



Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften

Fachgebiet Tierernährung/ Futtermittelkunde

Bestimmung der Keimgehalte an Bakterien, Hefen, Schimmel- und Schwärzepilzen

Verbandsmethode (Auszug)

Methodenbuch TU 5. Erg. 2004 © Copyright by VDLUFA-Verlag, Darmstadt Bearbeiter; E. Bücher; München/Oberschleißheim; H. Hofmann-Mietke; Leipzig; A. Thalmann, Karlsruhe; Chr. Dresbach. Bonn: G. Strauß, Speyer

1 Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode dient der Keimzahlbestimmung von aeroben, mesophilen Bakterien, Hefen, Schimmel- und Schwärzepilzen in Futtermitteln.

2 Prinzip

Von der Probe wird mit einer Pufferlösung eine Ausgangssuspension hergestellt. Aus dieser wird eine dezimale Verdünnungsreihe mit der Pufferlösung angelegt. Von geeigneten Verdünnungsstufen werden Keimzählplatten mit einem Nachweismedium für Bakterien bzw. für Hefen, Schimmel- und Schwärzepilze nach dem Oberflächenverfahren hergestellt.

Die beimpften Keimzählplatten für die Bakterien werden 2 Tage bei 30 °C, die für die Hefen, Schimmel- und Schwärzepilze 3 Tage bei 25 °C bebrütet und anschließend für mindestens 4 weitere Tage bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Für die Bestimmung der Keimgehalte der Bakterien, der Hefen, der Schimmel- und Schwärzepilze werden die betreffenden Kolonien jeweils insgesamt gezählt.

3. Reagenzien und Nährmedien

- ⇒ gepuffertes Peptonwasser
- ⇒ Nachweismedium für Bakterien: Tryptose-Agar oder Standard-Agar mit Zusatz von TTC (Anfärbung der produkttypischen Keime)
- ⇒ Nachweismedien für Pilze: Sabouraud-Agar oder Bengalrot-Chloramphenikol-Agar
- ⇒ Nachweismedium für Hefen: MHGBT-Agar, auf Platten gegossen

4 Geräte

Übliche Ausstattung eines mikrobiologischen Labors und insbesondere die folgenden Geräte:

- 4.1 Vorratsgefäße und dazu passende Kappen (sterilisiert) für die Suspendierungs- und Verdünnungslösung
- 4.2 Reagenzgläser zur Herstellung von weiteren Verdünnungen
- 4.3 Schüttelapparat, vorzugsweise Horizontalschüttler auf eine Frequenz von 120-180 /min einstellbar
- 4.4 Kolbenhubpipetten mit sterilen Pipettenspitzen
- 4.5 Sterile Petrischalen vorzugsweise aus Kunststoff mit Entlüftungsnocken
- 4.6 Ausstrichspatel, steril (z.B. Drigalski-Spatel)
- 4.7 Brutschrank auf 25 °C ± 1°C bzw. 30 °C ± 1 °C einstellbar
- 4.8 Wasserbäder auf 50 °C und 80 °C ± 1 °C einstellbar

5 Durchführung

5.1 Herstellung der Ausgangssuspension

Die jeweils erforderliche Einwaage und das Volumen an Suspendierungs- und Verdünnungslösung) sind aus Tabelle 1 ersichtlich. Die Genauigkeit der Einwaagen soll 0,1 g betragen.

Tabelle 1: Empfohlene Probeneinwaage und Volumen an Suspendierungslösung zur Herstellung von Ausgangssuspensionen für verschiedene Futtermittel

Art der Probe	Einwaage (g)	Suspendierungslösung (ml)	Verdünnung der Ausgangssuspension
Einzel- und Mischfuttermittel	20	180	1:10
Stark quellende Futtermittel	20	380	1:20
Heu, Stroh und Gärfutter	20	380	1:20
Flüssigfutter	40*	360	1:10

* Bei Flüssigfutter gegebenenfalls 40 ml statt 40 g

5.2 Behandlung der Ausgangssuspension

Die erforderliche Probemenge und die Suspendierungslösung (Tabelle 1) werden in einen Erlenmeyerkolben gegeben. Die so angefertigte Ausgangssuspension wird anschließend für 15 min auf einem Schüttelapparat behandelt.

5.3 Herstellung von Verdünnungen (Verdünnungsreihe)

5.3.1 Erste Verdünnung

Von den behandelten Ausgangssuspensionen sind gemäß Tabelle 2 erste Verdünnungen (1:100) herzustellen.

Dazu müssen die Ausgangssuspensionen für das Pipettieren homogen gehalten werden. Das erforderliche Volumen an Ausgangssuspension wird mit einer Pipette in die Verdünnungslösung übertragen.

