



Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmittel

DI Erich Ziegelwanger

Inhalt



- ⌘ Grundsätze - aseptisches Arbeiten
- ⌘ Anlegen von Verdünnungsreihen
- ⌘ Koch'sches Gussplattenverfahren
- ⌘ Spatelverfahren
- ⌘ Auswertung Koch und Spatelverfahren
- ⌘ MPN-Verfahren
- ⌘ Auswertung MPN-Verfahren

Begriffe und Definition des aseptischen Arbeitens:

- ⌘ **Keim:** vermehrungsfähiger Mikroorganismus
- ⌘ **Steril:** frei von vermehrungsfähigen Mikroorganismen jeglicher Art (Phagen, Viren, Sporen miteinbezogen)
- ⌘ **Aseptisch:** arbeiten unter Bedingungen, die Fremdorganismen ausschalten
- ⌘ **Kontamination:** Anwesenheit von Fremdorganismen
- ⌘ **Desinfektion:** weitgehende Abtötung von Mikroorganismen auf Oberflächen
- ⌘ **Dekontamination:** weitgehende Abtötung von Mikroorganismen in Nährmedien
- ⌘ **Infektion:** Anwesenheit / Parasitierung eines Organismus durch einen anderen Organismus (patholog. Begriff)

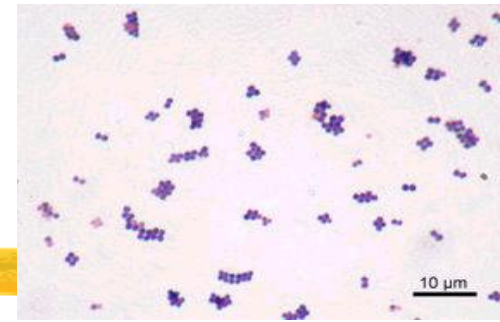
Grundsätze – aseptisches Arbeitens 1

- ⌘ Fenster und Türen geschlossen halten
- ⌘ Arbeitsplatz und Umgebung mit Desinfektionslösung (70% Spiritus)
- ⌘ Husten und Niesen vermeiden
- ⌘ Ränder von Glasgefäßen vor und nach der Entnahme von Material in der entleuchteten Bunsenbrenner-Flamme abflammen

Grundsätze – aseptisches Arbeitens 2

- ⌘ Mundpipettieren ist strengstens verboten!
- ⌘ Pipetten nur am oberen Ende, am Mundstück, berühren
- ⌘ Gefäße nur so lange öffnen, wie unbedingt erforderlich ist und dabei das Gefäß möglichst schräg halten
- ⌘ Sterile Stopfen nur am oberen, aus dem Gefäß ragenden Teil anfassen (zwischen kleinen Finger und Handballen halten, nirgends mit dem sterilen Teil des Stopfens anstößt)

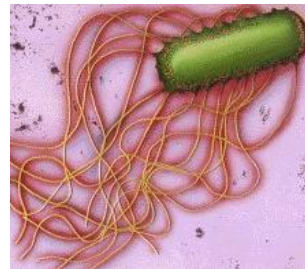
Identifizierung von MO



Form (Kokken-rund; Stäbchen-länglich)

