

Direkte Keimzahlbestimmung [7,10]

Mikroskopische Keimzahlbestimmung nach BREED

Bezeichnung heißt "direkt", weil die einzelnen Keime nach dem Anfärben direkt unter dem Mikroskop ausgezählt werden.

Prinzip: Ein genau bekanntes Volumen der zu untersuchenden Probe wird auf einem Objektträger auf einer genau bekannten Fläche gleichmäßig ausgestrichen, gefärbt und ausgezählt.

Durchführung

Mit einer Kapillarpipette werden 0,01 ml (10µl) der Probe auf einen Objektträger mit einer cm²-Einteilung aufgebracht und mit einer rechtwinkelig gebogenen Nadel auf 1cm² ausgestrichen; luftgetrocknet, fixiert und gefärbt.

Toluidinblau-Färbung nach MOATS

1. Herstellung der Breed Ausstriche wie üblich.
2. Bei Vollmilch und fetthaltigen Präparaten eintauchen der Ausstriche in Xylol (1 min, dann lufttrocknen), danach in abs. Alkohol überführen bzw. abspülen, eintauchen in die Fixierlösung für mindestens 30 min., nach dem Herausnehmen lufttrocknen lassen.
Ausstriche von Magermilch und nichtfetten Milchprodukten kommen gleich direkt für ebenso lange Zeit in die Fixierlösung.
3. Färben durch Auftropfen der pH-4-Toluidinblau-Lösung auf das Präparat (2 min Einwirkzeit), vorsichtig mit Wasser abspülen und lufttrocknen lassen.
Bei zu blasser Färbung kann die Einwirkzeit der Farblösung noch 2 min länger erfolgen.

Fixierlösung: 3 Teile abs. Alkohol und 1 Teil Eisessig, unmittelbar vor Gebrauch mischen!!

Toluidinblau-Farblösung: 0,1 g Toluidinblau lösen in 100 ml von MAC ILVAINES pH-4-Pufferlösung
(Herstellung: 38,5 ml einer 0,2 M Dinatriumphosphat-Lösung werden mit 61,5 ml einer 0,1 M Zitronensäure gemischt).

Vor dem Mikroskopieren ist der Durchmesser des Gesichtsfeldes unter Verwendung der Ölimmersion und eines Objekt-Mikrometers zu bestimmen. Das Objekt-Mikrometer besitzt eine Einteilung in 1/100 mm.

Bestimmung des Gesichtsfelddurchmessers:

Man benötigt hierzu ein Objektmikrometer, dies ist ein Objektträger mit eingeritzter Skala. Der Abstand von 2 Teilstrichen beträgt 10µm.

Durchführung: Man legt das Objektmikrometer auf den Objektisch und schaut mit 1000-facher Vergrößerung und Immersionsöl wie viele Teilstriche im Gesichtsfeld sichtbar werden.

Beispiel:

200 Teilstriche2 mm

18 Teilstrichex mm

Gesichtfelddurchmesser = 0,18 mm

Gesichtsfeldfläche = $r^2\pi = 0,09^2\pi = 0,0254469 \sim 0,02545 \text{ mm}^2$

Zur Auswertung werden Ausstriche mit einer vollständigen, gleichmäßigen Verteilung der Milch herangezogen. Da es nicht möglich ist, die gesamte Fläche von 1 cm² des Ausstriches durchzumustern, errechnet man die Keimzahl mit der Streifen-, oder Gesichtsfeldmethode. Es ist darauf zu achten, dass sich die durchmusterten Gesichtsfelder nicht überlappen, sowie auch alle leeren Gesichtsfelder berücksichtigt werden. Besonders nahe beieinanderliegende Keime werden als ein Keim gezählt.

Zuerst ist der **Mikroskop-Faktor** zu errechnen. Die Größe des Faktors ist für jedes Mikroskop anders.

$$F_d = \frac{10 \text{ mm (Kantenlänge des Ausstriches)}}{\text{Gesichtfelddurchmesser (Objekt-Mikrometer)}}$$

Beispiel: $F_d = 10 \text{ mm} : 0,18 = 55,56$

$$F_f = \frac{100 \text{ mm}^2 \text{ (Fläche des Ausstriches)}}{\text{Gesichtsfeldfläche (Objekt-Mikrometer)}}$$

Beispiel: $F_f = 100 \text{ mm}^2 : 0,02545 = 3929,27$

Ermittlung des Keimgehaltes nach der Streifenmethode:

Nun werden d r e i Streifen des Präparates ausgezählt und die Keimzahl wie folgt ermittelt:

$$\text{Keimzahl/ml} = \frac{\text{Ausgezählte Keime}}{\text{Anzahl der Streifen}} \times F_d \times \text{Verdünnung (100)}$$

Beispiel: $\text{Keimzahl/ml} = (210 : 3) \times 55,56 \times 100 = 388\,920 = \underline{\underline{3,9 \times 10^5 \text{ Keime/ml}}}$

ERMITTLUNG DES KEIMGEHALTES NACH DER GESICHTSFELDMETHODE:

Es werden 10 Gesichtsfelder ausgezählt, pro Gesichtsfeld sollten nicht mehr als 50 Keime vorhanden sein.

$$\text{Keimzahl/ml} = \varnothing \text{Keimzahl/Gesichtsfeld} \times F_f \times \text{Verdünnung (100)}$$

Beispiel: $\text{Keimzahl/ml} = 200 \times 3929,27 \times 100 = 78\,585\,461,7 = \underline{\underline{7,8 \times 10^7 \text{ Keime/ml}}}$