavieren, d.h. die Sterilisation mit gespanntem (= unter Druck stehendem), gesättigtem Wasserdampf. Bei diesem Verfahren erhitzt man Wasser in einem geschlossenen Druckbehälter, dem Autoklav oder Dampfsterilisator, und erreicht bei Dampfdruckwerten oberhalb des Atmosphärendrucks die zur Abtötung der Endosporen notwendigen Dampftemperaturen von über 100 °C (s. Tab. 2; Tab. 3, S. 10).

Der Autoklav

Hauptbestandteil des Autoklavs ist ein mit einem Deckel dicht verschließbarer Druckkessel, die Sterilisierkammer. Der untere Teil des Kessels ist mit Wasser gefüllt, das durch eine elektrische Heizung zum Verdampfen gebracht werden kann.

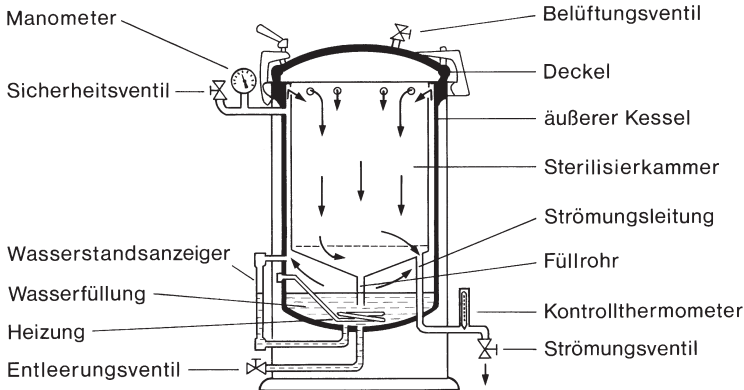


Abb. 1: Doppelwandiger Vertikalautoklav, schematischer Längsschnitt

Man unterscheidet

- nach der Lage der Sterilisierkammer bzw. der Beschickungsrichtung vertikale und horizontale Autoklaven
- nach dem Bau der Sterilisierkammer ein- und doppelwandige Autoklaven.

Im mikrobiologischen Labor verwendet man in erster Linie **Vertikalautoklaven** (Standgeräte) mit einem Nutzrauminhalt (= Fassungsvermögen der Sterilisierkammer) von ca. 60–200 l (Abb. 1). Eine Deckelverriegelung mittels mehrerer, einzeln zu bedienender Randverschlüsse ist weniger reparaturanfällig als ein zentraler Deckelverschluss. Zur notwendigen Ausstattung gehört die selbsttätige Regelung des Betriebsdruckes oder der Temperatur sowie eine Zeitschaltuhr für mindestens 60 (besser 120) min. Autoklaven zur Sterilisation von Flüssigkeiten müssen gemäß den Technischen Regeln für Druckbehälter (TRB 402 und 404) eine vollautomatische Programmsteuerung und -überwachung sowie eine automatische Deckelverriegelung (Thermosperre) besitzen (s. S. 10, 12).

Besonders preiswert, und einfach zu handhaben, sind **Topfautoklaven** mit einem Nutzrauminhalt von ca. 10 – 40 l. In ihnen lassen sich einzelne Geräte schnell und wirtschaftlich sterilisieren. Man muss jedoch gerade bei diesen meist sehr einfach gebauten Dampfsterilisatoren auf ausreichende Betriebssicherheit (z.B. bei der Deckelverriegelung oder beim Sicherheitsventil) achten.

Horizontalautoklaven dienen als Tischgeräte (Nutzrauminhalt ca. 15 – 50 l) ebenfalls zur Sterilisation kleinerer Mengen oder Teile in Labor und Arztpraxis, oder sie finden als Schrank- und Großraumautoklaven mit einem Fassungsvermögen bis zu mehreren 1000 l in Klinik und Industrie Verwendung.

Vertikal- und Horizontalautoklaven gibt es in einwandiger Ausführung mit nur einer einfachen Kammer oder als doppelwandige Geräte, bei denen die Sterilisierkammer noch von einem zweiten Kessel umgeben ist (Abb. 1). Beide Kammern lassen sich häufig völlig voneinander trennen. Die unterschiedlichen Einsatzbereiche der beiden Autoklaventypen zeigt Tab. 1, I (S. 5f.).