Zellverband; Anordnung der Zellen
zueinander

Größe



Beweglichkeit; begeißelt – unbegeißelt

Gramverhalten

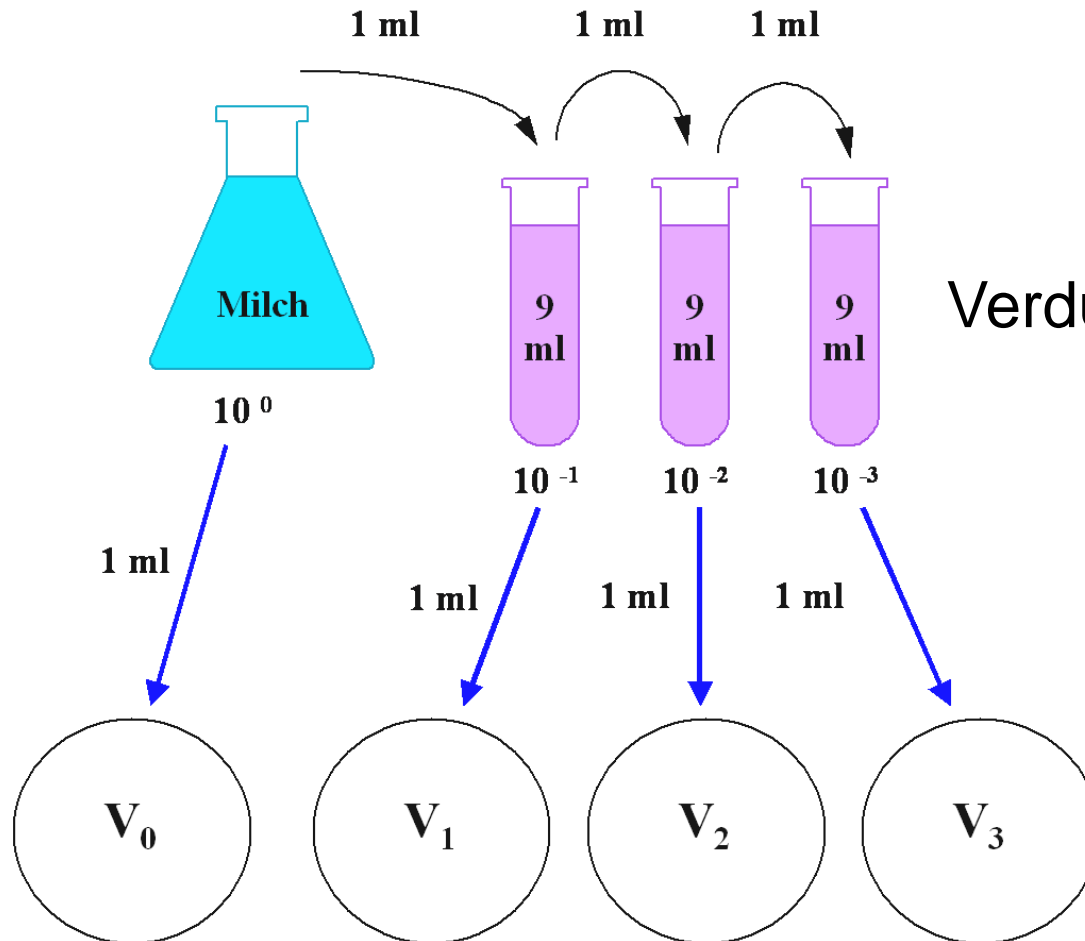
Sporenbildung





Methoden zur Sichtbarmachung - Nachweisverfahren

Verdünnungsreihe



Verdünnungsreihe

Koch'sches Gussplattenverfahren

- ⌘ Herstellen der Verdünnungsreihe
- ⌘ Beschriften der Platten:
 - ☒ Name, Datum, Probennummer ,V, Untersuchungsparameter
- ⌘ Nährmedien aufschmelzen: Agar (in Eprovetten oder Kölbchen) vollständig aufschmelzen (30 Minuten im Dampftopf) und im Wasserbad auf $47\pm 2^{\circ}\text{C}$ abkühlen
- ⌘ Einpipetieren der Probe: 1ml der jeweiligen Verdünnung in die Petrischale pipettieren
- ⌘ Mischen des Nährbodens mit der Probe: Nährmedium in Petrischale gießen (ca. 13 ml bei 47°C) → 8-schleifenförmige Bewegung
- ⌘ Bebrüten der Petrischalen:

Nach dem Erstarren des Nährbodens die umgedrehten Petrischalen (mit dem Boden nach oben) bei verschiedenen Temperaturen, abhängig von der optimalen Wachstumstemperatur der Organismen

