

Handhabung der **CRYOBANK**[®] Rekultivierungsstudie & Stammhaltung

Stammhaltung von Mikroorganismen bei -20 °C und -70 °C mit dem Mast **CRYOBANK**[®] System

Für die Aufbewahrung von Stammkulturen ist das Mast **CRYOBANK**[®] System, das Stammhaltungssystem der Mast Diagnostica GmbH, besonders geeignet.

Ursprünglich für eine Aufbewahrung bei -70 °C entwickelt, eignet sich das System auch für die Lagerung bestimmter Organismen bei einer Temperatur von -20 °C.

Die Lagerung von Enterobakterien, *Listeria* spp., *Bacillus* spp., Staphylokokken, Entero-

kokken sowie von einigen Hefen ist auch bei -20 °C durchaus möglich. Hochempfindliche Stämme wie *Haemophilus influenzae* oder *Neisseria gonorrhoeae* sollten bei -70 °C gelagert werden.

Die Rekultivierungsstudie gibt die Monate der Lagerung sowohl bei -20 °C als auch bei -70 °C an, nach denen eine erfolgreiche Kultivierung verschiedener Mikroorganismen erfolgte.



United Kingdom
Mast Group Ltd.
Mast House, Derby Road
Bootle, Merseyside, L20 1EA

Tel: +44 (0)151 472 1444
Fax: +44 (0)151 944 1332

Germany
Mast Diagnostica GmbH
Feldstraße 20
DE-23858 Reinfeld

Tel. +49 (0)4533 2007 0
Fax +49 (0)4533 2007 68

France
Mast Diagnostic
12 rue Jean-Jacques Mention
CS91106, 80011 Amiens, CEDEX 1

Tél: +33 (3) 22 80 80 67
Fax: +33 (3) 22 80 99 22

Stammhaltung von Mikroorganismen mit der barcodierten CRYOBANK®

Die Einführung des Barcodes ermöglicht ein schnelles Scannen sowie eine nachvollziehbare Zuordnung der Proben in der CRYOBANK®. Der Barcode erlaubt außerdem eine lückenlose (Rück-)Verfolgbarkeit und kann mit allen handelsüblichen Barcode-Scannern gelesen werden. Alternativ können die Cryoröhrchen auch weiterhin händisch beschriftet werden.

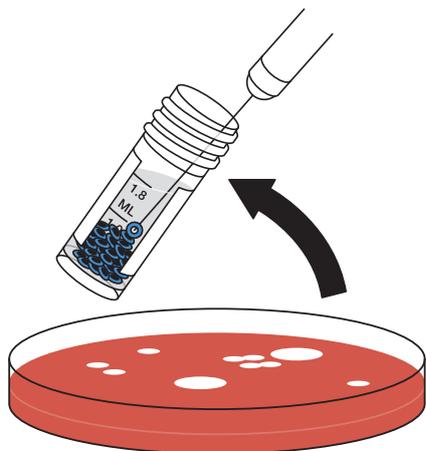


Bild 1: Barcode scannen, um die Probe zuzuordnen. Alternativ Cryoröhrchen mit wasserfestem Stift beschriften und mit der Kultur (Impfösenabstrich oder Suspension) beimpfen.

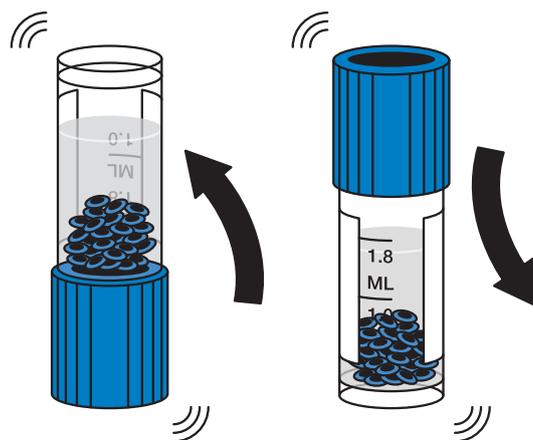


Bild 2: Zur Adhäsion der Mikroorganismen an die Beads die beimpften Cryoröhrchen vorsichtig schütteln (nicht vortexen).