Im **einwandigen Autoklav** kühlt das sterilisierte Gut rasch ab, ist aber in der Regel bei der Entnahme nicht trocken. (Wenn man das Gut genügend heiß entnimmt, trocknet es unter Umständen spontan aufgrund seiner Eigenwärme.) **Doppelwandige Autoklaven** sind universeller verwendbar als einwandige Geräte. Sie haben eine günstigere Dampfführung und können mit einer Vakuumpumpe ausgerüstet werden, die vor der Sterilisation die Luft weitgehend aus dem Sterilisiergut entfernt (Vorvakuum). Dies ist notwendig, wenn das Sterilisiergut viele Hohlräume enthält, aus denen sich die Luft nur schwer verdrängen lässt (vgl. Tab. 1). Noch effektiver ist ein mehrfach wiederholtes Evakuieren mit nachfolgendem Dampfeinlass (fraktioniertes Vakuumverfahren). Außerdem kann das sterilisierte Material trocken entnommen werden, da die Vakuumpumpe nach dem Autoklavieren den Wasserdampf aus dem Nutzraum abzieht (Nachvakuum).

Wegen der von heißem, gespanntem Wasserdampf ausgehenden Gefahren müssen alle Autoklaven vor Inbetriebnahme und auch später in regelmäßigen Abständen durch einen Sachverständigen des Technischen Überwachungsvereins bzw. durch einen Sachkundigen auf ihre Betriebssicherheit überprüft werden. Die Qualifikation des Prüfers sowie die Art und Häufigkeit der Prüfungen sind in der **Druckbehälterverordnung** festgelegt und abhängig vom Druckinhaltsprodukt (= zulässiger Betriebsüberdruck in bar \times Rauminhalt des Druckraums in Litern) des Autoklavs.

Verlauf der Dampfsterilisation

Der zeitliche Ablauf des gesamten Sterilisationsprozesses (= Betriebszeit) gliedert sich in mehrere Abschnitte:

1. Die **Anheizzeit** umfasst die Zeitspanne vom Einschalten der Heizung bis zum Erreichen einer Temperatur von 100 °C am Dampfaustritt. Im doppelwandigen Vertikalautoklav (Abb. 1), wie er im Labor hauptsächlich verwendet wird, steigt der am Grunde des äußeren Kessels erzeugte Dampf im Mantelraum auf, dringt in die Innenkammer ein und strömt dort von oben nach unten durch das Sterilisiergut. Dabei verdrängt er die spezifisch schwerere Luft über die am Boden des Innenraums abgehende Strömungsleitung und das geöffnete Strömungsventil (Entlüftungsventil) aus der Sterilisierkammer (Gravitationsverfahren).

Wichtig ist, dass die Luft möglichst vollständig aus dem Autoklav und dem Sterilisiergut entfernt und durch gesättigten Wasserdampf ersetzt wird. Bleiben mehr als etwa 10 % Luft zurück, so wird die erforderliche Sterilisiertemperatur nicht erreicht, denn Dampf-Luft-Gemische besitzen bei gleichem Druck eine niedrigere Temperatur als reiner Wasserdampf. Entscheidend für den Sterilisationserfolg ist jedoch die Temperatur, nicht der Druck! Deshalb muss nicht nur der Dampfdruck am Manometer des Autoklavs, sondern stets auch die **Dampf Temperatur** überwacht werden. Dies geschieht mit einem Thermometer, das vor dem Strömungsventil angebracht ist. Eine Dampf Temperatur von 100 °C zeigt an, dass die Luft aus dem Innenraum entfernt ist; darauf wird das Strömungsventil gedrosselt. Wenn allerdings das Sterilisiergut porös oder zu dicht gepackt ist, können Luftinseln zurückbleiben, die den Sterilisationserfolg beeinträchtigen. Hier hilft der Einsatz eines Vakuumverfahrens.

