

KULTIVIERUNG VON MIKROORGANISMEN [7, 9, 10, 11, 12]

1. ART DER KULTUR

Für die Anzucht von Mikroorganismen werden sterile Kolben, Reagenzgläser und Petrischalen verwendet. Als Medium werden vorwiegend Standardmedien verwendet: CASO-Agar oder -Bouillon, Standard I oder Standard II Agar bzw. -Bouillon, Nähragar bzw. -bouillon, PCA, Columbia-Agar. Die Bebrütungsdauer, -Art (Sauerstoffverhalten) und -Zeit richtet sich nach der Mikroorganismenart.

1. Bouillonkulturen - Züchtung im flüssigen Medium

Mit einer Öse werden Keime in eine Bouillon eingebracht. Die Bouillon kann in Röhrchen oder Kölbchen abgefüllt sein, (meist 10 ml pro Eprovette oder 100 ml Erlenmeyerkolben).

Das Wachstum erkennt man an der zunehmenden **Trübung** während der Bebrütung oder auch **Oberflächenwachstum** oder **Sedimentbildung** am Boden.

2. Agarstrichkultur

Reinkulturen werden bei diesem Verfahren auf Schrägagar mit einer Öse entweder geradlinig oder wellenförmig ausgestrichen. Mit der Nadel erfolgt die Beimpfung zunächst im unteren Nährbodenteil mittels Stich und erst dann die Schrägfläche. Anschließend wird die Eprovette mit der ausgestrichenen Kultur bei geeigneter Temperatur bebrütet, bis der Ausstrich makroskopisch sichtbar ist.

Manche Arten wachsen sehr charakteristisch:

Oberfläche ist **glatt, glänzend, rau, ausgefranst...; Farbbildung**,...

Die Agarstrichkultur mit Schraubverschluß wird auch zum Aufbewahren (4-8°C) von aeroben Reinkulturen verwendet, sogen. Stammkulturen.

3. Stichkultur

Die Stichkultur wird in Agar oder Gelatinenährböden (in Eprovetten abgefüllt und mit gerader Oberfläche erstarren gelassen) durchgeführt.

Mit der Agarstichkultur kann man das Verhalten der Kultur gegenüber Sauerstoff feststellen. **Aerobe** Kulturen wachsen an der Oberfläche des Stiches, während **anaerobe** Organismen sich im unteren Drittel des Stichkanals ansiedeln.

4. Schüttelkultur

Beimpfung eines flüssigen Mediums und Bebrütung im Schüttelapparat

5. Kultivierung auf Agarplatten

Gussverfahren (Koch), Oberflächenverfahren (fraktionierter Austrich, Spatelverfahren, Tropfplattenverfahren)

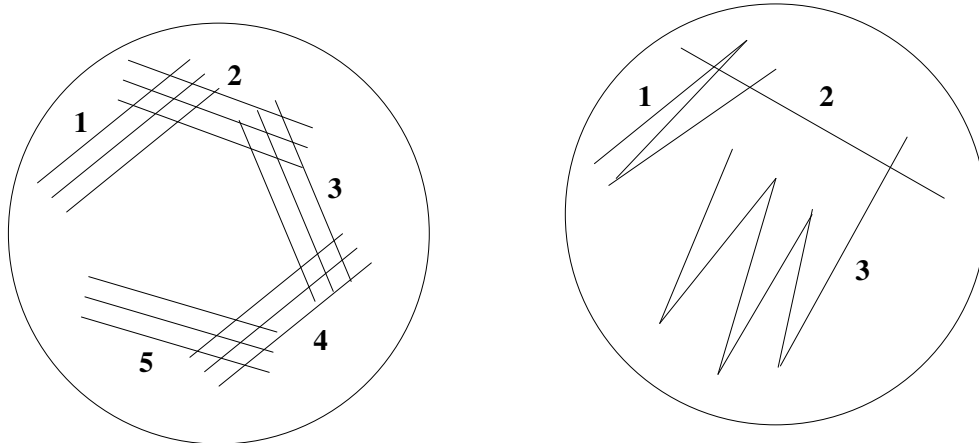
Tropfplattenverfahren:

Die Unterseite der Petrischale wird in Sektoren unterteilt. Bestimmte Volumina bis max. 0,1ml verschiedener aufeinanderfolgender Verdünnungen werden innerhalb dieser Sektoren auf die Agaroberfläche getropft und bis zu einem Durchmesser von 10-20mm mit der Pipettenspitze verteilt. Diese Methode ist nicht geeignet für Mikroorganismen, die flächenhaft und üppig wachsen, Schleimbildner und Schimmelpilze.

