universität wien

DIPLOMARBEIT

Mikrobiologisches Monitoring von Milchprodukten mit verlängerter Haltbarkeit

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Verfasserin:	Irene Rückerl
Matrikel-Nummer:	0348378
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt):	Ernährungswissenschaften A 474
Betreuer:	Univ. Prof. Dipl.-Ing. Dr. Wolfgang Kneifel

Wien, im März 2010

Danksagung

Hiermit bedanke ich mich herzlichst bei allen, die es ermöglicht haben diese Arbeit durchzuführen und fertig zu stellen:
Mein Dank gilt Herrn Dipl.-Ing. Alois Kronberger, der die Durchführung der Arbeit als Kooperation der Universität für Bodenkultur mit Berglandmilch reg.Gen.m.b.H. im Werk Aschbach überhaupt erst möglich machte.
Bei Herrn Univ. Prof. Wolfgang Kneifel möchte ich mich recht herzlich für die Übernahme des Themas, sowie für die exzellente Betreuung der Arbeit bedanken. Ebenso danke ich den MitarbeiterInnen seiner Abteilung für die Hilfestellung bei den Arbeiten im Labor.
Mein spezieller Dank gilt Herrn Dr. Andreas Reiter, der mir während meiner Arbeiten im Betrieb jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und es immer verstand mich motivierend zu unterstützen. Auch allen MitarbeiterInnen der Firma Berglandmilch reg.Gen.m.b.H. im Werk Aschbach, die mir bei der Durchführung meiner Arbeit behilflich waren möchte ich herzlich danken.
Den Firmen bioMérieux Austria GmbH und Foss GmbH möchte ich herzlich für die zur Verfügung Stellung der Geräte und die Betreuung vor Ort bedanken.
Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir mein Studium ermöglichten und mich all meiner Launen zum Trotz immer unterstützten.
Bei meinen Freundinnen und Studienkolleginnen bedanke ich mich für die seelische Unterstützung und das große Verständnis in allen Situationen während des Studiums.
Besonderer Dank gilt meinem Freund - der mir im Lauf der Jahre immer Rückhalt in schwierigen Situationen gab und mich in sämtlichen Höhen und Tiefen kompromisslos unterstützte - für das Korrekturlesen und den Beistand beim Abfassen dieser Arbeit.

I Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Fragestellung 1
2 Literaturübersicht 3
2.1 Milch und Milchprodukte mit verlängerten Haltbarkeiten 3
2.1.1 Einführung und Definition 3
2.1.2 Technologie 3
2.1.2.1 Hocherhitzung 4
2.1.2.2 Mikrofiltration mit anschließender thermischer Behandlung 6
2.1.2.2.1 Definition 6
2.1.2.2.2 Technologie 7
2.2 Die Mikrobiologie der Milch 9
2.2.1 Gesetzliche Anforderungen an Roh- und Trinkmilch 9
2.2.2 Die Mikrobiologie der Rohmilch 10
2.2.3 Die Mikrobiologie pasteurisierter Trinkmilch 11
2.2.4 Die Mikrobiologie der UHT-Milch 12
2.2.5 Die Mikrobiologie der ESL-Milch 13
2.2.6 Die Mikrobiologie mikrofiltrierter Milch 13
2.2.7 Einflussfaktoren auf die Produktqualität- und Stabilität von mikrofiltrierter ESL-Milch 14
2.2.8 Produktveränderungen durch Verfahren zur Herstellung von ESL-Milch 17
2.3 Mikrobiologisches Monitoring von Milchprodukten mittels Schnellmethoden 19
2.3.1 Definition 19
2.3.2 Anforderungen an Schnellmethoden 22
2.3.3 Nachweis von Mikroorganismen durch ATP-Biolumineszenz (CellScan Innovate™ System) 23
2.3.4 Colorimetrische Verfahren 25
2.3.4.1 BacT/ALERT 25
2.3.4.2 MicroFoss 27
3 Material und Methoden 30
3.1 Nährmedien und Verdünnungslösungen 30

3.1.1 Gesamtkeimzahlbestimmung - Referenzverfahren 30
3.1.2 Nährmedium zur Stammhaltung 31
3.1.3 Nährbouillon zur Resuszitation 31
3.1.4 Nährmedien zur Überimpfung 32
3.1.5 Verdünnungslösung 33
3.1.6 Nährmedien für die Keimisolierung- und differenzierung 33
3.1.6.1 Selektivnährmedien 33
3.1.6.1.1 Nachweis und Keimzahlbestimmung von *Enterobacteriaceae* 33
3.1.6.1.2 Nachweis von *Pseudomonas* 35
3.1.6.1.3 Nachweis von *Staphylococcus* und *Micrococcus* 36
3.1.6.2 Chromogene Selektivnährmedien 37
3.1.6.2.1 Isolierung von *Bacillus cereus* 37
3.1.6.2.2 Isolierung von *Escherichia coli* 38
3.1.6.3 Nährmedium zur Bestimmung des Hämolyseverhaltens 40
3.1.7 Cellscan System 41
3.1.8 BacT/ALERT 43
3.1.9 MicroFoss 44
3.1.10 Methoden zur Keimdifferenzierung 44
3.1.10.1 Katalasetest 45
3.1.10.2 Oxidasetest 46
3.1.10.3 Mikroskopische Differenzierung 46
3.1.10.3.1 Färbung mit Methylenblau 46
3.1.10.3.2 Gramfärbung 47
3.1.10.4 API-Test 47
3.1.11 Geräte und Hilfsmittel 48
3.2 Durchführung 49
3.2.1 Keimisolierung 49
3.2.2 Keimdifferenzierung 50
3.2.3 Durchführung des Methodenvergleichs 51
3.2.3.1 Versuch 1 51
3.2.3.2 Versuch 2 52
3.2.3.3 Produktionsbegleitende Anwendung der Methoden 53

3.2.3.3.1 Anlagenkonfiguration und Versuchsbedingungen 53
3.2.3.3.2 Probenahme- und Untersuchungsplan 55
4 Ergebnisse und Diskussion 58
4.1 Ergebnisse 58
4.1.1 Isolation und Charakterisierung relevanter Verderbskeime 58
4.1.2 Methodenvergleich 60
4.1.2.1 Versuch 1 – Methodenvergleich im zeitlichen Verlauf 60
4.1.2.2 Versuch 2 – Methodenvergleich im fünffachen Prallelansatz 69
4.1.2.2.1 Gesamtkeimzahlbestimmung 70
4.1.2.2.2 Die *Enterobacteriaceae*-Keimzahl 77
4.1.2.3 Produktionsbegleitende Anwendung der Methoden 82
4.2 Diskussion 87
5 Schlussbetrachtung 91
6 Zusammenfassung 92
7 Abstract 93
8 Literaturverzeichnis 94
9 Anhang 104
9.1 BacT/ALERT Wachstumskurven (iAST-Medium) 104
9.2 MicroFoss Wachstumskurven (TVC-Medium) 112
9.3 Ergebnisse des Versuchs 2 im Detail – Gesamtkeimzahl-bestimmung 117
9.4 Ergebnisse des Versuchs 2 im Detail – *Enterobacteriaceae*-Keimzahl 120

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Herstellungsverfahren für ESL-Milch: a) Hocherhitzung b) Mikrofiltration + thermische Behandlung 4
Abbildung 2: Schema des Injektions- und Infusionsprinzips 5
Abbildung 3: Abrennung von Milchinhaltsstoffen durch unterschiedliche Membrantrennverfahren 7
Abbildung 4: Prozessführung einer Mikrofiltration zur Herstellung von ESL-Milch 8
Abbildung 5: Haltbarkeit von mikrofiltrierter, kurzzeiterhitzter Milch mit unterschiedlicher Ausgangskeimzahl 15
Abbildung 6: Temperatur-Zeit Diagramm der Vorgänge bei Milcherhitzung 17
Abbildung 7: Luciferin-Luciferase Reaktion 23
Abbildung 8: CellScan Innovate™ System 24
Abbildung 9: BacT/ALERT® 3D Messprinzip 26
Abbildung 10: BacT/ALERT iAST Kulturfläschen 27
Abbildung 11: Messprinzip von MicroFoss 28
Abbildung 12: Messprinzip des CellScan System I 42
Abbildung 13: Messprinzip des CellScan System II 42
Abbildung 14: Grobdifferenzierung milchwirtschaftlich relevanter Mikroorgansimen 45
Abbildung 15: Schematische Darstellung der Keimisolierung 49
Abbildung 16: Schematische Darstellung der Keimdifferenzierung 50
Abbildung 17: Schematische Darstellung des ersten Versuchs zum Vergleich der Methoden 52
Abbildung 18: Schematische Darstellung des zweiten Versuchs zum Vergleich der Methoden 53
Abbildung 19: Mikrofiltrationsanlage mit drei Filtrationseinheiten 54
Abbildung 20: Anlagenkonfiguration und Probenahmestellen 55
Abbildung 21: Ergebnisse des Monitorings von mit *Staphylococcus* spp. inokulierten Milchproben über einen Zeitraum von zwei Wochen 66
Abbildung 22: Ergebnisse des Monitorings von mit *Bacillus* spp. inokulierten Milchproben über einen Zeitraum von zwei Wochen 67
Abbildung 23: Ergebnisse des Monitorings von mit *Pseudomonas* spp. inokulierten Milchproben über einen Zeitraum von zwei Wochen 68

Abbildung 24: Ergebnisse des Monitorings von mit *E. coli* inokulierten Milchproben über einen Zeitraum von zwei Wochen 69
Abbildung 25: Mittelwerte der mit *Staphylococcus* spp. inokulierten Milchproben in drei Konzentrationen nach 24- bzw. 48-stündiger Lagerung bei 7- bzw. 22 °C..... 70
Abbildung 26: Mittelwerte der mit *Micrococcus* spp. inokulierten Milchproben in drei Konzentrationen nach 24- bzw. 48-stündiger Lagerung bei 7- bzw. 22 °C..... 72
Abbildung 27: Mittelwerte der mit *Enterobacter* spp. inokulierten Milchproben in drei Konzentrationen nach 24- bzw. 48-stündiger Lagerung bei 7- bzw. 22 °C..... 73
Abbildung 28: Mittelwert der mit *E. coli* inokulierten Milchproben in drei Konzentrationen nach 24- bzw. 48-stündiger Lagerung bei 7- bzw. 22 °C..... 75
Abbildung 29: Mittelwerte der mit einer Mischflora inokulierten Milchproben in drei Konzentrationen nach 24- bzw. 48-stündiger Lagerung bei 7- bzw. 22 °C..... 76
Abbildung 30: Mittelwerte der *E. coli* inokulierten Milchproben in drei Konzentrationen nach 24- bzw. 48-stündiger Lagerung bei 7- bzw. 22 °C 78
Abbildung 31: Mittelwerte der mit *Enterobacter* spp. inokulierten Milchproben in drei Konzentrationen nach 24- bzw. 48-stündiger Lagerung bei 7- bzw. 22 °C..... 79
Abbildung 32: Mittelwerte der mit einer Mischflora inokulierten Milchproben in drei Konzentrationen nach 24- bzw. 48-stündiger Lagerung bei 7- bzw. 22 °C..... 80
Abbildung 33: *Pseudomonas* spp. in Konzentration C nach 24 h Lagerung bei 7 °C.. 104
Abbildung 34: *Pseudomonas* spp. in Konzentration C nach einer Woche Lagerung bei 7 °C 104
Abbildung 35: *Pseudomonas* spp. in Konzentration C nach zwei Wochen Lagerung bei 7 °C 105
Abbildung 36: *Bacillus* spp. in Konzentration C nach 24 h Lagerung bei 7 °C..... 105
Abbildung 37: *Bacilluss* spp. in Konzentration C nach einer Woche Lagerung bei 7 °C 106
Abbildung 38: *Bacillus* spp. in Konzentration C nach zwei Wochen Lagerung bei 7 °C 106
Abbildung 39: *Staphylococcus* spp. in Konzentration C nach 24 h Lagerung bei 7 °C 107
Abbildung 40: *Staphylococcus* spp. in Konzentration C nach einer Woche Lagerung bei 7 °C 107

Abbildung 41:*Staphylococcus* spp. in Konzentration C nach zwei Wochen Lagerung bei 7 °C 108
Abbildung 42: *E. coli* in Konzentration A nach 24-stündiger Lagerung bei 7 °C 108
Abbildung 43: *E. coli* in Konzentration B nach 24-stündiger Lagerung bei 7 °C 109
Abbildung 44: *E. coli* in Konzentration C nach 24-stündiger Lagerung bei 7 °C 109
Abbildung 45: *E. coli* in Konzentration A nach einer Woche Lagerung bei 7 °C 110
Abbildung 46: *E. coli* in Konzentration B nach einer Woche Lagerung bei 7 °C 110
Abbildung 47: E. coli in Konzentration C nach einer Woche Lagerung bei 7 °C 111
Abbildung 48: *Bacillus* spp. in Konzentration A, B und C – sowie Sterilkontrolle – nach 24-stündiger Lagerung bei 7 °C 112
Abbildung 49: *Bacillus* spp. in Konzentration A, B und C – sowie Sterilkontrolle – nach einer Woche Lagerung bei 7 °C 112
Abbildung 50: *Bacillus* spp. in Konzentration A, B und C – sowie Sterilkontrolle – nach zwei Wochen Lagerung bei 7 °C 113
Abbildung 51: *Staphylococcus* spp. in Konzentration A, B und C – sowie Sterilkontrolle – nach 24-stündiger Lagerung bei 7 °C 113
Abbildung 52: *Staphylococcus* spp. in Konzentration A, B und C – sowie Sterilkontrolle – nach einer Woche Lagerung bei 7 °C 114
Abbildung 53: *Staphylococcus* spp. in Konzentration A, B und C – sowie Sterilkontrolle – nach zwei Wochen Lagerung bei 7 °C 114
Abbildung 54: *E. coli* in Konzentration A, B und C – sowie Sterilkontrolle – nach 24-stündiger Lagerung 115
Abbildung 55: *E. coli* in Konzentration A, B und C – sowie Sterilkontrolle – nach einwöchiger Lagerung bei 7 °C 115
Abbildung 56: *E. coli* in Konzentration A, B und C – sowie Sterilkontrolle – nach zweiwöchiger Lagerung bei 7 °C 116

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Thermisch-induzierte Veränderungen in pasteurisierter und ESL-Milch 18
Tabelle 2: Geräte und Hilfsmittel 48
Tabelle 3: Probenahme und Untersuchungsplan 56
Tabelle 4: Übersicht der Charakterisierungsergebnisse 59
Tabelle 5: Mittels Referenzverfahrens und CellScan erhaltene Ergebnisse der Messungen innerhalb 14-tägiger Probenlagerung bei 7 °C 61
Tabelle 6: Mittels BacT/ALERT und MicroFoss erhaltene Ergebnisse 64
Tabelle 7: Standardabweichungen – Ergänzung zu Abbildung 25 70
Tabelle 8: Standardabweichungen – Ergänzung zu Abbildung 26 72
Tabelle 9: Standardabweichungen – Ergänzung zu Abbildung 27 73
Tabelle 10: Standardabweichungen – Ergänzung zu Abbildung 28 75
Tabelle 11: Standardabweichung – Ergänzung zu Abbildung 29 76
Tabelle 12: Standardabweichungen – Ergänzung zu Abbildung 30 78
Tabelle 13: Standardabweichungen – Ergänzung zu Abbildung 31 79
Tabelle 14: Standardabweichungen – Ergänzung zu Abbildung 32 80
Tabelle 15: Ergebnisse eines Produktionsmonitorings mit erfolgter Rekontamination auf Stufe des Steriltanks und nicht erfüllten Kriterien 83
Tabelle 16: Ergebnisse eines Produktionsmonitorings mit Rekontamination auf Stufe des Steriltanks 84
Tabelle 17: Ergebnisse eines Produktionsmonitorings mit erfolgter Rekontamination nach der Erhitzung 85
Tabelle 18: Ergebnisse eines Produktionsmonitorings, die definierten mikrobiologischen Kriterien werden erfüllt 86
Tabelle 19: Mittels Referenzverfahrens erhaltene Ergebnisse der Gesamtkeimzahlbestimmung nach 24-stündiger Lagerung bei 7 °C 117
Tabelle 20: Mittels CellScan erhaltene Ergebnisse der Gesamtkeimzahlbestimmung nach 24-stündiger Lagerung bei 7 °C 118
Tabelle 21: Mittels BacT/ALERT erhaltene Ergebnisse der Gesamtkeimzahlbestimmung nach 24-stündiger Lagerung bei 7 °C 118
Tabelle 22: Mittels MicroFoss erhaltene Ergebnisse der Gesamtkeimzahlbestimmung nach 24-stündiger Lagerung bei 7 °C 119

Tabelle 23: Mittels Referenzverfahrens erhaltene Ergebnisse der *Enterobacteriaceae*-Keimzahlbestimmung nach 24-stündiger Lagerung bei 7 °C 120
Tabelle 24: Mittels CellScan erhaltene Ergebnisse der *Enterobacteriaceae*-Keimzahlbestimmung nach 24-stündiger Lagerung bei 7 °C 120
Tabelle 25: Mittels BacT/ALERT erhaltene Ergebnisse der *Enterobacteriaceae*-Keimzahlbestimmung nach 24-stündiger Lagerung bei 7 °C 121
Tabelle 26: Mittels MicroFoss erhaltene Ergebnisse der *Enterobacteriaceae*-Keimzahlbestimmung nach 24-stündiger Lagerung bei 7 °C 121

IV Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BGBl	Bundesgesetzblatt
BP	Baird Parker (Agar)
Cf	Konzentrationsfaktor
COS	Columbia Schafblut (Agar)
DEFT	Direkte Epifluoriszenz-Filtertechnik
dest.	destillata; destilliert
DNA	Desoxyribonucleinacid
EG	Europäische Gemeinschaft
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESL	extended shelf life
fg	Femtogramm
FIL-IDF	Fédération International de Laiterie International Dairy FederationFI
g	Gramm
GKZ	Gesamtkeimzahl
GSP	Glutamat Stärke Phenolrot (Agar)
h	Stunde
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Point
HCl	Salzsäure
HE	Hocherhitzung
HTST	high temperature short time
IDF	International Dairy Federation
ISO	International Organization for Standardization
IU	International Unit
KbE	koloniebildende Einheit

KZE	Kurzzeiterhitzung
L	Liter
LAL	Limulus-Amoebozyten-Lysat(-Test)
LIMS	Labor-Informations- und Management-System
log	Logarithmus
M	Mittelwert
MAX	Maximum
MF	Mikrofiltration
mg	Milligramm
MHD	Mindesthaltbarkeitsdatum
MIN	Minimum
min	Minute
mL	Milliliter
MM	Magermilch
mm	Millimeter
n.s.	nicht spezifiziert
neg.	negativ
NF	Nanofiltration
Pa	Pascal
PAST	Pasteurisation
PC	Plate Count
PCM	Plate Count Magermilch (Agar)
PCR	Polymerase Chain Reaction
pos.	positiv
PP	Polypropylen
RLU	Relative Light Units
s	Sekunde
sp.	species
spp.	species pluralis
STD	Standardabweichung
TTD	time to detection
TVC	total viable count

UF	Ultrafiltration
UHT	ultra high temperature
UO	Umkehrosmose
VO	Verordnung
VRBD	Kristallviolett Neutralrot Galle Glucose (Agar)

1 Einleitung und Fragestellung

Milch und Milchprodukte mit verlängerter Haltbarkeit gewinnen immer mehr an Bedeutung, was sich in einem gesteigerten Marktanteil manifestiert. Der Kompromiss zwischen Geschmack der Frischmilch und Convenience in Form von längerer Haltbarkeit erweist sich dabei als wesentlicher Faktor für die Kaufentscheidung der KonsumentInnen und bringt durch gebündelte Logistik einen großen Vorteil für Produzent und Händler. Um den steigenden Anforderungen an die Lebensmittelsicherheit gerecht zu werden, ist eine rasche Auskunft über den Hygienestatus des Produkts zu jedem Zeitpunkt der Produktionskette (Stichwort ‚laufende Prozesskontrolle') erforderlich. Aufgrund der kurzen Antwortzeit werden Schnellmethoden immer häufiger in der mikrobiologischen Qualitätssicherung eingesetzt. Die ideale Schnellmethode zeichnet sich durch minimalen Arbeitsaufwand, hohe Schnellig-keit im Erhalt der Ergebnisse und mindestens jener Genauigkeit der Referenzmethode aus. Referenzmethoden erfordern viele zeitaufwändige Arbeitsschritte und liefern erst nach langer Inkubation Resultate. Die Ergebnisse vorliegender Studien bescheinigen Schnellmethoden teilweise vielversprechende Eigenschaften.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll anhand der produktionsbegleitenden Überwachung von mikrofiltierter und anschließend wärmebehandelter ESL-Milch in einer österreichischen Molkerei die Eignung der Methoden zur mikrobiolgischen Qualitätssicherung und Abschätzung der Haltbarkeit evaluiert werden. Die eingesetzten mikrobiologischen Schnellmethoden, CellScan Innovate™ System[1] (Celsis International BV, Brüssel, Belgien), BacT/ALERT® 3D[2] (bioMérieux SA, Marcy l'Etoile, Frankreich), MicroFoss™ 32 System[3] (Foss Analytical A/S, Hillerød, Dänemark) beruhen auf der Erfassung von Stoffwechselprodukten von Mikroorganismen. Die Aussagekraft der Ergebnisse und die Praxistauglichkeit der Schnellmethoden soll im Hinblick auf ihre Empfindlichkeit, Möglichkeiten und Grenzen, Eignung zur Haltbarkeitsvorhersage, Antwortzeit, Kosten und Arbeitsaufwand evaluiert und mit herkömmlichen in der industriellen mikrobiologischen Lebensmittelqualitätssicherung

[1] Im weiteren Text: CellScan
[2] Im weiteren Text: BacT/ALERT
[3] Im weiteren Text: MicroFoss

angewandten Methoden (Referenzmethoden ISO 4833:2003 sowie ISO 21528-2) verglichen werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Milch und Milchprodukte mit verlängerten Haltbarkeiten

2.1.1 Einführung und Definition

Die ersten ESL-Milchprodukte – Schlagobers und Kaffeeobers – wurden in den 1960-er Jahren in Nordamerika auf dem Markt eingeführt [HENYON, 1999]. Im mitteleuropäischen Raum wurde in den 1990er Jahren mit der Herstellung von ESL-Milch begonnen [HÜLSEN und RADEMACHER, 2005].

Trotzdem existiert bis heute noch keine gesetzliche Definition für ESL-Milch- bzw. Milchprodukte. Rysstad und Kolstad postulierten folgende Definition von ESL-Produkten: „ESL products are products that have been treated in a manner to reduce the microbial count beyond normal pasteurization, packaged under extreme hygienic conditions, and which have a defined prolonged shelf life under refrigerated conditions." Der Anspruch der Konsumenten nach pasteurisierter Milch mit längerer Haltbarkeit, aber ohne dem vielfach konstatierten ‚Kochgeschmack' der UHT-Milch, führte zur Entwicklung eines Milchprodukts, dessen sensorische Eigenschaften jenen der pasteurisierten Milch ähnlich sind, jedoch mit dem offensichtlichen Vorteil der längeren Haltbarkeit [RYSSTAD und KOLSTAD, 2006].

ESL kann als ein Ansatz verstanden werden, welcher das System in seiner Gesamtheit – vom Verarbeitungsprozess über das Abpacken bis hin zur Auslieferung – erfasst.