Tabelle 2: Herstellung der ersten Verdünnung (empfohlene Volumina)

Proben	Einzel- und Mischfuttermittel, Flüssigfutter	Stark quellende Futtermittel. Heu, Stroh und Gärfutter
Ausgangssuspension: Verdünnungsfaktor	1:10	1:20
Ausgangssuspension + Verdünnungslösung	5 ml + 45 ml	5 ml + 15 ml
Erste Verdünnung	10^{-2} (1:100)	

5.3.2 Weitere Verdünnungen

Je nach mutmaßlichen Keimgehalten werden von der ersten Verdünnung weitere dezimale Verdünnungen hergestellt (Tabelle 3). Es wird jeweils 1 ml der vorherigen Verdünnungsstufe in 9 ml Suspendierlösung pipettiert (1:10).

Tabelle 3: Empfohlene Verdünnungsstufen zur Herstellung von Keimzählplatten

Futtermittel	Bakterien					Schimmelpilze /Hefen				
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}			10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}		
Gepresste und extrudierte Futtermittel, Extraktionsschrote, Milchaustauscher										
Mehlförmige Futtermittel, Körnerfrüchte	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}			10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	
Gärfutter		10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}			10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Heu, Stroh, Nebenerzeugnisse der Brauerei- und Backwarenindustrie		10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}		10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Silage-Ausgangsmaterial		10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}		10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}

5.4 Beimpfung von Keimzählplatten

Auf je 2 Platten werden von jeder zweckmäßigen Verdünnungsstufe (Tabelle 3) jeweils 0,1 ml pipettiert, mit 10 ml Agar für Bakterien bzw. Pilze übergossen und vorsichtig gemischt.

Für den Hefenachweis werden 0,1 ml der Verdünnungsstufen auf Platten mit Nachweismedium pipettiert und anschließend mittels Ausstrichspatel verteilt.

Zu beachten ist, dass sich dadurch jeweils eine weitere Verdünnungsstufe von 1:10 ergibt, die in der Formel zur Berechnung der Keimgehalte berücksichtigt wird.

5.5 Bebrütung der Keimzählplatten

Die hergestellten Keimzählplatten werden bebrütet:

- Bakterien bei 30 °C für 2 Tage
- Hefen, Schimmel- und Schwärzepilze bei 25 °C für 3 Tage

Anschließend werden die Platten für mindestens weitere 4 Tage bei 25°C stehen gelassen. Die Kulturschalen dürfen keinesfalls direktem Sonnenlicht ausgesetzt werden.

6 Auszählung der Kolonien

Grundsätzlich ist Folgendes zu beachten:

- Nach insgesamt 3 Tagen sollte eine erste Überprüfung der Keimzählplatten für Bakterien auf schwärmende Kolonien vorgenommen werden; sofern diese vorhanden sind, wird ausgezählt
- Die endgültige Auszählung sollte nach frühestens 6 Tagen (Bakterien) bzw. 7 Tagen (Hefen, Schimmel- und Schwärzepilze) erfolgen.
- Zur Auszählung herangezogen werden in der Regel die Keimzahlplatten der Verdünnungsstufen, die im Durchschnitt folgende Koloniezahlen erbringen:

Bakterien: mindestens 20

Hefen, Schimmel- und Schwärzepilze: mindestens 10

7 Berechnung der Keimgehalte

Von den aus einer oder mehreren Verdünnungsstufen hergestellten Keimzählplatten jedes Nachweismediums müssen wenigstens zwei Platten auswertbar sein. Andernfalls ist die Bestimmung mit geeigneten Verdünnungsstufen zu wiederholen.

Von den auswertbaren Platten werden aus den gezählten Kolonien die koloniebildenden Einheiten pro Gramm Probe (KBE/g) bzw. pro Milliliter Probe (KBE/ml) nach den folgenden Formeln berechnet.

7.1 Berechnung aus mehreren Verdünnungsstufen:

$$N = \frac{? C}{V \times [n_1 + (0,1 \times n_2)] \times d}$$

N = Anzahl der koloniebildenden Einheiten pro Gramm Probe (KBE/g)

?C = Summe aller Kolonien der Keimzählplatten von zwei aufeinander folgenden Verdünnungen