Spatelverfahren

- ⌘ Herstellen der Verdünnungsreihe
- ⌘ Beschriften der Platten
- ⌘ Herstellung Agarplatten: etwa 15 ml des geschmolzenen Nährbodens in sterile Petrischalen überführen und verfestigen lassen
- ⌘ Platten vortrocknen: mit Agaroberfläche nach unten, schräg auf dem abgenommenen Deckel liegend, in einem Brutschrank ca. 30 min. bei 50°C
- ⌘ Spatelverfahren: beginnend mit höchster Verdünnung **0,1 ml** auf die Agarplatten pipettieren, mit einem sterilen Drigalski-Spatel wird die Menge gleichmäßig unter kreisenden Bewegungen verteilt
- ⌘ Bebrüten der Petrischalen

Auswertung – Koch/Spatel

⌘ Gußkultur und Spatelverfahren

Anzahl der Mikroorganismen pro g oder ml

$$\Sigma c$$

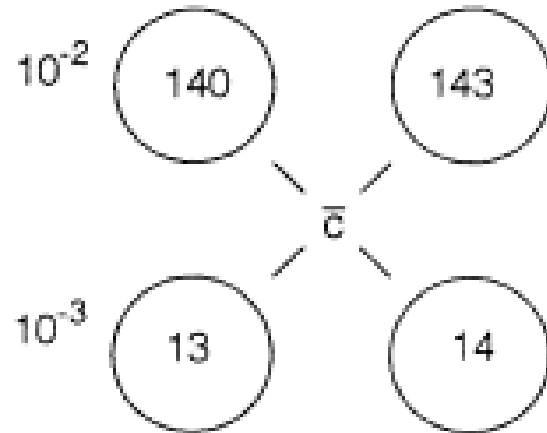
$$\text{-----} \times d = \text{KBE/ml bzw. g}$$
$$(\mathbf{1 \times n_1 + 0,1 \times n_2})$$

- ⌘ KBE = Kolonie bildende Einheiten
- ⌘ Σc = Summe aller ausgezählten Kolonien
- ⌘ n_1 = Zahl der Platten der 1. Verdünnungsstufe
- ⌘ n_2 = Zahl der Platten der 2. Verdünnungsstufe
- ⌘ d = Verdünnungsstufe der ersten ausgezählten Platte(n)

Berechnungsbeispiele

Koch und Spatel

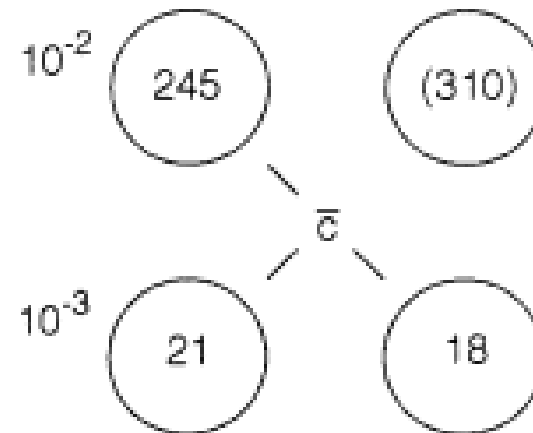
Beispiel 1
Verdünnungsstufe



$$\bar{c} = \frac{140 + 143 + 13 + 14}{2 \cdot 1 + 2 \cdot 0,1} = \frac{310}{2,2} = 140,9$$

$$\text{Ergebnis: } 140,90 \cdot 10^2 = 1,4 \cdot 10^4$$

Beispiel 2
Verdünnungsstufe



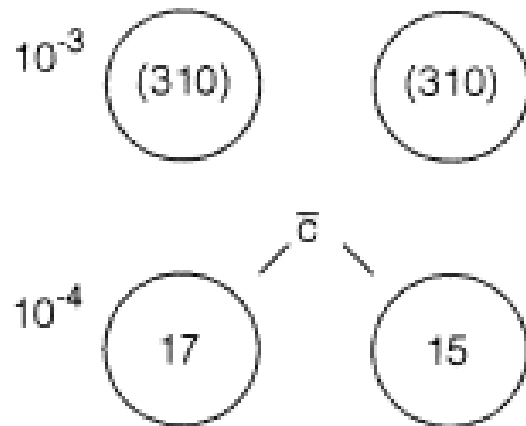
$$\bar{c} = \frac{245 + 21 + 18}{1 \cdot 1 + 2 \cdot 0,1} = \frac{284}{1,2} = 236,66$$