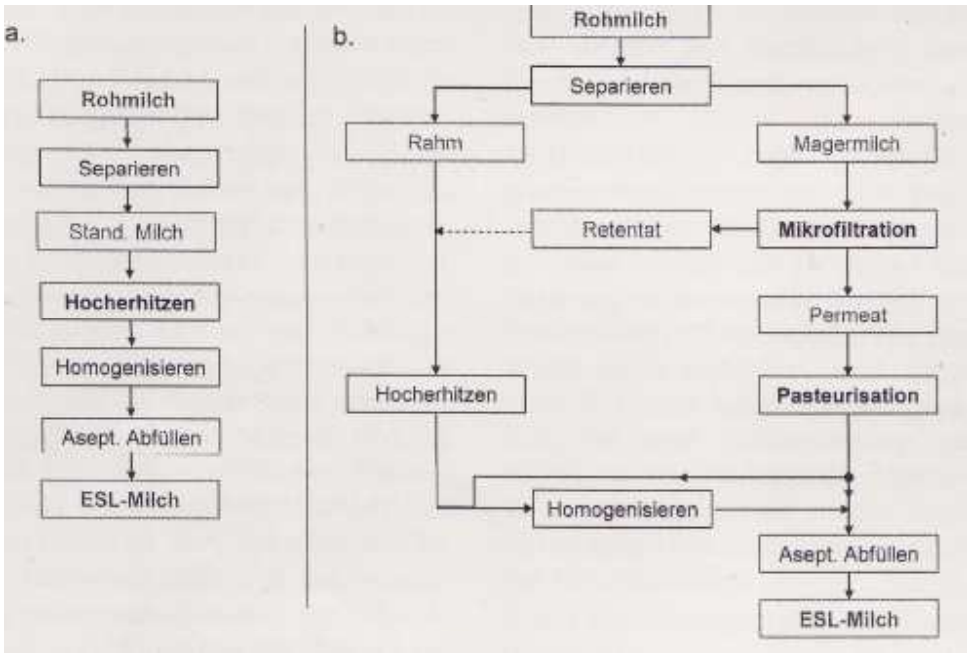
Bei Kühllagerung unter 10 °C weisen die heute am mitteleuropäischen Markt befindlichen ESL-Milchen je nach Herstellungsverfahren eine Haltbarkeit von 18 bis 25 Tagen auf.

2.1.2 Technologie

Milch mit verlängerter Haltbarkeit kann einerseits mittels Hocherhitzungsverfahren, wobei die Erhitzung mittels direkter Dampfinfusion oder -injektion bzw. indirekt mittels Wärmeaustauschern erfolgen kann, hergestellt werden. Andererseits kann eine verlängerte Haltbarkeit mechanisch, durch Baktofugation oder einen Mikrofiltrationsprozess mit anschließender thermischer Behandlung erreicht werden.

Eine grobe Übersicht über die einzelnen Verfahren und ihren Prozessablauf gibt Abbildung 1.

Abbildung 1: Herstellungsverfahren für ESL-Milch: a) Hocherhitzung b) Mikrofiltration + thermische Behandlung



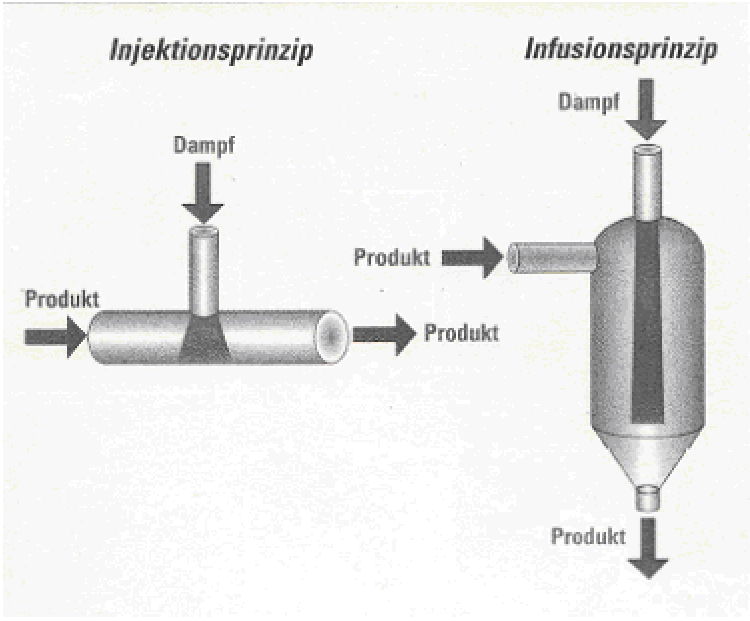
Quelle: KAUFMANN und KULOZIK (2008)

2.1.2.1 Hocherhitzung

Durch Hocherhitzung hergestellte ESL-Milch wird zur Abtötung der vegetativen Keimflora auf maximal 127 °C erhitzt, wobei die Heißhaltezeit drei Sekunden beträgt.
Bei den direkten Erhitzungsverfahren wird zwischen Injektions- und Infusionsverfahren unterschieden.

Bei einer Erhitzung mittels Injektor wird, wie in Abbildung 2 dargestellt, kulinarischer Dampf mit hohem Druck direkt in den Milchstrom injiziert. Der Strom durchläuft danach einen Heißhalter und wird schließlich in einem Flashkühler abgekühlt wo der vorher zugeführte Dampf wieder entzogen wird.

Abbildung 2: Schema des Injektions- und Infusionsprinzips



Quelle: SCHWERMANN und SCHWENZOW (2008)

Beim Infusionsprinzip gelangt der Milchstrom in dünnen Strahlen in den Infusionsbehälter, wo unter Druck eine Durchmischung mit Dampf erfolgt (Abbildung 2). Durch fast identische Dampf- und Produktsystemdrücke herrscht bei diesem Verfahren eine geringere Temperaturdifferenz zwischen dem Produkt und dem Erhitzungsmedium Dampf, was zu einer schonenderen Produktbehandlung im Vergleich zum Injektionsverfahren führt.

Eine weitere Möglichkeit ESL-Milch herzustellen ist eine indirekte Hocherhitzung. Dabei durchläuft die Milch eine Erhitzungsanlage, in der ein regenerativer Wärmeaustausch von Produktstrom auf Wasser stattfindet. In einer Erhitzerabteilung wird die Milch schließlich für etwa zwei Sekunden auf 125 °C erhitzt [SCHWERMANN und SCHWENZOW, 2008].

2.1.2.2 Mikrofiltration mit anschließender thermischer Behandlung

Neben Baktofugation in Kombination mit anschließender Pasteurisation, welche allerdings eine untergeordnete Rolle für Milch am Markt spielt und daher im Rahmen dieser Arbeit nicht näher behandelt wird, stellt die Mikrofiltration mit einer anschließenden thermischen Behandlung eine weitere Methode zur Produktion von Milch mit verlängerter Haltbarkeit dar.

2.1.2.2.1 Definition

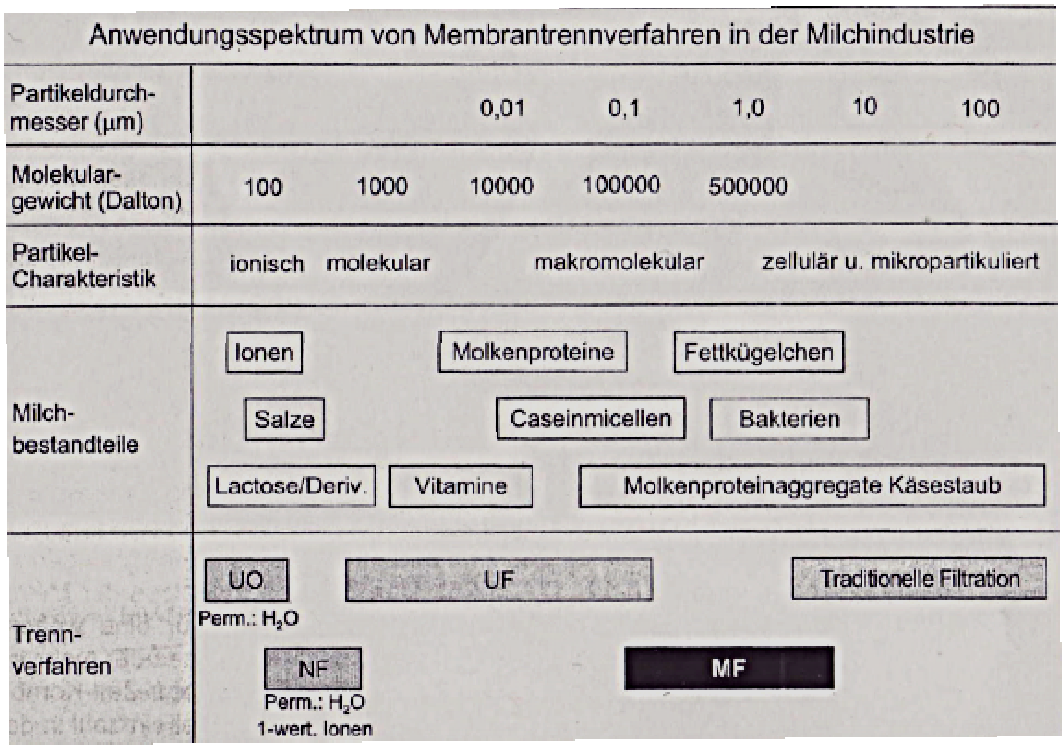
Membranfiltrationsverfahren sind Trennungsverfahren zweier oder mehrerer Komponenten in flüssiger Phase, die vorrangig auf einem Größenunterschied der Teilchen beruhen [GOULAS und GRANDISON, 2008].

Die in der Milchindustrie eingesetzten Membrantrennverfahren lassen sich in drei Gruppen einteilen [POULIOT, 2008]:

- Alternativen zu bestehenden Trennverfahren allgemeiner Natur
- 2) Möglichkeiten zur Trennung von Milchbestandteilen
- 3) Herstellung neuer Produkte

In Abhängigkeit der zu trennenden Teilchengrößen wird zwischen Umkehrosmose (UO), Nanofiltration (NF), Ultrafiltration (UF) und Mikrofiltration (MF) unterschieden (siehe Abbildung 3).

Abbildung 3: Abrennung von Milchinhaltsstoffen durch unterschiedliche Membrantrennverfahren



Quelle: KIESNER et al., (2005)

Mikrofiltrationsmembranen weisen eine Porengröße 0,1 µm bis 5 µm auf. Seit den 1980er Jahren wurde Mikrofiltration zur Entkeimung der zur Käseherstellung benutzten Kesselmilch angewandt und später auch zur Herstellung von Konsummilch mit reduzierten Keimzahlen und damit längerer Haltbarkeit eingesetzt [KIESNER et al., 2005].

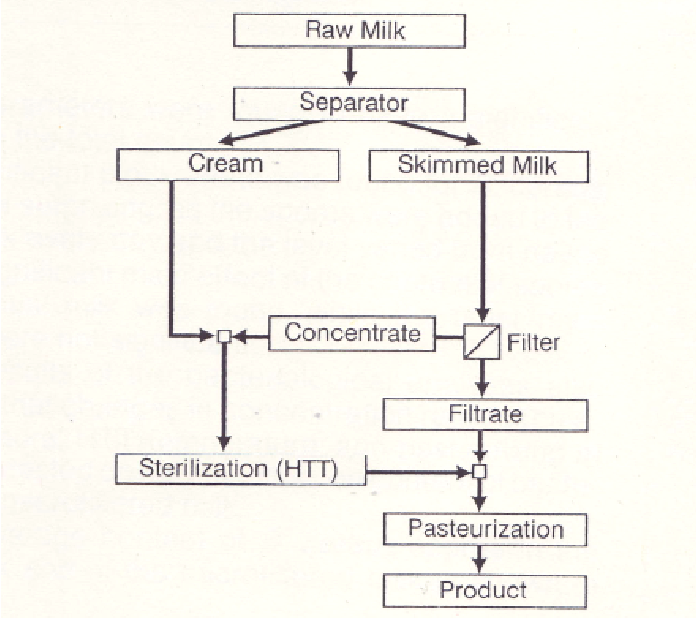
2.1.2.2.2 Technologie

Im weiteren soll ausschließlich auf die Technologie der Mikrofiltration zur Herstellung von Milch mit verlängerter Haltbarkeit eingegangen werden.

Den heute eingesetzten Mikrofiltrationsanlagen zur Herstellung von ESL-Milch liegt das patentierte Bactocatch® System zugrunde [HOLM et al., 1986]. Der schematische

Ablauf ist in Abbildung 1 zu sehen. In diesem Verfahren, wie auch in den Varianten davon wird Rohmilch in Rahm und Magermilch separiert, der Magermilchstrom wird mikrofiltriert, was zu einem keimarmen Permeat (Filtrat) und einem keimangereicherten Retentat (Konzentrat) führt, das Permeat wird dann mit dem hocherhitzten Rahmstrom zusammengeführt und abhängig von der Prozessführung einer Pasteurisation unterzogen und aseptisch abgefüllt.

Abbildung 4: Prozessführung einer Mikrofiltration zur Herstellung von ESL-Milch



Quelle: OLESEN und JENSEN (1989)

Eine Möglichkeit der Prozessführung, wie Olesen und Jensen sie für ihre Versuche zur Mikrofiltration verwendeten zeigt Abbildung 4.

Für das Verfahren der Mikrofiltration kommen Membranen mit einer Porengröße von 0,8 µm bis 1,4 µm zum Einsatz. Milchfett würde diese Membranen verstopfen, daher wird nur Magermilch mikrofiltriert. Die Stützschicht ist aus keramischen Material und die Oberfläche der Membran kann wahlweise aus Aluminiumoxid, Titanoxid, Zirkoniumoxid oder aus einer Mischung bestehen [SABOYA und MAUBOIS, 2000]. Heute zum Einsatz kommende Mikrofiltrationsanlagen arbeiten mit unterschiedlichen Membran- und Prozessgrößen. Porenstruktur, Membranmaterial. Transmembrane

Druckdifferenz[4], Wandschubspannung[5] oder Konzentrationsgrad[6] variieren von Anlagenhersteller zu Anlagenhersteller und sind nicht zuletzt abhängig vom gewünschten Endprodukt.

2.2 Die Mikrobiologie der Milch

Milch stellt aufgrund ihrer Nährstoffzusammensetzung ein optimales Medium zur Vermehrung von Mikroorganismen dar. Neben erwünschten Mikroorganismen zur Herstellung fermentierter Milchprodukte gedeihen Schadkeime, welche Qualität und Haltbarkeit vermindern sowie pathogene Keime, die zu einer gesundheitlichen Beeinträchtigung bei KonsumentInnen führen können [ZANGERL, 2007].
Neben den gesetzlichen Anforderungen an Roh- und verarbeitet Milch wird im Folgenden näher auf die Mikrobiologie der Milch auf verschiedenen Verarbeitungsstufen eingegangen.

2.2.1 Gesetzliche Anforderungen an Roh- und Trinkmilch

Um sicherzustellen, dass keine Mikroorganismen oder deren Metaboliten und Toxine in für die menschliche Gesundheit gefährlichen Mengen enthalten sind, trägt das Lebensmittelunternehmen die Verantwortung der Einhaltung gesetzlich vorgeschriebener mikrobiologischer Kriterien [VO (EG) 178/2002].
Für Rohmilch im Erzeugerbetrieb gilt ein Grenzwert von ≤ 100.000 KbE/mL (Keimzahl bei 30 °C). Vor der Verarbeitung im Verarbeitungsbetrieb dürfen maximal 300.000 KbE/mL vorliegen [VO (EG) 853/2004]. In der österreichischen Rohmilchverordnung ist ein Grenzwert von 50.000 KbE/mL für Rohmilch festgehalten [BGBl II Nr 106/2006].
Bezüglich *Enterobacteriaceae* gilt laut VO (EG) 1441/2007 für pasteurisierte Milch am Ende des Herstellungsprozesses ein oberer Grenzwert von 5 KbE/mL (Verfahren ISO 21528-1), wobei bei fünf gezogenen Proben maximal zwei zwischen 1 und 5 KbE/mL enthalten dürfen.

[4] Druckdifferenz zwischen Permeat und Retentatseite.
[5] Quer zur Filtrationsrichtung wirksame Scher- und Auftriebkräfte.
[6] Verhältnis der Volumenströme aus Permeat und Retentat („Ausbeute“ der Filtration).

2.2.2 Die Mikrobiologie der Rohmilch

Rohmilch ist das unveränderte Gemelk von Nutztieren, das nicht über 40 °C erhitzt und keiner Behandlung mit ähnlicher Wirkung unterzogen wurde [VO (EG) 853/2004].

Die Mikroflora der Rohmilch kann beträchtliche Variationen aufweisen. Typischerweise kontaminieren Mikrokokken, Corynebakterien, Streptokokken, Mikrobakterien, Laktobazillen, aerobe Sporenbildner, Enterobakterien, Pseudomonaden, Aeromonaden und Flavobakterien in einer Gesamtzahl von 10^4 bis $5x10^5$ KbE/mL die Rohmilch. Mikrokokken, Corynebakterien und gelegentlich Streptokokken sind im Falle niedriger Gesamtkeimzahlen vorherrschend, während Streptokokken und gramnegative Bakterien bei Proben mit hoher Keimbelastung dominieren. Die Thermoduren-Flora setzt sich hauptsächlich aus Mikrobakterien und Mikrokokken zusammen. Studien geben für das Vorliegen thermodurer und psychrotropher Mikroorgansimen in Rohmilch sehr unterschiedliche Keimzahlen an [ZANGERL, 2007, OTTE-SÜDI, 2006, CHAMBERS, 2002, COUSIN, 1982].
Euter, Melkpersonal, Einstreu, Futtermittel, Stallluft, Melkanlage und Sammeltank sind wichtige potentielle Kontaminationsquellen im Laufe der Milchgewinnung. Zitzen und Euteroberfläche werden von Staphylokokken dominiert, wobei ein Verhältnis von 100:10:1 zwischen Staphylokokken, Streptokokken und gramnegativen Bakterien vorherrscht [OTTE-SÜDI, 2006]. Über die Stallluft gelangen Mikrokokken (ca. 30%), coryneforme Bakterien (20,9%), gefolgt von Streptomyceten (19,4%), Sporenbildner (7,9%) und gramnegativen Bakterien (4,5%) in die Milch [KURZWEIL und BUSSE, 1973]. Frisch ermolkene Milch zeichnet sich durch die Dominanz von Mikrokokken und Staphylokokken aus, gefolgt von Streptokokken, Coryneformen, Bazillen, Pseudomonaden sowie Hefen und Schimmelpilzen [ZANGERL, 2007]. Bis zu 90% der in Rohmilch vorhandenen Mikroorganismen kann vom Melkgeschirr stammen. Melkanlagen und Aufbewahrungssysteme sind Quellen von Saprophyten, besonders gramnegativen psychrotrophen Bakterien. Diese Entwicklung setzt sich bei der Stapelmilch, welche gekühlt gelagert wird, fort. Es kommt zu einer Selektion hin zu gramnegativen psychrotrophen Bakterien, wobei nicht-coliforme, v.A. *Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas fragi* sowie *Pseudomonas putida* dominieren. Durch Thermisieren können die gramnegativen psychrotophen Keime sehr stark reduziert

werden [OTTE-SÜDI, 2006]. Ihre Lipasen und Proteinasen allerdings sind hitzeresistent und können daher zu Qualitätseinbussen bei ESL- und UHT-Milch führen [GARCIA et al., 1989, SHELLEY et al., 1987].

2.2.3 Die Mikrobiologie pasteurisierter Trinkmilch

Pasteurisation ist laut VO (EG) 2074/2005 eine Kurzzeiterhitzung von mindestens 72 °C für 15 s; eine Dauererhitzung von mindestens 63 °C für 30 min oder jede andere Zeit-Temperatur-Kombination mit gleicher Wirkung (d. h. der Alkalinphosphatasetest ist negativ).

Die Pasteurisation hat eine Änderung der Mikroflora zur Folge. Etwa 10% der Ausgangsflora überleben die Pasteurisation. Vor der Pasteurisation dominierende gramnegative psychrotrophe Keime werden abgetötet, während thermodure Mikroorganismen die Pasteurisation überleben. Ebenso überleben sporenbildende Mikroorganismen. Auch Enzyme von gramnegativen Psychrotrophen überdauern die Pasteurisation.
Verderb von pasteurisierter Milch tritt durch die Vermehrung von hitzeresitenten psychrotrophen Bakterien ein, dabei sind *Paenibacillus* (39%); *Bacillus* spp. (32%) und *Microbacterium lacticum* (14%) dominant. Ein Gehalt von > 10^7 *Bacillus cereus* Keimen/ml führt zur Süßgerinnung durch Phospholipase C des Bakteriums, welches die Fettkügelchenmembran abbaut und somit Fettklumpen hervorruft.

Kommt es zu einer Rekontamination, so dominieren Pseudomonaden, Aeromonaden, *Enterobacteriaceae* und Streptokokken die Flora [OTTE-SÜDI, 2006].

Eneroth et al. führten einige Untersuchungen zu Rekontaminationsquellen im Laufe der Milchverarbeitung und der an dem Prozess beteiligten Mikroorganismen durch. Dabei zeigte sich, dass es vor allem bei der Abfüllung durch Aerosole und Luft im Umfeld der Maschine zu einer Biofilmbildung und damit zur Rekontamination kam, wobei *Pseudomonas fluorescens* am häufigsten isoliert wurde [ENEROTH et al., 1998, 2000a, 2000b]. Während Lin et al. zum Ergebnis kamen, dass *Bacillus cereus* in pasteurisierter

Milch hauptsächlich aus der verarbeiteten Rohmilch stammten, zeigten Untersuchungen, dass *Bacillus cereus* sehr wohl durch Rekontamination über Oberflächen des Wärmeaustauschers, Leitungen nach dem Pasteur und der Abfüllmaschine in die Milch gelangen konnte [SALUSTIANO et al., 2009, ENEROTH et al., 2001, LIN et al., 1998, Te GIFFEL et al., 1997,].

Die Lagertemperatur hat einen wesentlichen Einfluss auf die Verderbsflora. Beträgt sie unter 7 °C, so können zum Verderbszeitpunkt vor allem psychrotrophe Rekontaminanten nachgewiesen werden; bei über 10 °C vor allem hitzeresistente Bakterien [STEPANIAK und ABRAHAMSEN, 1995]. In diesem Fall ist vor allem *Bacillus* als sporenbildender Keim für den Verderb verantwortlich [BOENEKE et al., 2008].

2.2.4 Die Mikrobiologie der UHT-Milch

Für die Herstellung von UHT-Milch muss die Milch mit nicht weniger als 135 °C bei geeigneter Heißhaltezeit behandelt werden, sodass in einen steril verschlossener Packung bei Umgebungstemperatur keine lebensfähigen Mikroorganismen oder Sporen vorhanden sind. Zudem muss der Prozess ausreichen um sicherzustellen, dass die Erzeugnisse nach einer Inkubation in verschlossenen Packungen bei 30 °C für 15 Tage oder bei 55 °C für 7 Tage oder nach Anwendung einer anderen Methode, bei der erwiesen ist, dass die geeignete Wärmebehandlung durchgeführt wurde, mikrobiologisch stabil sind [VO (EG) 2074/2005].

In UHT-Milch können durch die Hitzebehandlung nur Sporen von aeroben Sporenbildnern der Gattung *Bacillus* überleben. Aufgrund seiner extremen Hitzeresistenz kommt *Geobacillus stearothermophilus* als Testkeim zur Prüfung ordnungsgemäßer Erhitzung von UHT-Anlagen zum Einsatz. Hitzeresitente Enzyme sind für den Verderb verantwortlich. Dies sind einerseits (*Bacillus* spp.) Proteasen, die zu einer Süßgerinnung führen, andererseits Proteinasen von gramnegativen psychrophilen Keimen wie *Pseudomonas fluorescens*, welche sensorische Fehler und Gerinnung hervorrufen [HELLER, 2006].

2.2.5 Die Mikrobiologie der ESL-Milch

Um eine verlängerte Haltbarkeit der ESL-Milch zu realisieren, müssen einige Vorraussetzungen erfüllt werden [RYSSTAD und KOLSTAD, 2006, RYSSTAD und SPIKKESTAD, 2005]:

- Rohmilch guter Qualität
- optimale Erhitzungsbedingungen
- Freiheit von Rekontamination nach der Erhitzung
- lückenlose Kühlkette
- möglichst lichtdichte Verpackung

Mayr et al. führten Studien zur verderbsrelevanten Mikroflora von deutscher ESL-Milch durch. Sie kamen zum Ergebnis, dass hauptsächlich grampositive Rekontaminanten für den Verderb verantwortlich waren. In einer Untersuchung zum Vorkommen aerober Sporenbildner in ESL-Milch identifizierten sie *Bacillus licheniformis* als die häufigste Art, wobei sich bei einer Lagerung von 23 Wochen bei 10 °C kein mikrobielles Wachstum zeigte. Erst bei 30 °C Inkubation trat nach 10 Tagen Verderb auf [MAYR et al., 2004].

2.2.6 Die Mikrobiologie mikrofiltrierter Milch

Die in der Literatur genannten Werte zur Reduktion der Keimzahlen in Milch und der Zusammensetzung der Keimflora mikrofiltrierter Milch sind auf Grund des Einsatzes verschiedener Anlagenkonfigurationen und Prozessgrößen relativ heterogen.

