Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 82 (1991)

Heft: 6

Artikel: Schnellnachweis von Mikroorganismen im Betriebslabor = Rapid methods in food microbiology for industrial laboratories

Autor: Baumgart, J.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-982433

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 16.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **82**, 579–588 (1991)

J. Baumgart, Laboratorium Lebensmittel-Mikrobiologie im Fachbereich Lebensmitteltechnologie der Fachhochschule Lippe, Lemgo

Schnellnachweis von Mikroorganismen im Betriebslabor

Rapid Methods in Food Microbiology for Industrial Laboratories

Einleitung

Die traditionellen Methoden des Nachweises von Mikroorganismen wurden vor etwa 100 Jahren entwickelt. Die Verfahren sind auch noch heute brauchbar. Wenn brauchbare Verfahren mit sicherer Aussage vorliegen, ergibt sich die Frage nach der Notwendigkeit einer Methodenänderung, nach der Notwendigkeit von Schnellmethoden. Folgende Gründe sprechen für Schnellverfahren:

- Bei den konventionellen Methoden liegt das Untersuchungsergebnis in vielen Fällen erst vor, wenn das Lebensmittel den Betrieb bereits verlassen oder der Konsument das Produkt bereits verzehrt hat. Sperren Betriebe die Auslieferung des Erzeugnisses bis zur Freigabe durch das Labor, entstehen hohe Lagerkosten.
- Da mit den traditionellen mikrobiologischen Methoden häufig nur eine retrospektive Beurteilung möglich ist, können mikrobiologische Daten nicht mehr produktionssteuernd eingesetzt werden.
- Schnellmethoden sind besonders dann sinnvoll, wenn die Entscheidungen über Annahme oder Ablehnung von Rohstoffen, Halbfertig- oder Fertigerzeugnissen eilig zu treffen sind.

Mikrobiologische Schnellmethoden

Zu den mikrobiologischen Schnellmethoden können gezählt werden:

- Methoden, die die Laborleistung erhöhen und den Untersuchungsaufwand verringern
- Methoden, die schneller als die konventionellen Verfahren zum Ergebnis führen
- Methoden, die in 1 Stunde zum Ergebnis führen

In den folgenden Ausführungen wird nur auf solche Schnellverfahren eingegangen, über die eigene Erfahrungen vorliegen.

Methoden, die die Leistung im Labor erhöhen und den Untersuchungsaufwand verringern

Zu diesen Methoden bzw. Geräten zählen z. B.: automatische Pipettiergeräte, Plattenfüllsysteme, gravimetrische Verdünner, Stomacherbeutel mit «Gewebeeinlage» oder «Filterrohr», die Spiralplattenmethode, automatische Koloniezählgeräte und Robotersysteme.

Methoden, die schneller als die konventionellen Verfahren zum Ergebnis führen

Membranfilter-Mikrokolonie-Fluoreszenz-Methode (MMCF)

1. Prinzip der Methode

Die Untersuchungsprobe wird entweder filtriert (Membranfiltration), wobei die Membran auf einem festen Medium oder auf einem Nährkarton bebrütet wird, oder die Probe wird auf der Membran, die auf einem Medium liegt, mit dem Spatel verteilt. Nach einer verkürzten Bebrütungszeit werden die Mikrokolonien mit einem Fluorochrom (8-Anilino-Naphthalin-1-Sulfonsäure) angefärbt und unter dem Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskop bei 340–380 nm ausgezählt (1–4). Die automatische Zählung der Kolonien erfolgt mit dem Bildanalysegerät (5).

2. Ergebnisse

Besonders zum Nachweis der aeroben Keimzahl auf Fleischoberflächen und zur selektiven Erfassung von Hefen in Lebensmitteln hat sich das Verfahren bewährt (Tabellen 1 und 2).

