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

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 60 (1969)

Heft: 3

Artikel: Einfache und gleichzeitige Bestimmung von lebenden und toten Mikroorganismen mit Hilfe der Membranfiltermethode

Autor: Vetsch, U.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-982487

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: 13.12.2025

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

Einfache und gleichzeitige Bestimmung von lebenden und toten Mikroorganismen mit Hilfe der Membranfiltermethode

U. Vetsch
Eidg. Forschungsanstalt Wädenswil

Einleitung

Bisher war es üblich, die Zahl der lebenden und toten Mikroorganismen eines Substrates durch Kombination der Thomakammer-Auszählung (Gesamtkeimzahl) und der Koch'schen Plattenmethode (Zahl der lebenden, vermehrungsfähigen Keime) zu ermitteln.

Die von *Strugger* (1) ausgearbeitete Methode der Fluorochromierung von Mikroorganismen mit Acridinorange und nachfolgender Kontrolle im UV-Mikroskop liefert nach unseren Erfahrungen bei Hefen gute, bei Bakterien jedoch unbefriedigende Ergebnisse.

Es ist bekannt, daß Mikroorganismen auf Membranfiltern vermehrt und auch angefärbt werden können (2, 3, 4). In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, auf Membranfiltern gleichzeitig die Zahl der vorhandenen toten und lebenden Mikroorganismen eines Substrates zu ermitteln.

Die nachfolgend beschriebene Methode hat gegenüber den bekannten, meist angewandten Keimzahlbestimmungsmethoden den Vorteil, daß mit kleinem Arbeitsaufwand in kürzerer Zeit bezüglich Genauigkeit gleichwertige Resultate erarbeitet werden können.

2. *Methodik*

Von der zu prüfenden Mikroorganismen-Suspension wird eine bestimmte Menge durch ein Membranfilter (Filter-Durchmesser: 47 mm; Durchmesser der wirksamen Filterfläche: 40 mm; Porengröße: 0,45 μ) filtriert. Damit bei der späteren Auszählung unter dem Mikroskop eine günstige Organismenzahl und -verteilung vorliegt, ist vor der Filtration durch eine mikroskopische Schnellkontrolle die ungefähre Keimzahl zu ermitteln.

Zu diesem Zwecke werden 3 μl der zu untersuchenden Probe mit einer Mikropipette auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckglas (18×18 mm) bedeckt (Nativpräparat). Das Präparat wird mit der Vergrößerung 10 × 40 kontrolliert, wobei etwa 3 Bildfelder ausgezählt werden. Da die wirksame Filterfläche des Membranfilters 3,67 mal größer ist als die Fläche des Deckglases, sind auf dem Membranfilter bei gleicher Vergrößerung und Probenmenge ungefähr 4mal weniger Keime zu erwarten. Auf dem Filter haben sich 10 bis 15 Keime pro Bildfeld als optimal für das Auszählen erwiesen. Dies entspricht 40 bis 60 Keimen pro Blickfeld im Nativpräparat.

Proben mit höheren Keimzahlen sind mit keimfreiem Wasser zu verdünnen, während bei kleineren Keimzahlen entsprechend größere Suspensionsmengen filtriert werden müssen.

Um auf dem Filter eine gute Verteilung zu erreichen, wird die zu filtrierende Probe mit keimfreiem Wasser auf ein Volumen von 30 ml ergänzt.