Durch Mikrofiltration in Kombination mit thermischer Behandlung der Milch werden dezimale Reduktionszahlen von 2 $\log_{10}$-Stufen [KELLY et al., 1997], 2,6 $\log_{10}$ [TROUVÉ et al., 1991], 3 $\log_{10}$-Stufen [HOFFMANN et al., 2006], 3,5 $\log_{10}$ [SABOYA und MAUBOIS, 2000], 4 $\log_{10}$-Stufen [OLESEN und JENSEN, 1989], 5,6 $\log_{10}$ [ELWELL und BARBANO, 2006] angegeben. Mit dem von Alfa-Laval entwickelten Bactocatch® Systems wurde eine Sporenreduktion von 3 $\log_{10}$-Stufen erreicht [KIESNER et al., 2005].

Für pathogene Mikroorganismen wie *Listeria monocytogenes*, *Brucella abortus*, *Salmonella typhimurium* und *Mycobacterium tuberculosis* konnten dezimale Reduktionzahlen von 3,4; 4,0; 3,5 und 3,7 $\log_{10}$ nachgewiesen werden, was in < 1 KbE/ml in der Magermilch nach erfolgter Mikrofiltration resultiert. [SABOYA und MAUBOIS, 2000].
Thermostabile Sporen bildende Bakterien lassen sich durch Mikrofiltration gut abtrennen. So wird der Gehalt an *Bacillus cereus* im Endprodukt deutlich verringert; ebenso somatische Zellen [HOFFMANN et al. 2006, SABOYA und MAUBOIS, 2000].

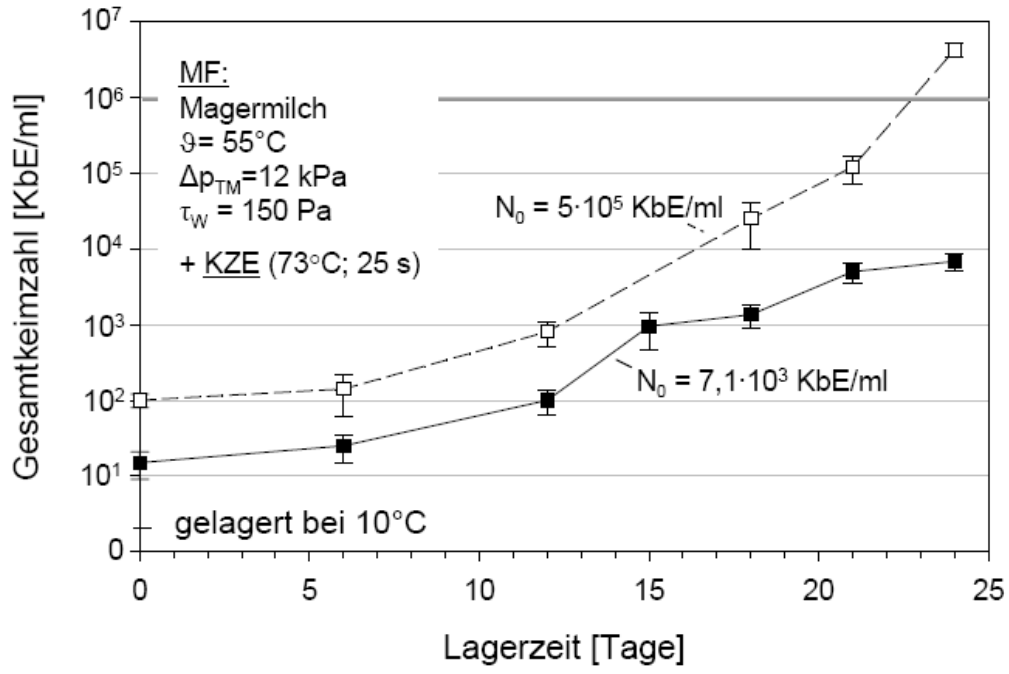
Überblicksmässig kann festgehalten werden, dass der Mikrofiltrationsprozess, unter der Voraussetzung der Vermeidung von Rekontamination und Kühlung des Produkts, sich vorteilig auf eine längere Produkthaltbarkeit auswirkt. Im Vergleich zu alleiniger Kurzzeiterhitzung führt die Mikrofiltration zu einer weiteren Reduktion der ursprünglich in der Rohmilch vorhandenen Keimzahlen. Der Prozess ermöglicht eine Keimreduktion um bis zu 5 $\log_{10}$-Stufen, was sonst nur durch Erhitzung über 130 °C erreicht werden kann. Alleinige Mikrofiltration kann pathogene Mikroorganismen reduzieren, allerdings nicht vollständig eliminieren. Eine in den Herstellungsprozess integrierte Wärmebehandlung der Milch ist daher von Nöten [KIESNER et al., 2005].
Die Hitzestabilität einzelner bakterieller Enzyme hat möglicherweise eine nicht zu unterschätzende Relevanz für die Haltbarkeit mikrofiltrierter Milch. Kulozik und Kaufmann wenden daher ein, dass eine thermische Inaktivierung der relevanten Keimgruppen (Pseudomonaden bilden besonders hitzeresistente Enzyme) bisher nicht in Betracht gezogen wurde. Eine Änderung der Prozessschritte, mit Pasteurisation vor der Mikrofiltration könnte sich laut den Autoren positiv auf die Lagerstabilität und -qualität auswirken [KAUFMANN und KULOZIK, 2006].

2.2.7 Einflussfaktoren auf die Produktqualität- und Stabilität von mikrofiltrierter ESL-Milch

Hohe Rohmilchkeimzahlen führen zu einer höheren mikrobiellen Belastung der Magermilch nach der Mikrofiltration und in Folge auch des Endprodukts. Es kommt zu einer Anlagerung an der Membran, was zu einem Fluxabfall und „Durchwachsen“ der

Membran führt. Eine derartige Ausgangsqualität bewirkt einen rascheren Verderb und damit Erreichen des Inakzeptanzlevels von 10^6 KbE/mL durch schnelleres Keimwachstum (Abbildung 5).

Abbildung 5: Haltbarkeit von mikrofiltrierter, kurzzeiterhitzter Milch mit unterschiedlicher Ausgangskeimzahl



Quelle: KAUFMANN (2007)

Ebenso kann eine längere Lagerung der Rohmilch das Wachstum und die Stoffwechselaktivität psychrotropher Keime begünstigen. Was bakteriologisch von Bedeutung ist, aber auch zur Bildung hitzeresistenter Enzyme (Proteinasen, Lipasen) führen kann, welche die Haltbarkeit herabsetzen.

Auch chemisch-physikalische Veränderungen (oxidative Umsetzungen, Hydrolysevorgänge) können haltbarkeitsrelevant sein, sind aber bis jetzt weitgehend ungeklärt.

Die Anlagenkonzeption und prozesstechnische Faktoren beeinflussen die Qualität des Endprodukts ebenfalls. Prozessparameter wie Temperatur, Schubspannungsgradient, und transmembrane Druckdifferenz haben Einfluss auf die Entstehung von Deckschichten, Filtrationsleistung und mögliche Betriebszeiten [KAUFMANN und KULOZIK, 2008].

Ähnlich der hitzebehandelten ESL-Milch ist die Vorraussetzung für eine längere Haltbarkeit die Einhaltung der Prozesshygiene, das Gewährleisten einer aseptischen Abfüllung in eine geeignete Verpackung und eine lückenlose Kühlkette.

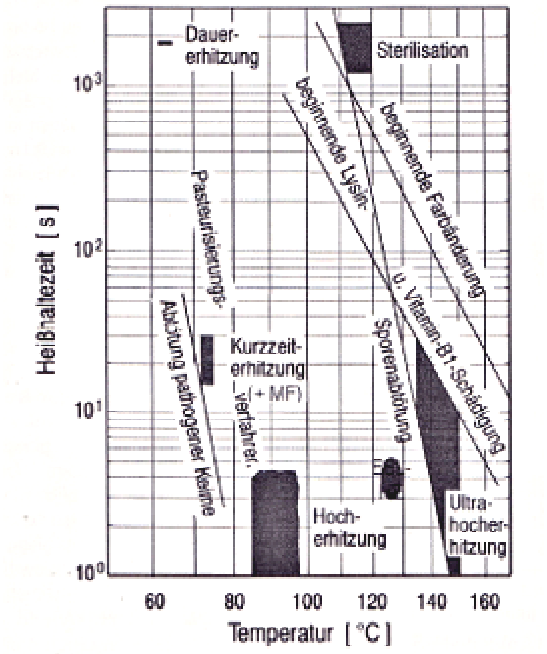
Eine Faustregel besagt, dass eine Erhöhung der Temperatur um 2 °C die Haltbarkeit um 50% reduziert. Für mikrofiltrierte Milch (in Kombination mit HTST Pasteurisation) werden unterschiedliche Haltbarkeiten angegeben: 16-21 Tage bei Kühllagerung [MALMBERG und HOLM, 1988], 17 Tage bei 10 °C (KESSLER, 2002), 15 Tage bei 4-6 °C; 35 Tage bei Abfüllung unter aseptischen Bedingungen [SABOYA und MAUBOIS, 2000] und über 92 Tage unter sehr kühlen Bedingungen (0,1 bzw. 2°C) und bei einer niedrigen Ausgangskeimzahl [ELWELL und BARBANO, 2006].

2.2.8 Produktveränderungen durch Verfahren zur Herstellung von ESL-Milch

Milch liefert wertvolle Mineralstoffe, dabei sind Kalcium und Phosphor hervorzuheben; auch für essentielle Aminosäuren und Vitamine (hauptsächlich B-Vitamine) ist Milch eine wichtige Quelle. Nicht nur für KonsumentInnen stellt sich daher die Frage, ob diese ernährungsphysiologisch positiven Bestandteile prozessbedingten Einbußen unterliegen. Die meisten Vitamine und Mineralstoffe bleiben von der Hitzebehandlung fast unbeeinflusst, aufgrund der Maillard Reaktion kommt es zu Lysinverlusten [KESSLER, 2002].

Wie aus Abbildung 6 ersichtlich, kommt es weder bei Mikrofiltration in Kombination mit thermischer Behandlung, noch bei schonender Hocherhitzung zu gravierenden Lysin- oder Vitamin B1-Verlusten.

Abbildung 6: Temperatur-Zeit Diagramm der Vorgänge bei Milcherhitzung



Quelle: KESSLER (2002)

In der Literatur finden sich einige Parameter, die zum Nachweis der Erhitzung von Milch herangezogen werden können. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die

Veränderungen einiger Parameter dreier unterschiedlicher Verfahren zur Herstellung von Trinkmilch. Die Werte für ß-Laktoglobulin, Laktulose, (Rest)Enzymaktivität der Protease und Lipase mikrofiltrierter und wärmebehandelter Milch decken sich dabei mit jenen der pasteurisierten Milch bei gleichzeitig höherer Keimreduktion und dadurch längerer Haltbarkeit [KAUFMANN et al., 2009]. Die höheren Restenzymatkivitäten der mikrofiltrierten ESL-Milch haben allerdings auch eine höhere Aktivität proteolyischer und lipolytischer Enzyme zur Folge und damit unerwünschte hydrolytische Reaktionen im Verlauf der Lagerung mit einem Anstieg der freien Fettsäuern und damit verbundenem ranzigen Geschmack nach 18 bis 21 Tagen. Der Abbau freier Fettsäuren führt zur einer weiteren sensorischen Verschlechterung.

Tabelle 1: Thermisch-induzierte Veränderungen in pasteurisierter und ESL-Milch

	PAST	MF + PAST	HE direkt	HE indirekt
			(127 °C/2 s)	
Keimreduktion [log N/N_0]	1,5	5–6	>8	
Phosphatase	–	–	–	–
Peroxidase	+	+	–	–
Natives β-Laktoglobulin [g/l]	3,1–3,4	3,0–3,3	>2,2	<1,8
Laktulose [mg/l]	15–20	15–20	<25	<30
Kochgeschmack	–	–	gering → –	
(Rest-)Enzymaktivität Protease [%]	>80	81±4	65±5	
(Rest-)Enzymaktivität Lipase [%]	>65	64±4	40±3	
Haltbarkeit (bei 10 °C) [Tage]	7–10	18–21	24–30	

Quelle: KAUFMANN und KULOZIK (2009)

Auch bei ESL-Milch, die durch Hocherhitzung erzeugt wurde, treten sensorische Defekte am Ende der Haltbarkeit – nach etwa 24 bis 30 Tagen – auf. Diese sind ebenfalls durch Reaktion proteolytischer und lipolytischer Abbauprodukte bedingt, allerdings treten sie auf Grund die niedrigeren Enzymaktivitäten, wie in Tabelle 1 gezeigt, in geringerem Maße auf [KAUFMANN und KULOZIK, 2009].

2.3 Mikrobiologisches Monitoring von Milchprodukten mittels Schnellmethoden

Die Europäische Gesetzgebung besagt, dass Lebensmittelunternehmer mikrobiologische Kriterien einhalten müssen und verpflichtet sind dies durch HACCP-gestützte Verfahren oder andere Hygienekontrollmaßnahmen sicherzustellen [VO (EG) 852/2005, VO (EG) 1441/2007]. So gilt es in der innerbetrieblichen mikrobiologischen Qualitätssicherung der Lebensmittelindustrie eine große Anzahl an Proben zu bewältigen. Rohstoffe, Zwischen- sowie Endprodukte müssen hinsichtlich Erfüllung der festgelegten Qualitätskriterien, wie Abwesenheit pathogener Keime und Rekontamination oder produktspezifische Grenzwerte für Gesamtkeimzahlen, getestet werden um die KonsumentInnen mit qualitativ einwandfreien Produkten zu versorgen.
Dabei bedürfen die in der mikrobiolgischen Qualitätssicherung routinemäßig eingesetzten Referenzmethoden langer Inkubationszeiten, hoher Arbeitsintensität und ebenso hohen Materialbedarfs. Immer stärker zentralisiert operierende Lebensmittelerzeuger sind stark auf eine rasche Produktfreigabe angewiesen. Hierbei kann der Einsatz geeigneter Schnellmethoden zu einer Einsparung von Zeit und auch zu Minimierung der Kosten führen. Ein weitere Vorteil zahlreicher automatisierter Schnellmethoden ist die Möglichkeit, erhaltene Ergebnisse in die vorhandene Laborsoftware zu übertragen. Rechtlich gesehen können alternative Methoden, sofern sie nach international anerkannten Protokollen validiert und von Behörden genehmigt wurden eingesetzt werden [VO (EG) 1441/2007].

2.3.1 Definition

Dem Begriff „schnell“ liegen zwei Bedeutungen zugrunde [DUDEN, 2003]:

1) innerhalb kurzer Zeit, nur wenig Zeit in Anspruch nehmend
2) mit hoher, großer Geschwindigkeit

Schnellmethoden operieren in Bezug auf die herkömmlichen meist arbeits- und zeitaufwändigen Referenzmethoden damit entweder durch das Einführen eines andersartigen Messprinzips, welches rascher ein Ergebnis liefert, oder durch ein

Vornehmen der zugrundeliegenden Methode mit höherer Geschwindigkeit [MATISSEK, 2006].

Mikrobiologen begannen sich ab Mitte der 1960er Jahre mit Schnellmethoden intensiver auseinander zu setzen. In der Lebensmittelmikrobiologie werden Schnellmethoden für die Probenvorbereitung, Früherkennung, Charakterisierung und Isolation und Keimzahlbestimmung von Mikroorganismen und zum Nachweis mikrobieller Stoffwechselprodukte eingesetzt [FUNG, 1995].

Um einen Überblick über am Markt befindliche Schnellmethoden mit Einsatzgebiet in der Lebensmittelmikrobiolgie zu geben, sollen hier einige Methoden Erwähnung finden [zur Vertiefung siehe ZSCHALER 2006, FUNG, 2002]:

- Schnellmethoden zur Keimzahlbestimmung
    - Spiralplattenmethode: Die Probe wird vom Gerät spiralförmig, automatisiert auf Agarplatten aufgetragen.
    - Automatisierte Koloniezählung mittels Laser
    - ISOGRID System
    - Petrifilm
    - Redigel System
    - SimPlate
    - Rida®Count
    - DEFT (Direkte Epifluoreszenz Filtertechnik)
    - Durchflusszytometrie

- Miniaturisierte Nachweisverfahren und Teststreifen:
    - Einsatz von Mikrotiterplatten
    - Vitek
    - API-Test, Enterotube
    - Clumping-Teststreifung
    - Aminopeptidase-Test
    - Cytochromoxidase Nachweis

- Messung mikrobieller Biomasse und Stoffwechselprodukte:
    - Elektrochemische Verfahren zur Leitfähigkeits- und Impedanzmessung
        - BacTrac®
        - Bactometer®
        - Malthus®
        - RABIT®
    - ATP-Biolumineszenz
    - Colorimetrische Verfahren
        - BacT/ALERT® 3D
        - MicroFoss™
    - Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Test:

      Zum Nachweis gramnegativer Mikroorganismen durch Gelbildung zwischen den Zellwandbestandteilen der Bakterien und den Amöbozyten.

- Immunologische Methoden:

Diese basieren auf der spezifischen Reaktion von Antigen und Antikörper.

- ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) -Test
- Automatisierte ELISA-Tests
    - VIDAS-System
    - Detex-System
- Immunopräzipitation
- Latex Agglutinationstest
- Immonumagnetische Separation (IMS)

- Molekularbiologische Methoden:

Die bisher erwähnten mikrobiologischen Schnellmethoden erfassen den phenotypischen Ausdruck der genotypischen Eigenschaften nachzuweisender Mikroorganismen. Genotypische Zelleigenschaften sind wesentlich stabiler als phenotypische und können mittels molekularbiolgischer Methoden erfasst werden.

Diese finden daher immer häufiger Anwendung in der Bestätigung und endgültigen Identifizierung mittels mikrobiolgischen Testverfahren.

- Hybridisierung
- PCR (Polymerase Chain Reaction)

- Biosensoren:

Biosensoren sind Moleküle respektive eine Gruppe von Molekülen biologischer Herkunft, die bei Kontakt mit einem Analyten (Toxine, Pathogene, Kohlenhydrate, Antibiotika u.a.) ein Signal unterschiedlicher Natur (elektrochemisch, otisch) aussenden, welche von einem Messgerät detektiert wird.

- Bio- und Microchips

Auf den folgenden Seiten soll näher auf jene mikrobiologischen Schnellmethoden eingegangen werden, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kamen.

2.3.2 Anforderungen an Schnellmethoden

- Genauigkeit: Falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse dürfen nur in minimalem Ausmaß auftreten. Die Spezifität und Sensitivität sollen so hoch und die Nachweisgrenze so niedrig wie möglich sein.
- Validierung: Die Methode muss wissenschaftlich anerkannt sein.
- Schnelligkeit: Ergebnisse sollen spätestens nach 24 h vorliegen. Die Methode soll im Stande sein möglichst viele Proben zeitgleich zu analysieren
- Kosten: Die Anschaffungskosten sollen bei effizienter Nutzung nach einem halben Jahr gedeckt sein. Zu berücksichtigen sind auch Kosten für Reagenzien und Zubehör, sowie Betriebs- und Wartungskosten.
- Benutzerfreundlichkeit: Die Methode soll einfach und unaufwändig bedienbar sein. Wobei von Anfang an ein möglichst geringer Schulungsaufwand vorliegen soll.
- Support: Die Herstellerfirma soll schnell, unkompliziert und zuverlässig ansprechbar sein.

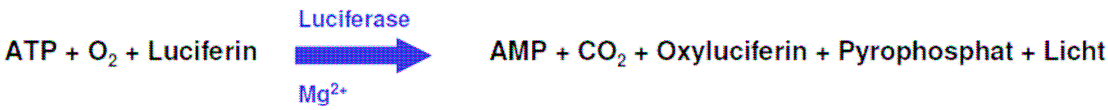
- Reagenzien: Sollten schnell verfügbar und möglichst lange haltbar sowie einfach zubereitbar sein.
- Platzbedarf: Das Gerät soll möglichst kompakt sein und wenig Stellfläche benötigen [De BOER und BEUMER, 1999, FUNG, 1995].
-

2.3.3 Nachweis von Mikroorganismen durch ATP-Biolumineszenz (CellScan Innovate™ System)

Biolumineszenz ist von Lebewesen enzymatisch erzeugtes, sichtbares Licht [MADIGAN et al., 2009].

Das energiereiche ATP kann durch den u. a. in *Photinus pyralis* (Leuchtkäfer) natürlich enthaltenen Enzym-Coenzym Komplex aus Luciferin-Luciferse bestimmt werden.
Davon ausgehend, dass ATP in allen lebenden Zellen in nahezu konstanter Menge enthalten ist, kann durch die stöchiometrische Umwandlung des energiereichen Moleküls in Photonen, von der Menge emittierten Lichts auf den Bakteriengehalt der Probe rückgeschlossen werden [GRIFFITHS, 1993].
Der Nachweis von ATP mittels Biolumineszenz basiert auf der in Abbildung 7 dargestellten Reaktion: Unter Anwesenheit von ATP und Magnesiumionen katalysiert Luciferase die Oxidation von Luciferin. Es bildet sich ein Luciferin-Luciferase-AMP-Komplex und in einem weiteren Umwandlungschritt energiereiches Oxyluciferin, welches durch Lichtemission wieder in den Grundzustand zurückkehrt. Durch die Reaktion emittiertes Licht wird mittels Photomultiplier erfasst.

Abbildung 7: Luciferin-Luciferase Reaktion



Quelle: Celsis (2007)

Das im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte CellScan Innovate™ System (Abbildung 8) wurde für den Einsatz in der Milchindustrie entwickelt und wird vom Hersteller speziell

für das Screening mikrobieller Kontamination von UHT- und ESL-Milchprodukten empfohlen. Die Nachweisgrenze liegt bei < 10 KbE/mL. Die Methode wurde für verschiedene Mikroorganismen validiert und liefert innerhalb von längstens 48 Stunden ein Ergebnis [Celsis, 2007].

Abbildung 8: CellScan Innovate™ System

Quelle: Celsis (2007)

Eine Studie zum Einsatz der ATP-Messung in der Untersuchung von Kosmetika, Waschrohstoffen, Weich- und Geschirrspülern, also Produkten mit sehr geringen Ausgangskeimzahlen zeigte, dass die Methode im Vergleich zur Keimzahlmethode schneller, rationeller und preiswerter ist. Die Anzahl der falsch positiv detektierten Proben (2500) lag bei < 0,4% [ZSCHALER, 2006].

In der Literatur finden sich einige Beispiele, die dem Biolumineszenzverfahren eine Eignung zum Hygienemonitoring in der Lebensmittelproduktion als Oberflächenabschwemmungstest attestieren. Eine gute Übereinstimmung von Ergebnissen des Koloniezählverfahren und der ATP-Messung von Oberflächenabschwemmungen, rascher Erhalt der Ergebnisse, die Möglichkeit im Herstellungsprozess rechtzeitig zu intervenieren werden als Vorzug der Methode aufgeführt [GRIFFITHS, 1993, KOTTFEROVÁ et al., 2003, MURPHY, 1998]. Allerdings muss darauf geachtet werden, dass für jeden Betrieb eigene Grenzwerte festzulegen sind.

Um die UHT- und ESL-Milch auf Sterilität zu testen schlugen Waes et al. ein ATP-Monitoring nach Produktinkubation bei 30° C vor. Dabei konnten durch Untersterilisierung hervorgerufene Kontaminationen nach drei Tagen mittels ATP-Methode detektiert werden. Kontamination in UHT-Milch konnten nach eintägiger Vorinkubation bei 30° C mit hoher Signifikanz nachgewiesen werden [GRIFFITHS, 1993].

Limitationen der Methode sind insofern gegeben, als dass die Messung keine Aussage darüber gibt welche Keimgruppe vorliegt. Im Vergleich zum Koloniezählverfahren muss berücksichtigt werden, dass verschiedene Mikroorganismen unterschiedlich viel ATP pro Zelle enthalten. Dabei wurde der ATP-Gehalt einer koloniebildenden Einheit mit 0,22 bis 1,03 fg beziffert. Die zelluläre Menge an ATP variiert abhängig vom Stadium des Wachstums in dem sich das Bakterium befindet [FUNG, 2002].