2. In der **Steigezeit** erfolgt der Druckanstieg im Autoklav. An ihrem Ende müssen in der Sterilisierkammer die geforderte Betriebstemperatur (= Sterilisiertemperatur; im Normalfall 121 °C) und der entsprechende Druck laut Tab. 3 erreicht sein.
3. Da die Sterilisiertemperatur im zu behandelnden Gut erst einige Zeit später erreicht wird als in der Kammer (thermisches Nachhinken), ist eine **Ausgleichszeit** erforderlich, während der alle Stellen des Sterilisiergutes die gewünschte Temperatur annehmen. Bei neueren Autoklaven misst man die Sterilisiertemperatur mit Hilfe eines flexiblen Temperaturfühlers (Thermoelements) direkt im Gut, z.B. in einer flüssigkeitsgefüllten Referenzflasche. Für

die Sterilisation von Flüssigkeiten ist dies gemäß den Technischen Regeln für Druckbehälter zwingend vorgeschrieben (vgl. S. 12).

4. Erst nach Ablauf der Ausgleichszeit beginnt die **Abtötungszeit**. Häufig lässt sich jedoch nicht zwischen Ausgleichs- und Abtötungszeit unterscheiden; deshalb fasst man beide Abschnitte auch als **Sterilisierzeit** zusammen. Die Sterilisierzeit beträgt im Normalfall (Standardverfahren, auch als „Overkill“-Verfahren bezeichnet) bei einer Temperatur von **121 °C** einschließlich eines Sicherheitszuschlags **20 min**.

Tab. 3: Temperatur und Dampfdruck von gesättigtem Wasserdampf

Temperatur in °C	Dampfdruck ¹⁾ in				
	kPa ²⁾	bar	atm ³⁾	at ⁴⁾ = kp/cm ²	mmHg ⁵⁾ (Torr)
100,0	101	1,01	1,00	1,03	760
105,3	122	1,22	1,20	1,24	912
109,7	142	1,42	1,40	1,45	1064
115,2	170	1,70	1,68	1,74	1277
120,6	203	2,03	2,00	2,07	1520
133,9	304	3,04	3,00	3,10	2280

Seit der Umstellung auf SI-Einheiten⁶⁾ 1978 sind nur noch die Druckeinheiten **Pascal** und **Bar** gesetzlich zulässig.

Da man jedoch die veralteten Einheiten auf älteren Manometern und in der älteren Literatur noch antrifft, sind sie in der Tabelle mit aufgeführt.

100 kPa (kN/m²) = 1 bar = 0,987 atm = 1,020 at (kp/cm²) = 750 mmHg (Torr) = 14,5 psi (lbf/in²)

1) = absoluter Druck (Gesamtdruck)! Häufig wird auf Manometern, in Bedienungsanleitungen und in der Literatur nur der Überdruck über Atmosphärendruck (= absoluter Druck minus Atmosphärendruck) angegeben.

2) Kilopascal (Pascal = SI-Einheit des Druckes)

3) physikalische Atmosphäre (veraltete Einheit)

4) technische Atmosphäre (veraltete Einheit)

5) Millimeter Quecksilbersäule (veraltete Einheit)

6) SI = Système International d'Unités (Internationales Einheitensystem)

Wenn das Sterilisiergut genügend hitzestabil ist (Glas- und Metallgeräte, reines Wasser, Lösungen anorganischer Substanzen), kann man auch bei 134 °C 5 min lang autoklavieren; für Nährböden in kleinen Portionen werden 121 °C und 15 min, für Lösungen mit empfindlichen Substanzen, z.B. Zuckern, 115 °C und 30 min empfohlen. Beim Autoklavieren großer Flüssigkeitsvolumina kann sich die Sterilisierzeit wegen der längeren Ausgleichszeit erheblich verlängern (s. Tab. 4, S. 13). Dies gilt in noch stärkerem Maße für Nährböden, die Agar enthalten.

5. In der anschließenden **Abkühlzeit** geht der Überdruck im Autoklav auf Atmosphärendruck zurück. Der Druckausgleich darf insbesondere bei der Sterilisation von Flüssigkeiten nicht zu rasch erfolgen. Wird das Entlüftungsventil vorzeitig geöffnet, so kann der Innendruck im sterilisierten Gut der plötzlichen Abnahme des Außendrucks nicht schnell genug folgen, und es kommt zu einem „Überkochen“ der Flüssigkeiten; dabei können z.B. Wattestopfen durchnässt oder herausgeschleudert werden. Verschlossene Kunststoffbehälter und dünnwandige Glasgefäße können platzen, größere oder dickwandige Glasgefäße und -apparaturen durch die im Glas auftretenden Spannungen Sprünge bekommen. Deshalb muss der Autoklav eine automatische Deckelverriegelung besitzen, die den Deckel erst freigibt, wenn die Temperatur im flüssigen Sterilgut auf unter 80 °C gefallen ist und der Behälterdruck weniger als 1,1 bar beträgt.