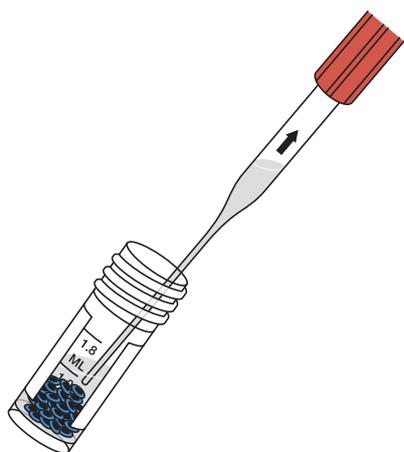


Bild 3: Das Cryomedium vollständig abpipettieren.

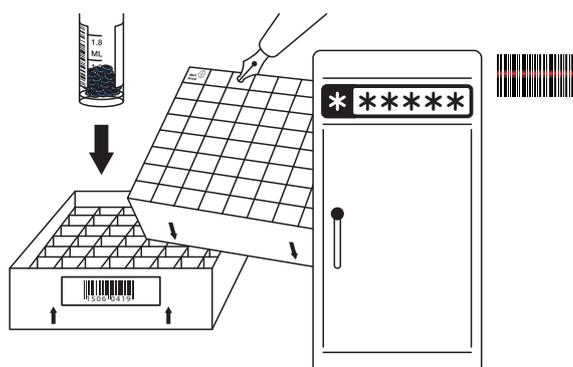


Bild 4: Barcode des Cryoröhrchens scannen und in die Software einfügen. Die CRYOBANK® mit beimpften Cryoröhrchen bei -20 °C bis -80 °C oder in flüssigem Stickstoff aufbewahren.

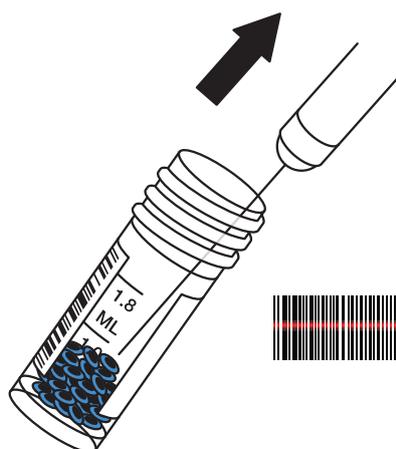


Bild 5: Zur Reaktivierung Barcode des Cryoröhrchens scannen und dann die Beads mit steriler Pinzette oder Nadel entnehmen. Zum Schutz der Kultur vor Auftauen empfiehlt sich die Verwendung des MAST® CRYOBLOCKS.

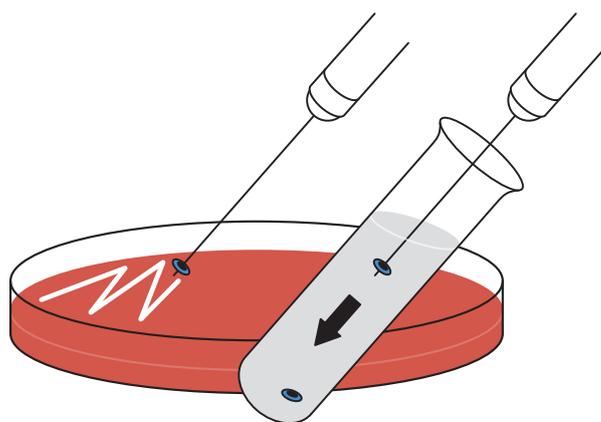


Bild 6: Das entnommene Bead auf festem Medium ausplattieren oder in Flüssigmedium geben.