Lange Zeit stellte das in der Milch vorliegende freie ATP und das ATP in somatischen Zellen neben dem bakteriellen ATP, das eigentlich erfasst werden sollte eine große Herausforderung dar. Es war eine Zentrifugation oder Filtration der Probe nötig um nur bakterielles ATP messen zu können. Abhängig von der jeweils angewandten Aufbereitung führte dies zu relativ hohen Nachweisgrenzen von über 10^4 KbE/mL [REYBROECK, 1999]. Auch Te Giffel et al. bestätigten diese Nachweisgrenze in ihrer Untersuchung thermoresistenter Streptokokken und schlugen die Verwendung der ATP-Methode daher nur als „Notbremse“ vor [Te GIFFEL et al., 2001]. Verbesserungen des Verfahrens führten zu einer Nachweisgrenze von < 10 KbE/mL [GRIFFITHS, 1999].
Zu beachten ist weiters, dass gewisse Substanzen, wie Peroxid oder Alkohole die Messung stören können.

2.3.4 Colorimetrische Verfahren

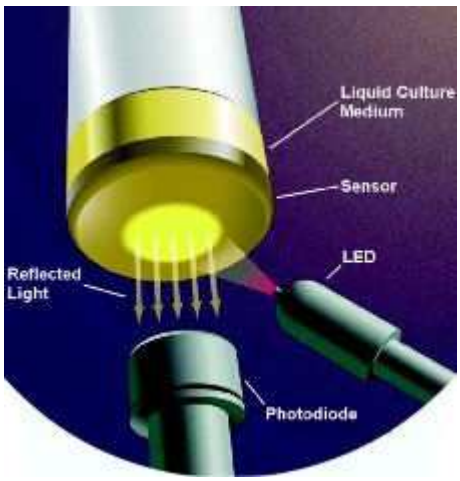
2.3.4.1 BacT/ALERT

BacT/ALERT ist ein System zur Detektion mikrobiellen Wachstums basierend auf einem colorimetrischen Messverfahren, bestehend aus einer Inkubationskammer in der

sich einzelne Messzellen befinden, dem Computersystem und Vials mit Nährmedium und eingebautem Sensor.

Für das Messgerät können je nach Lebensmittel Kulturfläschchen mit unterschiedlichen Nährmedien eingesetzt werden. BacT/ALERT iAST-Medium (Tryptic Soy Broth) wurde in dieser Arbeit für die Detektion mikrobiellen Wachstums in Milch verwendet, da es sich zum Nachweis aerober Mikroorganismen mit einem pH-Wert < 4,6 eignet. Weiters stehen iLYM- und iNST-Medien zur Verfügung, die für die Untersuchung sauerer Proben und dem Nachweis anaerober Mikroorganismen vorgesehen sind.

Abbildung 9: BacT/ALERT® 3D Messprinzip



Quelle: bioMérieux (2010)

Abbildung 9 zeigt das in der Messzelle der Inkubationskammer ablaufende Messprinzip: eine lichtemittierende Diode sendet in zehnminütigem Intervall eine Lichtstrahl auf den Sensor am Boden des Kulturfläschchens.

Der Sensor reagiert auf eine durch CO_2-Bildung bzw. durch organische Säuren hervorgerufene pH-Wert Änderung im Kulturmedium mit einem Farbumschlag von grau nach gelb, wie in Abbildung 10 dargestellt.

Abbildung 10: BacT/ALERT iAST Kulturfläschen

Fung nennt mit BacT/ALERT ermittelte Detektionszeiten von 6 bis 8 h für eine *E. coli*-Kultur [FUNG, 2002].

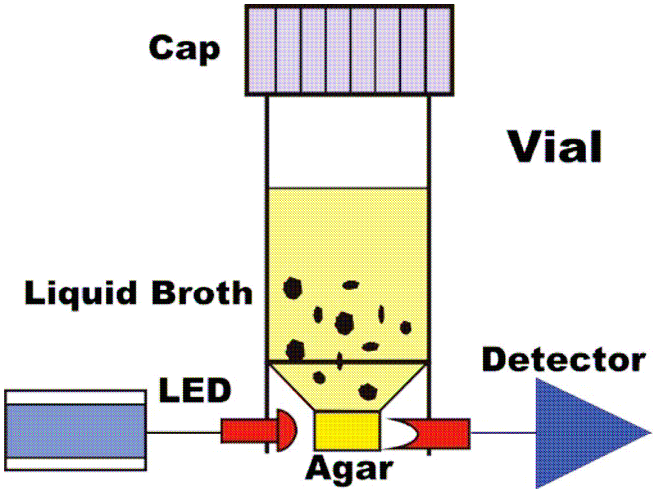
Eine Photodiode erfasst das vom Sensor reflektierte Licht und gibt die Information an das Computersystem weiter, welches mittels eines Algorithmus die entsprechende Wachstumskurve generiert.

2.3.4.2 MicroFoss

MicroFoss basiert wie BacT/ALERT ebenfalls auf einer colorimetrischen Detektion von mikrobiellen Stoffwechselprodukten. Die Vials, enthalten eine Nährbouillon und haben am Boden einen Agardiffusionszone eingearbeitet. Das Wachstum der Mikroorganismen führt zu einer Veränderung des pH-Werts und des Redoxpotentials im Medium. Die auftretende Farbänderung wird in der Agarzone reflektiert. Eine lichtemittierende Diode sendet alle sechs Minuten einen Lichtstrahl durch die Agardiffusionszone. Eine Photodiode detektiert die Farbänderung im Agar und die

Detektionszeit, welche umgekehrt proportional zur Zahl an Mikroorganismen in der Probe ist, wird aufgezeichnet. Das Messprinzip ist in Abbildung 11 dargestellt.

Abbildung 11: Messprinzip von MicroFoss



Quelle: Foss (2004)

Für das MicroFoss System sind unterschiedliche Nährmedien erhältlich:

- TVC-Medium für die Erfassung der Gesamtkeimzahl,
- Medien zum Nachweis von coliformen Keimen
- *Enterobacteriaceae*-Medium
- *E. coli*-Medium
- Schimmelpilze und Hefen-Medium

In einigen Studien wurde MicroFoss für den Nachweis mikrobiellen Wachstums in Milch im Vergleich zu konventionellen Methoden angewandt und evaluiert. Sowohl bei der Gesamtkeimzahlbestimmung mittels TVC-Medium und Koloniezählverfahren mit PC-Agar als auch bei dem Vergleich des *Enterobacteriaceae*-Mediums mit VRBD-Agar wurde mit MicroFoss schneller ein Ergebnis erhalten (2-12 h). Es konnten selbst sehr niedrige Keimzahlen detektiert werden (bis zu 1 KbE/mL) [FIRSTENBERG-EDEN et al., 2004, FIRSTENBERG-EDEN et al., 2002, SHELEF und FIRSTENBERG-EDEN, 1997].

Im Vergleich zur Referenzmethode lieferte MicroFoss genauere Ergebnisse mit höherer Selektivität und Sensitivität [FIRSTENBERG-EDEN et al, 2004 und 2002].

Auch bei der Detektion von pathogenen Mikroorganismen wurden ähnliche Ergebnisse erzielt [PENG und SHELEF, 2000, TAN und SHELEF, 1999, SHELEF und EDEN, 1996]. Odumeru et al. verglichen MicroFoss und die Standardprozedur zur Detektion von Listerien auf Oberflächenproben. Sie erhielten eine ähnliche Anzahl falsch negativer Detektionen bei beiden Methoden, ebenso eine ähnliche Sensitivität der Methoden. Mit MicroFoss wurden mehr falsch positive Ergebnisse als mit dem Referenzverfahren erhalten, was die Autoren darauf zurückführen, dass einerseits Mikroorganismen der in den Proben vorhandenen Begleitflora ebenfalls im Stande waren die vorhandenen Nährstoffe zu nutzen und andererseits alle falsch positiven Ergebnisse nach 30 h Inkubationszeit erhalten wurden, sodass sie von einer derart langen Probeninkubation abraten [ODUMERU et al., 2004].

White et al. zeigten, dass sich MicroFoss auch zum Abschätzen der Haltbarkeit von Trinkmilch eignet. Sie verglichen das MicroFoss TVC-Medium und jenes für den Nachweis von gramnegativen Bakterien mit dem Moseley Keeping-Quality Test. Unter der Vorraussetzung der vorherigen Inkubation der Probe bei 21 °C für 18 h kam mit MicroFoss nach 38 h ein Ergebnis zustande, während der Moseley-Test erst nach 8 bis 9 Tagen eine Aussage lieferte. Sie kamen daher insgesamt zu dem Ergebnis, dass sich MicroFoss gut zur Haltbarkeitsvorhersage eignet [WHITE et al., 2006].

3 Material und Methoden

3.1 Nährmedien und Verdünnungslösungen

3.1.1 Gesamtkeimzahlbestimmung - Referenzverfahren

Die Gesamtkeimzahlbestimmung erfolgte gemäß der Norm ISO 4833:2003 bzw. IDF Standard 100B:1991 im Koch'schen Plattengussverfahren. Zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl wurde Plate-Count-Magermilch (PCM)-Agar der Firma Merck, Darmstadt, Deutschland verwendet.

Durch den Zusatz von Magermilch entstehen für Mikroorganismen, welche in Milch zu finden sind, optimale Wachstumsbedingungen. Im Vergleich zu anderen Kulturmedien können somit ein breiteres Spektrum an Bakterien sowie mehr Kolonien nachgewiesen werden [TERPLAN et al., 1967].

- Zusammensetzung in g/L:

Caseinpepton	5,0
Hefeextrakt	2,5
Magermilchpulver (hemmstofffrei)	1,0
Glucose	1,0
Agar-Agar	10,5

- Herstellung:

In eine Schraubflasche wurden 20 g des dehydrierten Mediums eingewogen und mit demineralisiertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt. Unter Rühren wurde das Medium bis zum Kochen erhitzt und anschließend 15 min bei 121 °C autoklaviert.

- Arbeitsablauf:

Das autoklavierte Medium wurde auf 48 °C abgekühlt und in einem Wärmeschrank auf dieser Temperatur gehalten. Nachdem die Probe in der jeweiligen Menge und Verdünnung in sterile Petrischalen pipettiert wurde, erfolgte die Zugabe von etwa 14 bis 15 mL des Nährmediums pro Schale. Die Durchmischung wurde durch 8er Schleifen erreicht. Nach Erstarren des Nährbodens in der Schale erfolgte eine Bebrütung bei 30 °C für 72 h und anschließende Auszählung der Kolonien.

- Auswertung:

Bei der Koloniezählung wurden auch stecknadelkopfgroße Kolonien mit einbezogen. Laufkolonien wurden als Einzelkolonie gewertet, außer sie bewuchsen mehr als ein Viertel der Platte. In diesem Fall wurde die Schale verworfen.

3.1.2 Nährmedium zur Stammhaltung

- Herstellung von Schrägagarröhrchen:

PCM-Agar wurde auch für die Herstellung von Schrägagarröhrchen benutzt, um die isolierten und differenzierten Keime über den Versuchsverlauf aufbewahren zu können. Dabei wurden jeweils etwa 4 mL autoklavierter PCM-Agar in einer Sterilwerkbank in sterile, mit Schraubverschluss versehene, Kunststoffeprouvetten überführt. Diese wurden in einem Winkel an eine Tischkante gelegt, der eine Schrägagarfläche möglich machte, und dort über Nacht erstarren lassen.

- Arbeitsablauf:

Die isolierten Keime wurden von einer 24 h alten Kolonie einer PCM-Agarplatte mit einer Kunststofföse in 1 mL sterile Ringerlösung überführt. Diese Lösung wurde gut durchgemischt und mit einer weiteren Kunststofföse wurde der Schrägagar in Schlangenlinienform beimpft. Die Schrägagarröhrchen wurden bei 30 °C 24 h bebrütet. Die Röhrchen wurden bei 4 °C gelagert.

3.1.3 Nährbouillon zur Resuszitation

Zur Resuszitation der auf Schrägagar kühl gelagerten Keimisolate wurde Tryptone Soya Broth der Firma Oxoid, Basingstoke, England verwendet.

- Zusammensetzung in g/L

Caseinpepton	17,0
Sojamehlpepton	3,0
Natriumchlorid	5,0
Dikaliumhydrogenphosphat	2,5
Glucose	2,5

- Herstellung:

In eine Schraubflasche wurden 30 g des dehydrierten Mediums eingewogen und mit demineralisiertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt. Unter Rühren wurde das Medium bis zum Kochen erhitzt und anschließend 15 min bei 121 °C autoklaviert.

- Arbeitsablauf:

In einer Sterilwerkband wurden mittels Impföse aus Kunststoff Schrägagarkolonien in die Nährbouillon überimpft. Diese wurde gut gevortext und bei 30 °C 24 h bebrütet.

3.1.4 Nährmedien zur Überimpfung

Für die Durchführung weiterer Keimdifferenzierungsmethoden, welche mit Kolonien direkt von Selektivnährböden eine verfälschte Reaktion liefern würden, wurde auf PCM-Agar (Zusammensetzung, Herstellung und Arbeitsablauf siehe oben) bzw. Keimzahlagar zuckerfrei nach FIL-IDF überimpft. Dieses Nährmedium enthält keine fermentierbaren Kohlehydrate und hat nur einen geringen Nährwert, daher können Keime, die nicht zur individuellen Flora des Milchprodukts gehören identifiziert werden.

- Zusammensetzung Keimzahlagar zuckerfrei (g/L):

Pepton aus Gelatine	7,5
Pepton aus Casein	7,5
Natriumchlorid	5,0
Agar-Agar	15,0

- Herstellung:

In eine Schraubflasche wurden 35 g des dehydrierten Mediums eingewogen und mit demineralisiertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt. Unter Rühren wurde das Medium bis zum Kochen erhitzt und anschließend 15 min bei 121 °C autoklaviert.

- Arbeitsablauf:

Es wurden 14 bis 15 mL des Nährmediums in eine sterile Petrischale gegossen. Nachdem der Nährboden erstarrt war, wurden Kolonien vom jeweiligen

(Selektiv-)Nährboden mit einer Kunststofföse im fraktionierten Ausstrich aufgebracht. Die Bebrütung erfolgte bei 30 °C für 24 h.

3.1.5 Verdünnungslösung

Als Verdünnungslösung wurde für sämtliche Verdünnungsschritte eine viertelstarke Ringerlösung verwendet. Diese wurde aus Ringertabletten gemäß Herstellerempfehlung (Firma Fisher Scientific, Wien, Austria) zubereitet.

- Zusammensetzung (g/L):

Natriumchlorid	2,250
Kaliumchlorid	0,105
Calciumchlorid, wasserfrei	0,120
Natriumhydrogencarbonat	0,050

- Herstellung:

Für die Herstellung von einem Liter Ringerlösung wurden zwei Ringertabletten in einem Liter Aqua dest. gelöst. Die Lösung wurde zu je 10 mL (nach Autoklavieren lagen 9 mL pro Eprouvette vor) in Eprouvetten portioniert und danach bei 121 °C für 15 min autoklaviert.

3.1.6 Nährmedien für die Keimisolierung- und differenzierung

3.1.6.1 Selektivnährmedien

3.1.6.1.1 Nachweis und Keimzahlbestimmung von *Enterobacteriaceae*

Die Keimzahlbestimmung von *Enterobacteriaceae* wurde gemäß der ISO Norm 21528-2 durchgeführt. Zur Bestimmung von *Enterobacteriaceae* wurde VRBD-Agar (nach Mossel, Merck) verwendet.

Die Wirkungsweise basiert darauf, dass Gallensalze und Kristallviolett die mikrobielle Begleitflora inhibieren. Es kommt zu einem Abbau von Glucose und der Bildung von Säure, welche zur Entstehung roter Kolonien beiträgt und durch Präzipitate der Gallensalze hervorgerufene Höfe um die Kolonien resultiert. Alle *Enterobacteriaceae* bilden Säure aus Glucose und sind daher mit VRBD-Agar nachweisbar. Diese

Eigenschaft findet sich u.a. auch bei *Aeromonas*, wodurch das Medium nicht absolut spezifisch für *Enterobacteriaceae* ist. Daher sollte eine weitere Bestätigung verdächtiger Kolonien vorgenommen werden.

- Zusammensetzung (g/L):

Pepton aus Fleisch	7,000
Hefeextrakt	3,000
Natriumchlorid	5,000
D(+)Glucose	10,000
Gallensalze	1,500
Neutralrot	0,030
Kristallviolett	0,002
Agar-Agar	13,000

- Herstellung:

In eine Schraubflasche wurden 39,5 g des dehydrierten Mediums eingewogen und mit demineralisiertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt. Unter Rühren wurde das Medium bis zum Kochen erhitzt. Dieser Nährboden darf nicht autoklaviert werden.

- Arbeitsablauf:

Für die Bestimmung der *Enterobacteriaceae*-Keimzahl wurde das Medium auf 48 °C abgekühlt und in einem Wärmeschrank auf dieser Temperatur gehalten. Die Beimpfung des Nährbodens wurde mittels Koch'schem Plattengussverfahren erreicht. Nach Erstarren des Nährbodens in der Schale erfolgte eine Bebrütung bei 37 °C für 24 h und anschließende Auszählung und Beurteilung der Kolonien.

Zur Isolierung und anschließender Differenzierung der *Enterobacteriaceae* wurden 14 bis 15 mL des Nährmediums in eine sterile Petrischale gegosse. Nachdem der Nährboden erstarrt war, wurde Probenmaterial mit einer Kunststofföse im fraktionierten Ausstrich aufgebracht.

- Auswertung:

Koloniemorphologie	*Mikroorganismen*
Rot, umgeben von rötlichen Präzipitationshöfen	*Enterobacteriaceae* und andere
Farblos	Keine *Enterobacteriaceae*

3.1.6.1.2 Nachweis von *Pseudomonas*

Für den Pseudomonaden Nachweis wurde GSP-Agar Basis (*Pseudomonas-Aeromonas*-Selektivagar nach Kielwein) von Merck verwendet.

GSP-Agar enthält Glutamat und Stärke als Nährstoffquellen. Viele Mikroorganismen sind nicht in der Lage diese Bestandteile zu metabolisieren. Stärke wird von *Aeromonas* unter Säureproduktion abgebaut, was Phenolrot zu gelb werden lässt. *Pseudomonas* zeigen diese Reaktion nicht. Die Selektivität des Mediums wird durch Zugabe von Penicillin verbessert.

- Zusammensetzung (g/L):

Natrium L(+)Glutamat	10,00
Stärke, löslich	20,00
Kaliumdihydrogenphosphat	2,00
Magnesiumsulfat	0,50
Phenolrot	0,36
Agar-Agar	12,00

- Herstellung:

In eine Schraubflasche wurden 45 g des dehydrierten Mediums eingewogen und mit demineralisiertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt. Unter Rühren wurde das Medium bis zum Kochen erhitzt und anschließend 15 min bei 121 °C autoklaviert.

- Arbeitsablauf:

Das autoklavierte Medium wurde auf 48 °C abgekühlt und gemäß Herstellerempfehlung 100.000 IU Penicillin-G-Kaliumsalz[7] (Firma Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) pro Liter zugegeben. Das Nährmedium wurde in einem Wärmeschrank auf dieser Temperatur gehalten und sterile Petrischalen mit je 14 bis 15 mL des Mediums gefüllt und erstarren lassen. Die Beimpfung des Nährbodens erfolgte durch einen Oberflächenausstrich, wobei Probenmaterial mit einer Kunststofföse in einem fraktionierten Ausstrich auf die Nährbodenoberfläche aufgebracht wurde. Die Bebrütung erfolgte bei 30 °C für 72 h.

[7] Eine IU Penicillin G entspricht 0,6 µg.

- Auswertung:

Koloniemorphologie	*Mikroorganismen*
Groß, Durchmesser 2-3 mm, blau-violett, umgeben von einem rot-violetten Hof	*Pseudomonas*
Groß, Durchmesser 2-3 mm, gelb, umgeben von einem gelben Hof	*Aeromonas*
Klein, mit verzögertem Wachstum, manchmal mucoid	*Enterobacteriaceae* und andere

3.1.6.1.3 Nachweis von *Staphylococcus* und *Micrococcus*

Um Staphylokokken sowie Mikrokokken nachzuweisen, wurde BP-Agar (Baird Parker Medium Base) der Firma LabM, Bury, GB verwendet.
Lithium-Chlorid und Tellurit unterdrücken die mikrobielle Begleitflora. Pyruvat und Glycin fördern selektiv das Wachstum von Staphylokokken.

- Zusammensetzung (g/L):

Pepton aus Casein	10,0
Fleischextrakt	5,0
Hefeextrakt	1,0
Kaliumpyruvat	10,0
Glycin	12,0
Lithium-Chlorid	5,0
Agar-Agar	15,0

- Herstellung:

In eine Schraubflasche wurden 58 g des dehydrierten Mediums eingewogen und mit demineralisiertem Wasser auf 950 mL aufgefüllt. Unter Rühren wurde das Medium bis zum Kochen erhitzt und anschließend 15 min bei 121 °C autoklaviert.

- Arbeitsablauf:

Autoklaviertes Medium wurde auf 48 °C abgekühlt und gemäß Hersteller-empfehlung 50 mL Eigelb-Tellurit (LabM) pro Liter zugegeben. Das Nährmedium wurde in einem Wärmeschrank auf dieser Temperatur gehalten und sterile Petrischalen mit je 14 bis 15 mL des Mediums gefüllt und erstarren lassen. Die Beimpfung des Nährbodens erfolgte durch einen Oberflächenausstrich, wobei

Probenmaterial mit einer Kunststofföse in einem fraktionierten Ausstrich auf die Nährbodenoberfläche aufgebracht wurde. Die Bebrütung erfolgte bei 37 °C für 48 h.

- Auswertung:

Koloniemorphologie	*Mikroorganismen*
Schwarze, glänzende, konvexe Kolonien, 1-5 mm Durchmeser, umgeben von einem klarem Präzipationshof mit 2-5 mm Durchmesser.	*Staphylococcus aureus*
Schwarz, glänzend, unregelemässige Erscheinungsform.	*Staphylococcus epidermidis*
Sehr kleine, braun bis schwarze Kolonien ohne Hof	*Micrococcus sp.*
Dunkelbraun, getrübt	*Bacillus* sp.
Weiß, ohne Hof	Hefen

3.1.6.2 Chromogene Selektivnährmedien

3.1.6.2.1 Isolierung von *Bacillus cereus*

Zum Nachweis und zur Isolierung von *Bacillus cereus* wurde Brilliance™ *Bacillus cereus* Agar, ein selektiver chromogener Nährboden der Firma Oxoid verwendet.
Die ß-Glucosidase von *Bacillus cereus* spaltet das chromogene Substrat 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-ß-Glucopyranosid, was zur Bildung blau-grüner Kolonien führt. Gramnegative Bakterien werden durch die Zugabe von Polymyxin B gehemmt. Grampositive Mikroorganismen wie *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp. und einige *Bacillus* spp., außer *Bacillus cereus* werden durch Trimethoprim, welches die Synthese von Folsäure und somit die DNA-Synthese blockiert, gehemmt.

- Zusammensetzung (g/L):

Pepton	10,00
Hefeextrakt	4,00
Dinatriumhydrogenphosphat	2,52
Kaliumdihydrogenphosphat	0,28
Natriumpyruvat	10,00
Chromogene Mischung	13,00
Agar	13,00

- Herstellung:

In eine Schraubflasche wurden 20,5 g des dehydrierten Mediums eingewogen und mit demineralisiertem Wasser auf einen halben Liter aufgefüllt. Unter Rühren wurde das Medium bis zum Kochen erhitzt und anschließend 15 min bei 121 °C autoklaviert.

- Zusammensetzung

Brilliance™ *Bacillus cereus*-Selektiv-Supplement (Oxoid) (Zusammensetzung von einem Röhrchen – zur Supplementation von 500 mL Nährboden):

Polymyxin B	53000,0 IU
Trimethoprim	5,0 mg

- Arbeitsablauf:

Das autoklavierte Medium wurde auf 48 °C abgekühlt und den in 2 mL sterilem Aqua dest. gelösten Inhalt eines Brilliance™ *Bacillus cereus*-Selektiv-Supplement (Oxoid) pro halben Liter zugefügt um eine unerwünschte Keimflora zu unterdrücken. Das Nährmedium wurde in einem Wärmeschrank auf dieser Temperatur gehalten und sterile Petrischalen mit je 14 bis 15 mL des Mediums gefüllt und erstarren lassen. Die Beimpfung des Nährbodens erfolgte durch einen Oberflächenausstrich, wobei Probenmaterial mit einer Kunststofföse in einem fraktionierten Ausstrich auf die Nährbodenoberfläche aufgebracht wurde. Die Bebrütung erfolgte bei 37 °C für 24 h.