Das Filter wird nach der Filtration auf eine mit geeigneter Nährlösung ge-

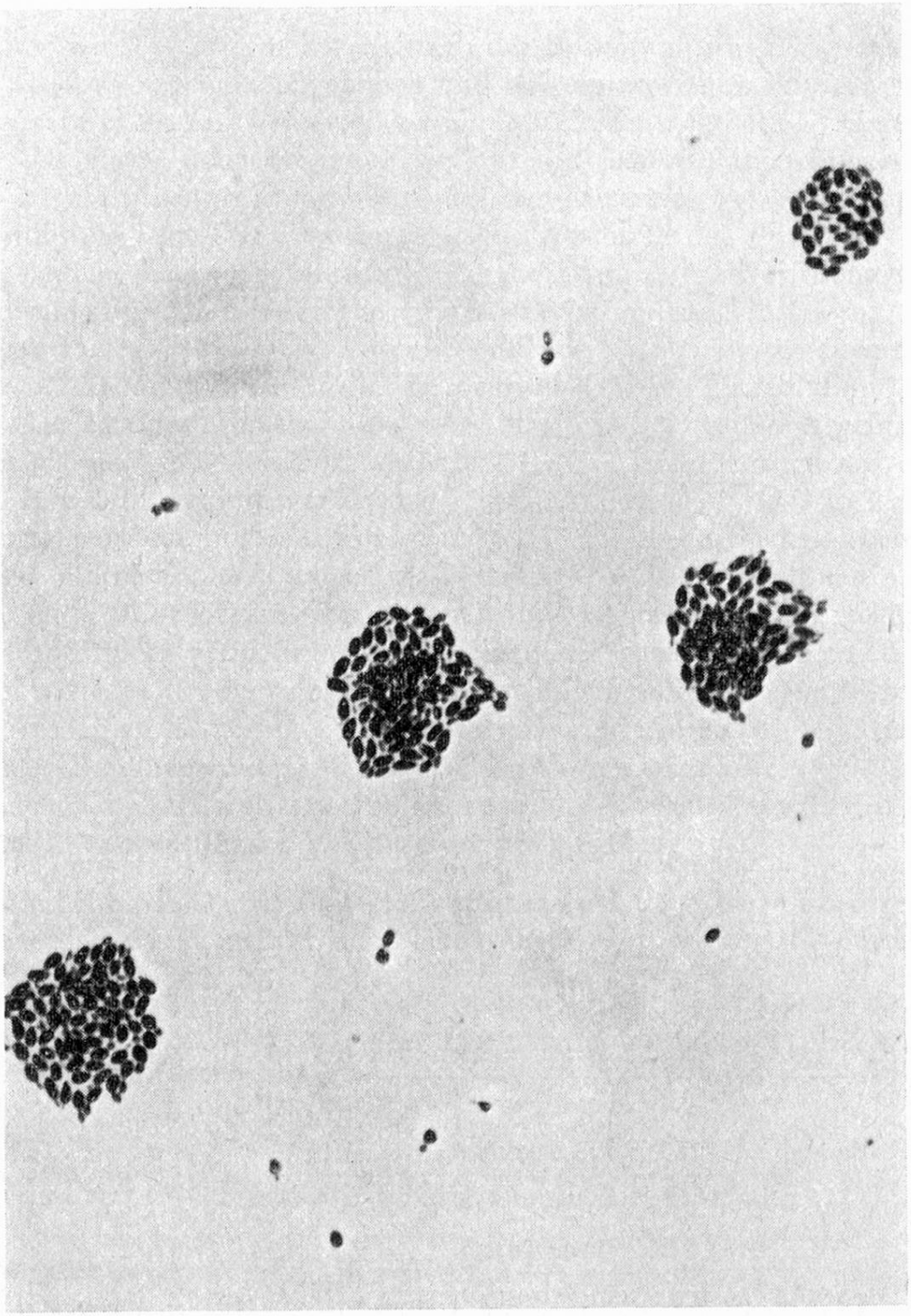

Bild 1 **Mikro-Aufnahme einer gefärbten Hefekultur auf einem Membranfilter**
Bildfeld-Ausschnitt mit toten Einzelhefen und Hefenkolonien (Bebrütungszeit: 8 Stunden).
Vergrößerung: 300fach.