Vor allem größere Autoklaven besitzen zum Teil eine **Druckausgleichvorrichtung** (Stützdruck- oder Gegendruckprogramm), um durch Einblasen steriler Luft ein Platzen von Gefäßen zu verhindern,

sowie eine **Rückkühlautomatik**, die ein schnelleres Abkühlen großer Flüssigkeitsmengen ermöglicht. Dicht verschlossene Gefäße mit wässrigen Lösungen dürfen nur in Autoklaven mit einem Stützdruckprogramm für den gesamten Sterilisationsprozess sterilisiert werden, da in den Gefäßen während des Autoklavierens ein Innendruck entsteht, der erheblich über dem Druck im Sterilisiererraum liegt.

Durchführung der Sterilisation im Laborautoklav

Vorbereitung des Sterilisierguts¹⁾

Die Zusammensetzung des Sterilisierguts soll möglichst einheitlich sein!

- **Geräte**, besonders solche aus Kunststoff, nach Möglichkeit gründlich reinigen und anschließend mit demineralisiertem Wasser spülen.
- Geräte, Textilien und Gummiwaren in dampfdurchlässiges Material (z.B. Pergamentpapier, Kraftpapier, Polymethylpenten-[TPX-]Folie) oder in Aluminiumfolie (dann nur lose verpacken!) einpacken. Verpackungsmaterial wegen möglicher Beschädigung nicht wiederverwenden. Textilien und Gummiwaren locker packen, nicht zusammenpressen. Bei Gummi- und Siliconteilen (z.B. Handschuhen, Schläuchen) Falten und Knicke vermeiden; ins Handschuhinnere gegen ein Verkleben Zellstoff einschieben, Schlauchenden mit Watte und Pergamentpapier verschließen.
- **Gefäße mit Flüssigkeiten** (z.B. Nährlösungen) höchstens halb voll füllen.
- Dampfundurchlässige **Verschlüsse** nur lose aufsetzen; Schraubverschlüsse mit einer Viertel- bis halben Drehung leicht öffnen. Keine dicht verschlossenen Glas- oder Kunststoffgefäße autoklavieren, es sei denn, der Autoklav verfügt über ein Stützdruckprogramm für die gesamte Sterilisation!
- Watte- und Zellstoffverschlüsse mit einem Stück Pergamentpapier oder Aluminiumfolie abdecken. Pergamentpapier mit zwei Gummiringen befestigen (sicherheitshalber, falls einer beim Autoklavieren reißt), Aluminiumfolie nur lose aufsetzen.
- Gefäße und verpackte Gegenstände mit autoklavenfestem Filzstift (z.B. Edding 3000, schwarz) **beschriften**. Eventuell auf der Verpackung markieren, wo ein Gerät nach der Sterilisation angefasst werden darf.
- Sterilisiergut in Einsatzbehälter stellen oder legen, am besten in stapelbare Drahtkörbe (Gitterkörbe) aus Edelstahl; Wäsche, Verbandstoffe, Gummihandschuhe u.ä. in Siebtrommeln mit Deckel. Sterilisiergut möglichst in **senkrechter** Schichtung anordnen und nicht zu dicht packen. Schläuche flach hinlegen. Leere Gefäße so lagern, dass die Luft herausfließen kann.
- Für die **Vernichtungssterilisation** seitlich und am Boden geschlossene Blecheinsatztrommeln oder Eimer aus Aluminium oder Edelstahl verwenden (s. S. 45).
- Nur Gefäße etwa gleichen Volumens zusammen autoklavieren.

Für das Autoklavieren ohne Vakuum in einem Vertikalautoklav ohne Vollautomatik gilt – je nach Gerät mit gewissen Abänderungen – der nachstehende Arbeitsablauf. Zusätzlich muss die Bedienungsanleitung des betreffenden Autoklavs sorgfältig studiert und beachtet werden!