- Auswertung:

Koloniemorphologie	*Mikroorganismen*
Blau-grün	*Bacillus cereus*

3.1.6.2.2 Isolierung von *Escherichia coli*

Zum Nachweis und zur Isolierung von *Escherichia coli* wurde Brilliance™ *E. coli*/Coliform Agar, ein selektiver chromogener Nährboden der Firma Oxoid verwendet.

- Wirkungsweise:

Die meisten Coliformen sind Laktoseverwerter. Dadurch sind sie in der Lage den chromogenen Agar-Zusatz Rose-Gal zu spalten, was zur Entstehung von rosa Kolonien führt. Die von *E. coli* exprimierte ß-Glucuronidase verwertet das Agar-Substrat X-Glu – Chromogen, was zur Bildung von violett gefärbten Kolonien führt.

- Zusammensetzung (g/L)

Pepton	8,00
Dinatriumhydrogenphosphat	2,20
Natriumchlorid	5,00
Kaliumdihydrogenphosphat	1,80
Natriumlaurylsulfat	0,10
Chromogene Substanzen	0,35
Agar-Agar	10,60

- Herstellung:

In eine Schott Schraubflasche wurden 28,1 g des dehydrierten Mediums eingewogen und mit demineralisiertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt. Unter Rühren wurde das Medium erhitzt und einmal kurz aufgekocht. Dieser Nährboden darf nicht autoklaviert werden.

- Arbeitsablauf:

Das auf 48 °C abgekühlte Nährmedium wurde in einem Wärmeschrank auf dieser Temperatur gehalten und sterile Petrischalen mit je 14 bis 15 mL des Mediums gefüllt und erstarren lassen. Die Beimpfung des Nährbodens erfolgte durch einen Oberflächenausstrich, wobei Probenmaterial mit einer Kunststofföse in einem fraktionierten Ausstrich auf die Nährbodenoberfläche aufgebracht wurde. Die Bebrütung erfolgte bei 37 °C für 24 h.

- Auswertung:

Koloniemorphologie	*Mikroorganismen*
Violett	*Escherichia coli*
Rosa	*Klebsiella pneumoniae* und andere Coliforme

3.1.6.3 Nährmedium zur Bestimmung des Hämolyseverhaltens

Um Auskunft über das Vorliegen bestimmter Keimspezies zu erlangen wurden alle Isolate auf Columbia Agar mit 5% Schafblut (COS)-Platten (Ready-to-use) der Firma bioMérieux (Marcy l'Etoile, France) ausgestrichen.

- Arbeitsablauf:

Die kühlgelagerten Ready-to-use Platten wurden in einer Sterilwerkbank zum Trocknen aufgelegt. Die Beimpfung des Nährbodens erfolgte durch einen Oberflächenausstrich, wobei Probenmaterial mit einer Kunststofföse in einem fraktionierten Ausstrich auf die Nährbodenoberfläche aufgebracht wurde. Die Bebrütung erfolgte bei 37 °C für 24 h. Blutagar wird zur Anzucht anspruchsvoller Mikroorganismen und zur Beurteilung des Hämolyseverhaltens verwendet.

- Auswertung:

α-Hämolyse: Um die Bakterienkolonie findet sich eine grünlich gefärbte Zone teilweise zerstörter Erythrozyten (=Vergrünung).

β-Hämolyse: Um die Kolonie befindet sich eine klare Hämolysezone. Erythrozyten sind vollständig zerstört.

γ-Hämolyse: Auf Blutagar rufen die Bakterien keine Veränderungen hervor [RIEMELT, 2003].

3.1.7 Cellscan System

CellScan von Celsis ist ein Messgerät für die Milchindustrie, das nach dem Prinzip der ATP-Biolumineszenzmessung funktioniert.

- Reagenzien:
  - Sensilux
  - Dilutor DS
  - Cellsolver DE
  - ATX
  - Dilutor DA
  - Microwash

- Herstellung:

Sensilux Reagenz wurde aus dem vorliegenden trockenem Pulver durch Zugabe von 12 mL Dilutor DS mittels Dispenser hergestellt und nach dem Auflösen in ein 50 mL PP-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von weiteren 12 mL Dilutor DS in das PP-Röhrchen war die Lösung gebrauchsfertig. Auch ATX liegt als Trockenpulver in einem Fläschchen vor. Das Pulver wurde mittels 9 mL Dilutor DA aus dem Dispenser gelöst und in ein 50 mL PP-Röhrchen überführt.

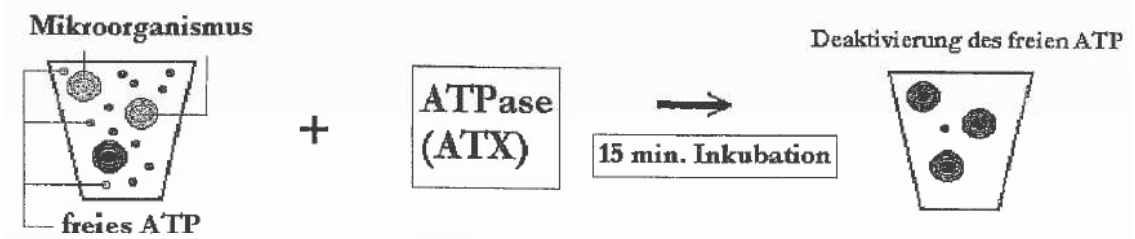
- Geräte und Material:
  - Mikrotiterplatte mit 96 Wells
  - 50 µL Pipette
  - Pipettenspitzen
  - Dispenser
  - CellScan Innovate™ System mit Software

- Arbeitsablauf und Funktionsprinzip:

50 µL der vorbebrüteten und gut gemischten Probe wurden mit einer Kolbenhubpipette in die Wells der Mikrotiterplatte pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde in das Luminometer eingesetzt.

Die nächsten Schritte sind in Abbildung 12 und Abbildung 13 dargestellt und erfolgen automatisch im Gerät.

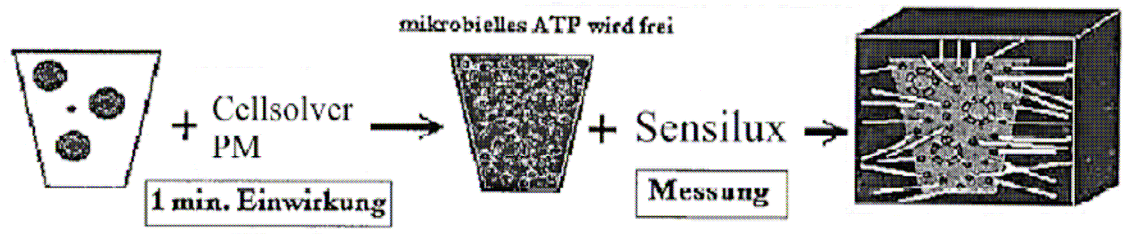
Abbildung 12: Messprinzip des CellScan System I



Quelle: Celsis (undatiert)

Das Instrument injiziert in jedes Well 25 µL ATX. Dieses enthält eine ATPase, die freies ATP inaktiviert. Nach einer 10-minütigen Inkubation, wobei die Proben geschüttelt werden, erfolgt die Injektion von 50 µL Cellsolver. Dadurch wird die Zellwand der Mikroorganismen angegriffen und mikrobielles ATP kann aus der Zelle austreten. Durch Zugabe von 100 µL Sensilux, dem Lichtenzym, welches mit dem freigesetzten ATP reagiert, kommt es zur Emittierung von Licht.

Abbildung 13: Messprinzip des CellScan System II



Quelle: Celsis (undatiert)

Das emittierte Licht entspricht der Menge an ATP und ist damit proportional zur Keimbelastung.

Es wird erfasst und in RLU (Relative Light Units) angegeben.

3.1.8 BacT/ALERT

BacT/ALERT ist ein mikrobiologisches Analysengerät, welches auf einem colorimetrischen Messprinzip beruht. Zur Bestimmung der Keimbelastung in Milch wird BacT/ALERT iAST-Medium verwendet. Dieses eignet sich für die Nachweis von aerob wachsenden Keimen in Lebensmitteln mit einem pH-Wert > 4,6. Ein Fläschchen enthält 40 mL Fertigmedium. Mikrobielles Wachstum wird durch einen im Boden eingearbeiteten Sensor, der auf CO_2 Produktion reagiert erfasst. Dabei kommt es zu einer Farbveränderung des Sensors von grau nach gelb. Dieser Umschlag wird mittels Photodiode gemessen und vom Gerät aufgezeichnet.

- Zusammensetzung des iAST-Mediums (Gew./Vol.)

Pankreatisch abgebautes Casein	1,700%
Papaisch abgebautes Sojabohnenmehl	0,300%
Natriumpolyanetholsulfonat	0,035%
Pyridoxin-HCl	0,001%
Komplexe Aminosäuren- und Kohlenhydratsubstrate in gereinigtem Wasser	n.s.

- Arbeitsablauf:

Vor der Probeneinbringung wurde das Septum des Vials mit Alkohol besprüht und trocknen gelassen. Mit einer sterilen Einwegspritze- und Kanüle wurden 10 mL der unverdünnten, gut homogenisierten Probe in das Probenfläschchen eingebracht. Danach wurden die Vials in die Inkubationskammer des BacT/ALERT Geräts eingesetzt.

3.1.9 MicroFoss

MicroFoss basiert ebenfalls auf einem colorimetrischen Messprinzip. Ein Vial enthält ein bestimmtes Volumen des Nährmediums. Am Boden des Vials befindet sich eine Agardiffusionszone. Kommt es im Nährmedium zu einer Farbänderung aufgrund von pH- und anderen biochemischen Reaktionen hervorgerufenen mikrobiellen Wachstums, so wird diese in der Agarzone reflektiert. Im Abstand von 6 min wird Licht einer Leuchtdiode durch die Agardiffusionszone geleitet, wobei eine Photodiode am anderen Ende Farbänderungen registriert. Kommt es zu einer Änderung wird der Zeitpunkt der Detektion (TTD) aufgezeichnet.

- Zusammensetzung TVC-Medium:

Das Nährmedium enthält Glucose als Kohlenstoffquelle. Bromkresolpurpur dient als pH-Indikator.

- Zusammensetzung *Enterobacteriaceae*-Medium:

Das Medium besteht aus Peptonhefeextrakt mit Laktose als Kohlenstoffquelle. Weiters sind Gallensalze, Natriumlaurylsulfat, 1% Glucose und andere inhibierend auf Grampositive wirkende Substanzen enthalten. Bromkresolpurpur dient als pH-Indikator.

- Arbeitsablauf:

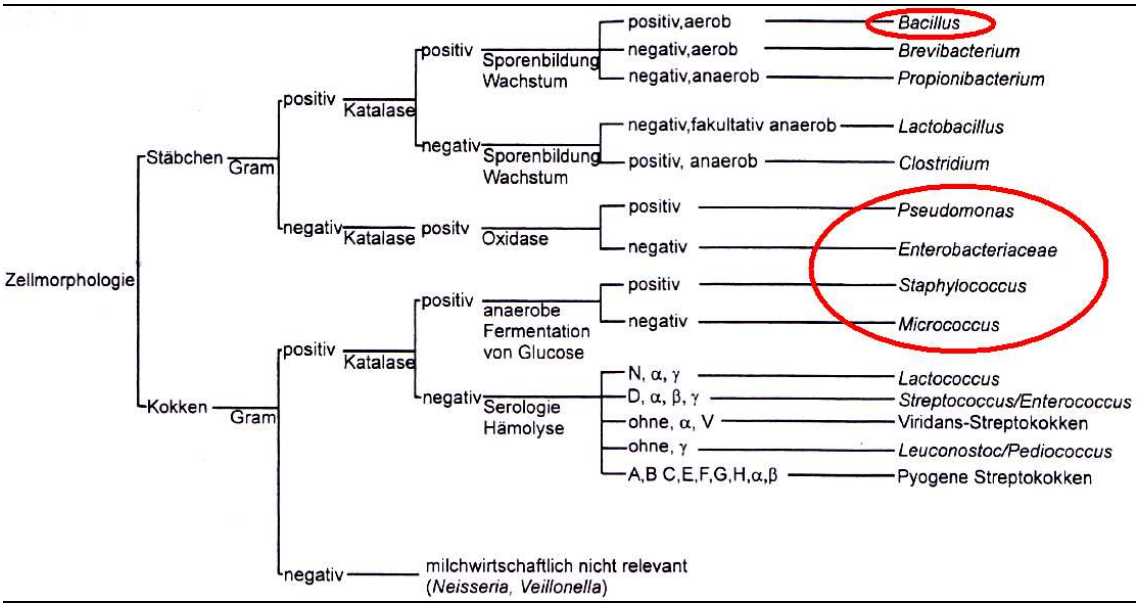
Mit einer sterilen Pipette wurden 2 mL für das TVC-Medium und 5 mL für das *Enterobacteriaceae* Medium der unverdünnten, gut homogenisierten Probe in das Vial transferiert und einige Male geschüttelt. Im Anschluss wurden die verschraubten Probenröhrchen in die Inkubationskammer das MicroFoss Systems eingesetzt und der Deckel um eine Viertelumdrehung gelockert.

3.1.10 Methoden zur Keimdifferenzierung

Ausgehend von Reinkulturen wurden neben dem Wachstumsverhalten auf Selektivnährboden weitere Verfahren zur Differenzierung der Milchverderbskeime angewandt. Die Gestalt und Anordnung der Kolonien und das Vorhandensein von Sporen wurden unter Verwendung von mikroskopischen Präparaten bestimmt. Als ein

wichtiges Kriterium zur Differenzierung wurde mittels Gramfärbung eine Unterscheidung zwischen grampositiven und -negativen Keimen gefällt. Katalase- und Oxidasetest lassen auf das Vorhandensein bestimmter Enzyme schließen, was eine weitere Möglichkeit zur Differenzierung darstellte. Mittels API 20E und API 20NE wurden zusätzliche Information innerhalb der *Enterobacteriaceae* und Nicht-*Enterobacteriaceae* generiert. Abbildung 14 gibt einen Überblick über die Grobdifferenzierung milchwirtschaftlich relevanter Keime. Die verwendeten Mikroorganismen sind farblich gekennzeichnet.

Abbildung 14: Grobdifferenzierung milchwirtschaftlich relevanter Mikroorgansimen



Quelle: Riemelt (2003)

3.1.10.1 Katalasetest

- Testprinzip:

Viele Bakterien besitzen Katalase, ein Enzym das Wasserspoffperoxid in Wasser und Sauerstoff spaltet. Reaktionsgleichung: $2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$

- Arbeitsablauf:

Die zu testende, maximal 24 h alte Kultur wurde vom Nährboden (PCM-Agar) mit einer Kunststofföse entnommen und auf einem sauberen Objektträger verrieben. Darauf wurde ein Tropfen 3%iger H_2O_2-Lösung gegeben.

- Auswertung:

Die Bildung von Bläschen zeigt eine positive Katalasereaktion an.

3.1.10.2 Oxidasetest

- Testprinzip:

Die Oxidation reduzierter Cytochrome wird in Anwesenheit von Sauerstoff durch die Cytochromoxidase katalysiert. Reagktionsgleichung:
Dimethyl-p-phenylendiamin + Alpha-Naphthol → Indophenolblau

- Arbeitsablauf:

Die zu testende, maximal 24 h alte Kultur wurde vom Nährboden (Keimzahlagar zuckerfrei) mit einer Kunststofföse entnommen und auf einem mit Oxidase-Reagent (bioMérieux) benetzten Streifen Filterpapier verrieben.

- Auswertung:

Im Falle eines Nachweises von Cytochromoxidase, d.h. einer positiven Reaktion, kommt es innerhalb von 30 s zu einer Blau- bis Violettfärbung.

3.1.10.3 Mikroskopische Differenzierung

3.1.10.3.1 Färbung mit Methylenblau

Zur allgemeinen Beurteilung der Zellmorphologie und Kolonieanordnung wurde eine Methylenblaufärbung durchgeführt (Löffler's Methylenblaulösung, Merck).

- Arbeitsablauf:

Auf einem Objektträger wurde steriles, destilliertes Wasser aufgetragen und mit einer ausgeglühten Impföse eine Kolonie in dem Wassertropfen verrieben. Das Präparat wurde an der Luft getrocknet und dann hitzefixiert. Gefärbt wurde mit Methylenblau für 180 s und anschließend unter Ölimmersion mikroskopiert.

3.1.10.3.2 Gramfärbung

Aufgrund des Zellwandaufbaus kann man Bakterien mittels Gramfärbung in zwei Gruppen unterteilen: Grampositive Bakterien lassen sich nach Färbung mit Kristallviolett und Jod nicht mit Alkohol entfärben, während gramnegative Bakterien erst durch die Gegenfärbung mit einem roten Kontrastfarbstoff sichtbar werden.

- Arbeitsablauf:

  Analog zur Methylenblaufärbung wurden die auf einem Objektträger ausgestrichenen Bakterien hitzefixiert. Danach erfolgte der Färbeprozess (alle Lösungen Merck):

  - Färben mit Kristallviolett – 30 s
  - Spülen mit Wasser – 5 s
  - Beizen in Lugol'scher Lösung – 30 s
  - Spülen mit Wasser – 5 s
  - Trocknen
  - Gegenfärben mit Safranin – 10 s
  - Spülen mit Wasser – 5 s
  - Trocknen

  Mikroskopiert wurde unter Ölimmersion.

- Auswertung:

  Im mikroskopischen Präparat sind grampositive Bakterien blau-violett, gramnegative hingegen rot. Zudem kann die Morphologie beurteilt werden und zwischen Stäbchen und Kokken unterschieden werden.

3.1.10.4 API-Test

Um die gramnegativen Bakterien genauer zu differenzieren und identifizieren wurde ein API 20E Test, für *Enterobacteriaceae* sowie ein API 20NE Test, für non-*Enterobacteriaceae*, (beide bioMérieux) durchgeführt. Dabei wurde nach Anleitung des Herstellers vorgegangen.

3.1.11 Geräte und Hilfsmittel

Tabelle 2: Geräte und Hilfsmittel

Gerät	*Hersteller*
50 mL PP-Röhrchen	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Autoklav	Certoclav, Traun, Österreich
BacT/ALERT	BioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
Brutschränke	Memmert, Schwabach, Deutschland
CellScan Innovate	Celsis International BV, Brüssel, Belgien
Dispenser	Celsis International BV, Brüssel, Belgien
Einwegkanülen	Braun, Melsungen, Deutschland
Einwegkunststoffbecher steril 100 mL	diverse
Einwegspritzen	Braun, Melsungen, Deutschland
Glaswaren: Eprouvetten, Glasflaschen	diverse
Kolbenhubpipetten 100-1000 µL	Fisher Scientific, Wien, Österreich
MicroFoss	Foss Analytical A/S, Hillerød, Dänemark
Mikrotiterplatten 96-Well	Celsis International BV, Brüssel, Belgien
Petrischalen	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Pipetten 50 , 2000 µL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Waage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	Grant, Cambridge, GB

3.2 Durchführung

Die Durchführung dieser Arbeit erfolgte, bis auf die Keimdifferenzierung, im mikrobiologischen Qualitätssicherungslabor der Firma Berglandmilch reg.Gen.m.b.H., Werk Aschbach. Die allgemeinen Techniken des mikrobiologischen (sterilen) Arbeitens wurden eingehalten. Es wurde ausschließlich in einer Laminar-flow-Werkbank gearbeitet. Probenlagerung für sämtliche Versuche erfolgte in einem Kühlraum bei 7 °C. Wurden Proben bei Raumtemperatur gelagert, so erfolgte dies bei 22 °C in den Laborräumlichkeiten.

3.2.1 Keimisolierung

Um jene Keime zu Isolieren, die für den Verderb von Milch verantwortlich sind, wurde Milch unterschiedlicher Herkunft und aus unterschiedlichen Herstellungsprozessen stammend herangezogen.

Abbildung 15: Schematische Darstellung der Keimisolierung

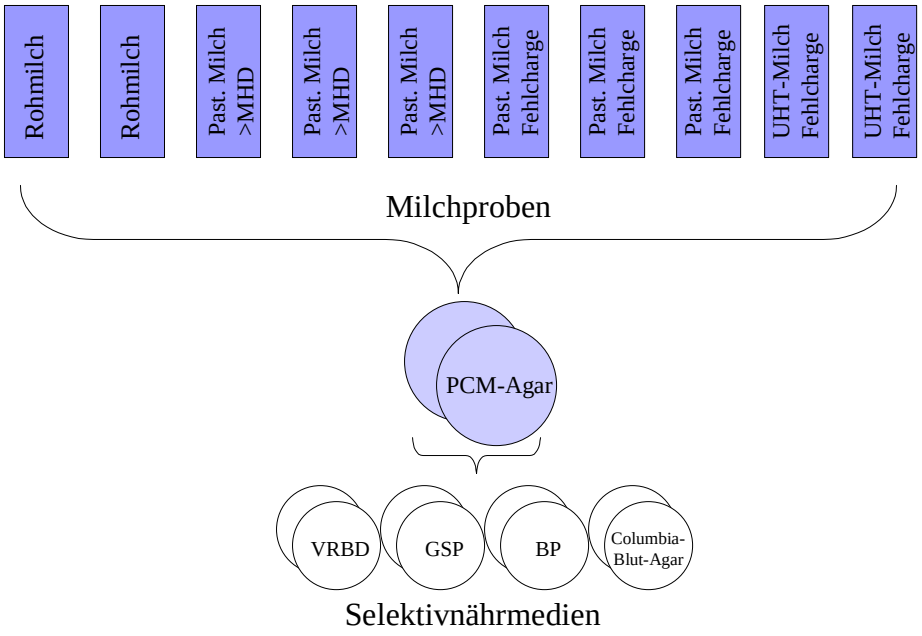
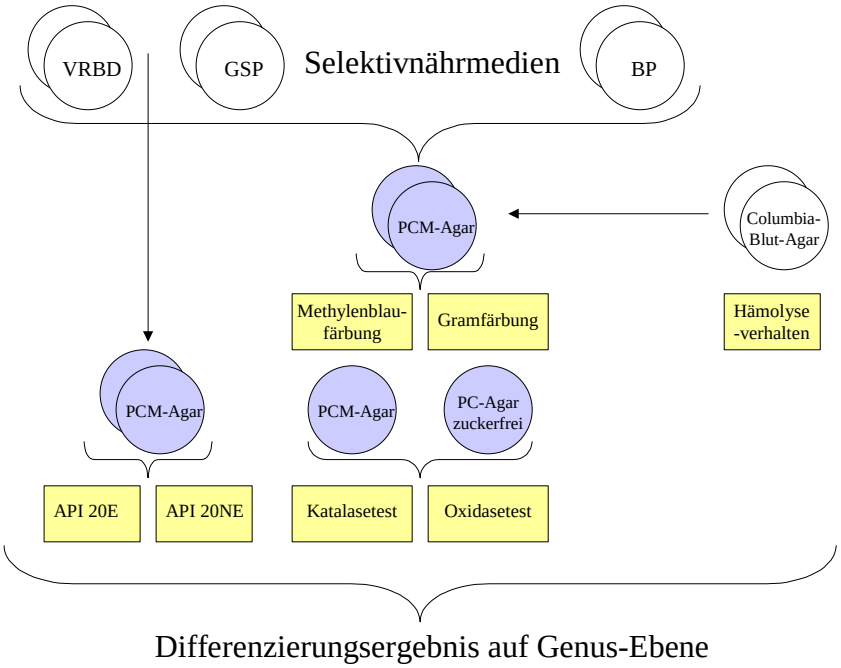


Abbildung 15 zeigt schematisch den Ablauf der Isolierung relevanter Mikroorganismen. Ausgehend von 24 Milchproben unterschiedlicher Herkunft wurden unter Verwendung verschiedener Verdünnungen PCM-Agar im Oberflächenverfahren beimpft. Nach Bebrütung erfolgte ein Überimpfungsschritt auf Selektiv- und Blutnährböden. Dadurch wurden insgesamt 36 Isolate gewonnen.

3.2.2 Keimdifferenzierung

Nachdem Reinkulturen auf Selektivnährmedien vorlagen, wurde mit der weiteren Differenzierung fortgesetzt. Abbildung 16 veranschaulicht den Vorgang der Differenzierung.

