

Klaus Pichhardt

Lebensmittel- mikrobiologie

Grundlagen für die Praxis

Zweite, überarbeitete und
erweiterte Auflage

Mit 79 Abbildungen

Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
London Paris Tokyo Hong Kong (1992)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1	Aufgabe und Bedeutung der Lebensmittelmikrobiologie.....	3
1.1.1	Anforderung an die lebensmittelmikrobiologische Analytik.....	6
1.1.2	Bakterien-Schlüssel	6
1.1.3	Bakterienklassifikation nach physiologischen Merkmalen	8
1.1.4	Mikroorganismen für die Beurteilung von Lebensmitteln.....	9
1.2	Umgang mit Mikroorganismen	11
1.2.1	Kriterien für die Klassifikation von Mikroorganismen und Krankheitserregern nach den im Umgang mit ihnen auftretenden Gefahren	11
1.2.1.1	Klassifizierung der Bakterien.....	12
1.2.1.2	Klassifizierung der Pilze	13
1.2.2	Grundregeln guter mikrobiologischer Technik	13
1.2.3	Anforderung an Laboratorien für Arbeiten mit Bakterien und Pilzen.....	14

2 Techniken - Verfahren - Nährböden - Untersuchungsmethoden

2.1	Laboraausstattung.....	17
2.1.1	Ausrüstung für das mikrobiologische Laboratorium.....	17
2.1.1.1	Apparate und technische Hilfsmittel	17
2.1.1.2	Glas- und Kunststoffartikel.....	19
2.1.1.3	Utensilien für die Probenahme	20
2.2	Nährböden.....	21
2.2.1	Herstellung von Nährböden.....	22
2.2.1.1	Lösen von Trocken-Nährmedien.....	23
2.2.1.2	pH-Wert-Einstellung	23
2.2.1.3	Sterilisieren von Nährmedien	23
2.2.1.4	Gießen der Nährböden.....	23
2.2.1.5	Trocknen und Vorbebrüten der Nährböden	24
2.2.2	Nährböden in Kulturröhrchen.....	24
2.2.3	Lagerung gebrauchsfertiger Nährböden	25

2.3	Sterilisationsverfahren	26
2.3.1	Sterilisation durch feuchte Hitze	26
2.3.1.1	Tyndallisation	27
2.3.2	Sterilisation durch trockene Hitze	28
2.3.3	Sterilisation durch Ausglühen oder Abflammen	29
2.3.4	Sterilisation durch Filtration	29
2.4	Untersuchungsgang	30
2.4.1	Die Probenahme	30
2.4.2	Verdünnung der Lebensmittelprobe	32
2.4.3	Verhältnis der Probemenge zur Verdünnungsflüssigkeit	32
2.4.4	Verdünnungsreihe	33
2.4.4.1	Verdünnungsreihe in Reagenzgläsern	33
2.4.4.2	Verdünnungsreihe in Flaschen	34
2.4.5	Kultivierungsverfahren	35
2.4.5.1	Koch'sches Plattengußverfahren	35
2.4.5.2	Oberflächen-Spatelverfahren	35
2.4.5.3	Plattentropfverfahren	38
2.4.6	Auswertung der bebrüteten Agarplatten	38
2.4.7	Keimzahl- und Mittelwertberechnung	41
2.4.7.1	Keimzahlberechnung	41
2.4.7.2	Mittelwertberechnung	41
2.4.7.3	Einfaches arithmetisches Mittel	41
2.4.7.4	Gewogenes arithmetisches Mittel	42
2.5	Tauchverfahren zur Ermittlung von Keimgehalten	44
2.5.1	Eintauch- und Kontaktobjektträger	44
2.5.1.1	Anwendungsbereich	45
2.5.1.2	Untersuchungsgang	45
2.5.1.3	Auswertung	46
2.5.1.4	Vorsichtsregeln	47
2.6	Nicht-kulturelle und indirekte kulturelle Keimzahlbestimmungen	48
2.6.1	Direkte Epifluoreszenz-Filter-Technik (DEFT)	48
2.6.2	Limulus-Testverfahren (LAL)	49
2.6.3	Impedanzmessung	50
2.6.4	Adenosintriphosphat-(ATP)-Messung	50
2.6.5	Messung der Gasveränderung	51
2.7	Kultivierungsverfahren	52
2.7.1	Isolierung und Reinkultivierung von Mikroorganismen	52
2.7.1.1	Ausstrich-Methoden	52
2.7.2	Übertragungsmethoden von Mikroorganismen	53