tränkte Kartonscheibe und mit dieser in eine Petrischale gelegt. Dabei wird es leicht abgerollt, damit zwischen ihm und der Kartonscheibe keine Luftblasen entstehen. Das Nährmedium diffundiert nun von der Kartonscheibe durch das Filter hindurch und ermöglicht den lebenden Mikroorganismen die Vermehrung, bzw. die Kolonienbildung. Um das Austrocknen der Kartonscheiben während der Be-

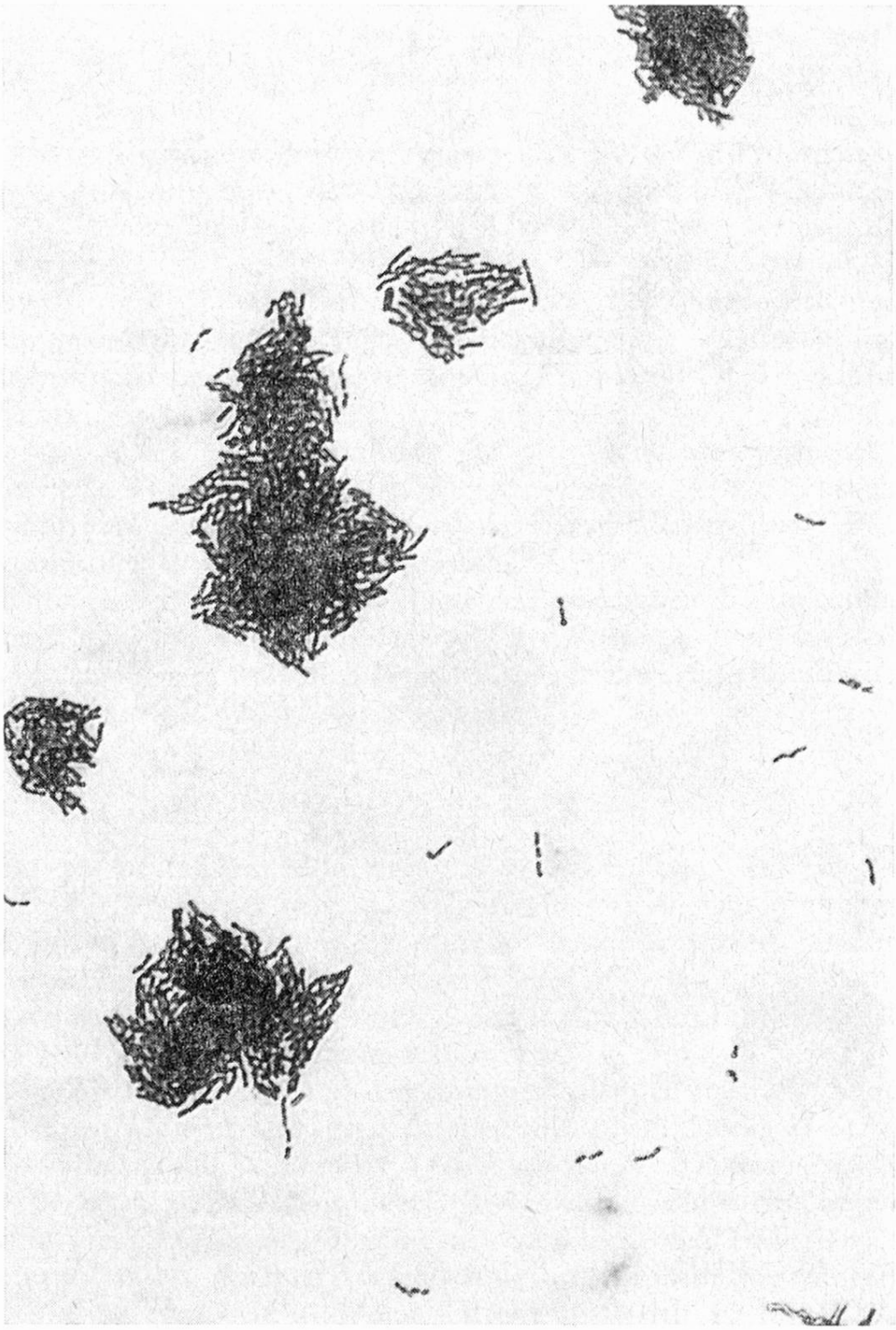

Bild 2 **Mikro-Aufnahme einer gefärbten Bakterienkultur auf einem Membran-Filter**
Bildfeld-Ausschnitt mit toten Einzelbakterien und Bakterienkolonien (Bebrütungszeit: 10 Stunden). Vergrößerung: 600fach.