Fraktionierter Austrich

zur Gewinnung von Einzelkolonien zur genaueren Identifizierung von MO

Bebrütung: 24h

**6. Membranfilterverfahren**

Eine flüssige Probe wird durch eine bakteriendichte Membran (Porengröße 0,2-0,5µm) filtriert. Der Filter wird anschließend auf eine vorgegossene Agarplatte oder auf eine Nährkartonscheibe gelegt. Die Nährstoffe diffundieren bis zu den Mikroorganismen und diese wachsen zu sichtbaren Kolonien während der Bebrütungszeit an.

Die Membranfilter sollten als sterilisierte Filter bezogen werden und bestehen aus Celluloseacetat oder -nitrat.

Die Filtrationsgeräte können aus Glas, Metall oder Kunststoff gefertigt sein. Vor der Benutzung müssen sie sterilisiert werden. Das Filtrationsgerät wird an eine Saugvorrichtung angeschlossen (Wasserstrahlpumpe oder Vakuumpumpe), dabei ist Sorge zu tragen, dass nicht Flüssigkeit in die Pumpe gesaugt wird, oder dass Flüssigkeit zurückschlägt.

Die Methode wird häufig zur Untersuchung von größeren Probenmengen flüssiger Produkte eingesetzt (Wasser, Fruchtsaft, Zucker und dgl.), aber auch für Proben mit geringer Mikroorganismenzahl.

7. Kontaktverfahren

Auf einem Nährbodenträger befindet sich ein festes Nährmedium. Dieses wird auf die zu untersuchende Fläche aufgedrückt. Dadurch werden die Mikroorganismen von der Fläche auf den Nährboden übertragen. Anschließend erfolgt die Bebrütung und Auswertung.

z.B.: RODAC-Platten, Contact Slides, Bacto-Strip-Streifen oder Agaroid-Stangen

Diese Methode wird für Hygienekontrollen eingesetzt.

Das gleiche Prinzip kann auch zur Kontrolle von Flüssigkeiten angewendet werden. Dabei werden die Nährbodenträger in die Untersuchungsflüssigkeit getaucht. Dieses Verfahren ist nur für Flüssigkeiten mit geringen Mikroorganismengehalten geeignet.

2. BEBRÜTUNG DER KULTUR

Die Bebrütung erfolgt bei den für die entsprechenden MO optimalen Temperaturen. Bei der Bebrütung von Petrischalen muss der Deckel unten liegen, damit kein Kondenswasser auf die Kultur tropft. Bei bestimmten Nachweisverfahren wird die Petrischale mit dem Deckel nach oben bebrütet, so kann ein Auftropfen des Kondenswassers auf das Medium durch Einlegen eines sterilen Filterpapiers in den Deckel vermieden werden.

Nur in Ausnahmefällen werden Kulturen im Licht bebrütet (z.B. um Pigmentbildung zu erreichen). In der Regel wird die Bebrütung im Dunkeln vorgenommen und zwar in Brutschränken, -räumen oder Wasserbädern.

Bei Anwendung von Verfahren zur Züchtung von Mikroorganismen muß die Tatsache berücksichtigt werden, dass die Mikroorganismen einen unterschiedlichen Bedarf an Luftsauerstoff haben.

Obligat (=strikt) aerob:

Mikroorganismen, die Sauerstoff zum Wachstum brauchen.

Obligat anaerob:

Mikroorganismen, die durch Sauerstoff im Wachstum gehemmt werden.

Fakultativ anaerob bzw. fakultativ aerob:

Mikroorganismen, die sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen gedeihen.

Bei der Kultur aerober und anaeroben Mikroorganismen ist diesem Unterschied durch die Wahl entsprechender Verfahren, die einen Sauerstoffzutritt zulassen bzw. einen Sauerstoffausschluss bewirken, Rechnung zu tragen.

a) Kultur unter aeroben Bedingungen

Züchtung auf Oberflächen oder in geringer Tiefe von festen Medien
In flüssigen Medien, wobei die Schichthöhe im Verhältnis zur Oberfläche nicht so groß sein darf.

b) Kultur unter anaeroben Bedingungen

Kultur in hoher Schicht: Durch Kochen wird ein agarhaltiges Medium in einem Reagenzröhrchen sauerstofffrei gemacht und unmittelbar nach der Abkühlung beimpft.

Kultur unter Luftabschluss: Durch Überschichten mit Paraffinöl oder einer Mischung aus Hartparaffin und Vaseline (1:4) oder einem Paraffin-Gemisch.

Zusatz von reduzierenden Verbindungen zum Medium: bewirkt eine Erniedrigung des Redoxpotentials im Medium.

Kultur im sauerstofffreien Raum:

Durch Evakuierung und anschließendem Begasen mit einem Gemisch von 90% Stickstoff und 10% CO₂ erfolgt eine Erniedrigung des Sauerstoffpartialdrucks.