V = Volumen der auf die Keimzählplatten pipettierten Verdünnungen in ml

n₁ = Anzahl der Keimzählplatten der niedrigeren Verdünnung

n₂ = Anzahl der Keimzählplatten der höheren Verdünnung

d = Verdünnungsfaktor der niedrigeren Verdünnung

7.2 Berechnung aus einer Verdünnungsstufe

Aus den Zählergebnissen ist das arithmetische Mittel zu berechnen

$$N = \frac{C}{V \times n \times d}$$

n = Anzahl auswertbarer Keimzählplatten

7.3 Beispiele für die Berechnung:

Zwei Verdünnungsstufen mit je 3 parallelen Keimzählplatten

	Beispiel A		Beispiel B	
	Alle Keimzählplatten auswertbar		Nicht alle Keimzählplatten auswertbar	
Verdünnung	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
	Anzahl der Kolonien			
1. Platte	295	19	540	10
2. Platte	278	27	Infektion	27
3. Platte	274	23	274	23
Summe Koloniezahlen	847	69	814	60
Mittelwert	282,3	23	407	20
	Feststellung von Ausreißern			
Größte Koloniezahl	295	27	540	27
Abweichung vom Mittel	4,49 %	17,39 %	32,7 %	35 %
Kleinste Koloniezahl	274	19	274	10
Abweichung vom Mittel	97,05 %	82,61 %	67,32 %	50,00 %
Ergebnis	Keine Koloniezahlen mit unzulässiger Abweichung von mehr als ±40%.		Die Koloniezahlen 274 (10 ⁻⁴) und 10(10 ⁻⁵) weichen um mehr als ± 40 % vom Mittelwert ab.	
	Alle Koloniezahlen können zur Berechnung herangezogen werden.		Diese Zahlen können nicht zur Berechnung herangezogen werden.	
	Berechnung nach Formel		Berechnung nach Formel mit korrigierter Anzahl Keimzählplatten und Summe Koloniezahlen	
Korrekturen	nein		ja	
Anzahl Keimzählplatten	n ₁ = 3	n ₂ = 3	n ₁ = 1	n ₂ = 2
Summe Koloniezahlen	847	69	540	50

Beispiel A

Beispiel B

Das Volumen der eingepfunden Verdünnung beträgt jeweils 0,1 ml.

$$N = \frac{847 + 69}{0,1 \times [3 + (0,1 \times 3)] \times 10^{-4}}$$

$$N = \frac{540 + 50}{0,1 \times [1 + (0,1 \times 2)] \times 10^{-4}}$$

$$N = \frac{916 \times 10^4}{0,22}$$

$$N = \frac{590 \times 10^4}{0,12}$$

Ergebnis gerundet:

$$= 27.772.727,27 \text{ KBE/g}$$

$$= \underline{\underline{27\ 000\ 000 \text{ KBE/g}}}$$

$$= \underline{\underline{27 \times 10^6 \text{ KBE/g}}}$$

$$= 49166666,7 \text{ KBE/g}$$

$$= \underline{\underline{49\ 000\ 000 \text{ KBE/g}}}$$

$$= \underline{\underline{49 \times 10^6 \text{ KBE/g}}}$$

8 Ergebnisbericht

Im Ergebnisbericht sind die Methode und die Bestimmungsgrenzen zu vermerken. Der ermittelte Keimgehalt ist auf zwei signifikante Ziffern zu runden. Bei Vorliegen von Gehalten aus mehreren Bestimmungen ist das arithmetische Mittel zu bilden.

Die Keimgehalte der drei Gruppen an Mikroorganismen sind im Ergebnisbericht wie folgt anzugeben:

- Bakterien in Millionen (10^6) KBE/g bzw. /ml
- Hefen, Schimmel- und Schwärzepilze in Tausend (10^3) KBE/g bzw. /ml

9 Toleranzgrenzen

Tabelle 4: Hefen- und Schimmelpilzbesatz in Futtermitteln

Keimgruppen	Einstufung des Keimbesatzes	Keimbesatz in		Häufigkeiten des Keimbesatzes in %				
		logKBE/g FM	Absolutzahl/g FM	Gras-Silagen	Mais-Silagen	Heu	Biertreber	ZR-Schnitzel
Verderberregende Pilze	hoch	$\geq 3,7$	5000	2	2,9	35,3	0,0	0,0
	tolerierbar	$\leq 2,0$	100	92	97,1	47,1	100	100
Hefen, allgemein	hoch	$\geq 6,0$	1.000.000	2,0	25,7	0,0	60,0	75,0
	tolerierbar	$< 4,0$	10.000	86	34,3	94,1	0	25

10 Mitgeltende Unterlagen

- Allgemeine Verfahrensanweisung zur Bestimmung von Keimzahlen mittels fester Nährmedien. VDLUFA-Methode, in der jeweils gültigen Fassung
- Verfahrensanweisung zur mikrobiologischen Qualitätsbeurteilung von Futtermitteln. VDLUFA-Methode, in der jeweils gültigen Fassung
- Verjährensanweisung zur Identifizierung von Bakterien, Hefen, Schimmel- und Schwärzepilzen als produkttypische oder verderbanzeigende Indikatorkeime in Futtermitteln, VDLUFA-Methode, in der jeweils gültigen Fassung

11 Literatur

- DRESBACH, CHR., GOLBMBOWSH, D., BELUN, P., 1982: Das Oberflächenverfahren zur Keimzahlbestimmung von Futtermittelproben als Alternative zum herkömmlichen Plattengussverfahren. Getreide, Mehl und Brot, 36, Rheinisch-Westfälischer Bäcker-Verlag GmbH, 332-335
- ISO/CD 21527-2, 2002: Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds - Colony-count technique - Part 2: Products with low aw (below 0,95) using DG 18 agar
- SCHMIDT, H.-L., BUCHER, E UND SPICHER, G., 1981: Keimgehaltsbestimmung von Bakterien, Schimmelpilzen und Hefen in Futtermitteln - Nährboden und Methodik. Landwirtsch. Forsch. 34, 242-250