CRYOBANK® - Rekultivierungsstudie

Mikroorganismus	NCTC	ATCC	NEQAS	Erfolgreiche Rekultivierung nach (Monate)		Empfohlene maximale Lagerungszeit (Jahre)	
				-70 °C	-20 °C	-70 °C	-20 °C
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	5866	15309		108	78	5	3
<i>Aeromonas hydrophila</i>	8049	7966		108	78	5	3
<i>Aspergillus niger</i>				108	24*	5	1
<i>Bacillus cereus</i>		14579		108	78	5	3
<i>Bacillus subtilis</i>	10400	6633		108	24*	5	1
<i>Bacteroides fragilis</i>				108	12*	½	½
<i>Bordetella bronchiseptica</i>		10580		108	70*	5	3
<i>Burkholderia cepacia</i>	10661	17759		108	78	5	3
<i>Campylobacter coli</i>	11366	33559		45*	1*	3	0
<i>Candida albicans</i>		90029		108	18*	5	1
<i>Citrobacter freundii</i>	9750	8090		108	78	5	3
<i>Clostridium difficile</i>	11204			108	70*	5	3
<i>Clostridium perfringens</i>	8237	13124		108	45*	5	2
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>			3091	108	70*	5	3
<i>Cryptococcus neoformans</i>		90112		108	24*	5	1
<i>Edwardsiella tarda</i>	11934			108	78	5	3
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1006	13048		108	70*	5	3
<i>Enterococcus faecalis</i>		29212		108	78	5	3
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>			4024	108	18*	5	1
<i>Escherichia coli</i>		25922		106	12	5	3
<i>Haemophilus influenzae</i>				108	2*	5	0
<i>Hafnia alvei</i>			3030	108	78	5	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		13883		108	45*	5	2
<i>Lactobacillus casei</i>	10302			108	6 *	5	½
<i>Lactococcus lactis</i>	6621			108	78	5	3
<i>Legionella pneumophila</i>	12821			108	45*	5	2
<i>Listeria ivanovii</i>	11846	19119		108	78	5	3
<i>Listeria monocytogenes</i>	5214			108	78	5	3
<i>Moraxella catarrhalis</i>			4062	108	78	5	3
<i>Morganella morganii</i>			3094	108	70*	5	3
<i>Mycobacterium smegmatis</i>				95	70*	5	3
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>				12*	2*	1	0
<i>Pasteurella multocida</i>			4009	108	6*	5	½
<i>Peptostreptococcus assaccharolyticus</i>			3092	95	45*	5	2
<i>Proteus mirabilis</i>		12453		108	24*	5	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10662			108	18*	5	2
<i>Rhodococcus equi</i>	1621	6939		108	45*	5	2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3178			108	45*	5	2
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	12023	14028		108	78	5	3
<i>Serratia marcescans</i>	1377			108	45*	5	2
<i>Shigella sonnei</i>	8574			108	78	5	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	1803			108	24*	5	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	11047	14990		108	78	5	3
<i>Streptococcus pneumoniae</i>				108	2*	5	½
<i>Vibrio cholerae</i>	11348			108	78	5	3
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		17803		108	78	5	3
<i>Yersinia spp.</i>				108	78	5	3
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	3879			108	6*	5	½

Um die Mikroorganismen erfolgreich zu rekultivieren, kann man sie maximal bis zu der mit * gekennzeichneten Anzahl an Monaten bei entsprechender Temperatur lagern.