2.7.2.1	Abimpf-Verfahren.....	53
2.7.2.2	Beimpfungs-Verfahren	55
2.7.3	Aufbewahrung von Mikroorganismen	55
2.7.4	Anaerobierkultur	56
2.7.4.1	Anaerobier-Topf.....	56
2.7.4.2	Anaerobier-Folienbeutel	58
2.7.4.3	Marino-Platte.....	58
2.7.4.4	Wright-Burri-Röhrchen.....	58
2.8	Membranfilterverfahren.....	60
2.8.1	Das Filtrationsgerät	60
2.8.2	Filtermaterial	60
2.8.3	Membranfilter-Nährböden.....	62
2.8.3.1	Agarnährböden	62
2.8.3.2	Nährkartonscheiben (NKS)	62
2.8.4	Untersuchungsmethoden.....	62
2.8.4.1	Leichtlösliche Lebensmittel	63
2.8.4.2	Schwerlösliche Lebensmittel.....	64
2.8.4.3	Unlösliche Lebensmittel.....	64
2.8.5	Membranfilter-Mikrokolonie-Schnellverfahren.....	64
2.8.5.1	Membranfilter-Mikrokolonie-Methode	65
2.8.5.2	Membranfilter-Mikrokolonie-Fluoreszenz-Methode (MMCF-Methode).....	66
2.9	Titer- und Most Probable Number-Technik	68
2.9.1	Titer-Bestimmung	68
2.9.1.1	Beziehung zwischen Titer und Keimzahl	68
2.9.1.2	Beispiel und Auswertung einer Titerbestimmung.....	69
2.9.2	Most Probable Number-Technik (MPN).....	70
2.9.2.1	Durchführung der 9-Röhrchen-Technik	70
2.9.2.2	Durchführung der Methode nach Hess et al. (1969).....	72
2.9.3	Rekontaminations-Titer	75
2.9.3.1	Durchführung.....	76
2.9.3.2	Ermittlung der Keimzahl.....	76
2.10	Färbeverfahren	78
2.10.1	Vitalfärbung - Färbung von Nativpräparaten	78
2.10.2	Intensivfärbung - Färbung von Ausstrichpräparaten.....	78
2.10.2.1	Herstellung von Ausstrichpräparaten.....	78
2.10.2.2	Einfache Färbung	80
2.10.3	Sporenfärbung	80
2.10.3.1	Malachit-Safranin-Sporenfärbung.....	80
2.10.3.2	Carbolfuchsin-Methylenblau-Sporenfärbung.....	81
2.10.4	Gramfärbung.....	81