brütung zu vermeiden, wird die Petrischale in einen Polyaethylenbeutel eingegossen. Die Zugabe einiger Tropfen Wasser in den Beutel sichert eine feuchte Atmosphäre.

Je nach Art der Mikroorganismen dauert die bei optimaler Temperatur vorgenommene Bebrütung 8 bis 14 Stunden. Nach dieser Zeit sind die Kolonien der vermehrungsfähigen Organismen so groß, daß sie unter dem Mikroskop gut von den nicht vermehrten Organismen unterschieden werden können (Abbildungen 1 und 2).

Das Filter wird zu diesem Zweck nach der Bebrütung sorgfältig mit der Pinzette von der Kartonscheibe abgehoben und auf ein trockenes Papierfilter gelegt. Auf diesem wird es im Trockenschrank während 20 Minuten bei 60 ° C getrocknet. Nun wird das ganze oder auch nur ein mit der Schere ausgeschnittenes Stück des Filters angefärbt, indem man dieses mit der Rückseite auf eine 2%ige wässerige Fuchsinlösung legt. Der Farbstoff diffundiert durch das Filter und färbt die auf der Oberfläche liegenden Mikroorganismen. Diese Art der Färbung vermeidet eine Verunreinigung der Filterfläche mit Partikeln aus der Farblösung. Die Färbezeit dauert ca. 2—3 Minuten. Anschließend wird auf einem trockenen Papierfilter während 20 Minuten bei 60 ° C getrocknet. Mit dem Einschlußmittel «L 25» (C. Zeiss) Caedex oder Immersionsoel kann das Filter transparent gemacht werden. Ein Stück des gefärbten Filters von ca. 1×1 cm Größe wird auf einen mit 2 Tropfen Einschlußmedium versehenen Objektträger gelegt. Das in kurzer Zeit durchsichtig gewordene Filterstück wird mit einem sauberen Deckglas bedeckt und anschließend mikroskopiert, wobei man zur Konstrasterhöhung ein Grünfilter einlegt. Lebende Mikroorganismen haben während der Bebrütung Kolonien gebildet, tote oder nicht vermehrungsfähige Keime liegen einzeln vor. Die Zahl der Kolonien sowie jene der einzeln vorliegenden Mikroorganismen wird nacheinander durch Auszählen festgestellt. Wir zählen dabei nur Kolonien, deren Mitte noch innerhalb der Randbegrenzung des Bildfeldes liegt. Das Bildfeld wird dabei jeweils mit dem Objektführer um eine ganze Bildbreite verschoben. Pro Präparat sind horizontal und vertikal je 30 Bildfelder auszuzählen.

Die durchschnittlich pro Bildfeld ermittelten Zahlen der Einzelzellen und Kolonien werden wie folgt mit der Fläche des Membranfilters in Beziehung gebracht:

$$\text{Fläche des Membranfilters} = \left(\frac{\text{Durchmesser der wirksamen Filterfläche}}{2}\right)^2 \times \pi$$

$$\text{Fläche des Bildfeldes} = \left(\frac{\text{Sehweite des Okulars}}{2 \times \text{Vergrößerung des Objektivs}}\right)^2 \times \pi$$

$$\text{Umrechnungsfaktor} = f = \frac{\text{Filterfläche}}{\text{Bildfeldfläche}}$$