CRYOBANK® - Stammhaltung von Pilzen

Bei sporenbildenden Pilzen müssen zunächst Sporen gewonnen werden. Diese Sporen werden dann in frischem Wachstumsmedium mit der Konservierungslösung resuspendiert. Der Einfriervorgang der Pilzsporen darf nicht zu lange dauern, um sicherzustellen, dass keine Keimung vor dem Einfrieren stattfindet. Bei nicht-sporenbildenden Pilzen müssen Myzelien vor dem Einfrieren durch geeignete Verfahren gewonnen werden: Bei Pilzen mit festen Myzelien wird die Kultur direkt von der Agarplatte geerntet. Der die Myzelien enthaltende Agarbereich wird abgeschnitten und dann in frisches Wachstumsmedium mit Konservierungslösung überführt. Feste Myzelien, die nicht gut auf Agarplatten haften, werden in einer Bouillon angezchtet und die so entstehenden Myzelien vor dem Einfrieren homogenisiert.

Zelltyp	Zellzahl	Minimale Lagertemperatur
Bakterien	10 ⁷ / mL	-60 °C *
Bakteriophagen	10 ⁸ / mL	-60 °C
Fungi - Hyphen	x	-150 °C
Sporen	10 ⁶ / mL	-150 °C
Hefen	10 ⁷ / mL	-150 °C
Protozoen	10 ⁵ - 10 ⁷ / mL	-150 °C
Algen	10 ⁵ - 10 ⁷ / mL	-150 °C

* Während eine Lagerung bei -60 °C für die meisten Organismen dieser Gruppe adäquat ist, überleben empfindliche Zellen eine längere Lagerung bei dieser Temperatur möglicherweise nicht.

x Myzelien werden für das Einfrieren von Pilzhypen ohne Berücksichtigung der Zellzahl aufbereitet.

Rekultivierung von Pilzen aus den Cryoröhrchen mittels Beads bei -70 °C und -20 °C

Nach 6-monatiger Lagerung wurde *Aspergillus niger* erfolgreich aus bei -20 °C und -70 °C gelagerten Cryoröhrchen rekultiviert. Hierbei war das Wachstum bei -70 °C besser als bei -20 °C. Nach einem Jahr war die Rekultivierung von *Aspergillus niger* immer noch erfolgreich und die Rekultivierungsrate für beide Temperaturen ähnlich. Aus früheren Arbeiten über die Lagerung von Pilzen bei -20 °C (Smith, 1991)¹ ist bekannt, dass Stämme von *Aspergillus*, *Penicillium* sowie verwandten Gattungen bis zu 5 Jahre nach dem Einfrieren rekultiviert werden konnten. Es gibt jedoch auch empfindliche Pilze wie *Martensiomycetes*, einige Oomyceten sowie Wasserschimmelpilze, die bei dieser Temperatur absterben. Im Allgemeinen überleben Pilz-Isolate, die in Kultur gut wachsen, mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Lagerung bei -70 °C und -20 °C.

Verfahren zum Beimpfen von Cryoröhrchen mit Pilzen

Für eine adäquate Lagerung von Pilzen sollten die Cryoröhrchen mit großen Sporenmengen inokuliert werden. Dieser Prozess muss schnell ablaufen (minimale Exposition der Sporen gegenüber Luft), da die Sporen leicht in die Luft gelangen und eine potentielle Gefahr darstellen könnten. Ein kleiner Agarausschnitt wird mit einem Korkbohrer entfernt und in das Cryoröhrchen eingebracht. Das Cryoröhrchen wird dann geschüttelt, damit sich die Sporen verteilen können und das Anhaften der Sporen an die Beads ermöglicht wird. Die überschüssige Flüssigkeit sowie der Agarausschnitt werden entfernt und das Cryoröhrchen bei -70 °C eingefroren. Diese Methode wird auch für Pilze empfohlen, die nur Myzelien ausbilden. Darüber hinaus wird teilweise eine Phase der Kalthärtung der Pilze empfohlen. Hierzu werden die Kulturen in einen Kühlschrank gestellt, um dort für kurze Zeit bei 4–7 °C weiter zu wachsen.

¹ Smith D. Maintenance of Filamentous Fungi. In: Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells. Kirsop BE, Doyle A, editors. London: Academic Press, (1991) 133 – 160.