2.10.4.1	GRAM-negative Bakterien	83
2.10.4.2	GRAM-positive Mikroorganismen	83
2.10.4.3	Kristallviolett-Safranin-Gramfärbung.....	84
2.10.5	Färbepank.....	84
2.10.6	Farbstofflösungen.....	84
2.11	Betriebshygiene, Bedarfsgegenstände, Keimzahlbestimmungen von Oberflächen, Behältnissen und Luft	85
2.11.1	Abklatschverfahren	85
2.11.1.1	Rodac-Platten - Agaroid-Stangen	86
2.11.2	Abstrichverfahren.....	86
2.11.2.1	Vorbereitung für das Verfahren.....	87
2.11.3	Abschwemmverfahren	89
2.11.4	Überschichtungsverfahren	89
2.11.5	Keimzahlbestimmung in Flaschen	89
2.11.5.1	Rollflaschen-Methode	90
2.11.5.2	Flaschen-Spül-Methode.....	90
2.11.6	Bestimmung der Luftkeimzahl	91
2.11.6.1	Sedimentationstest	91
2.11.6.2	Gelatine-Membranfilter-Verfahren	92
2.11.6.3	Impingment-Verfahren.....	92
2.11.6.4	Impaction-Verfahren	93
2.12	Hemmstoffe	94
2.12.1	Konservierungsstoffe.....	94
2.12.1.1	Bestimmung der Mindest- oder Grenzhemmkonzentration.....	95
2.12.1.2	Inhibitive und mikrobizide-Konzentration.....	96
2.12.2	Antibiotika.....	97
2.12.2.1	Agardiffusions-Verfahren	97
2.12.2.2	Arten von Antibiotika-Tests	97
2.12.3	Desinfektionsmittel	98
2.12.3.1	Suspensionsversuch	98
2.13	Stabilitätsprüfung von Konserven	100
2.13.1	Prüfung der äußeren Dosenbeschaffenheit	100
2.13.2	Prüfung bei der Öffnung bombierter Dosen	101
2.13.3	Dichtigkeitsprüfung von Konserven.....	101
2.13.4	Stabilitätsprüfung	102
2.13.5	Hilfsuntersuchungen	102
2.13.6	Stichprobenumfang	103
2.14	Ausgewählte Nährböden, Reaktionsmedien, Seren.....	104
2.14.1	Nährböden, Reaktionsmedien und Seren	105

2.15	Nachweismethoden	111
2.15.1	Gesamtkoloniezahl und aerobe mesophile Mikroorganismen	111
2.15.1.1	Nachweis der Gesamtkoloniezahl	112
2.15.1.2	Nachweis der aeroben mesophilen Bakterien	112
2.15.2	Gesamtkoloniezahl anaerober mesophiler Keime	112
2.15.2.1	Beurteilung	113
2.15.3	Unterscheidung gramnegativer und -positiver Bakterien mittels KOH-Test	113
2.15.3.1	Durchführung und Prinzip der Methode	113
2.15.4	Aminopeptidase-Test zur Überprüfung des Gramverhaltens gramnegativer und grampositiver Bakterien	114
2.15.4.1	Prinzip und Durchführung der Methode	114
2.15.5	Überprüfung der mikroskopischen und makroskopischen Keim- bzw. Koloniemorphologie	115
2.15.5.1	Formgebung im mikroskopischen Bereich	116
2.15.5.2	Koloniemorphologie	118
2.15.6	Überprüfung des Verhaltens von Bakterien gegenüber Sauerstoff	119
2.15.6.1	Standkultur in Hochschichtröhrchen	119
2.15.6.2	Stichkultur in Hochschichtröhrchen	120
2.15.7	Oxidations-Fermentations-Test zum Nachweis der Kohlenhydratverwertung	120
2.15.7.1	Durchführung und Auswertung	120
2.15.8	Aerobe mesophile Fremdkeime	121
2.15.8.1	Untersuchungsgang	122
2.15.8.2	Auswertung	122
2.15.9	Pseudomonaden	122
2.15.9.1	Auswertung	122
2.15.9.2	Identifizierung	123
2.15.9.3	Differenzierung	123
2.15.10	Enterobacteriaceen	125
2.15.10.1	Anreicherungsmedien	126
2.15.10.2	Differenzierung von Enterobacteriaceen	127
2.15.10.3	System-Differenzierung von Enterobacteriaceen	127
2.15.11	Coliforme Keime und <i>Escherichia coli</i>	128
2.15.11.1	Selektivanreicherung	128
2.15.11.2	Fraktionierter Ausstrich	128
2.15.11.3	IMViC-Differenzierungs-Test	129
2.15.11.4	SIM-Differenzierungs-Test	131
2.15.11.5	Bestimmung von <i>Escherichia coli</i> im flüssigen Medium	132
2.15.11.6	Beimpfung	133
2.15.11.7	Spezifische <i>E. coli</i> Identifikations-Tests	133
2.15.11.8	Schnellbestimmung von <i>E. coli</i> mittels Direkt-Platten-Methode	135