Abbildung 16: Schematische Darstellung der Keimdifferenzierung



Ausgehend von VRBD-, GSP-, BP-Agar sowie Columbia-Blut Agar wurde auf PCM-Agar überimpft und von den Isolaten mikroskopische Präparate angefertigt. Ein grober Überblick wurde durch die Färbung mit Methylenblau erzielt. Mittels Gramfärbung wurde eine Differenzierung in grampositive- und negative Keime ermöglicht. Anhand des Ausstriches auf Columbia-Blut-Agar konnten aufgrund des Hämolyseverhaltens

Rückschlüsse auf das Vorliegen bestimmter Bakteriengattungen gezogen werden. Nach einem weiteren Überimpfungsschritt zur Erhaltung frischer Kolonien auf dafür geeigneten Nährmedien (PC-Agar zuckerfrei für Oxidasetest und PCM-Agar für Katalasetest) wurden ein Katalse- und Oxidase Test durchgeführt. Zeigte sich Wachstum auf VRBD- und GSP-Agar, kam – nach Überimpfung auf PC-Agar - ein API 20E respektive API 20NE-Test zum Einsatz. Ebenso erfolgte ein Nachweis von *E. coli* sowie *Bacillus cereus* mittels chromogener Nährmedien ausgehend von Keimen, die Wachstum auf VRBD, bzw. ß-Hämolyse auf Columbia-Blut-Agar zeigten.

3.2.3 Durchführung des Methodenvergleichs

Für die Durchführung des Methodenvergleichs wurde in einem ersten Schritt sterile Milch mit den Keimisolaten aus Übernachtkultur beimpft. Die eingesetzten Schnellmethoden sowie die Referenzmethode wurden in zwei unterschiedlichen Versuchsanordnungen evaluiert. Im Anschluss daran erfolgte eine produktionsbegleitende Anwendung der Methoden um deren Eignung für die mikrobiologische Routinequalitätskontrolle im Milchverarbeitungsbetrieb zu prüfen.

3.2.3.1 Versuch 1

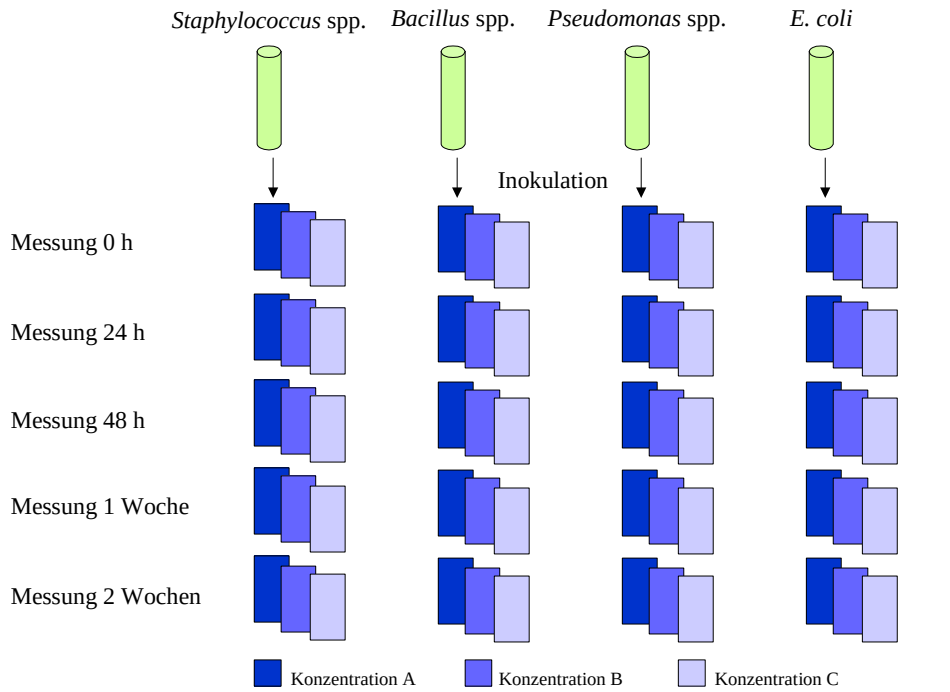
Für diesen Versuchsdurchlauf wurde sterile Milch in drei verschiedenen Konzentrationen (A: $1x10^3$ KbE/mL, B: $1x10^2$ KbE/mL, C: $1x10^1$ KbE/mL) mit Isolaten von *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp. *Pseudomonas* spp. und *E. coli* inokuliert. Mit allen Methoden wurde die Gesamtkeimzahl bestimmt. Abbildung 17 zeigt den Ablauf des Experiments.

Die Proben wurden für den Versuchszeitraum von zwei Wochen bei 7 °C gelagert. Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl mit Koch`schem Plattengussverfahren und die ATP-Biolumineszenzmessung (mit CellScan) erfolgte nach 0 h, 24 h sowie 48 h, 1 Woche und nach 2 Wochen. Messungen mit BacT/ALERT und MicroFoss (TVC-Medium) erfolgten nach 24 h, 1 Woche und 2 Wochen Lagerung der beimpften Probe. Es wurden zwei Messreihen in zweifachem Ansatz durchgeführt.

- Methodenparameter:

Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl wurde im Koloniezählverfahren bei 30 °C – gemäß ISO 4833:2003 - durchgeführt. Die Bebrütungsdauer betrug 72 h. Bei der ATP-Biolumineszenzmessung mit CellScan wurde – abweichend vom Arbeitsprotokoll und den Herstellerempfehlungen – ohne Inkubation gemessen. Messungen mit BacT/ALERT (iAST-Medium) und MicroFoss (TVC-Medium) erfolgten bei einer Temperatur der Inkubationskammer von 30 °C für 48 h.

Abbildung 17: Schematische Darstellung des ersten Versuchs zum Vergleich der Methoden

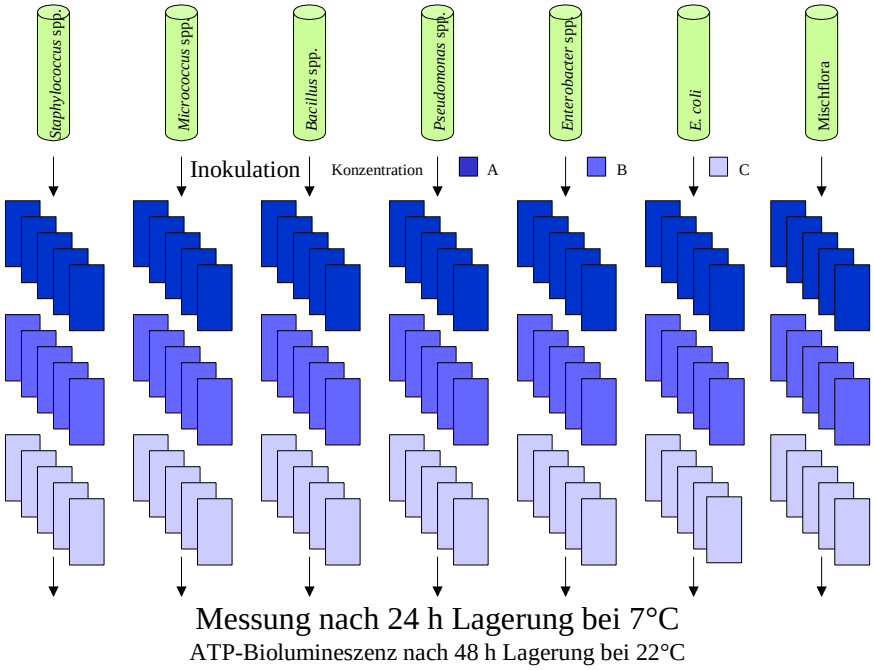


3.2.3.2 Versuch 2

In einem weiteren Versuch wurde sterile Milch in einem fünffachen Ansatz in drei unterschiedlichen Konzentrationen (wie in Versuch 1) mit Isolaten von *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp, *E. coli* und Mischflora (*Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *E. coli*) beimpft. Nach 24 h Lagerung bei 7 °C erfolgte eine Gesamtkeimzahlbestimmung mittels Referenzverfahren, Keimzahlbestimmung von *Enterobacteriaceae* gemäß ISO 21528-2, sowie Messungen mit BacT/ALERT und MicroFoss (TVC-Medium und

Enterobacteriaceae-Medium). Messungen mit CellScan wurden nach einer 48-stündigen Vorbebrütung bei Raumtemperatur (22 °C) durchgeführt. Abbildung 18 zeigt den Versuchsverlauf in vereinfachter Darstellung.

Abbildung 18: Schematische Darstellung des zweiten Versuchs zum Vergleich der Methoden



Bis auf den veränderten Ablauf bei der ATP-Biolumineszenzmessung wurden die Methodenparameter aus Versuch 1 übernommen.

3.2.3.3 Produktionsbegleitende Anwendung der Methoden

Die Eignung der einzelnen Schnellmethoden zur mikrobiologischen Routinequalitätskontrolle im Milchverarbeitungsbetrieb, sowie ein Vergleich mit dem Koch`schen Plattengussverfahren als Referenzmethode, wurde anhand unterschiedlicher Verarbeitungsstufen im Rahmen der Herstellung von keimarmer, pasteurisierter Milch evaluiert.

3.2.3.3.1 Anlagenkonfiguration und Versuchsbedingungen

Für diesen Veruch wurde die Produktion einer mikrofiltierten und anschließend pasteurisierten Milch mikrobiologisch überwacht.

Die Probenahmen, sowie sämtliche mikrobiologische Untersuchungen fanden ebenfalls in der Molkerei Berglandmilch reg.Gen.m.b.H., Werk Aschbach, statt. Die Anlagen zur Milchverarbeitung- sowie Abfüllung wurden gemäß Qualitätsmanagementsystem überwacht und gereinigt.

Wie in Abbildung 20 ersichtlich wurde Rohmilch in einem Separator in Magermilch und Rahm getrennt. Der Rahmstrom wurde bei 120 °C für 4 s hocherhitzt. Der Magermilchstrom durchlief die Mikrofiltrationsanlage, bestehend aus drei Filtrationseinheiten (siehe Abbildung 19).

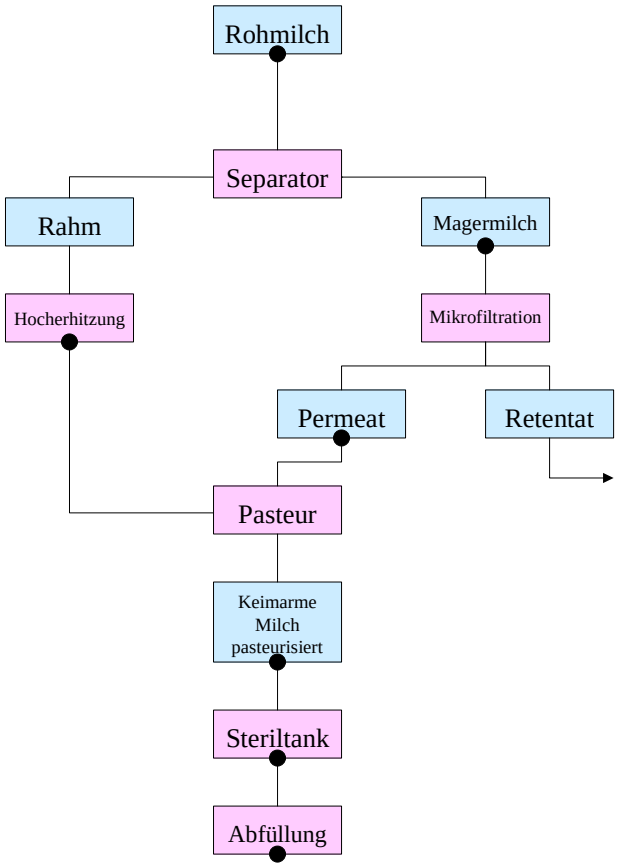
Abbildung 19: Mikrofiltrationsanlage mit drei Filtrationseinheiten

Quelle: Tetra Pak Deutschland (2010)

Porendurchmesser der eingesetzten Tami Isoflux® Membranen betrug 1,4 µm. Die Anlage wurde im Cross Flow Verfahren mit einer Überströmungsgeschwindkeit von 7 m/s und einem Cf von 20 betrieben. Keimangereichertes Retentat aus der Filtration wurde nicht für das Endprodukt verwendet, sondern aus dem Prozess geleitet. Das keimarme Permeat und der Rahm wurden zusammengeführt und einer Pasteurisation

bei 73 °C für 25 Sekunden unterzogen. Die Milch wurde bis zur Abfüllung in einem gekühlten Steriltank gelagert. Die Abfüllung in keimfreie Verpackung erfolgte unter hygienischen Bedingungen.

Abbildung 20: Anlagenkonfiguration und Probenahmestellen



3.2.3.3.2 Probenahme- und Untersuchungsplan

Im Rahmen dieses Versuchs kamen neben den mikrobiologischen Schnellmethoden BacT/ALERT und MicroFoss die im Qualitätssicherungslabor etablierten Methoden zur mikrobiologischen Qualitätskontrolle - Koloniezählverfahren nach ISO 4833:2003 und Messung mit CellScan - zum Einsatz.

Die Probenahme erfolgte unter sterilen Bedingungen, an den jeweils dafür vorgesehenen Probenahmeventilen- bzw. stellen. Dabei wurde das Ventil mit 96%-igem

Ethanol eingesprüht, anschließend abgeflammt und mit einer Einwegspritze und -kanüle Milch entnommen. Die Probe wurde in sterile Kunststoffbehältnisse überführt. Die Packungen wurden der Abfüllanlage unmittelbar nach Abfüllung entnommen.
Die schwarzen Punkte in Abbildung 21 markieren Probenahmepunkte. Wie in Tabelle 3 aufgelistet, wurden bis auf die Rohmilch alle Produktionsschritte mehrmals beprobt, und zwar am Anfang, in der Mitte und am Ende des Produktionsprozesses.

Tabelle 3: Probenahme und Untersuchungsplan

Probenahmen	***Frisch***				***24 h***	
	GKZ	***BacT/ALERT***	***MicroFoss Ent***	***CellScan***	***CellScan***	***VRBD 1:1***
Rohmilch	1:10000	x		x	x	
MM vor MF Anfang	1:10000	x		x	x	
MM vor MF Mitte	1:10000	x		x	x	
MM vor MF Ende	1:10000	x		x	x	
MM nach MF Anfang	1:10	x		x	x	
MM nach MF Mitte	1:10	x		x	x	
MM nach MF Ende	1:10	x		x	x	
Rahm nach Erhitzer Anfang	1:1	x		x	x	
Rahm nach Erhitzer Mitte	1:1	x		x	x	
Rahm nach Erhitzer Ende	1:1	x		x	x	
MF nach Pasteur Anfang	1:10	x	x	x	x	x
MF nach Pasteur Mitte	1:10	x	x	x	x	x
MF nach Pasteur Ende	1:10	x	x	x	x	x
Steriltank Anfang	1:10	x	x	x	x	x
Steriltank Mitte	1:10	x	x	x	x	x
Steriltank Ende	1:10	x	x	x	x	x
Abfüllung Anfang	1:10	x	x	x	x	x
Abfüllung Stündlich	1:10	x	x	x	x	x
Abfüllung Ende	1:10	x	x	x	x	x

Die durchgeführten mikrobiologischen Analysen sind in Tabelle 3 aufgelistet. Für die Zeit bis zur Untersuchung wurden die Proben in einem Kühlschrank bei 5 °C gelagert. Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl in der jeweiligen Verdünnungsstufe und die Messung mit BacT/ALERT wurden von jeder gezogenen Prozessstufe ohne vorangehende Inkubation durchgeführt. Eine Biolumineszenzmessung mit CellScan erfolgte ebenfalls von jeder Prozessstufe. Dabei wurden die Proben direkt nach Erhalt und nach Inkubation für 24 h bei Raumtemperatur gemessen. Um Rückschluß auf etwaige Rekontaminationen bei der Produktion bzw. bei der Abfüllung ziehen zu

können wurde nach 24 h Inkubation der Proben bei Raumtemperatur die *Enterobacteriaceae*-Keimzahl unter Verwendung von VRBD-Agar sowie MicroFoss *Enterobacteriaceae*-Medium bestimmt.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Ergebnisse

Der experimentelle Ablauf der vorliegenden Arbeit gliedert sich in drei Abschnitte. Begonnen wurde damit, die für die Fragestellung optimal geeigneten Einstellungen und Probenbehandlungsmethoden (Ermittlung der Keimbelastung, Vorinkubation, Testdauer, Temperatur, Verdünnung) der einzelnen Verfahren zu ermitteln und die als relevant eingestuften Milchverderbskeime, welche für die folgenden Kontaminationsversuche verwendet wurden, aus Fehlchargen und Rohmilch zu isolieren und zu spezifizieren. Im zweiten Teil wurde ein Methodenvergleich mittels Kontaminationsversuchen durchgeführt. Dabei wurden die Methoden unter vor allem in Hinblick auf Genauigkeit und auf die jeweilige Wiederholbarkeit der Ergebnisse überprüft. Zudem wurden die Ergebnisse im zeitlichen Verlauf beobachtet. In der dritten Phase kamen die verschiedenen Methoden produktionsbegleitend unter Verwendung pasteurisierter, mikrofiltrierter Milch als Probenmatrix im Betrieb zur Anwendung.

4.1.1 Isolation und Charakterisierung relevanter Verderbskeime

Insgesamt 37 Proben von Fehlchargen pasteurisierter und ultrahocherhitzter Milch, abgelaufener pasteurisierter Milch sowie Rohmilch wurden auf das Vorhandensein milchtechnologisch bedeutsamer Verderbsorganismen untersucht.

Tabelle 4 gibt einen Überblick über die Charakterisierungsergebnisse, der für den erfolgten Methodenvergleich verwendeten Verderbskeime.

Tabelle 4: Übersicht der Charakterisierungsergebnisse

Probe	*Herkunft*	*Kolonienmorphologie auf Nährboden*	*Katalasetest*	*Oxidasetest*	*Morphologie-Mikroskopisches Präparat*	*Identifikation mit API 20E*	*Identifikation mit API 20NE*	*identifiziert als*
1	Rohmilch	BP: schwarze 0,5-1mm große, glänzende, erhabene, runde Kolonien; glatter Rand; klarer ~2mm großer Präzipitathof	pos	pos	Grampositive Kokken: haufenförmige Anordnung	/	/	*Staphylococcus* spp.
2	Rohmilch	BP: bräunlich-schwarze, sehr kleine Kolonien mit unklarem Präzipitathof	pos	pos	Grampositive Kokken	/	/	*Micrococcus* spp.
3	Pasteurisierte Trinkmilch - Fehlcharge	VRBD: rosa-rote, runde, erhabene Kolonien	pos	neg	Gramnegative kurze, dicke Stäbchen	97,5% *Enterobacter aerogenes*	/	*Enterobacter* spp.
4	Pasteurisierte Trinkmilch - Fehlcharge	VRBD: rosa-rote, runde, erhabene Kolonien; Brilliance E.coli: violette Kolonien	pos	neg	Gramnegative Stäbchen	99,5% *Escherichia coli*	/	*Escherichia coli*
6	UHT-Milch - Fehlcharge	GSP: rot-rosa Kolonien mit glattem Rand, glänzender Oberfläche	pos	neg	Gramnegative gedrungene Stäbchen	/	92,8% *Pseudomonas luteola*	*Pseudomonas* spp.
27	UHT-Milch - Fehlcharge	GSP: rot-rosa Kolonien mit glattem Rand, glänzender Oberfläche	pos	neg	Gramnegative gedrungene Stäbchen	/	98,2% *Pseudomonas luteola*	*Pseudomonas* spp.
30	Pasteurisierte Trinkmilch - abgelaufen	COS: ß-Hämolyse, vollständig; Brilliance Bacillus cereus: blau-grüne Kolonien	pos	pos	Grampositive Stäbchen; Endospore zentral	/	/	*Bacillus* spp.
31	Pasteurisierte Trinkmilch - abgelaufen	COS: ß-Hämolyse, vollständig; Brilliance Bacillus cereus: blau-grüne Kolonien	pos	pos	Grampositive Stäbchen; Endospore zentral	/	/	*Bacillus* spp.
35	Pasteurisierte Trinkmilch - Fehlcharge	VRBD: rosa-rote, runde, erhabene Kolonien; Brilliance E.coli: violette Kolonien	pos	neg	Gramnegative Stäbchen	99,5% *Escherichia coli*	/	*Escherichia coli*

4.1.2 Methodenvergleich

In einem ersten Versuch wurden die beimpften Proben in zeitlichen Abständen mittels Schnellmethoden und Referenzverfahren gemessen um eine Aussage über das Wachstum der Mikroorganismen und die Reaktion der einzelnen Methoden im zeitlichen Verlauf zu prüfen. Um die Schnellmethoden untereinander und mit dem Referenzverfahren vergleichen zu können, wurde mit einem fünffachen Parallelansatz gearbeitet, wobei ein deskriptiver, statistischer Vergleich möglich wird.

4.1.2.1 Versuch 1 – Methodenvergleich im zeitlichen Verlauf

Für diesen Versuch wurden vier verschieden Isolate verwendet: *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. und *E. coli*. In zwei Messreihen mit jeweils identen Ausgangsinokula wurden insgesamt 120 Proben in Doppelbestimmung analysiert. Die Proben wurden auf Gesamtkeimzahl mittels Koloniezählverfahren nach ISO in Koch'schem Plattenguss als Referenzverfahren, CellScan, BacT/ALERT sowie MicroFoss untersucht. Die Biolumineszenzmessung mit CellScan erfolgte wie alle anderen Methoden auch aus bei 7 °C gelagerten Proben.

Tabelle 5: Mittels Referenzverfahrens und CellScan erhaltene Ergebnisse der Messungen innerhalb 14-tägiger Probenlagerung bei 7 °C

Referenzverfahren	***nach 0 Stunden***	***nach 24 Stunden***	***nach 48 Stunden***	***nach 1 Woche***	***nach 2 Wochen***
***Staphylococcus* spp.**					
Konzentration A	18.800	20.480	23.500	54.560	100.000.000
Konzentration B	1.660	1.580	2.200	7.760	920.000
Konzentration C	220	170	290	1.440	62.000
***Bacillus* spp.**					
Konzentration A	300	310	710	1.560.000	100.000.000
Konzentration B	20	20	40	99.410	100.000.000
Konzentration C	<1	<1	<1	16.120	1.850.000
***Pseudomonas* spp.**					
Konzentration A	8.320	9.440	14.200	25.840	100.000.000
Konzentration B	1.110	1.050	1.310	6.240	740.000
Konzentration C	90	70	160	720	26.240
E. coli					
Konzentration A	16.000	17.360	19.560	21.760	100.000.000
Konzentration B	1.480	2.000	4.760	10.520	530.000
Konzentration C	210	150	520	920	21.120
CellScan	***nach 0 Stunden***	***nach 24 Stunden***	***nach 48 Stunden***	***nach 1 Woche***	***nach 2 Wochen***
***Staphylococcus* spp.**					
Konzentration A	109	92	86	113	6.234
Konzentration B	112	96	84	66	1.672
Konzentration C	116	98	86	69	560
***Bacillus* spp.**					
Konzentration A	221	113	100	9.219	10.840
Konzentration B	123	109	95	2.461	9.986
Konzentration C	124	114	86	190	10.834
***Pseudomonas* spp.**					
Konzentration A	658	102	86	75	392
Konzentration B	113	93	87	68	96
Konzentration C	124	112	83	69	50
E. coli					
Konzentration A	112	101	114	99	1.100
Konzentration B	101	84	94	74	431
Konzentration C	116	87	85	64	84

Zur Beurteilung der Verdorbenheit kann der Grenzwert von 10^5 KbE/mL herangezogen werden, da bei dieser Gesamtkeimzahl häufig bereits sensorische Veränderungen auftreten. Biolumineszenzmessungen mit CellScan von nicht inokulierter, steriler ESL-Milch ergaben bei frischen Proben im Mittel 100 RLU, 98 RLU nach 24 h bei 7 °C, nach 48 h 82 RLU, nach einer Woche 53 RLU und nach zwei Wochen Lagerung im Kühlraum 39 RLU (nicht dargestellt).

Wie aus Tabelle 5 ersichtlich, wurde bei Inokulation mit *Staphylococcus* spp. der Grenzwert von 10^5 KbE/mL nach zwei Wochen Lagerung bei 7 °C bei Konzentration A und B überschritten, nachdem die Gesamtkeimzahl über den Verlauf der Lagerung in allen drei Konzentrationen stetig anstieg. Auch die Biolumineszenzmessung zeigte nach zwei Wochen bei allen drei Konzentrationen erhöhte Werte, während sich nur bei Konzentration A nach einer Woche Lagerung ein leichter Anstieg im Vergleich zu den Blindwerten bemerkbar machte und bei Konzentration B und C auch nach einer Woche Lagerung noch kein merkbarer Unterschied zu nicht inokulierten Proben bestand.