Chemische Verfahren der Sauerstoffbindung in einem Anaerobiertopf.

2. KULTURELLE KEIMZÄHLVERFAHREN

2.1 Koch'sches Plattenverfahren

Prinzip:

Dieses Verfahren basiert auf der Annahme, daß aus 1 Keim durch die Bebrütung eine Kolonie entsteht (es kann aber auch aus einer Keimgruppe eine Kolonie entstehen → KbE), die mit freiem Auge sichtbar ist. Um die Keimzahl erfassen zu können, bzw. zu sog. "auszählbaren" Platten zu kommen, muß die Probe entsprechend verdünnt werden. Ist die Probe fest oder pastös, muß diese zuerst mit einer bestimmten Menge Verdünnungslösung aufgelöst oder aufgeschwemmt werden. Für diese Probenaufbereitung gibt es internationale Standards (IMV-Standard 122B:1992). Von der Probe oder den Verdünnungen werden dann Platten gegossen und nach der Bebrütung die aus den Zellen oder Zellklumpen entstandenen Kolonien gezählt. Die Keimzahl (neue Definition: Anzahl der kolonienbildenden Einheiten = KbE) der Probe erhält man, wenn man die Zahl der Kolonien auf der auszählbaren Platte mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert.

Die Probennahme ist eine Momentaufnahme, d. h. nach 1 Tag ergibt die Probe nicht mehr das selbe Ergebnis. Somit ist es sehr wichtig, daß die Proben sofort oder nach kurzer Kühlagerung mikrobiologisch untersucht werden.

Vorbereitung der Proben:

Milch und Milchprodukte -Probenaufbereitung und Herstellung der Verdünnungen für die mikrobiologische Untersuchung

Auszug aus dem FIL-IDF Standard 122C: 1996

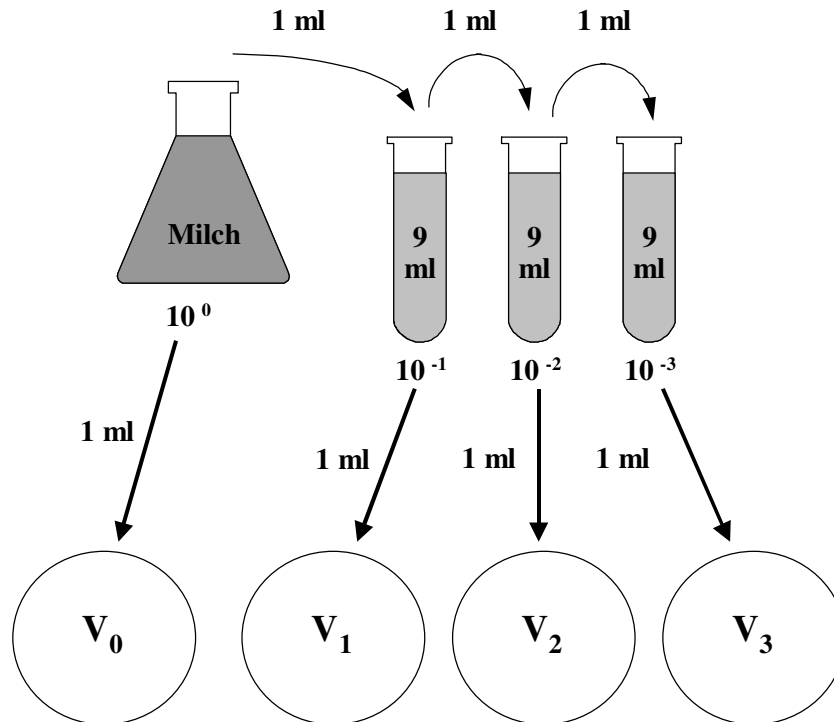
Es wird unterschieden: Probe (z.B. Milch)
 Erstverdünnung
 weitere Verdünnungen

Die Erstverdünnung (Ausgangssuspension) wird aus dem Probenmaterial und der 9-fachen Menge einer Verdünnungslösung hergestellt, indem man **1:10** Verdünnungen anlegt (im Routineverfahren sind 1: 100-Verdünnungen gestattet), dabei wird die Probe sorgfältig gemischt (25mal stürzen) und eine Verdünnung 1 : 10 mit einer ¼ starken Ringerlösung hergestellt.

Herstellen der Verdünnungsreihe für das Plattengießverfahren nach KOCH:

Referenz- (Standard-) verfahren: 3 Verdünnungsstufen
 Verdünnung erfolgt in 10er Schritten

Routineverfahren: 3 Verdünnungsstufen
 Verdünnung erfolgt in 100er Schritten
 99 ml Verdünnungslösung + 1 ml Probe



Plattengießen:

Vor dem Plattengießen muss der Agar (in Epruvetten oder Kölbchen) vollständig aufgeschmolzen werden (30 Minuten im Dampfbad) und im Wasserbad auf $47 \pm 2^\circ\text{C}$ abgekühlt werden. Bei Entnahme eines Röhrchens aus dem Wasserbad ist das außen anhaftende Wasser zur Vermeidung von Kontaminationen mit einem Tuch abzuwischen und der Rand der Epruvette ist vor dem Ausgießen in die Petrischale abzuflammen.