2.15.12	Salmonellen (Überprüfung auf Abwesenheit - Verdachtsdiagnose).....	137
2.15.12.1	Biochemische Identifikation (Screening)	139
2.15.12.2	Serologische Überprüfung	141
2.15.12.3	Agglutination, Durchführung und Interpretation	142
2.15.12.4	Verdachtsdiagnose durch Phagolyse.....	143
2.15.12.5	Untersuchungstechnik	143
2.15.13	Shigellen	146
2.15.13.1	Schema der Shigellen-Untersuchung.....	147
2.15.14	<i>Yersinia enterocolitica</i>	148
2.15.14.1	Anreicherungsmedien und Selektivnährböden.....	148
2.15.14.2	Untersuchungsgang.....	149
2.15.14.3	Auswertung verdächtiger Kolonien.....	151
2.15.15	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	152
2.15.15.1	Verdünnungsflüssigkeit und Selektiv-Bouillon.....	152
2.15.15.2	Analysengang	152
2.15.15.3	Nährböden für die Diagnostik	154
2.15.15.4	Kanagawa-Test	154
2.15.16	<i>Campylobacter jejuni</i>	156
2.15.16.1	Selektivanreicherung	156
2.15.16.2	Nachweis und Beurteilung	156
2.15.16.3	Bestätigung.....	157
2.15.17	Enterokokken	158
2.15.17.1	Streptokokken-Latex-Agglutination.....	161
2.15.18	<i>Staphylococcus aureus</i>	161
2.15.18.1	Anreicherung	162
2.15.18.2	Direkter quantitativer Nachweis	162
2.15.18.3	Bestätigungs-Tests.....	162
2.15.18.4	ELISA-Test zum Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen	165
2.15.19	<i>Bacillus cereus</i>	166
2.15.19.1	Auswertung	166
2.15.19.2	Ermittlung der aeroben Sporenzahl	167
2.15.20	<i>Clostridium perfringens</i>	168
2.15.20.1	Untersuchungsgang.....	168
2.15.20.2	Auswertung und Bestätigung.....	168
2.15.21	<i>Clostridium perfringens</i> -Sporen.....	169
2.15.21.1	Analysengang.....	170
2.15.21.2	Beschreibung der Nährböden.....	171
2.15.22	Qualitativer Anaerobier-Nachweis	172
2.15.22.1	Durchführung.....	172
2.15.23	Quantitativer Nachweis anaerober Sporen.....	172
2.15.24	Listerien.....	174
2.15.24.1	Nachweis und Nährböden, Prüfung verdächtig gewachsener Kolonien	174
2.15.24.2	Grobdifferenzierung	177
2.15.25	Milchsäurebakterien	178

2.15.25.1	Nachweisverfahren	178
2.15.25.2	Auswertung und Bestätigung	179
2.15.26	Proteolyten	180
2.15.26.1	Nachweis	180
2.15.27	Lipolyten	181
2.15.27.1	Nachweis	181
2.15.28	Halophile - Halotolerante	182
2.15.28.1	Nachweis	182
2.15.28.2	Halotoleranz-Test	182
2.15.29	Hefen und Schimmelpilze, Gesamtzahl	183
2.15.30	Osmotolerante Hefen	184
2.15.30.1	Quantitativer Nachweis	184
2.15.30.2	Qualitativer Nachweis	184
2.15.30.3	MPN-Zählung hochosmotoleranter Hefen	185
2.15.31	<i>Aspergillus flavus</i> und <i>Aspergillus parasiticus</i>	186
2.15.31.1	Nachweis	186
2.15.32	<i>Penicillium expansum</i>	187
2.15.32.1	Nachweis	187
2.15.33	<i>Byssoschlamys</i> -Ascosporen	187
2.15.33.1	Nachweis	188
2.16	Physikalische Hilfsuntersuchungen	189
2.16.1	Wasseraktivität	189
2.16.2	pH-Wert	191