Zahl der Keime pro filtrierte Probemenge = f × (Zahl der Keime + Zahl der Kolonien pro Bildfeld)

Der prozentuale Anteil der lebenden Keime an der Gesamtkeimzahl ergibt sich aus :

$$\frac{\text{Zahl der Kolonien} \times 100}{\text{Zahl der Kolonien} + \text{Zahl der einzelnen Keime}}$$

3. Resultate und Diskussion

3.1 Vergleichende Untersuchungen

In der Tabelle 1 haben wir die Resultate von Vergleichs-Versuchen mit den beiden bisher üblichen Methoden (Fluoreszenz-Methode nach *Strugger* sowie kombinierte Thomakammer-Plattenmethode) und der beschriebenen zusammengestellt. Untersucht wurden verschieden alte Hefekulturen.

Tabelle 1

Ergebnisse von Keimzählungsversuchen mit drei verschiedenen Methoden

Art der Mikro-Organismen-Kultur	Methode nach Strugger Lebende Keime in %	Kombinierte Methode (Thomakammer/Platten)				Anfärbung auf Membranfilter			
		Gesamt-K'zahl Mill. (Thomak.)	Lebende Keime Mill. Platten	Tote Keime Mill.	Lebende Keime in %	Gesamt-K'zahl Mill.	Lebende Keime Mill.	Tote Keime Mill.	Lebende Keime in %
Weinhefe 10 Tage alt	**56**	49	25	24	**51**	38	22	16	**58**
Weinhefe 30 Tage alt	**28**	107	28	79	**26**	94	30	64	**32**
Lyophylis. Hefekultur 12 Jahre alt	**8**	150	8	142	**5**	100	9	91	**9**

Aus den in Tabelle 1 zusammengestellten Ergebnissen geht hervor, daß die kombinierte Methode die niedrigsten Werte für den Anteil der lebenden Keime an der Gesamtkeimzahl liefert. Dies dürfte auf die bekannten Fehler bei der Thomakammer-Auszählung zurückzuführen sein. Vergleicht man die gewachsenen Kolonien auf den Platten und den Membranfiltern, so erhält man eine gute Uebereinstimmung.

3.2 Zuverlässigkeit der Resultate bei der Untersuchung von Hefe- und Bakterien-Kulturen

In den nachfolgenden Tabellen 2 und 3 soll die Zuverlässigkeit der Methode durch den Vergleich von Parallelversuchen auf Grund verschiedener Probe-Entnahmen beurteilt werden.

In Tabelle 2 werden Untersuchungen von zwei verschiedenen Weinhefekulturen zusammengestellt.

Tabelle 2 Resultate von Parallel-Bestimmungen bei Hefekulturen

Art der Mikroorganismen	Filter Nr.	Probe-Menge µl	% lebende Zellen
Weinhefe Nr. 18	1	2,5	51
	2	2,5	49
	3	2,5	44
	4	2,5	44
	5	5,0	48
	6	5,0	49
	7	5,0	47
Weinhefe Nr. 5	1	5,0	79
	2	5,0	76
	3	5,0	77
	4	7,5	80
	5	7,5	78
	6	7,5	78

Die Auszählungsresultate der vorliegenden Tabelle zeigen im allgemeinen eine sehr gute Uebereinstimmung. Sie schwanken nur in den Filtern 1—4 (Weinhefe Nr. 18) in etwas weiterem Rahmen. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die Ausgangsprobe von 2,5 µl eine zu geringe Keimzahl (3 Keime pro Blickfeld!) aufwies. Die Proben von 5,0 bzw. 7,5 µl haben eine bessere Uebereinstimmung gebracht.

In Tabelle 3 wurden die Untersuchungen von zwei Bakterienkulturen zusammengestellt. Die mikroskopische Beurteilung der Filter gestaltet sich hier wegen der ungünstigen Größenverhältnisse wesentlich schwieriger.