$$\text{Ergebnis: } 236,66 \cdot 10^2 = 2,4 \cdot 10^4$$

Berechnungsbeispiele

Koch und Spatel

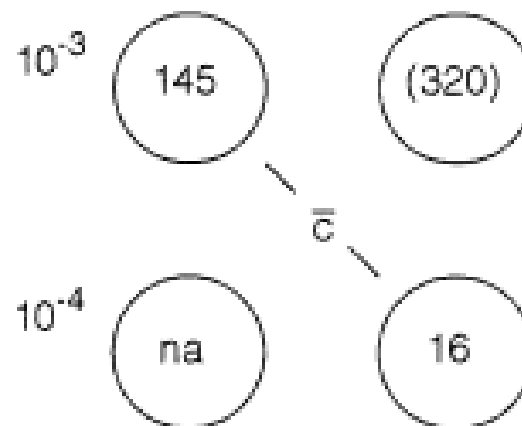
Beispiel 3
Verdünnungsstufe



$$\bar{c} = \frac{17 + 15}{2 \cdot 1 + 0 \cdot 0,1} = \frac{32}{2} = 16$$

$$\text{Ergebnis: } 16 \cdot 10^4 = 1,6 \cdot 10^5$$

Beispiel 4
Verdünnungsstufe

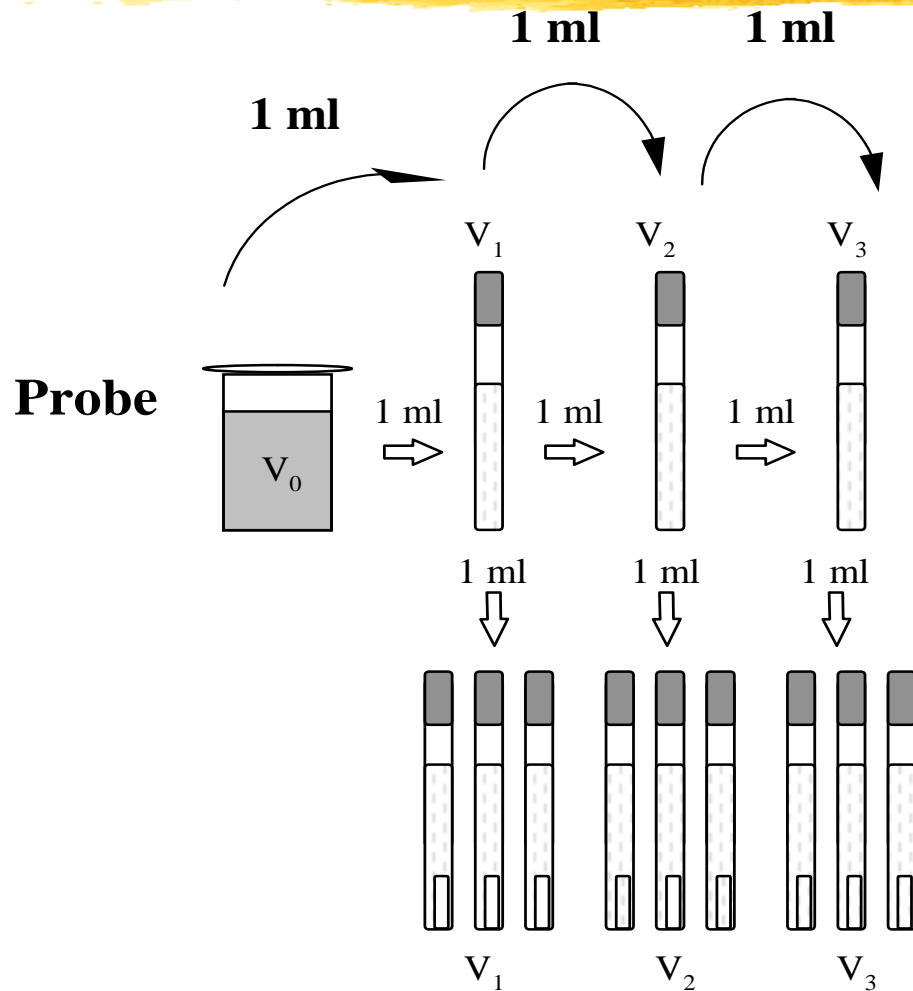


$$\bar{c} = \frac{145 + 16}{1 \cdot 1 + 1 \cdot 0,1} = \frac{161}{1,1} = 146,36$$

$$\text{Ergebnis: } 146,36 \cdot 10^3 = 1,5 \cdot 10^5$$

na = nicht auswertbar

Ermittlung der höchstwahrscheinlichen Keimzahl - Most probable number (MPN)