3 Stichprobenpläne - "Gute Herstellpraxis" - Produktklassen

3.1	Aspekte zum Stichprobenplan	195
3.2	Grundlagen	197
3.2.1	Losgröße	197
3.2.2	GMP-Richtlinien und HACCP-Konzept	198
3.2.3	Grenz- und Toleranzwerte, Richtwerte und Spezifikationen	198
3.2.4	Klassenplan	200
3.2.5	Consumer Risk - Producer Risk	201
3.2.6	Kriterien für die Klassifizierung von Rohstoffen und Fertigwaren	202
3.2.6.1	Gefährdung der Produkte	202
3.2.7	Durchführung von Kontrollen	203
3.3	Produktklassifizierungen - Stichprobenpläne	205
3.3.1	Klassifizierung von Rohstoffen und Fertigwaren	205
3.3.1.1	Rohstoffe	205

3.3.1.2	Fertige Produkte.....	206
3.3.2	Umfang und Häufigkeit von Bemusterungen.....	207
3.3.2.1	Rohstoffe	207
3.3.2.2	Fertige Produkte.....	207
3.3.3	Bemusterung von Konserven und UHT-behandelten Produkten	209
3.3.4	Bemusterungen und Anforderungen nach international anerkannten Richtlinien	210
3.3.5	Überprüfung der Abwesenheit von Salmonellen	211
3.3.5.1	Systematische Bemusterung kontinuierlich hergestellter Pulverprodukte	215

4 Kosmetische Produkte

4.1	Untersuchungsumfang, -methoden und Kriterien	219
4.1.1	Mikrobiologisches Untersuchungsprogramm.....	219
4.1.1.1	Kontaminationsquellen.....	219
4.1.1.2	Notwendige Kontrollen	219
4.1.1.3	Entwicklungsphase	219
4.1.1.4	Produktionsphase	220
4.1.1.5	Produktkontrolle	220
4.1.2	Konservierungsbelastungs-Test	220
4.1.2.1	Prinzip der Methode	221
4.1.2.2	Vorbereitung der Testkeime.....	221
4.1.2.3	Temperaturbelastung des Prüfmateri als	222
4.1.2.4	Bestimmung der Keimzahl.....	222
4.1.2.5	Beurteilung des Belastungstests	223
4.1.3	Mikrobielle Reinheit - mikrobiologischer Status.....	223
4.1.3.1	Methoden und Anwendungsbereiche für Keimzahl-/ Keimart- Bestimmungen	223
4.1.3.2	Probenahme und -vorbereitung.....	224
4.1.3.3	Untersuchungsbeispiele zu ausgewählten Mikroorganismen.....	224
4.1.4	Mikrobiologische Kriterien	229

5 Anhang

5.1	Rezepturen für Farbstoff- und Reagenzlösungen diverser Färbemethoden.....	233
5.1.1	Farbstoff- und Reagenzlösungen.....	233
5.1.1.1	Methylenblaulösung für die Vitalfärbung	233
5.1.1.2	Erythrosinlösung für die Vitalfärbung.....	233
5.1.1.3	Methylenblaulösung	233
5.1.1.4	Carbolfuchsinlösung.....	234

5.1.1.5	Malachit-Safranin-Sporenfärbung.....	234
5.1.1.6	Carbolfuchsin-Methylenblau-Sporenfärbung	234
5.1.1.7	Carbolgentianaviolett-Fuchsin-Gramfärbung.....	234
5.1.1.8	Kristallviolett-Safranin-Färbung.....	235
5.2	Stammsammlungen für Bakterien-, Pilz- und Hefekulturen.....	236
5.2.1	Bakterien	236
5.2.2	Pilz- und Hefekulturen	236
Literatur		237
Sachverzeichnis.....		245