Aus den Abbildungen 1 und 2 geht aber deutlich hervor, was die Methode zu leisten imstande ist. Bei kleinen Bakterien können Verunreinigungen die Ermittlung der toten bzw. nicht entwicklungsfähigen Keime erschweren oder sogar verunmöglichen. Die Zahl der lebenden läßt sich durch Auszählen der Mikro-

kolonien unter dem Mikroskop eindeutig und was von besonderem Vorteil ist, sehr frühzeitig in einem Versuch ermitteln.

Tabelle 3 Resultate von Parallel-Bestimmungen bei Bakterien-Kulturen

Art der Mikroorganismen	Filter Nr.	Probe-Menge µl	% lebende Zellen
Lactobacillus fermenti (junge Kultur)	1	5,0	92
	2	5,0	85
	3	7,5	82
	4	7,5	93
Lactobacillus fermenti (alte Kultur)	1	10	11
	2	10	8
	3	10	16
	4	10	11

Die Tabelle 3 zeigt, daß die Resultate von Parallel-Bestimmungen bei Bakterienkulturen in etwas weiterem Rahmen schwanken als bei Hefe-Kulturen.

Währenddem wir bei der Untersuchung von Hefe-Kulturen mit 1—2 Filter-Versuchen auskommen, würden wir aufgrund unserer Erfahrung bei Bakterien eine größere Zahl vorschlagen, abhängig vom Schwierigkeitsgrad in der mikroskopischen Beurteilung und Erkennung der Einzelkeime.

3.3 Beurteilung der Methode

— Die Methode liefert in trubstofffreien Medien sehr zuverlässige Resultate bei Hefen und, von den erwähnten Einschränkungen abgesehen, befriedigende Genauigkeit bei Bakterien.
— Sie benötigt nur Standard-Einrichtungen eines mikrobiologischen Laboratoriums, ist sehr einfach und wenig aufwendig in ihrer Durchführung.
— Sie gestattet die Durchführung und Kontrolle von Wachstums-Versuchen und Mittelprüfungen mit kleinsten Volumina.
— Die Resultate von Parallel-Untersuchungen durch vier Personen wiesen nur eine Streuung von ± 5 % auf.

Zusammenfassung

Die beschriebene Methode erlaubt eine rasche Unterscheidung und Bestimmung von lebenden und toten Mikroorganismen auf einem bebrüteten Membranfilter. Die Arbeit

enthält ferner Angaben über das Anfärben und die Präparation der Filter, sowie über die Auszählung und Berechnung der Resultate. Vergleichende Untersuchungen zeigen, daß die Zuverlässigkeit der Methode wenigstens so gut ist, wie jene traditioneller Verfahren. Ihr Vorteil liegt im geringeren Zeit- und Arbeitsaufwand. Voraussetzung ist (insbesondere bei Bakterienzählungen) daß eine trubstofffreie Untersuchungsprobe vorliegt.

Résumé

La méthode décrite permet la distinction rapide et la numération des microorganismes vivants et morts sur un filtre («Membranfilter») traité, après la filtration, par un milieu nutritif, puis incubé. Cette méthode livre en moins de temps des résultats équivalents à ceux donnés par les procédés usuels. Une condition à observer est que l'échantillon examiné soit limpide.

Summary

The method described permits a fast differenciation and counting of living and dead microorganismus on an incubated membrane filter. Instruction for the Dyeing and the preparation of the filters are given, as well as data on counting and calculation of the results. A comparison shows the reliability of the method to be at least as good but much faster as that of conventional procedures, provided that the sample is free of suspended particles (especially when counting bacteria).

Literatur

1. *Strugger S.:* Fluorescensmikroskopie und Mikrobiologie, Hannover 1949.
2. *Jannasch H. W.:* J. gen. Microbiol. 18. 609—620.
3. Schrifttum über Membranfilter der Sartorius Membranfilter G. m. b. H.
4. Millipore Bibliography 1968.