Staphylococcus aureus wächst in einem Temperaturbereich von 7-48 °C [BAUMGART et al., 2004]. Staphylokokken sind grampositive Mikroorganismen und zusammen mit Mikrokokken die vorherrschende Keimflora in Rohmilch mit niedrigen Keimzahlen. Ein milchhygienisch wichtiger Vertreter innerhalb der Gattung ist *Staphylococcus aureus* als koagulasepositiver, enterotoxinbildender Erreger von Lebensmittelvergiftungen.

Bazillen kommen in rekontaminationsfrei abgefüllten pasteurisierten wie UHT-behandelten Milchprodukten als Verderbskeime vor. Fehlt eine aktive Begleitflora in der Milch, so setzten sie sich durch. Bedeutsam ist insbesondere die Fähigkeit des Bakteriums hitzeresistente Sporen zu bilden und die Bildung proteolytischer und lipolytischer Enzyme, welche zu Geschmacksfehlern führen. Innerhalb der Gruppe der Bazillen finden sich mesophile, thermophile wie psychrotrophe Vertreter [ZANGERL, 2007]. Die optimale Vermehrungstemperatur von *Bacillus cereus* liegt zwischen 30 und 40 °C [BAUMGART et al., 2004].

Bei mit *Bacillus* spp. inokulierten Milchproben der niedrigsten Konzentration konnte im Koloniezählverfahren erst nach einer Woche Lagerung bei 7 °C ein Wachstum festgestellt werden. Mit CellScan wurde nach einer Woche bei allen drei Konzentrationen eine Erhöhung der Keimzahl festgestellt, wobei Konzentration A und B im Vergleich zu den vorigen Messungen deutlich angestiegen sind. Nach zwei Wochen wurden Gesamtkeimzahlen, sowie RLU-Werte ermittelt, die auf Verderbnis der Milch schließen lassen und weit über jenen Werten, der mit den übrigen Spezies

inokulierten Milchproben lagen. Die ausgesprochen niedrigen Werte bis 48 h nach Inokulation sowie der starke Anstieg der Keimzahlen nach einer Woche Lagerung lassen darauf schließen, dass es zu einer Sporulation bis dahin vegetativ vorliegender Keime kam.

Pseudomonaden sind bedeutsame Rekontaminationskeime und gelten daher als Indikatorkeime für Hygienemängel im Bereich des Verarbeitungsprozesses. Sie sind gramnegative, psychrotrophe Stäbchen und vermögen durch Bildung von Proteasen und Lipasen, welche auch hitzestabil sein können, Eiweiß und Fett zu zersetzen [RIEMELT, 2003]. Die mit *Pseudomonas* spp. in den beiden höchsten Inokula beimpften Milchproben überschritten nach vorherigem stetigen Ansteigen der Keimzahlen, nach zwei Wochen den festgelegten Grenzwert von 10^5 KbE/mL. Mit CellScan konnte nur in der höchsten Konzentration und erst nach zwei Wochen Lagerung ein deutlicher Anstieg der mikrobiellen Belastung detektiert werden. Der erhaltene RLU-Wert von 658 für Konzentration A ohne vorangehende Lagerung kann als möglicher Ausreißer interpretiert werden.

E. coli ist ein gramnegatives, stäbchenförmiges Bakterium innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae*. *E. coli* wird aufgrund der Fähigkeit, Gas aus Laktose zu bilden, zu den coliformen Keimen gezählt. Das Temperaturoptimum des Keimes liegt bei 37 °C, das Minimum bei 3-10 °C [ZANGERL, 2007]. Als Markerorganismus lässt die Anwesenheit von *E. coli* in Lebensmitteln auf mangelnde Hygiene schließen und weist auf eine eventuelle Anwesenheit anderer pathogener Keime, wie z. B. Salmonellen hin.
Bei Inokulation mit einer Ausgangskeimzahl von 16.000 KbE/mL und 1.480 KbE/mL wurden nach kontinuierlichem Anstieg über die Dauer der Kühllagerung 10^5 KbE/mL nach zwei Wochen überschritten. Die Messung mittels CellScan ergab nach zwei Wochen Lagerung bei Konzentration A einen deutlichen erhöhten Wert und sprunghaften Anstieg im Vergleich zur Woche davor und einen erhöhten Wert bei Konzentration B. Die übrigen Messungen ohne Lagerung, nach 24 h, 48 h und einer Woche Lagerung zeigten keine wesentlichen Abweichungen zu den ermittelten Blindwerten.

Tabelle 6: Mittels BacT/ALERT und MicroFoss erhaltene Ergebnisse der Messungen innerhalb 14-tägiger Probenlagerung bei 7 °C

BacT/ALERT	***nach 24 Stunden***	***nach 1 Woche***	***nach 2 Wochen***
***Staphylococcus* spp.**			
Konzentration A	11,52	9,60	7,44
Konzentration B	13,44	10,80	8,88
Konzentration C	15,12	12,48	10,08
***Bacillus* spp.**			
Konzentration A	8,88	4,32	4,32
Konzentration B	10,80	5,04	4,80
Konzentration C	12,48	6,72	4,08
***Pseudomonas* spp.**			
Konzentration A	18,96	16,08	12,00
Konzentration B	22,80	18,72	15,12
Konzentration C	25,68	21,84	17,76
E. coli			
Konzentration A	8,64	7,92	6,24
Konzentration B	10,08	8,64	7,44
Konzentration C	11,52	10,08	9,36
MicroFoss	***nach 24 Stunden***	***nach 1 Woche***	***nach 2 Wochen***
***Staphylococcus* spp.**			
Konzentration A	8,20	6,70	4,40
Konzentration B	9,60	8,40	5,40
Konzentration C	11,40	8,90	6,50
***Bacillus* spp.**			
Konzentration A	8,20	2,30	2,30
Konzentration B	9,60	3,00	2,30
Konzentration C	11,40	4,00	2,40
***Pseudomonas* spp.**			
Konzentration A	neg.	neg.	neg.
Konzentration B	neg.	neg.	neg.
Konzentration C	neg.	neg.	neg.
E. coli			
Konzentration A	5,50	5,60	3,80
Konzentration B	6,50	6,10	4,90
Konzentration C	7,40	7,40	5,90

Wie in Tabelle 6 dargestellt konnten mit BacT/ALERT alle Mikroorganismen nachgewiesen werden.

Die Detektionszeiten variierten von 4,08 h für *Bacillus* spp. in der niedrigsten Konzentration nach zwei Wochen Lagerung bis 25,68 h für *Pseudomonas* spp. in Konzentration C nach 24 h bei 7 °C. Auch mit dieser Methode wird die Eigenschaft von *Bacillus* zur Sporulation deutlich: Ein Vergleich der Detektionszeiten nach 24 h mit

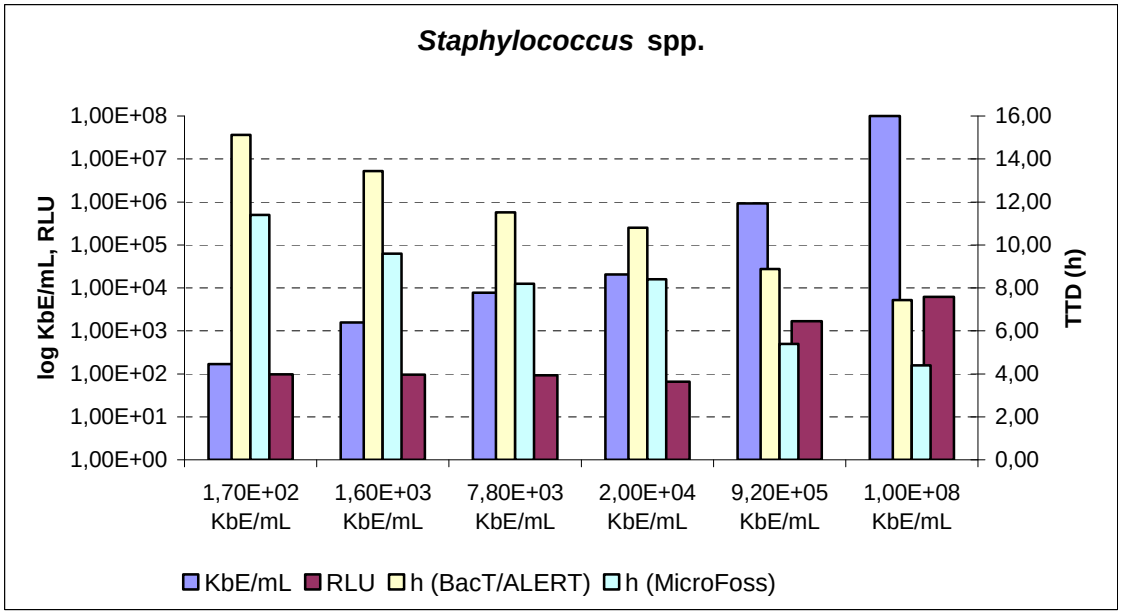
jenen von *E. coli*, zeigt sehr ähnliche Ergebnisse. Bei Betrachtung der Detektionszeiten nach einer sowie nach zwei Wochen Lagerung, liegen die Werte von *Bacillus* spp. in einem deutlich niedrigeren Bereich als bei *E. coli*.

Pseudomonas spp. fermentieren keine Glucose und konnten daher mit MicroFoss unter Verwendung des Gesamtkeimzahl-Nährmediums, welches Glucose als Kohlenstoffquelle enthält nicht nachgewiesen werden.
MicroFoss lieferte Detektionszeiten von 2,30 h für *Bacillus* spp. in der höchsten Konzententration nach zwei Wochen Lagerung bei 7 °C, bis 11,40 h für *Staphylococcus* spp., sowie *Bacillus* spp. in der niedrigsten Konzentration nach 24-stündiger Kühllagerung. Auch an den mit MicroFoss erhaltenen Werten wird die Natur des Sporenbildners *Bacillus* im Vergleich zu den anderen eingesetzten Spezies deutlich (vgl. Tabelle 6).
Beispiele für im Rahmen dieses Versuchs erhaltenen Wachstumskurven mittels BacT/ALERT und MicroFoss finden sich im Anhang.

Um die mit den eingesetzten Methoden erhaltenen, in den Tabellen 4 und 5 aufgelisteten Ergebnisse besser gegenüberstellen zu können folgt hier eine Darstellung nach den verwendeten Inokulaten *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. und *E. coli*.

Abbildung 21 zeigt die mit Koloniezählverfahren und den eingesetzten Schnellmethoden erhaltenen Ergebnisse der Messungen bei Milch, die mit *Staphylococcus* spp. künstlich kontaminiert wurde. Bei einer Keimzahl von etwa 10^2 KbE/mL wurden zeitgleich Messwerte von 100 RLU, etwa 15 h Detektionszeit mit BacT/ALERT sowie etwa 11 h Detektionszeit mit MicroFoss, erhalten. Nach fortschreitender Lagerungsdauer lässt sich ein Anstieg der Gesamtkeimzahl erkennen und in Analogie ein Absinken der Detektionszeiten bei BacT/ALERT und MicroFoss. RLU-Werte blieben dagegen bis zu einer Keimzahl von 10^6 KbE/mL unverändert und steigen erst dann an. Ein kontinuierliches Ansteigen der KbE/mL im Laufe der Lagerzeit um jeweils ca. eine $\log_{10}$-Einheit führte zu einer entsprechend verkürzten Detektionszeit bei BacT/ALERT und MicroFoss, wobei ein Ergebnis mit MicroFoss durchschnittlich drei Stunden schneller erhalten wurde als mit BacT/ALERT.

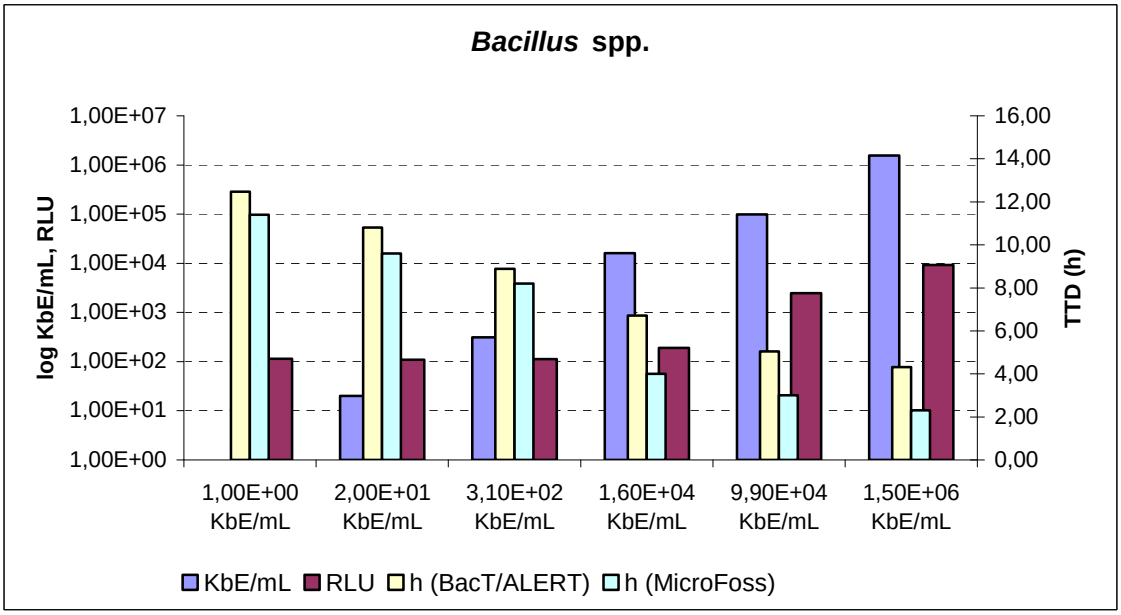
Abbildung 21: Ergebnisse des Monitorings von mit *Staphylococcus* spp. inokulierten Milchproben über einen Zeitraum von zwei Wochen



Bei einer Gesamtkeimzahl von 10^8 KbE/mL wurde ein RLU-Wert von etwa 8.000 erreicht, sowie Detektionszeiten von 7,5 h und 4 h für BacT/ALERT respektive MicroFoss.

Die erhaltenen Werte der mit *Bacillus* spp. gespikten Milchproben sind in Abbildung 22 dargestellt. Ein ähnlicher Verlauf wie bei *Staphylococcus* spp. zeigt sich auch hier: Während die Gesamtkeimzahl und die RLU-Werte im Laufe der Lagerzeit anstiegen, wurden die Detektionszeiten der BacT/ALERT und MicroFoss Messungen entsprechend kürzer. Bei einem anfänglichen RLU-Wert von 100 sowie Detektionszeiten von etwa 12 h und 11 h mit BacT/ALERT bzw. MicroFoss, war im Koloniezählverfahren kein Wachstum erkennbar. Ein deutlicher Anstieg der RLU-Werte war in diesem Fall erst ab einer Keimzahl von 10^5 zu verzeichnen.

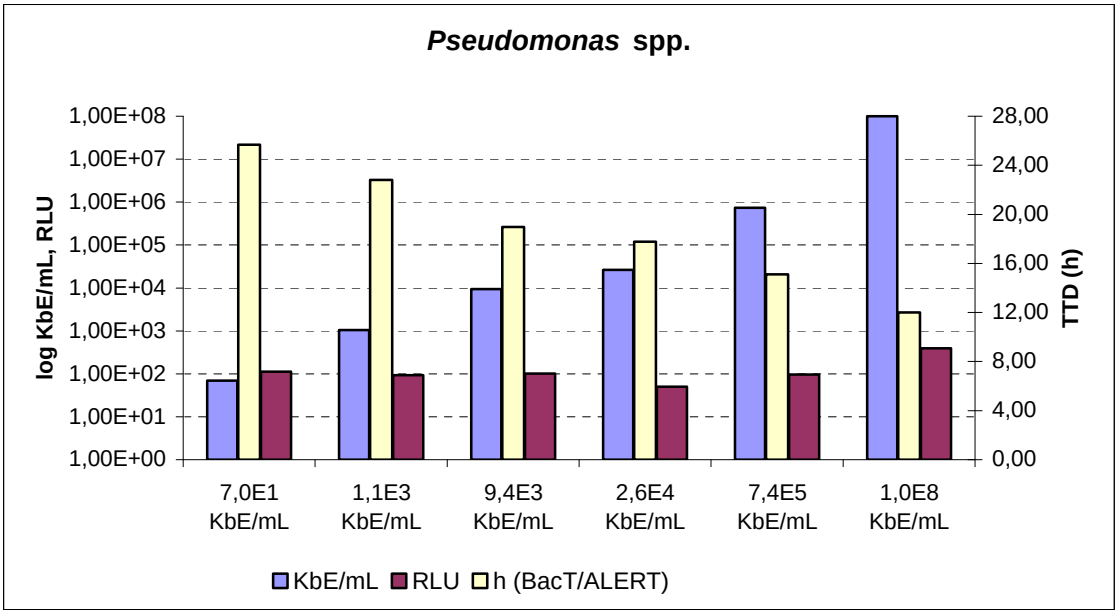
Abbildung 22: Ergebnisse des Monitorings von mit *Bacillus* spp. inokulierten Milchproben über einen Zeitraum von zwei Wochen



Bei einer Keimzahl von 10^6 KbE/mL ergab die Messung mit CellScan einen Wert von 10.000 RLU; mit BacT/ALERT war die Probe nach etwa 4 h positiv und mit MicroFoss betrug die Detektionszeit knapp über zwei Stunden. Im Falle der Inokulation mit *Bacillus* spp. betrug die TTD bei MicroFoss etwa ein bis zwei Stunden weniger als bei BacT/ALERT.

Wie bereits erwähnt, konnten mit dem bei MicroFoss üblichen Gesamtkeimzahlmedium die mit *Pseudomonas* spp. beimpften Milchproben nicht detektiert werden, weshalb in Abbildung 23 MicroFoss nicht aufscheint.

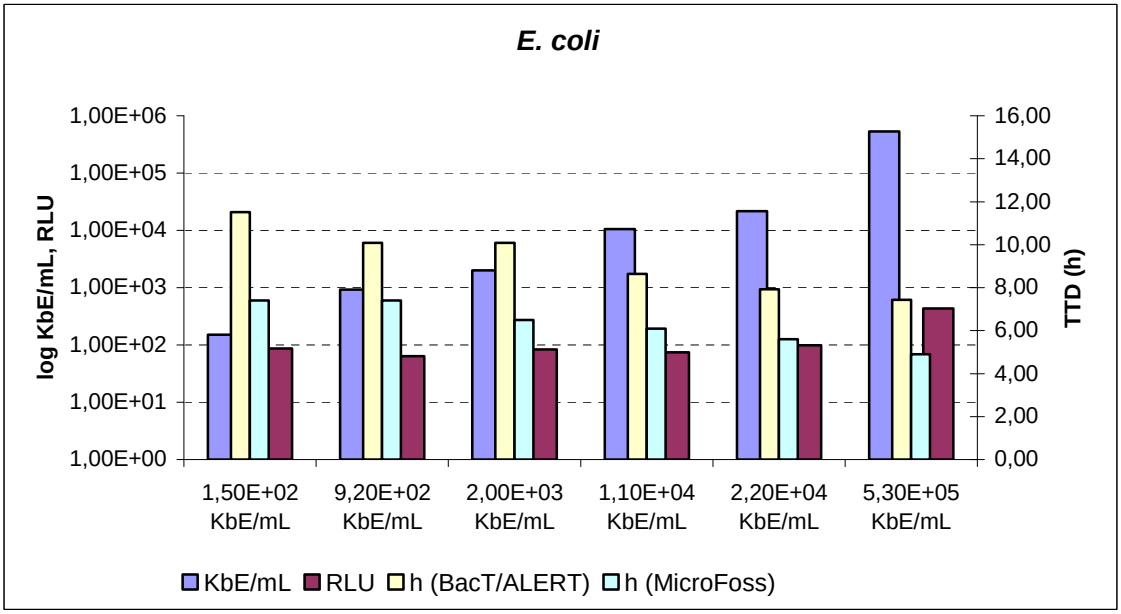
Abbildung 23: Ergebnisse des Monitorings von mit *Pseudomonas* spp. inokulierten Milchproben über einen Zeitraum von zwei Wochen



Bei einer Ausgangskeimzahl von knappen 10^2 KbE/mL, wurde gleichzeitig ein RLU-Wert von etwa 100 und mit BacT/ALERT eine Detektionszeit von etwa 26 h gemessen. Die ermittelten Keimzahlen stiegen kontinuierlich bis auf 10^8 KbE/mL an. Zum selben Zeitpunkt lag, nach stetigem Sinken, eine mit BacT/ALERT detektierte TTD von 12 h vor, während mit CellScan erst zu diesem Zeitpunkt ein leicht erhöhter Wert gemessen werden konnte.

Die in Abbildung 24 dargestellten Ergebnisse der mit *E. coli* gespikten Milchproben zeigen eine sich kontinuierlich verkürzende Detektionszeit mit BacT/ALERT und MicroFoss, eine analogen Anstieg der KbE/mL, sowie eine Erhöhung der mit CellScan erhaltenen RLU-Werte bei einer Gesamtkeimzahl von etwa $5x10^5$ KbE/mL auf 500 RLU. Bei einer Gesamtkeimzahl von knapp über 10^2 KbE/mL wurde ein RLU-Wert von knapp unter 100 RLU und Detektionszeiten von 12 h mit BacT/ALERT und 7 h mit MicroFoss verzeichnet.

Abbildung 24: Ergebnisse des Monitorings von mit *E. coli* inokulierten Milchproben über einen Zeitraum von zwei Wochen



4.1.2.2 Versuch 2 – Methodenvergleich im fünffachen Prallelansatz

In diesem Versuch wurde mit Isolaten von *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp, *E. coli* und einer Mischflora bestehend aus *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. und *E. coli* in drei unterschiedlichen Konzentrationen gearbeitet. Die Messungen erfolgten im fünffachen Parallelansatz nach 24 h Lagerung der inokulierten Milchproben bei 7 °C mit jenen Methoden des Versuch 1, wobei diesmal auch die *Enterobacteriaceae*-Keimzahl durch Plattengussverfahren mit VRBD-Agar und MicroFoss *Enterobacteriaceae*-Medium ermittelt wurden. Messungen mit CellScan wurden für diesen Versuch gemäß der Herstellerempfehlung nach einer 48-stündigen Vorbebrütung bei Raumtemperatur (22

°C) durchgeführt. Die detaillierten Messergebnisse dieses Versuchs finden sich im Anhang (siehe Seite 117ff).

4.1.2.2.1 Gesamtkeimzahlbestimmung

Wie in Abbildung 25 dargestellt, zeigten die mit *Staphylococcus* spp. beimpften Milchproben nach 24-stündiger Lagerung bei 7 °C eine mittlere Gesamtkeimzahl von 876 KbE/mL in der höchsten Impfkonzentration, wobei der niedrigste Wert 820 KbE/mL betrug und der höchste 930 KbE/mL. Bei Konzentration B betrug der Mittelwert 87 KbE/mL mit 77 KbE/mL als Minimum und 97 KbE/mL als Maximum. Die mit dem niedrigsten Inokulationsvolumen beimpften Milchproben enthielten durchschnittlich 11 KbE/mL. Die Standardabweichungen – dargestellt in Tabelle 7 – in absteigender Konzentrationsreihenfolge betrugen 43,93; 8,08 sowie 2,77.