Tabelle 1. Nachweis von Mikroorganismen mit der Membranfilter-Mikrokolonie-Fluoreszenz-Methode (MMCF)

Lebensmittel	Mikroorganismen	Nachweiszeit in Stunden
Frischfleisch	Aerobe Koloniezahl	7
Quark, Fruchtzubereitungen, Getränke, Feinkost	Hefen	16–24
Marzipan	Hefen	48
Vergleich zum Plattenverfahren: $r = 0{,}90 - 0{,}95$		

Tabelle 2. Nachweis von Hefen in Feinkost-Salaten mit der MMCF-Methode

Hefen	Probenzahl	Zellzahl pro g	Nachweis in h	Vergleich mit Oberflächenverfahren
Saccharomyces cerevisiae	30	10^3–10^5	15	$r = 0{,}98$
Torulaspora delbrueckii	32	10^3–10^5	15	$r = 0{,}91$
Saccharomyces exiguus	18	10^4	15	$r = 0{,}95$
Zygosaccharomyces bailii	48	10^3–10^5	48	$r = 0{,}92$

3. Anmerkungen zum Verfahren

Die Methode ist einfach; sie hat gegenüber anderen Verfahren (DEFT) den Vorteil, dass nur vermehrungsfähige Zellen nachgewiesen werden. Auch die Erfassung geschädigter Zellen ist möglich, wobei die Membran zuerst kurzzeitig auf einem optimalen Medium bebrütet wird.

Automatische Turbidimetrie

1. Prinzip

Die automatisch verdünnten Proben werden in einer selektiven oder optimalen Bouillon in der Messapparatur bebrütet, nach jeweils 10 Minuten geschüttelt und gemessen. Die Trübungsmessung bei 340–580 nm erfolgt in 200 Vertiefungen der Titerplatten gleichzeitig.

2. Ergebnisse

Mit dem Bioscreen-Gerät (Labsystems, Helsinki) wurden Enterobacteriaceen, Mikrokokken und Staphylokokken, Enterokokken und Milchsäurebakterien in Hackfleisch, Mettwurst und in Feinkostsalaten nachgewiesen (6). Die Nachweiszeit war abhängig vom Anfangskeimgehalt und der Generationszeit der Mikroorganismen im Selektivmedium (Tabelle 3).

Ähnliche Ergebnisse erzielten auch andere Autoren (7–9).

3. Anmerkungen zum Verfahren

Unter der Voraussetzung, dass gute selektive Medien vorliegen, ist das Verfahren nicht nur für kinetische Messungen, sondern auch für die Bestimmung der Keimzahl in Lebensmitteln geeignet.

Tabelle 3. Selektiver Nachweis von Mikroorganismen mit der automatischen Turbidimetrie

Lebensmittel	Probenzahl	Mikroorganismen	Keimzahl	Nachweiszeit in Stunden
Hackfleisch	30	Enterobacteriaceen	10^4	11
			10^7	5
		Enterokokken	10^4	14
			10^7	7
Mischsalate	28	Milchsäurebakterien	10^4	14
			10^7	8
		Enterokokken	10^4	12
			10^7	7
Vergleich zum Plattenverfahren: $r = 0{,}96$				

Leitfähigkeitsmessungen

1. Prinzip der Methode

Die sich bei der Vermehrung von Mikroorganismen bildenden Stoffwechselprodukte führen in einem Medium zur Änderung des elektrischen Widerstandes. Die Leitfähigkeit des Mediums nimmt zu bzw. der Widerstand ab. Diese Änderungen werden gemessen, wenn die Zellzahl oberhalb von 10^6 ml^{-1} liegt. Einige Geräte messen die Leitfähigkeit, andere die Leitfähigkeit und die Widerstandsänderung (10).

2. Ergebnisse (11–19)

Die Untersuchungen verschiedener Produkte (Tabelle 4) wurden mit dem Analysengerät «Malthus 2000», Fa. Radiometer, Willich) durchgeführt. Für den selektiven Nachweis von Enterobacteriaceen wurde «Malthus Enterobacteriaceae Bouillon» eingesetzt, für den Nachweis von *E. coli* das «Malthus Coliform Medium». Durch den Zusatz von 100 ppm MUG (4-Methylumbelliferyl-glucuronid) zum Medium konnte nach Erreichen der Detektionszeit der Nachweis von *E. coli* im UV-Licht (360 nm) spezifiziert werden. Bei positiver Fluoreszenz erfolgte eine biochemische Identifizierung (Enterotube, Hoffmann-La Roche, API 20E).

Der Nachweis der Salmonellen erfolgte mit verschiedenen Medien und Methoden (20–23).