Autoklavieren

(Zum Aufbau des Autoklavs s. Abb. 1)

- Am Wasserstandsanzeiger Wasserfüllung (Speisewasser) kontrollieren, und gegebenenfalls Wasser nachfüllen. Nur demineralisiertes Wasser verwenden.

¹⁾ Sterilisiergut = zu sterilisierende Materialien; Sterilgut = sterilisierte (sterile) Materialien

In regelmäßigen Abständen (z.B. alle 4 Wochen) bzw. immer dann, wenn im Autoklav Lösungen übergekocht oder ausgelaufen sind, Speisewasser über das Entleerungsventil ablassen, Kessel reinigen und neu mit Wasser füllen.

- Am Temperaturregler (z.B. Kontaktthermometer) oder Druckregler gewünschte Sterilisiertemperatur bzw. -druck einstellen oder überprüfen.
- Strömungsventil (Entlüftungsventil) ganz öffnen.
- Körbe mit Sterilisiergut in den Autoklav einsetzen (empfindliches Gut, z.B. Nährböden, erst dann, wenn das Wasser siedet).
- Beim Autoklavieren von **Flüssigkeiten** einen Temperaturfühler in eine Referenzflasche stecken, die mit demineralisiertem Wasser oder (besser!) mit der zu sterilisierenden Flüssigkeit gefüllt ist (vgl. S. 9f.). Die Referenzflasche muss mindestens so groß und so weit gefüllt sein wie die Gefäße des Sterilisierguts. Die Spitze des Temperaturfühlers soll sich im unteren Drittel der Referenzflasche befinden. Man stellt die Flasche in die Mitte des oberen Einsatzkorbes.
- Autoklavdeckel schließen. Verschlüsse über Kreuz fest, aber – besonders bei kaltem Autoklav – nicht zu fest anziehen. Belüftungsventil schließen.
- Heizung einschalten, Zeitschaltuhr voll aufziehen.
- Wenn dem Strömungsventil Dampf entströmt (über einen Schlauch ins Freie leiten oder in einem Abdampfkondensator kondensieren lassen!) und das Kontrollthermometer 100 °C anzeigt, Strömungsventil noch etwa 5 min geöffnet lassen, dann drosseln, aber nicht völlig schließen. Das Strömungsventil bleibt während der gesamten Betriebszeit ein wenig geöffnet, muss jedoch bei ansteigendem Druck nach und nach weiter gedrosselt werden.
- Wenn die Sterilisiertemperatur und der ihr entsprechende Druck (s. Tab. 3, S. 10) erreicht sind (im Normalfall 121 °C und 2,0 bar), Zeitschaltuhr auf die gewünschte Sterilisierzeit (in der Regel 20 min) zurückdrehen.

Vorgehen nach Ablauf der Sterilisierzeit bei festem Sterilgut:

- Bei nicht bruchempfindlichem Sterilgut das Strömungsventil vorsichtig nach und nach öffnen und den Dampf ablassen (Vorsicht, **Verbrühungsgefahr!**).
Beim Autoklavieren größerer Glasgefäße und -geräte sowie von Kunststoffbehältern den Autoklav abkühlen lassen, bis das Manometer keinen Überdruck mehr anzeigt. Erst dann Strömungsventil langsam ganz öffnen.
- Wenn aus dem Strömungsventil kein Dampf mehr ausströmt, Belüftungsventil öffnen, Deckelverschlüsse lösen und Autoklav öffnen. Wegen der Verbrühungsgefahr Deckel zunächst nur einen Spalt weit anheben (eventuell ein Stück Holz o.ä. zwischen Deckel und Kesselrand legen!), den Dampf entweichen lassen und erst dann ganz öffnen. Hitzeschutzhandschuhe mit langer Stulpe und Schutzbrille tragen!
- Sterilgut sofort aus dem Autoklav herausnehmen und an einem staubfreien, keimarmen Ort durch seine Eigenwärme trocknen lassen.
- Sterilgut trocken und bei gleichbleibender Temperatur in einem staubdichten Schrank aufbewahren und möglichst bald verwenden.