DI Erich Ziegelwanger und Dr. Gudrun Nagl

Auswertung - MPN

- ⌘ Röhrrchen werden hinsichtlich des Auftretens eines positiven Ergebnisses beurteilt
- ⌘ Ermittlung der Indexziffer (Stichzahl)
- ⌘ Berechnung der Keimzahl: MPN-Tabelle
- ⌘ Ergebnis:
$$\text{KbE/ml} = \text{MPN-Index} * \text{niedrigste Verdünnung}$$

MPN Tabelle

3 x 1.0			3 x 0.1			3 x 0.01 g (ml)			Vertrauensbereich	
Anzahl positive Ergebnisse			MPN	Kategorie	≥95 %					
0	0	0	<0.30		0.00	1.10				
0	0	1	0.30	3	0.00	1.10				
0	1	0	0.30	2	0.00	1.20				
0	2	0	0.62	3	0.08	2.00				
1	0	0	0.36	1	0.01	2.00				
1	0	1	0.72	2	0.08	2.00				
1	1	0	0.74	1	0.09	2.20				
1	1	1	1.10	3	0.30	3.60				
1	2	0	1.10	2	0.30	3.60				
1	2	1	1.50	3	0.30	4.30				
1	3	0	1.60	3	0.30	4.30				
2	0	0	0.92	1	0.10	3.60				
2	0	1	1.40	2	0.30	3.60				
2	1	0	1.50	1	0.30	4.30				
2	1	1	2.00	2	0.30	4.40				
2	2	0	2.10	1	0.30	4.60				
2	2	1	2.80	3	0.70	11.10				
2	3	0	2.90	3	0.70	11.10				
3	0	0	2.30	1	0.30	11.10				
3	0	1	3.80	1	0.70	12.10				
3	0	2	6.40	3	1.30	20.00				
3	1	0	4.30	1	0.70	20.00				
3	1	1	7.50	1	1.40	23.00				
3	1	2	12.00	3	3.00	37.00				
3	2	0	9.30	1	1.60	36.00				
3	2	1	15.00	1	3.00	44.00				
3	2	2	21.00	2	3.00	47.00				
3	2	3	29.00	3	7.00	122.00				
3	3	0	24.00	1	4.00	122.00				
3	3	1	46.00	1	7.00	235.00				
3	3	2	110.0	1	20.00	480.00				
3	3	3	>110.0							

DI Erich Ziegelwanger und Dr. Gudrun Nagl

Auswertung -MPN

⌘ Kategorie 1:

Am wahrscheinlichsten vorkommende Röhrenkombinationen. Andere Kombinationen ergeben sich mit einer Wahrscheinlichkeit von höchstens 5 %.

⌘ Kategorie 2:

Weniger wahrscheinlich als in Kategorie 1 vorkommende Röhrenkombinationen. Andere Kombinationen als in Kategorie 1 und 2 ergeben sich mit einer Wahrscheinlichkeit von höchstens 1 %.

⌘ Kategorie 3:

Noch weniger wahrscheinlich als in Kategorie 2 vorkommende Röhrenkombinationen. Andere Kombinationen als in Kategorie 1 bis 3 ergeben sich mit einer Wahrscheinlichkeit von höchstens 0,1 %.

Literatur



- ⌘ Mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel VO 2073/2005
- ⌘ Leitlinie über die mikrobiologischen Kriterien für Milch und Milchprodukte

http://www.bmg.gv.at/cms/site/attachments/5/1/5/CH0819/CMS1165222160466/leitlinie_milch-_und_milchprodukte.pdf