Bei für Salmonellen typischer Detektionskurve wurde aus den positiven Röhrchen eine Bestätigung mit an Latexpartikeln gebundenen Antikörpern (Fa. Unipath, Wesel) als Objektträger-Agglutination durchgeführt. In Einzelfällen erfolgte eine Bestätigung aus der Zelle mit dem ELISA-Test (Salmonella-Tek, Fa. Organon, Technika).

Hefen wurden in Fruchtsäften und -konzentraten sowie in Gemüsesäften mit dem Analysengerät Bactometer 120 SC nachgewiesen (16) (Tabelle 5).

Tabelle 4. Nachweis von Mikroorganismen durch Bestimmung der Leitfähigkeit

Produkt	*n*	Mikroorganismen	Zellzahl g/ml	Nachweiszeit in Stunden	*r*
Rohstoff Tierfutter	186	«Gesamtzahl»	10^6	7	0,97
Feinkostsaucen und Feinkostsalate	62	Milchsäurebakterien	10^1 10^3 10^5 10^6	36 22 13 8	0,89 bis 0,96
Fruchtsäfte	126	Milchsäurebakterien	10^2 10^3 10^4	27 24 20	0,88
Gewürze	30	Enterobacteriaceen	10^1 10^2 10^3 10^4 10^5	12 10 9 7 5	0,92
Fertiggerichte, tiefgefroren	156	Enterobacteriaceen	10^0 10^1 10^2	18 14 10	0,93
Eiprodukte	52	Enterobacteriaceen	10^2 10^3 10^4	14 10 6	0,92
Hackfleisch	43	*E. coli*	10^0 10^1 10^2	7 6 5	0,80
Hackfeisch	43	Salmonellen *(S. typhimurium)*	10^0 10^1 10^2	25 23 21	0,86
			(+ Voranreicherung 16 h)		

r = Korrelation zu den konventionellen Verfahren nach §35 LMBG

3. Anmerkungen zum Verfahren

Die Methode der Leitfähigkeitsmessung ist ein geeignetes Verfahren zum schnelleren Nachweis von Mikroorganismen in zahlreichen Lebensmitteln. Bewährt hat sich das Verfahren zum selektiven Nachweis von Enterobacteriaceen, *E. coli* und Salmonellen und zur Bestimmung der aeroben Koloniezahl in Lebensmitteln, bei denen die gramnegative Flora vorherrscht.

Tabelle 5. Vergleichender Nachweis von Hefen mit dem Bactometer 120 SC und der Oberflächenkultur auf YGC-Agar (16)

Lebensmittel	Probezahl	Hefen	Zellzahl pro ml	Nachweiszeit in Stunden	*r*
Gemüsesäfte	138	*Pichia sp.*, *Cadida sake*, *C. tropicalis* *Sacch. cerevisiae*	10^3 10^4 10^5	20 16 12	0,96
Fruchtsäfte		*Zygosaccharo-myces rouxii* und *Z. bailii*	10^4	32	
Fruchtkonzentrate, tiefgefroren	32	Hefen	10^1 10^2 10^4	45 39 18	0,94
(Knispel (16))					

Methoden, die in 1 Stunde zum Ergebnis führen

Direkte Epifluoreszenz-Filter-Technik (DEFT)

1. Prinzip der Methode

Nach Filtration der Probe werden die Zellen direkt mit Acridinorange angefärbt und unter dem Auflichtmikroskop ausgezählt (24).

2. Ergebnisse

Untersucht wurde die «Gesamtkeimzahl» von Hackfleisch (24). Bei der vergleichend mit dem Tropfplatten-Verfahren durchgeführten Untersuchung von 88 Proben ergab sich ein Korrelationskoeffizient von 0,97 (Abb. 1). Schwieriger als die Bestimmung der Keimzahl von Hackfleisch war der selektive Nachweis von Hefen in Fruchtzubereitungen für Joghurt. Hefezahlen oberhalb von 10^4/g konnten direkt nach Vorfiltration (Siebgewebe aus Polyester, Porengrösse 60 µm, Fa. Reichelt) und Zusatz von Enzymen (z. B. Pektinasen) nachgewiesen werden. Geringere Zahlen waren nur durch eine Anreicherung in Malzextraktbouillon unter Zusatz von 100 ppm Chloramphenicol möglich.