Beschriften der Platten: erfolgt am Boden und am Rand der Petrischale

Datum

Probennummer

Name

V (tatsächliche Verdünnungsstufe in der Platte) und was wurde untersucht

Mischen des Nährbodens mit der Probe: (Hiefür gibt es eine Standardvorschrift)

Im Routinebetrieb genügt es, sofort nach dem Eingießen des Agars die Platten in kreisende oder 8-schleifenförmige Bewegung zu versetzen und so eine Durchmischung zu erreichen. Zwischen dem Herstellen der Verdünnungsreihe und dem Ausgießen des Agars sollten **maximal 15 Minuten** verstreichen.

Bebrüten der Petrischalen:

Nach dem Erstarren des Nährbodens werden die umgedrehten Petrischalen (mit dem Boden nach oben) bei verschiedenen Temperaturen, abhängig von der optimalen Wachstumstemperatur der Organismen, bebrütet. Gelatineplatten dürfen nicht umgedreht werden, da hier die Verflüssigung der Gelatine geprüft wird.

Auswertung der Platten:**Zählen der Kolonien:**

Unter Zuhilfenahme eines Plattenzählgerätes wird jede Kolonie markiert und gleichzeitig ein Zählwerk betätigt. Platten, die weniger als 10 Kolonien und mehr als 300 Kolonien aufweisen, werden ausgeschieden ("auszählbare" Platte: 10 bis 300 Kolonien – GKZ). Zu viele Keime auf der Platte hemmen sich gegenseitig im Wachstum, weiters wird der Zählfehler und somit der mathematische Fehler zu groß.

"Laufkolonien" und "pin point"-Kolonien werden jeweils als eine Kolonie gezählt.

Platten, die mehr als ein Viertel von Laufkolonien bedeckt sind, werden verworfen.

Berechnung des Keimgehaltes:

Die Keimzahl wird immer auf 1 ml (bei flüssigen Produkten) bzw. 1 g (bei festen Produkten) der Probe bezogen. Die Berechnung des Keimgehaltes erfolgt mit dem gewogenen arithmetischen Mittel, d. h. die Summe aller ausgezählten Kolonien wird dividiert durch die Summe der untersuchten. Berechnung des Ergebnisses erfolgt nach der Formel:

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

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)

n = ausgezählten Platten

Das ermittelte Ergebnis wird mit **lediglich 2 Stellen** angegeben. Die 3. Stelle wird auf 0 gerundet. Beträgt sie 5, wird abgerundet, wenn die zweite Stelle eine gerade Zahl ist, und aufgerundet, wenn sie eine ungerade Zahl ist.

Bspl.:
 124 → 120
 125 → 120
 135 → 140

Werden weniger als 10 Kolonien auf der Platte gefunden → $< 10 \times d$
 d ist der Faktor der niedrigsten Verdünnungsstufe.

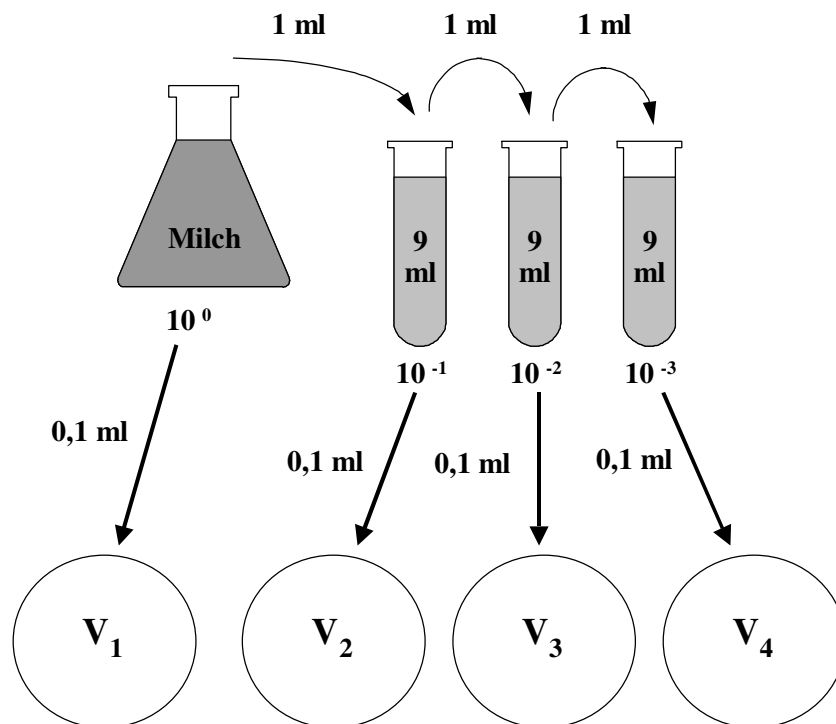
Werden mehr als 300 Kolonien auf der Platte gefunden → „geschätzte Keimzahl je g oder ml“

