

BESTIMMUNG DER GESAMTKEIMZAHL (GKZ)

Koloniezählung bei 30 °C (FIL-IDF 100B: 1991)

Anwendungsgebiet:

- Milch, flüssige Milchprodukte
- Milchpulver, süßes Molkepulver, Buttermilchpulver, Laktose
- Säurekasein, Milchsäurekasein und Labkasein
- Kaseinate und saures Molkepulver
- Schmelzkäse
- Butter
- gefrorene Milchprodukte (einschließlich Speiseeis)
- Eiercreme, Desserts und Rahm

Probenahme gemäß IDF - Standard 50C: 1995
ÖNORM EN ISO 707:1998.02
ÖNORM EN ISO 2505:1998.02

Probenaufbereitung und Herstellung der Verdünnungen gemäß IDF-Standard 122C:1996.

Prinzip der Methode:

Es werden alle Mikroorganismen (Bakterien, Hefen und Schimmelpilze) gezählt, die unter den Bebrütungsbedingungen anwachsen. Es werden in erster Linie aerobe und fakultative anaerobe mesophile Keime erfaßt.

Anlegen einer Verdünnungsreihe (1:10)

Herstellung von Gussplatten: 2 Platten pro Verdünnungsstufe

Kulturmedium: Plate-Count-Agar mit Magermilchzusatz (12-15 ml)

Bebrütung: aerob bei 30°C +/- 1 °C; 72 +/- 2 Stunden

Nur Platten auswerten, die mit 10 - 300 Kolonien besetzt sind. Die 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)

BESTIMMUNG VON SÄUREBILDNERN UND NICHTSÄURE-BILDNERN**VDLUVA Methodenbuch VI M.16.2. (1985)**

Zur Unterscheidung von Säurebildnern und Nichtsäurebildnern wird Chinablau-Laktose-Agar herangezogen. Das Chinablau dient als pH-Indikator um laktosevergärende von nicht-laktosevergärenden Mikroorganismen zu unterscheiden.

Säurebildner: blaue Kolonien oder Kolonien mit blauem Rand
Nicht-Säurebildner: weiße Kolonien

SB:	<i>Lactobacillen</i>	NSB:	Aerobe Sporenbildner
	<i>Milchsäurestreptokokken</i>		<i>Salmonellen</i>
	Coliforme Keime, <i>E. coli</i>		<i>Serratia</i>
	manche <i>Aeromonaden</i>		<i>Proteus</i>
	manche <i>Staphylokokken</i>		

Da das Wachstum von Kokken nicht beeinträchtigt wird, können neben den Bakterien der Coli-Aerogenes-Gruppe auch *Staphylokokken* und *Streptokokken* ungehindert zur Entwicklung kommen.

Anwendung: Milch und Milchprodukte

Kulturmedium: Chinablau-Laktose -Agar (CBL-Agar) (12-15 ml)

Verdünnungslösung: 1/4 starke Ringerlösung (9 ml) oder 0,1%ige Peptonlösung

Herstellung von Gussplatten: 2 Platten pro Verdünnungsstufe

Bebrütung: aerob 2-3 Tage bei 30 °C

AW der Platten: 10-300 Kolonien, Differenzierung von NSB / SB

Die Auswertung erfolgt nach denselben Regeln wie bei der Gesamtkeimzahlbestimmung.

BESTIMMUNG DER PSYCHROTROPHEN MIKROORGANISMEN

Durch Bebrütung der gegossenen Platten bei niedrigen Temperaturen können nur die kältetoleranten Keime:

Pseudomonaden,
Aeromonaden,
einige Stämme coliformer Keime,
Achromobacter,
Flavobacterium
aber auch einige Hefen und SchiPi

zu sichtbaren Kolonien anwachsen. Psychrotrophe Keime gehören zur Gruppe der mesophilen Keime (Optimum bei 20 ° - 30 °C), bilden in dieser Gruppe aber eine Ausnahme, da sie auch bei Temperaturen unter 6 °C noch leben können (=Kühlschranktemperatur). Psychrotrophe Keime sind stark proteolytisch und lipolytisch, die Enzyme sind nach dem Absterben der Keime, z.B. nach Pasteurisierung, noch immer aktiv.

Als Grenzwert bei guter Milchqualität sind max. 10.000 Keime/ml anzusetzen, wobei die Keimzahl immer in Bezug zur GKZ zu sehen ist, da ein hoher Anteil psychrotropher Keime ungünstig ist. So ist es z.B. besser 300.000 Keime mit 10.000 psychrotrophen Keimen, als 10.000 Keime mit 8.000 psychrotrophen Keimen nachzuweisen.