3. Anmerkungen zum Verfahren

Das Verfahren ist einfach in der Durchführung, wenn ein Bildanalysegerät eingesetzt wird (eigene Untersuchungen mit Bio Foss DEFT-System, Hamburg). Die Nachweiszeit einschliesslich Vorbereitung beträgt ca. 1 Stunde. Die nachzuweisenden Keimzahlen müssen oberhalb von 10^4/g oder ml liegen.

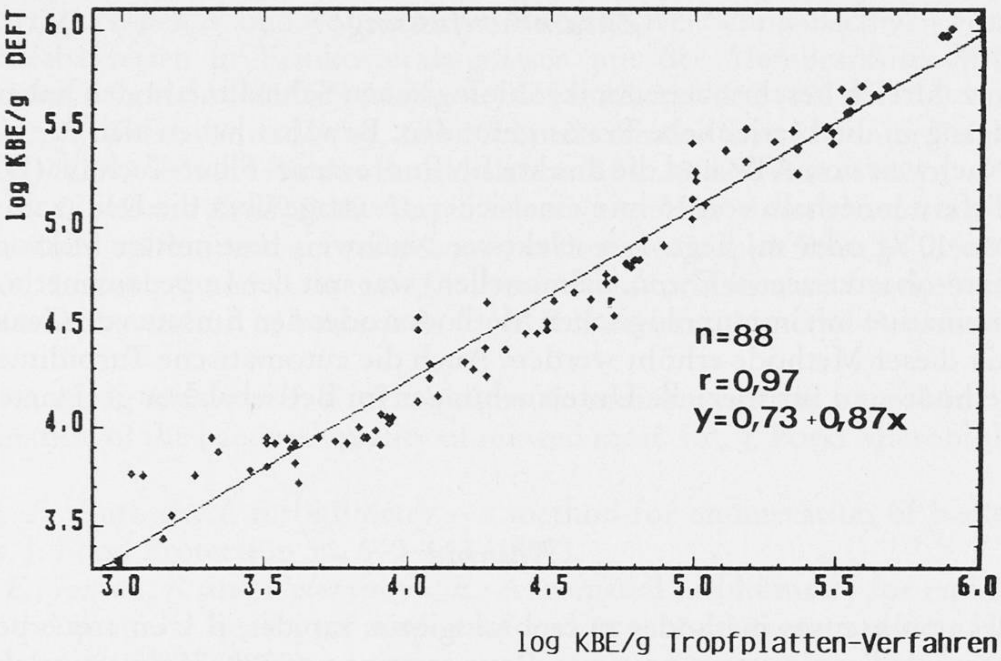

Abb. 1. Vergleichender Nachweis der Keimzahl von Hackfleisch mit dem Tropfplatten-Verfahren und der direkten Epifluoreszenz-Filter-Technik (DEFT)

Nachweis von Adenosintriphosphat (ATP)

1. Prinzip der Methode

Alle lebenden Mikroorganismen enthalten ATP. Das extrahierte ATP bildet in Anwesenheit von Magnesiumionen, Luciferin und Luciferase einen Adenosin-Monophosphat-Komplex, wobei Licht als Energie frei wird. Das entstehende Licht ist direkt proportional der ATP-Konzentration. Somatisches ATP kann durch ATPasen abgebaut werden (25). Der durchschnittliche ATP-Gehalt von Bakterien liegt bei 10^{-15}g (= 1 fg), der der Hefen bei 10^{-12}g.

2. Ergebnisse

Ein Vergleich der Koloniezahlbestimmung auf Standard-I-Nähragar und dem Nachweis von ATP ergab bei 40 untersuchten Hackfleischproben einen Korrelationskoeffizienten von 0,83 (y = 0,81 x –1,58). Für einen sicheren Nachweis der Mikroorganismen im Hackfleisch durch ATP-Bestimmung muss der Keimgehalt oberhalb von 10^4 g^{-1} liegen. Die in der EG-Richtlinie 88/657 vom 14. Dezember 1988 festgelegten Werte von 5,0 x 10^5 (m) und 5 x 10^6 (M) sind mit der Bioluminescenzmethode gut nachweisbar (15).

3. Anmerkungen zum Verfahren

Das Verfahren ist schnell (30 min bis 1 Stunde) und einfach in der Durchführung. Durch Bindung monoklonaler Antikörper an das Luciferin ist auch ein spezifischer Nachweis von Mikoorganismen möglich (26).