Weitere Möglichkeit: 124000 → $1,2 \times 10^5$ K/ml oder K/g

2.2 Spatelverfahren

Von der Probe bzw. den Verdünnungen werden **0,1 ml** auf der Oberfläche eines festen Nährbodens ausgespatelt. Das Verfahren ist anwendbar bei der Untersuchung aller Lebensmittel.

Teilmengen von etwa 15 ml des geschmolzenen Nährbodens werden in sterile Petrischalen überführt und zum Verfestigen stehengelassen. Platten, die vorher hergestellt wurden, sollten nicht länger als 4 Std. bei Raumtemperatur oder einen Tag bei 5°C aufbewahrt werden. Wenn die Platten gegen Austrocknung geschützt sind, können sie bei einer Aufbewahrung bei 5°C bis zu 7 Tagen verwendet werden. Unmittelbar vor der Verwendung werden die Platten mit der Agaroberfläche nach unten, schräg auf dem abgenommenen Deckel liegend, in einem Brutschrank ca. 30 min. bei 50°C getrocknet. Beginnend bei der höchsten Verdünnung werden **0,1 ml** auf die Agarplatten geben. Mit einem sterilen Drigalski-Spatel wird die Menge gleichmäßig unter kreisenden Bewegungen verteilt. Für jede Platte ist ein steriler Spatel zu verwenden. Die Platten werden mit dem Boden nach oben bei der für die nachzuweisenden Mikroorganismen erforderlichen Temperatur und Zeit bebrütet.



2.3 Petrifilm-Methode

Die Petrifilmmethode ist eine Abart des Koch'schen Plattenverfahrens; anstelle von Petrischalen werden vorgefertigte Scheiben benutzt, die den betreffenden Agar in teilentwässerten Zustand enthalten. Auf jede Agarscheibe wird **1 ml** Probelösung aufgebracht und der Agar quillt auf. Mit Hilfe eines Stempels wird das Deckblatt auf das Agar-Areal gedrückt. Der Petrifilm kann bebrütet werden.

Vorteil: Fertigmedium (kein Nährbodenkochen mehr!), geringer Platzbedarf im Brutschrank (es können bis zu 20 Petrifilme übereinandergestapelt werden)

Nachteil: hohe Materialkosten.

Die gute Analytische Praxis bei Anwendung der Koch'schen Plattenmethode

Die mikrobiologische Plattenmethode ist grundsätzlich mit folgenden Fehlern behaftet:

Probenahmefehler

Wägefehler: Die einzuwägende Probemenge soll nie kleiner als 10 g sein, wobei auf 0,1 g genau eingewogen werden muß. Bei Einhaltung dieser Vorschrift ist der Variationskoeffizient sehr gering und beträgt im Mittel 0,712 %.

Mazerationsfehler: Durch zu intensives Aufschließen der Probe etwa mit dem Ultraturrax, kann es zu einer lokalen Erwärmung der Probe kommen, wodurch Keime geschädigt werden können, was zu einer Mindererfassung führen kann. Bei der Analyse von Milchprodukten kann man diese Gefahr aufgrund von deren Konsistenz als gering einschätzen.

Verdünnungsfehler

Pipettenvolumensfehler: Abgesehen von der Variabilität des abgegebenen Volumens, bei Pipetten verschiedener Genauigkeitsklassen können Partikel und/oder Mikroorganismen am Pipettenglas oder -plastik haften bleiben.

Verdünnungslösungsvolumensfehler: Dieser Fehler setzt sich zusammen aus Dosierfehlern bei der Abfüllung und dem variablen Wasserverlust beim Autoklavieren. Der Variationskoeffizient beim Abfüllen liegt je nach Einsatz verschiedener Geräte zwischen 0,8 und 1,5 % und jener beim Autoklavieren zwischen 2,2 und 2,6 %. Durch kummulative Effekte kann dieser Fehler eine entscheidende Variationsursache sein; es können Verdünnungsfehler von 10 - 12 % auftreten. Um diesen Fehler möglichst gering zu halten, wird bekanntlich empfohlen die Verdünnungslösungen steril abzufüllen (Amtliche Sammlung von Methoden nach §35 LMBG, 1989).