Vorgehen nach Ablauf der Sterilisierzeit bei Flüssigkeiten:

- Den Autoklav erst dann öffnen, wenn die Flüssigkeit auf **unter 80 °C** abgekühlt ist, anderenfalls besteht die Gefahr eines **Siedeverzugs!** Bei vollautomatischem Programmablauf ist für die Sterilisation von Flüssigkeiten eine thermische Sicherheitseinrichtung (Thermosperr) vorgeschrieben, die den Verschluss des Autoklavs blockiert, solange die Temperatur im Sterilgut über 80 °C liegt.
- Nährböden und andere Lösungen mit hitzeempfindlichen Bestandteilen anschließend sofort entnehmen und rasch abkühlen, z.B. unter kaltem, fließendem Wasser (s. S. 88).
- Nur lose aufgesetzte Verschlüsse nach dem Abkühlen andrücken oder fest zuschrauben.

Tab. 4: Sterilisierzeiten im Autoklav bei 121 °C für verschiedene Flüssigkeitsvolumina in Glasgefäßen¹⁾ (Richtwerte)

Einzelvolumen	Sterilisierzeit
bis 50 ml	15 min
50 – 200 ml	20 min
200 – 1000 ml	25 min
1 – 2 l	35 min
10 l	60 – 90 min
20 l	120 – 180 min

Bei größeren Volumina (ab ca. 500 ml) agarhaltiger Nährböden (mit 1 – 2 % Agar) muss man diese Zeiten um 20 – 30 % verlängern.

¹⁾ Für Kunststoffgefäße gelten längere Sterilisierzeiten, da Kunststoffe die Wärme weniger gut leiten als Glas.

Beim **Autoklavieren eines großen Flüssigkeitsvolumens** in **einem** Gefäß dauert es sehr lange, bis die Sterilisiertemperatur auch im Zentrum des Gefäßes erreicht ist. Wird die Temperatur nicht mit Hilfe eines Thermoelements direkt im Sterilisiergut gemessen, muss die Sterilisierzeit entsprechend der längeren Ausgleichszeit verlängert werden (s. Tab. 4). Oft ist es jedoch zweckmäßiger und schonender, nur das leere Gefäß zu autoklavieren; anschließend sterilisiert man die Flüssigkeit durch Filtration (s. S. 26ff.) und füllt sie dabei direkt in den autoklavierten Behälter.

Kontrolle der Dampfsterilisation

Zur Kontrolle einer einwandfreien Sterilisation im Autoklav kann man chemische Indikatoren und Bioindikatoren verwenden.

Bei den **chemischen Indikatoren** (Thermoindikatoren) handelt es sich um Teststreifen oder -etiketten, die man auf das zu sterilisierende Gut aufklebt oder ihm möglichst weit innen, in der Mitte des Guts oder der Sterilisierkammer, beipackt. Auf das Indikatorpapier sind Farbfelder aufgedruckt, die in Abhängigkeit von der Temperatur und ihrer Einwirkungsdauer sowie der Dampfsättigung einen Farbumschlag zeigen. Sie haben den Vorteil, dass man sie ohne weiteren Arbeitsaufwand unmittelbar nach dem Autoklavieren auswerten kann, und eignen sich daher zur regelmäßigen Sterilisationskontrolle.

Um eine Verwechslung zwischen sterilisiertem und unbehandeltem Gut zu vermeiden, kann man **Behandlungsindikatoren** auf das Sterilisiergut aufkleben. Es handelt sich um bedruckte Papierstreifen, Klebebänder oder Etiketten, deren Farbe beim Autoklavieren umschlägt, oder es erscheint der Aufdruck „sterilisiert“. Diese Indikatoren zeigen jedoch nicht an, wie lange eine bestimmte Temperatur eingehalten worden ist.

Zuverlässiger als durch chemische Indikatoren lässt sich der Sterilisationserfolg mit **Bioindikatoren** beurteilen. Ihre Anwendung ist jedoch mit einem gewissen Arbeits- und Zeitaufwand verbunden; deshalb dienen sie in erster Linie zur Überwachung kritischer Sterilisationen und zur Funktionsprüfung von Autoklaven in größeren Zeitabständen. Als Bioindikatoren verwendet man bakterielle Endosporen bekannter Hitzeresistenz, vorzugsweise die besonders hitzeresistenten Sporen des thermophilen, apathogenen *Geobacillus* (früher: *Bacillus*) *stearothermophilus*, Stamm ATCC 7953 (= DSM 5934). Es stehen kommerzielle, standardisierte Sporenpräparate zur Verfügung, entweder in Form von **Sporenstreifen**, d.h. Filtrierpapierstreifen, die mit Endosporen beschickt und in einer dampfdurchlässigen Hülle verpackt sind, oder als **Testampullen**, die eine Sporensuspension enthalten.