Zusammenfassung

Von den zahlreich beschriebenen mikrobiologischen Schnellmethoden haben bisher nur wenige Eingang in die betriebliche Praxis gefunden. Bewährt haben sich für einzelne Produkte der Nachweis von ATP und die direkte Epifluoreszenz-Filter-Technik (DEFT). Diese Verfahren liefern innerhalb von 45 min eine sichere Aussage über die Keimzahl, wenn diese oberhalb von 10^4/g oder ml liegt. Ein selektiver Nachweis bestimmter Mikroorganismengruppen (Enterobacteriaceen, *E. coli,* Salmonellen) war mit der Impedanzmethode möglich. Durch Kombination mit immunologischen Methoden oder den Einsatz von Gensonden kann die Spezifität dieser Methode erhöht werden. Auch die automatische Turbidimetrie und die MMCF-Methode sind für spezielle Untersuchungen im Betriebslabor geeignete Verfahren.

Résumé

Parmi les nombreuses méthodes microbiologiques rapides, il y en a que peu, qui aient franchi la barre de l'exploitation pratique. Pour certains produits la détection de l'ATP et la technique de l'épifluorescence à filtre directe (DEFT) ont fait leur preuves. Ces méthodes fournissent en 45 minutes des données fiables sur le nombre de germes, pour autant que celui-ci se situe au-dessus de 10^4/g ou ml. La mise en évidence sélective de certains groupes de microorganismes (entérobactériacées, *E. coli,* salmonelles) a été rendue possible par la méthode de l'impédance. En combinaison avec des méthodes immunologiques ou l'utilisation de sondes génétiques la spécificité de cette méthode peut être augmentée. La turbidimétrie automatique et la méthode MMCF sont des procédés qui se prêtent également pour des examens spéciaux dans un laboratoire d'exploitation.

Summary

Only a few of the numerous rapid methods in food microbiology described in literature are used in industrial laboratories. For a rather limited number of food products the ATP- and the DEFT-Method have been successfully introduced. The two procedures mentioned offer reliable results for total counts > 10^4/g or ml. The selective detection of different groups of microorganisms such as Enterobacteriaceae, *E. coli* or Salmonella sp. is possible by means of the impedance method. The selectivity of this method may be even raised by immunological techniques and nucleic acid probe assays. The automatic turbidimetry as well as the MMCF method are suitable for special purposes of industrial food mcirobiology laboratories.

Literatur

1. *Baumgart, J., Schierholz, B.* und *Huy, Chr.:* Membranfilter-Mikrokolonie-Fluoreszenz-Methode (MMCF-Methode) zum Schnellnachweis des Oberflächenkeimgehaltes von Frischfleisch. Fleischw. **61,** 726–730 (1981).
2. *Baumgart, J.* und *Vieregge, B.:* Schnellnachweis von Hefen im Marzipan. Süsswaren **5,** 190–193 (1984).