A) Koloniezählung bei 6,5 °C (IDF 101: 2005 / ISO 6730:2005)

Anwendungsbereich: rohe und hitzebehandelte Milch

Eine definierte Untersuchungsmenge oder eine Reihe dezimaler Verdünnungen der Probe wird in Petrischalen mit dem Kulturmedium vermischt und bei 6,5 °C für 10 Tage bebrütet. Die Kolonien werden gezählt und die Anzahl Mikroorganismen in der Originalprobe berechnet.

Kulturmedium: Plate Count Magermilch-Agar (12-15 ml)

Verdünnungslösung: 1/4 starke Ringerlösung (9 ml) oder 0,1%ige Peptonlösung

Herstellung von Gussplatten: 2 Platten pro Verdünnungsstufe

Bebrütung: 10 Tage bei 6,5 ± 0,5 °C

Die Auswertung erfolgt nach denselben Regeln wie bei der Gesamtkeimzahlbestimmung.

B) Koloniezählung bei 21 °C

(FIL-IDF 132 A:1991) *neuer Standard bereits in Arbeit IDF 132:2004/ ISO 8552*

Die hier beschriebene Schnellmethode erfasst den Keimgehalt nur ungefähr, da unter den Bebrütungsbedingungen auch andere Keime anwachsen können. Vergleichsstudien haben jedoch ergeben, dass eine gute Korrelation mit den Ergebnissen der Standardmethode besteht.

Anwendungsbereich: rohe und hitzebehandelte Milch

Zur Keimzahlbestimmung für past. Trinkmilch nach einer Bebrütung bei 6 °C 5 Tage.

Kulturmedium: Plate Count Magermilch-Agar (12-15 ml)

Verdünnungslösung: 1/4 starke Ringerlösung (9 ml) oder 0,1%ige Peptonlösung

Herstellung von Gussplatten: 2 Platten pro Verdünnungsstufe

Bebrütung: 25 +1 Stunden bei 21 ± 1 °C Die Bebrütungszeit ist genau einzuhalten, da bei einer längeren Bebrütung auch andere Keime anwachsen können.

Die Auswertung erfolgt nach denselben Regeln wie bei der Gesamtkeimzahlbestimmung.

AEROBE THERMORESISTENTE MIKROORGANISMEN

VDLUVA Methodenbuch VI M.7.13. (1996)

Die Anzahl aerober thermoresistenter Mikroorganismen ist immer in Bezug zur GKZ zu sehen, um zu erfassen, wieviele Keime die Pasteurisierung überleben. Der Pasteurisierungseffekt spiegelt die Verminderung der Keimzahl um 2-3 Zehnerpotenzen wieder. Als Grenzwerte sind 2.000 Keime/ml anzunehmen. Vertreter dieser Gruppe sind:

Alcaligenes tolerans,
Enterococcus faecalis, *-durans*,
Streptococcus thermophilus,
Micrococcus varians, *-luteus*,
Bacillus cereus, *-circulans*, *-macerans*

Die Sporenbildner treten bei der Winterfütterung im Stall aufgrund höherer Staubentwicklung vermehrt auf.

Für die Bestimmung aerober thermoresistenter Mikroorganismen in flüssiger Milch wurde auf EU-Ebene (**ASSILEC**) ein **Methodenvorschlag** zur wahlweisen Anwendung ausgearbeitet. Als aerobe thermoresistente MO werden im Sinne dieses Standards solche Keime definiert, die nach einer Erhitzung ("Pasteurisierung") bei 63,5 °C für 35 min überleben und auf Plate-Count-Agar sichtbare Kolonien bilden.

Anwendung: Milch und flüssigen Milchprodukten

Durchführung:

5 ml Milch bzw. flüssiges Milchprodukt werden im Reagenzglas in einem Wasserbad bei $63,0 \pm 0,5$ °C erhitzt. Der Wasserspiegel des Wasserbades soll mindestens 4 cm über der Milchoberfläche sein. Die Anwärmung auf 63,0 °C soll in 5 min erfolgt sein, die Temperatur wird 30 min gehalten, anschließend wird die Probe rasch unter fließendem Wasser abgekühlt (ca. 10°C). Eine Temperaturkontrolle über ein zusätzliches Röhrchen muss parallel dazu erfolgen.

Kulturmedium: Plate Count Magermilch-Agar (12-15 ml)

Verdünnungslösung: 1/4 starke Ringerlösung (9 ml) oder Pepton-Kochsalzlösung

Herstellung von Gussplatten: 2 Platten pro Verdünnungsstufe

Bebrütung: 3 Tage bei 30°C

Die Auswertung erfolgt nach denselben Regeln wie bei der Gesamtkeimzahlbestimmung.

Thermoresistent im Sinne dieses Standards bedeutet, dass die Keime eine gewisse Hitzeeinwirkung überleben und sich dann bei mittleren Temperaturen wieder entwickeln, wogegen thermophile bzw. thermotolerante Keime bei höheren Temperaturen wachsen und sich vermehren können.