Plattenfehler

Pipettierfehler: setzt sich aus dem bereits oben besprochenen Pipettenvolumensfehler zusammen und dem variablen Probenvolumen, das außen an der Pipette haften bleibt und während des Pipettiervorganges abtropfen kann. Aus diesem Grund soll die Pipette nie tiefer als 1 cm in die zu pipettierende Lösung eingetaucht werden.

Medienfehler: können sehr zahlreich sein und betreffen die Nährmedienzusammensetzung, den Wassergehalt, den Sauerstoffgehalt, pH-Wert etc.

Inkubationsfehler: sie werden häufig durch ungleichmäßige Temperaturverteilung im Brutschrank verursacht. Dies kann einerseits ein Gerätefehler sein, andererseits kann eine mangelnde Luftzirkulation und Wärmeübertragung durch unsachgemäßes Beschicken des Brutschrankes verursacht werden (Plattenstapel berühren einander, bzw. die Wände des Brutschrankes; Plattenstapel höher als 6 Platten). Legt man einen Plattenstapel in einen Brutschrank mit einer Temperatur von 37 °C beträgt für die oberste Platte die Zeit bis zum Erreichen der Bruttemperatur 3 Stunden, für eine Platte inmitten eines Stapels von 10 Einheiten jedoch 14 Stunden.

Verteilungsfehler

Dies bedeutet eine nicht zufällige Verteilung auf der Platte, diese kann bedingt sein durch ausgeprägte antibiotische Wirkungen zwischen den Keimen auf der Platte (Hemmungserscheinungen). Bei Medienfehlern kann es zu einer unregelmäßigen Verteilung der Keime auf der Platte kommen.

Zählfehler: kann von vielen Faktoren abhängig sein; so von der Unterscheidungsmöglichkeit zwischen Probenresten, Nährbodenpartikeln und Kolonien,

- von der geistigen und körperlichen Verfassung des Laboranten,
- von der Anzahl der bereits ausgezählten Platten,
- von der Zahl der Keime auf den Platten.

Der Zählfehler ist besonders groß ist, wenn sehr viele Keime, oder nur wenige Keime auf einer Platte anzutreffen sind. Aus Gründen der Genauigkeit sind "Marathonauszählungen" unbedingt zu vermeiden.

Aufzeichnungsfehler: sind rein menschliche Fehler und können nur durch Eigenkontrolle des Laboranten vermieden werden.

Berechnungsfehler: Darunter versteht man nicht falsches Ausrechnen eines Keimzählergebnisses durch den Laboranten, sondern das nicht Angepasstsein der Berechnungsart an die tatsächliche Verteilung der Keime auf den Platten der einzelnen Verdünnungsstufen. Im Rahmen des Internationalen Milchwirtschaftsverbandes (IMV, IDF, FIL) ist man dabei, dieses Problem näher zu untersuchen und neue Berechnungsvorschläge zu erstellen.

Übungsbeispiele zur Berechnung:

Koloniezahlen in Verdünnungsstufe						
Probe	1	2	3	4	5	Keimzahl/ml
1	n.a.	270	32	4	0	
	n.a.	252	44	6	0	
2	82	14	2	0		
	96	22	3	0		
3	n.a.	n.a.	280	62	12	
	n.a.	n.a.	300	50	15	
4	überw.	6	1	0		
5	n.a.	n.a.	160	42	12	
6	n.a.	n.a.	360			
7	8	2	0			
8	285	25	10			
	305	28	3			
	290	19	5			
9	270	19	9			
	n.a.	25	3			
	295	28	4			

3. BESTIMMUNG VON MIKROORGANISMEN MITTELS FLÜSSIGEN MEDIEN

3.1 Ermittlung der höchstwahrscheinlichen Keimzahl

Most probable number (MPN)

a) Für die Ermittlung einer MPN müssen Röhrrchen über einen weiten Bereich (mindestens **drei** aufeinander folgende Verdünnungsstufen) beimpft werden. Für jede Verdünnungsstufe sind mindestens zwei, üblicherweise **drei** Parallelröhrrchen notwendig. Die Verdünnungsreihe wird nach demselben Prinzip, wie bei Koch'schen Plattenverfahren beschrieben, durchgeführt.

b) Die beimpften Röhrrchen werden bei der jeweils festgesetzten Zeit bei der vorgegebenen Temperatur bebrütet.

c) Die bebrüteten Röhrrchen werden hinsichtlich des Auftretens eines positiven Ergebnisses beurteilt (z.B. Gasbildung im Durhamröhrrchen, Schwarzfärbung, Farbumschlag u.a.) und die Anzahl der positiven Ergebnisse für jede Verdünnungsstufe festgestellt.

Es gibt nur positiv-negativ-Ergebnisse!