3. *Baumgart, J., Hobel, A.* und *Rottensteiner, B.:* Selektiver Schnellnachweis von Hefen und Milchsäurebakterien in Feinkosterzeugnissen mit der Membranfilter-Mikrokolonie-Fluoreszenz-Methode (MMCF-Methode). ZFL **32,** 251–252 (1981).
4. *Baumgart, J., Weber, B.* und *Huy, Chr.:* Schnellnachweis von Hefen in Feinkosterzeugnissen: MMCF-Methode für das Betriebslabor. ZFL **33,** 460–461 (1982).
5. *Rodrigues, U. M.* and *Kroll, R. G.:* Rapid selective enumeration of bacteria in foods using a microcolony epifluorescence microscopy technique. J. appl. Bact. **64,** 65–78 (1988).
6. *Jakob, R., Lippert, S.* and *Baumgart, J.:* Automated turbidimetry for the rapid differentiation and enumeration of bacteria in food. Z. Lebensm. Unters. -Forsch. **189,** 147–148 (1989).
7. *Jørgensen, H. L.* and *Schulz, E.:* Turbidimetric measurement as a rapid method for the determination of the bacterial quality of minced meat. Int. J. Food Microbiol. **2,** 177–183 (1985).
8. *Mattila, T.:* Automated turbidimetry – a method for enumeration of bacteria in food samples. J. Food Protection **50,** 640–642 (1987).
9. *Schulz, E., Jensen, B.* and *Celerynova, E.:* Automated turbidimetry for rapid determination of the bacterial quality of raw meat and processed meat products. Int. J. Food Microbiol. **6,** 219–227 (1988).
10. *Easter, M.-C.* and *Gibson, D. M.:* Detection of microorganisms by electrical measurement. In: Adams, M.R. and Hope, C.F.A. (ed.), Rapid methods in food microbiology, p. 57–100. Elsevier Verlag Amsterdam, 1989.
11. *Holling, Birte:* Nachweis von Laktobazillen in einer Feinkostsauce mit der Impedanz-Methode. Diplomarbeit FH Lippe (1990).
12. *Buchholz, Gabriele:* Nachweis der zum Verderb vegetarischer Brotaufstriche führenden Mikroorganismen und Schnellnachweis von Bazillen in den verwendeten Gewürzen. Diplomarbeit FH Lippe (1989).
13. *Krüper, Elisabeth:* Schnellnachweis osmotoleranter Hefen in Marzipan mit der MMCF-Methode und durch ATP-Biolumineszenz. Diplomarbeit FH Lippe (1989).
14. *Wenk, Gabriela:* Schnellnachweis von Enterobacteriaceen in asiatischen Fertiggerichten und Speiseeis mit der Impedanzmethode. Diplomarbeit FH Lippe (1988).
15. *Gessler, Annerose:* Schnellerer Nachweis von Mikroorganismen im Hackfleisch mit der Biolumineszenz- und Impedanzmethode. Diplomarbeit FH Lippe (1991).
16. *Knispel, Martina:* Schnellnachweis von Verderbsorganismen in Frucht- und Gemüsesäften sowie Konzentraten mit dem Impedanz-Verfahren. Diplomarbeit FH Lippe (1987).
17. *Kolbus, St.:* Schnellnachweis von Mikroorganismen in Rohstoffen für Hunde- und Katzennahrung mit der Impedanzmethode. Diplomarbeit FH Lippe (1986).
18. *Rochus, Renate:* Schnellnachweis von Enterobacteriaceen in Eiprodukten mit der Impedanzmethode. Diplomarbeit FH Lippe (1986).
19. *Sandhaus, Veronika:* Schnellnachweis von Hefen und Milchsäurebakterien in Feinkostsalaten mit der Impedanzmethode. Diplomarbeit FH Lippe (1987).
20. *Ogden, I. D.:* A conductance medium to distinguish between *Salmonella* and *Citrobacter* spp. Int. J. Food Microbiol. **7,** 287–297 (1988).
21. *Ogden, I. D.: Salmonella* detection by a modified lysine conductance medium. Letters in Appl. Microbiol. **11,** 69–72 (1990).
22. *Easter, M. C.* and *Gibson, D. M.:* Rapid automated detection of *salmonella* by electrical measurements. J. Hyg. Camb. **94,** 245–262 (1985).
23. *Smith, P. J., Bolton, F. J.* and *Gayner, V. E.:* Reproducibility of electrical conductance assay results for the detection of *salmonella.* Letters in Appl. Microbiol. **12,** 78–80 (1991).

24. *Baumgart, J.* und *Steffen, Heike:* Schnellnachweis von Mikroorganismen mit der direkten Epifluoreszenz-Filter-Technik (DEFT). Arch. Lebensmittelhyg. (1991), im Druck.
25. *Stanley, P. E., McCarthy, B. J.* and *Smither, R.:* ATP bioluminescence. Rapid methods in microbiology. Blackwell Sci. Publ., Oxford 1989.
26. *Leaback, D. H., Hooper, Claire, E.* and *Pirzad, R.:* The use of image luminometers for the simultaneous assay of multiple ATP samples by means of the firefly system. In: Stanlay, P. E., McCarthy, B. J. and Smither, R. (ed.), ATP luminescens. Rapid methods in microbiology, p. 276–287. Blackwell Sci. Publ., Oxford 1989.

Prof. Dr. J. Baumgart
Fachhochschule Lippe
Liebigstrasse 87
D-4920 Lemgo 1