BESTIMMUNG VON HEFEN UND SCHIMMELPILZEN

Im Gegensatz zu den Bakterien sind Hefen und Schimmelpilze eukaryontische Mikroorganismen, da sie einen echten Zellkern besitzen. Für die Milchwirtschaft sind sie von besonderer Wichtigkeit, da sie durch Milchsäuregärung haltbar gemachte fermentierte Milchprodukte (Joghurt, Sauermilch, Käse) verderben können. Unerwünschte organoleptische Veränderungen (Geruch, Geschmack, Aussehen und Konsistenz), Bombagen, sowie die Bildung von Mycotoxinen können auftreten.

In Milchwirtschaft eingesetzte Pilze: *Candia kefir*, *Penicillium camemberti*, *caseicolum*, *roqueforti*,...

Schimmelpilze, die sich auf Lebensmitteln vermehren, können Stoffwechselprodukte bilden, die für Mensch und Tier giftig sind. Man nennt diese Stoffe Mycotoxine. Einige durch Schimmelpilze gebildeten Toxine sind z.B. das Aflatoxin, Ochratoxin, Patulin, Sterigmatocystin. Von den Mycotoxinen sind die Aflatoxine am besten untersucht worden und zwar deshalb, weil sie eines der am stärksten wirksamen krebserregenden Stoffe sind. Aflatoxine werden durch die Schimmelpilze *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus*, vor allem in fettreichen Lebensmitteln gebildet. Gelangen verschimmelte Schrote dieser Früchte zur Verfütterung, so werden mit diesen Futtermitteln auch Aflatoxine aufgenommen. Von der aufgenommenen Menge wird ca. 1 % in die Milch wieder ausgeschieden („Carry over Effekt“) und zwar als sogenanntes Aflatoxin M1. Im Käsebruch reichert sich das Toxin, je nach der angewendeten Technologie, um den Faktor 3,2 bis 8 an. In der Trockenmilch kommt es zu einer 7 bis 8-fachen Anreicherung. Pasteurisieren, Sterilisieren, auch UHT-Erhitzung der Milch zerstören die Aflatoxine nicht vollständig.

Für die **selektive Züchtung** von Hefen und Schimmelpilzen werden Nährböden eingesetzt, die das Wachstum von Bakterien hemmen. Das kann durch Absenken des pH-Wertes (pH 3,5 mittels Milchsäure 0,15ml pro Röhrchen) oder durch Zugabe von selektiven Antibiotika (Chloramphenicol) erreicht werden. Antibiotikumhaltige Nährböden sind leichter herzustellen und erlauben, wegen des nahezu neutralen pH-Wertes einer größeren Anzahl von Hefen und Schimmelpilzen das Wachstum, als die bisher üblichen stark sauren Medien. Chloramphenicol gibt man gegenüber Tetracyclinen den Vorzug, da Chloramphenicol kochfest ist. Tetracycline sind dagegen in wässriger Lösung instabil. Gelegentlich treten antibiotikaresistente Bakterien auf, die durch mikroskopische Kontrollen erkannt werden können.

FIL-IDF 94B: 1990 neue Version ISO/DIS 21527-1; VDLUVA VI M 7.7.2 (1996)

Kulturmedium: Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Agar (YGC-Agar) (12-15 ml) ev. pH 4,6±0,1 mit 10%iger Weinsäure einstellen

Verdünnungslösung: 1/4 starke Ringerlösung (9 ml) oder Pepton-Kochsalzlösung

Herstellung von Gussplatten: 2 Platten pro Verdünnungsstufe

Bebrütung: aerob 3-4 Tage bei 25±1 °C

AW der Platten: 10-200 Kolonien, Differenzierung von He/SchiPi

Die Auswertung erfolgt nach denselben Regeln wie bei der Gesamtkeimzahlbestimmung.

Bei nicht sauren Produkten ist YGC-Agar nicht zu 100% selektiv → „Hefen = Bakterien“.

Auch andere Nachweismethoden möglich:

Für Fruchtprodukte: Würzeagar, Sabouraud-Agar

Schnellnachweis von Hefen in Joghurt und Topfen VDLUVA VI M 7.7.2 (1996)

Kulturmedium: Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Bouillon (YGC-B.)

Verdünnungslösung: 1/4 starke Ringerlösung (9 ml) oder Pepton-Kochsalzlösung

Ansatz: 100-250g Probe + gleiche Menge an Bouillon

Bebrütung: aerob 48h bei 25±1 °C

AW: Methylenblaufärbung,

in 10 Gesichtsfeldern (40-facher Vergrößerung) sollte keine Hefe sichtbar sein → o.k.