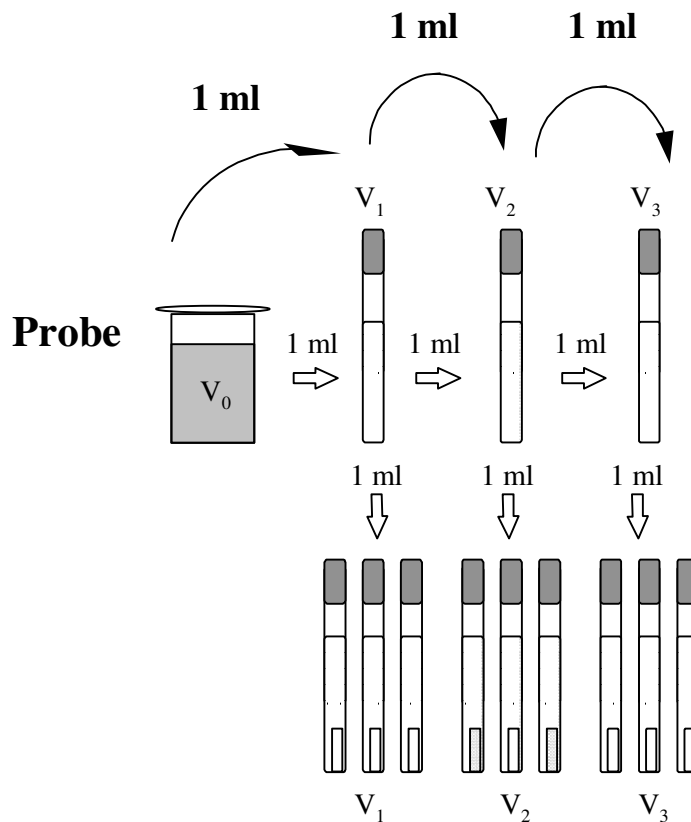
d) Ermittlung der Indexziffer (Stichzahl): Die Indexziffer beschreibt den Bereich der "Grenzverdünnung", also den Bereich, in dem die Probemengen sowohl Keime enthalten oder auch nicht enthalten. (Probemengen, die so viele Keime enthalten, daß auf jeden Fall ein positives Ergebnis nach der Bebrütung auftritt oder Probemengen, die keine Keime mehr enthalten und daher auf jeden Fall negative Reaktionen ergeben, sind für die Bildung der Indexziffer nicht brauchbar). Aus den aus drei aufeinanderfolgenden Verdünnungsstufen erhaltenen Ergebnisse wird die Indexziffer gebildet. Nach Möglichkeit sollen dazu die drei Verdünnungsstufen, die noch positive Ergebnisse zeigen, herangezogen werden. Enthält die Verdünnungsreihe keine drei Verdünnungsstufen mit positiven Ergebnissen, so dürfen auch Verdünnungsstufen mit negativen Ergebnissen zur Bildung der Indexziffer herangezogen werden.

e) Berechnung der Keimzahl: Aus der MPN-Tabelle für dreifachen Ansatz wird die zur Indexziffer gehörige wahrscheinliche Anzahl entnommen. Diese bezieht sich auf die niedrigste Verdünnungsstufe, die zur Bildung der Indexziffer herangezogen wurde. Die Keimzahl je ml bzw. g Probe wird durch Multiplikation der Keimzahl mit dem Verdünnungsfaktor errechnet.

Sind sämtliche angelegten Verdünnungsstufen negativ (Indexziffer 000), so ist die Keimzahl kleiner als das 0,3-fache der niedrigsten vorhandenen Verdünnungsstufe. Sind sämtliche Ansätze positiv (Indexziffer 333), so ist die Keimzahl größer als das 110-fache der niedrigsten zur Bewertung herangezogenen Verdünnungsstufe.

Die Vertrauensgrenzen berücksichtigen ausschließlich die zufällige Streuung der Ergebnisse. Andere Variationsquellen, wie z.B. Fehler beim Ansatz der Proben, gehen damit nicht in die MPN-Schätzung ein. Um derartige Einflüsse erkennen zu können, wurden die Röhrrchenkombinationen nach der Wahrscheinlichkeit ihres Vorkommens in Kategorien eingeteilt. Der Anwender kann seine Arbeitsweise kontrollieren, indem er überprüft, wie häufig die unwahrscheinlichen Kategorien 2 und 3 im Material vorkommen.

Durchführung:



Beispiel:	Anzahl der positiven Röhren						MPN
	V ₀	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₅	
1	3	3	2	1	0	0	1×10^2
2	3	3	3	0	0	0	$2,4 \times 10^2$
3	2	2	1	1	0	0	$7,4 \times 10^1$
4	3	3	0	0	0	0	$2,4 \times 10^1$
5	2	2	0	1	0	0	2,1

Kategorie 1: Sehr wahrscheinliche Röhrenkombination. Wahrscheinlichkeit des Auftretens insgesamt 95%.