Die Präparate werden an den kältesten Stellen, d.h. im unteren und mittleren Bereich des Autoklavs, zwischen das Sterilisiergut gelegt, und zwar bis zu 250 l Nutzrauminhalt mindes-

tens zwei, darüber mindestens sechs Ampullen oder Streifen. Ampullen sollte man wegen der Bruchgefahr in ein Becherglas stellen. Die Sporenpräparate sind so eingestellt, dass die Sporen bei einer Dampftemperatur von 121 °C nach 15 min sämtlich abgetötet sind. Bei niedrigerer Temperatur oder kürzerer Einwirkungszeit überlebt dagegen ein Teil der Endosporen. Nach dem Autoklavieren entnimmt man die Sporenstreifen steril aus der Hülle und bringt sie in eine spezielle Nährlösung mit pH-Indikator. Sicherer und bequemer zu handhaben sind die Testampullen, da sie neben der Sporensuspension bereits die Nährlösung und einen Indikatorfarbstoff enthalten. Man bebrütet die Sporenstreifen oder die ungeöffneten Ampullen bei 55–60 °C für 24–48 Stunden, bei negativem Ergebnis bis zu sieben Tagen. Bleibt die Nährlösung klar und ihre Farbe unverändert, so hat man korrekt sterilisiert. Eine Trübung des Nährmediums und ein Farbumschlag infolge Säurebildung zeigen ein Wachstum der Bakterien und damit eine ungenügende Sterilisation an. Zur Kontrolle wird ein nicht autoklavierter Bioindikator mitbebrütet.

3.1.1.2 Tyndallisieren

Unter Tyndallisieren (J. Tyndall, 1882), auch als **fraktionierte Sterilisation** bezeichnet, versteht man ein dreimaliges Erhitzen von Flüssigkeiten und Nährböden im Wasserbad oder Dampftopf bei 80–100 °C für 30 min an drei aufeinanderfolgenden Tagen. In der Zwischenzeit wird das Gut bei Raumtemperatur aufbewahrt. In dieser Zeit sollen die hitzeresistenten Endosporen, die das vorhergehende Erhitzen überlebt haben, zu vegetativen Zellen auskeimen, die dann beim nächsten Erhitzen abgetötet werden. Das setzt jedoch voraus, dass die behandelte Flüssigkeit ein Auskeimen der Sporen erlaubt. Da dies aber durchaus nicht immer der Fall ist, ist der **Sterilisationserfolg sehr zweifelhaft**. Außerdem ist das Verfahren umständlich und zeitraubend. Am ehesten ist es geeignet für nährstoffreiche, keimarme (vorfiltrierte) Lösungen, die ein Autoklavieren nicht vertragen.

3.1.1.3 Kochen, strömender Dampf

Die einmalige Anwendung feuchter Hitze von 100 °C bewirkt nur eine **Teilentkeimung** und zählt gewöhnlich zu den **Desinfektionsverfahren** (s. S. 19 ff.). Durch 5 min langes Auskochen (z.B. von Geräten), am besten in 0,5%iger Sodalösung, oder durch ≥ 30 min langes Erhitzen in drucklosem, strömendem Wasserdampf in einem offenen Dampftopf werden alle vegetativen Keime abgetötet (vgl. Tab. 2, S. 7), vorausgesetzt, dass sie nicht durch Schmutzhüllen (z.B. aus Fett oder Eiweiß) geschützt sind. Die bakteriellen Endosporen sind jedoch gegen feuchte Hitze bei 100 °C weitgehend unempfindlich. Sie vertragen zum Teil stundenlanges Kochen und können nur durch Autoklavieren abgetötet werden.



<http://www.springer.com/978-3-8274-1813-5>

Mikrobiologische Methoden

Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken

Bast, E.

2014, XVIII, 472 S. 31 Abb., Special Cover Type

ISBN: 978-3-8274-1813-5