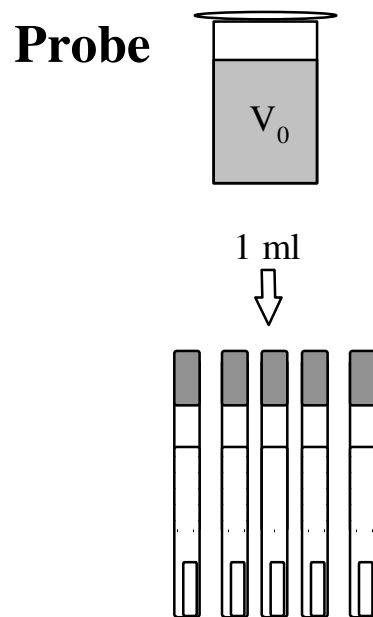
Kategorie 2: Weniger wahrscheinliche Röhrenkombination. Wahrscheinlichkeit des Auftretens maximal 5%.

Kategorie 3: Sehr wenig wahrscheinliche Röhrenkombination. Wahrscheinlichkeit des Auftretens maximal 1%.

Röhrenkombinationen, die nach der Wahrscheinlichkeit ihres Vorkommens noch unterhalb der Grenze der Kategorie 3 liegen, sind in der Tabelle nicht enthalten.

3.2 Titerverfahren

Das Titerverfahren ist eine Abart des MPN-Verfahrens, wobei nur **1 Verdünnungsstufe** angelegt wird. Es wird meist dann angewendet, wenn man nur „Negativ-Positiv“-Ergebnisse benötigt. Für Titeransätze gibt es ebenfalls Tabellen, aus welchen man die wahrscheinliche Keimzahl ablesen kann (verschiedene Tabellen je nach Anzahl der Parallelröhrchen).



3.3 Presence/Absence-Test

Dieser Test ist eine Abart des Titer. Es werden zumindest 3 Parallelprobenansätze angelegt und nur auf An- bzw. Abwesenheit eines Merkmals geprüft. In vielen Fällen wird eine Abwesenheit von Keimen in einem bestimmten Probevolumen gefordert (z.B. „Coliforme in 100ml nicht nachweisbar“).

Auswertung:

Ergebnis nach der Bebrütung			Endergebnis
Neg	neg	neg	negativ im Probevolumen
Pos	neg	neg	unter 1 Keim im Probevolumen
Pos	pos	pos	positiv im Probevolumen

Tabelle 3: MPN Tabelle¹⁾ für 3 x 1 g (ml), 3 x 0,1 g (ml) und 3 x 0,01 g (ml)

nagl.netzreport.com

Anzahl der positiven Ergebnisse			MPN Index	Kategorie ^{*)}	Vertrauensgrenzen	
					> 95 %	> 95 %
0	0	0	< 0,30		0,00	0,94
0	0	1	0,30	3	0,01	0,95
0	1	0	0,30	2	0,01	1,00
0	1	1	0,61	0	0,12	1,70
0	2	0	0,62	3	0,12	1,70
0	3	0	0,94	0	0,35	3,50
1	0	0	0,36	1	0,02	1,70
1	0	1	0,72	2	0,12	1,70
1	0	2	1,1	0	0,4	3,5
1	1	0	0,74	1	0,13	2,00
1	1	1	1,1	3	0,4	3,50
1	2	0	1,1	2	0,4	3,5
1	2	1	1,5	3	0,5	3,8
1	3	0	1,6	3	0,5	3,8
2	0	0	0,92	1	0,15	3,50
2	0	1	1,4	2	0,4	3,5
2	0	2	2,0	0	0,5	3,8
2	1	0	1,5	1	0,4	3,8
2	1	1	2,0	2	0,5	3,8
2	1	2	2,7	0	0,9	9,4
2	2	0	2,1	1	0,5	4,0
2	2	1	2,8	3	0,9	9,4
2	2	2	3,5	0	0,9	9,4
2	3	0	2,9	3	0,9	9,4
2	3	1	3,6	0	0,9	9,4
3	0	0	2,3	1	0,5	9,4
3	0	1	3,8	1	0,9	10,4
3	0	2	6,4	3	1,6	18,1
3	1	0	4,3	1	0,9	18,1
3	1	1	7,5	1	1,7	19,9
3	1	2	12	3	3	36
3	1	3	16	0	3	38
3	2	0	9,3	1	1,8	36,0
3	2	1	15	1	3	38
3	2	2	21	2	3	40
3	2	3	29	3	9	99
3	3	0	24	1	4	99
3	3	1	46	1	9	198
3	3	2	110	1	20	400
3	3	3	>110			