Abbildung 25: Mittelwerte der mit *Staphylococcus* spp. inokulierten Milchproben in drei Konzentrationen nach 24- bzw. 48-stündiger Lagerung bei 7- bzw. 22 °C

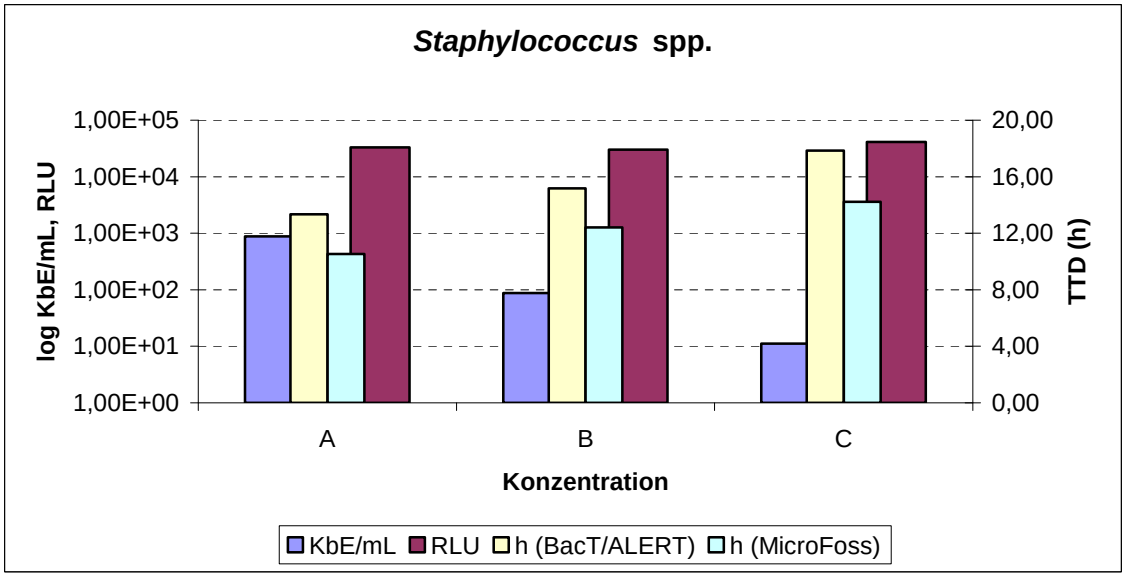


Tabelle 7: Standardabweichungen – Ergänzung zu Abbildung 25

***Staphylococcus* spp.**	***Konzentration A***	***Konzentration B***	***Konzentration C***
KbE/mL	43,93	8,08	2,77
RLU	6.100	6.323	11.849
h (BacT/ALERT)	0,21	0,26	0,27
h (MicroFoss)	0,22	0,26	0,13

Die Proben wurden mit CellScan nach 48-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur gemessen. Dabei lag der mittlere RLU-Wert der Messungen bei 32.866 für die höchste Konzentration, 30.223 für Konzentration B und 41.411. Die Standardabweichungen betrugen 6100 RLU, 6.323 RLU und 11.849 RLU für Konzentrationen A, B und C. Im Gegensatz zu den mittels Referenzverfahren erhaltenen Werten, welche eine deutliche Abstufung nach Gesamtkeimzahl entsprechend der Konzentrationen A, B und C zeigen, lässt sich von den mit CellScan ermittelten RLU-Werten der jeweiligen Konzentration nicht auf das ursprüngliche Inokulationsvolumen schließen.

Mit BacT/ALERT wurde nach 24-stündiger Lagerung der Proben bei 7 °C gemessen. Dabei lagen die Detektionszeiten für Proben der Konzentration A zwischen 12,96 h und 13,44 h mit einer Standardabweichung von 0,21. Mit *Staphylococcus* spp. in Konzentration B beimpfte Proben ergaben Detektionszeiten von 14,88 h bis 15,36 h, wobei die Standardabweichung bei 0,26 lag. Bei der niedrigsten Konzentration zeigten sich Messwerte von 17,52 h bis 18,24 h und eine Standardabweichung von 0,27.

Die Probenhandhabung vor der Messung mit MicroFoss erfolgte analog jener für BacT/ALERT. Ergebnisse lagen um etwa zwei Stunden früher vor als bei einer Messung mit BacT/ALERT und es wurden ähnliche Standardabweichungen ermittelt. Bei der niedrigsten Konzentration lagen die Detektionszeiten zwischen 14,10 h und 14,40 h. Die Standardabweichung betrug in diesem Fall 0,13.

Die Ergebnisse der mit *Micrococcus* spp. inokulierten Milchproben sind in Abbildung 26 und Tabelle 8 dargestellt. Im Koloniezählverfahren wurde für Konzentration A ein Mittelwert von 969 KbE/mL ermittelt, für Konzentration B 94 KbE/mL und für Konzentration C hingegen 8 KbE/mL. Die Standardabweichungen lagen bei 97,45; 15,37 und 2,70 (siehe Tabelle 8).

Abbildung 26: Mittelwerte der mit *Micrococcus* spp. inokulierten Milchproben in drei Konzentrationen nach 24- bzw. 48-stündiger Lagerung bei 7- bzw. 22 °C

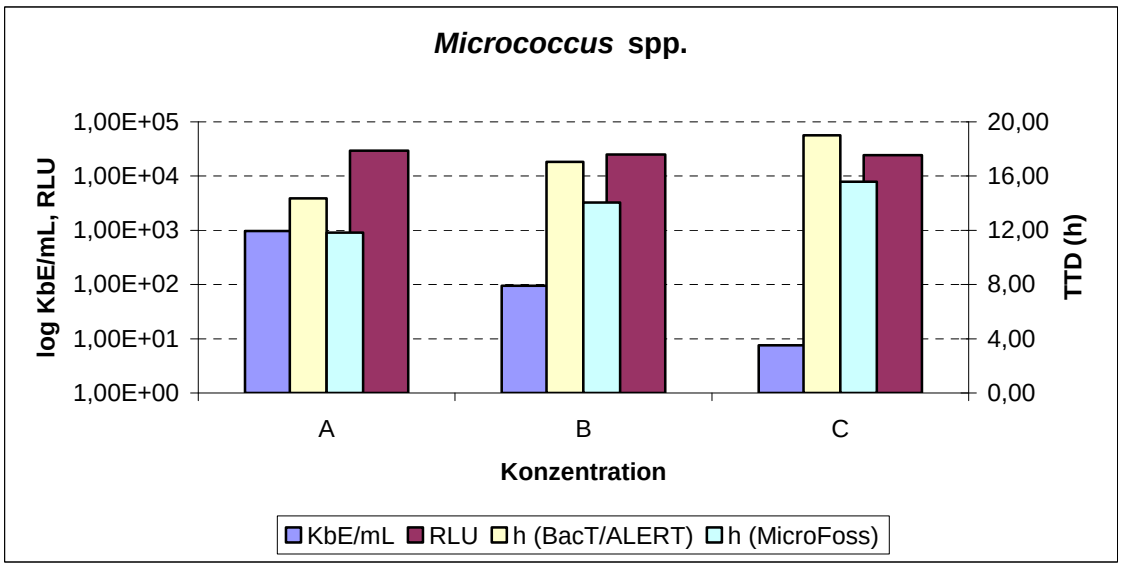


Tabelle 8: Standardabweichungen – Ergänzung zu Abbildung 26

***Micrococcus* spp.**	***Konzentration A***	***Konzentration B***	***Konzentration C***
KbE/mL	97,45	15,37	2,70
RLU	1.546	913	2.034
h (BacT/ALERT)	0,31	0,00	0,26
h (MicroFoss)	0,21	0,53	0,61

Die Biolumineszenzmessung ergab im Vergleich zu den mit *Staphylococcus* spp. inokulierten Proben im Mittel in allen Konzentrationen etwas niedrigere RLU-Werte und auch eine jeweils geringere Standardabweichung.

Bei der Messung mit BacT/ALERT für die Konzentrationen in abnehmender Inokulationsdichte wurden Mittelwerte der Detektionszeiten von 14,35 h, 17,04 h und 19,01 h mit den dazugehörigen Standardabweichungen von 0,31; 0,00 und 0,26 detektiert.

Mit MicroFoss wurden Ergebnisse zwei bis drei Stunden schneller als mit BacT/ALERT erzielt, wobei die Detektionszeit für die Konzentration A bei 11,84 h, bei Konzentration B bei 14,06 h und bei Konzentration C bei 15,58 h lag. Die Standardabweichungen von Konzentration A betrug 0,21. Mit 0,53 für Konzentration B und 0,61 für Konzentration C waren die Standardabweichungen etwas höher als jene mit BacT/ALERT für das entsprechende Konzentrationsniveau ermittelten.

Die Ergebnisse des Gesamtkeimzahlmonitorings der mit *Enterobacter* spp. gespikten Proben sind in Abbildung 27 sowie Tabelle 9 dargestellt.

Abbildung 27: Mittelwerte der mit *Enterobacter* spp. inokulierten Milchproben in drei Konzentrationen nach 24- bzw. 48-stündiger Lagerung bei 7- bzw. 22 °C

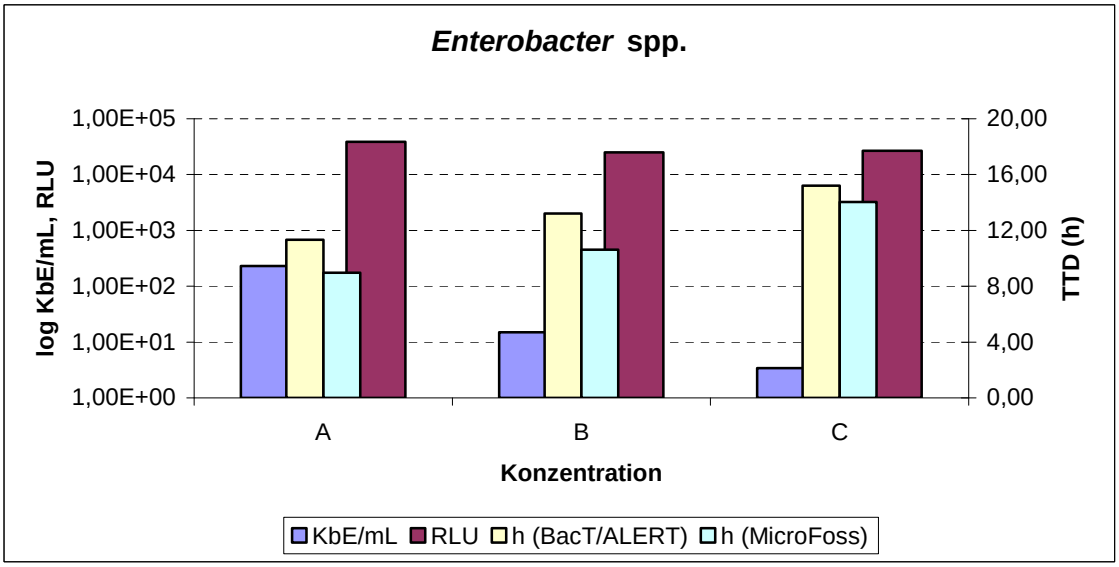


Tabelle 9: Standardabweichungen – Ergänzung zu Abbildung 27

***Enterobacter* spp.**	***Konzentration A***	***Konzentration B***	***Konzentration C***
KbE/mL	52,20	3,16	4,39
RLU	2.208	897	1.263
h (BacT/ALERT)	0,20	0,17	0,27
h (MicroFoss)	0,13	0,13	1,20

Mit dem Referenzverfahren wurden für die höchste Konzentration Gesamtkeimzahlwerte von 173 KbE/mL bis 300 KbE/mL und mit Konzentration B Werte zwischen 11 KbE/mL und 19 KbE/mL erhoben.

Die mittels Koloniezählverfahrens erhaltenen Ergebnisse der Konzentration C sind nur der Vollständigkeit halber angegeben. Da sich die erhaltenen Keimzahlen großteils in einem Bereich von < 1 bis 11 KbE/mL bewegen, ist die Aussagequalität deskriptiver Statistik hier nicht mehr gewährleistet. (Vgl. dazu FIL-IDF Standard 100B:1991: „Retain dishes containing more than 10 and fewer than 300 colonies.").
CellScan lieferte Mittelwerte von 38.709 RLU für Konzentration A, 25.115 RLU für Konzentration B und 26.616 RLU für Konzentration C, die Standardabweichungen, wie in Tabelle 9 ersichtlich, betrugen, 2.208; 879 sowie 1263.

Die durch Fünffachbestimmung mit BacT/ALERT ermittelten Detektionszeiten ergaben Mittelwerte von 11,33 h, 13,20 h und 15,22 h. Die dazugehörigen Standard-abweichungen betrugen 0,20; 0,17 und 0,27.

Die mit MicroFoss durchgeführten Messungen der mit *Enterobacter* spp. inokulierten Proben ergaben für die Konzentration A einen Mittelwert der Detektionszeit von 8,96 h und eine Standardabweichung von 0,13. Für Konzentration B betrug der Mittelwert 10,62 h und die Standardabweichung 0,53. Bei der niedrigsten Konzentration C war der Mittelwert der TTD 14,04 h und die Standardabweichung im Vergleich mit zu jener der Konzentrationen A und B relativ hoch.

Wie in Abbildung 28 gezeigt, wurden bei der Gesamtkeimzahlbestimmung der mit *E. coli* inokulierten Proben für die Konzentrationen A, B und C die Mittelwerte von 6412 KbE/mL, 470 KbE/mL und 72 KbE/mL ermittelt. Die Standardabweichungen dazu betrugen 378,84; 32,75 und 4,09 (siehe Tabelle 10).

Abbildung 28: Mittelwert der mit *E. coli* inokulierten Milchproben in drei Konzentrationen nach 24- bzw. 48-stündiger Lagerung bei 7- bzw. 22 °C

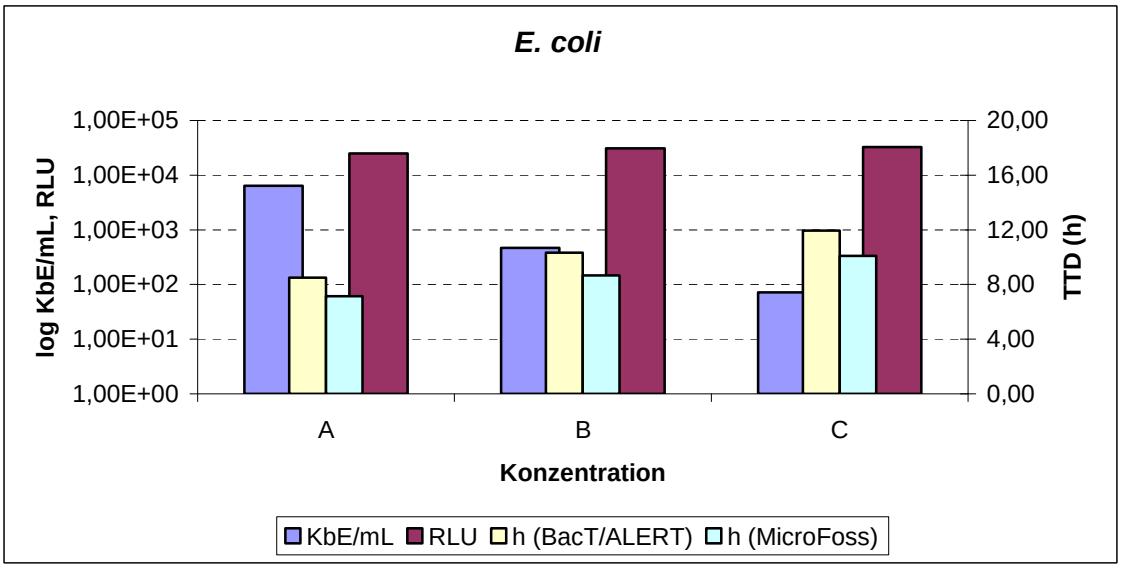


Tabelle 10: Standardabweichungen – Ergänzung zu Abbildung 28

E. coli	*Konzentration A*	*Konzentration B*	*Konzentration C*
KbE/mL	378,84	32,75	4,09
RLU	2.853	2.786	3.667
h (BacT/ALERT)	0,13	0,17	0,11
h (MicroFoss)	0,30	0,13	0,16

Die Messung mit CellScan ergab für die Konzentration A einen Mittelwert von 25.049 RLU und eine Standardabweichung von 2.853. Der Mittelwert der Proben mit der Konzentration B lag über dem der höchsten Konzentration. Die Standardabweichung betrug 2.786. Das Mittel der Messungen der Konzentration C ist höher als jenes der beiden höheren Konzentrationen. Für Konzentration C beträgt die Standardabweichung 3.667.

Die Messung mit BacT/ALERT brachte Mittelwerte von 8,50 h, 10,32 h und 11,95 h mit dazugehörigen Standardabweichungen von 0,13; 0,17 und 0,11. Die mit MicroFoss

erhaltenen Ergebnisse ähneln jenen von BacT/ALERT; die Mittelwerte der Konzentration A und C mit 7,14 h und 10,10 h sind allerdings niedriger. Für Konzentration A war die Standardabweichung mit 0,30 im Vergleich leicht höher.

Neben einzelnen Gattungen von Mikroorganismen wurde auch eine Mischflora, welche aus *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *E. coli* bestand mit der Referenzmethode und den Schnellmethoden erfasst. Die Ergebnisse dazu sind in Abbildung 29 und Tabelle 11 dargestellt.

Abbildung 29: Mittelwerte der mit einer Mischflora inokulierten Milchproben in drei Konzentrationen nach 24- bzw. 48-stündiger Lagerung bei 7- bzw. 22 °C

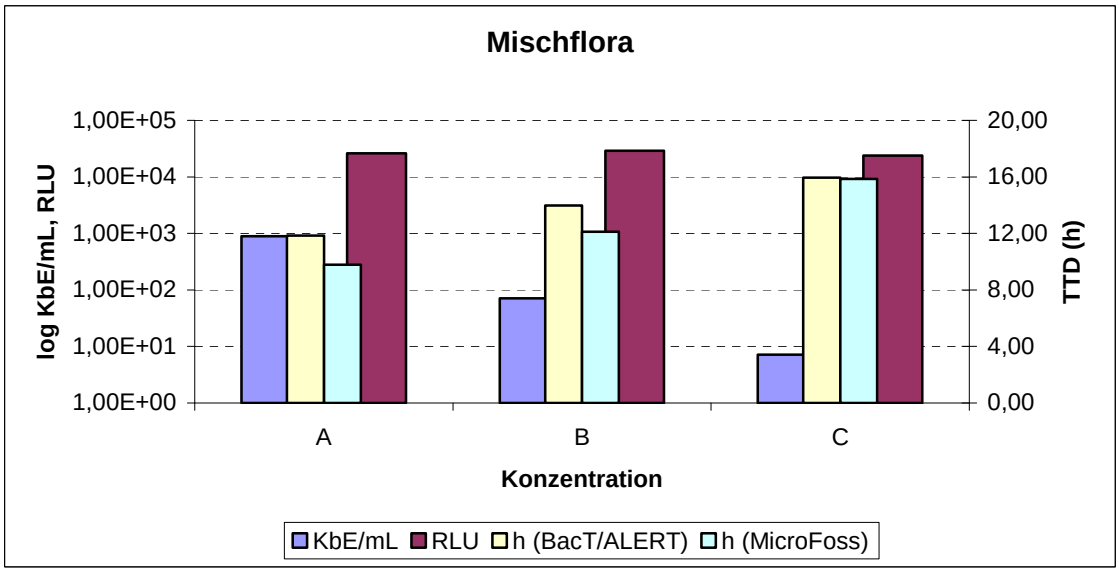


Tabelle 11: Standardabweichung – Ergänzung zu Abbildung 29

Mischflora	***Konzentration A***	***Konzentration B***	***Konzentration C***
KbE/mL	220,34	26,87	0,84
RLU	2.693	1.901	4.015
h (BacT/ALERT)	0,13	0,26	0,98
h (MicroFoss)	0,28	0,66	2,77

Für die im Koloniezählverfahren ermittelten KbE/mL der Konzentration C gilt die für *Enterobacter* spp. gemachte Beobachtung. Der Mittelwert der Proben mit Konzentration A betrug 890 KbE/mL, die Standardabweichung 220,34. Für Konzentration C lagen diese Werte bei 71 KbE/mL und 26,87.

Die Messungen mit CellScan ergaben Mittelwerte von 25.979 RLU, 29.108 RLU und 23.961 RLU und dazugehörende Standardabweichungen von 2.693; 1.901 und 4.015.

Mit BacT/ALERT ließen sich Mittelwerte von 11,86 h, 13,97 h und 15,94 h ermitteln. Die Standardabweichungen der Konzentrationen A und B mit 0,13 und 0,26 sind mit den Ergebnissen der isoliert beprobten Spezies vergleichbar, einzig Konzentration C ergab eine Standardabweichung von 0,98. Ein ähnliches Bild ergibt sich auch aus den Messungen mit MicroFoss. Auch hier ist die für Konzentration C erhaltene Standardabweichung mit 2,77 im Vergleich zu den sonstigen erhaltenen Ergebnissen die höchste.

4.1.2.2.2 Die *Enterobacteriaceae*-Keimzahl

Analog zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl wurde in einem weiteren Experiment die *Enterobacteriaceae*-Keimzahl ermittelt. Statt PCM-Agar wurde VRBD-Agar, statt MicroFoss Gesamtkeimzahl Medium kam ein *Enterobacteriaceae*-Medium zum Einsatz. Als Inokula dienten *E. coli, Enterobacter* und eine Mischflora bestehend aus *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. und *E. coli.*

Abbildung 30 zeigt die bei der Inokulation der Proben mit *E. coli* erhaltenen Ergebnisse der *Enterobactericeae*-Keimzahlbestimmung mit VRBD-Agar. Die Mittelwerte für die Proben der Konzentrationen A, B und C betrugen 1.966 KbE/mL, 106 KbE/mL und 4 KbE/mL. Die Standardabweichungen - ersichtlich in Tabelle 12 - dazu betrugen 194,35; 28,24 und 1,22.

Die Messung mit CellScan ergab für die Konzentration A einen Mittelwert von 14.917 RLU und eine Standardabweichung von 1.906. Der Mittelwert der Proben mit der Konzentration B lag über dem der höchsten Konzentration. Die Standardabweichung betrug 1.528. Der Durchschnitt aller Messungen der Konzentration C war höher als jener der beiden höheren Konzentrationen. Für Konzentration C betrug die Standardabweichung 1.677.

Die Messung mit BacT/ALERT brachte Mittelwerte von 9,31 h, 10,80 h und 12,38 h mit dazugehörigen Standardabweichungen von 0,11; 0,29 und 0,50.

Mit MicroFoss betrug die Detektionzeit nur wenig mehr als halb so lange wie mit BacT/ALERT. Die erhaltenen Mittelwerte von Konzentration A bis C waren 5,54 h, 6,74 h und 7,68 h. Die Standardabweichungen dazu betrugen 0,19; 0,23 und 0,08.

Abbildung 30: Mittelwerte der *E. coli* inokulierten Milchproben in drei Konzentrationen nach 24- bzw. 48-stündiger Lagerung bei 7- bzw. 22 °C

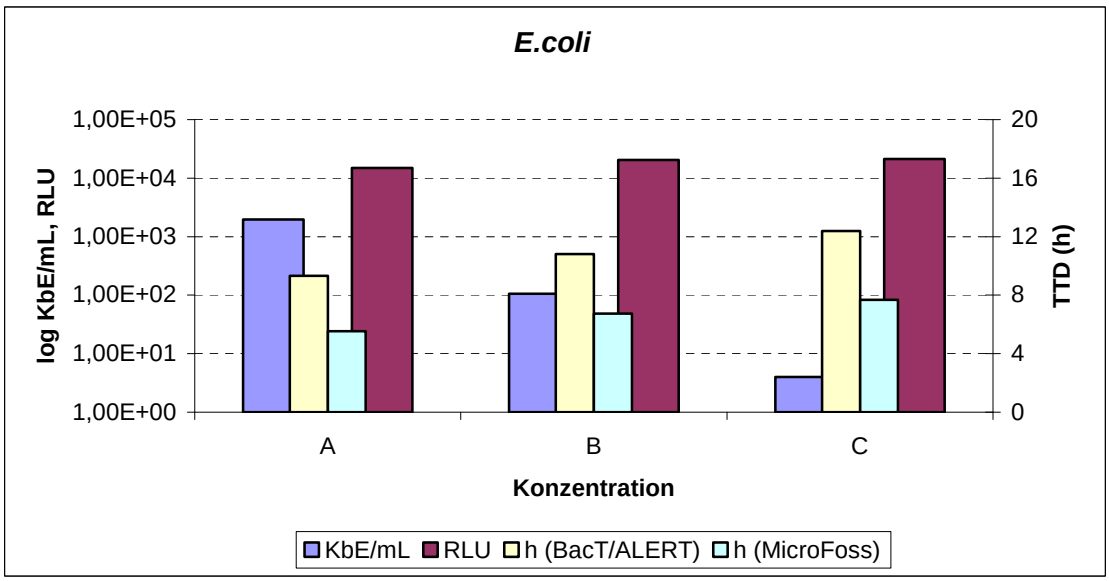


Tabelle 12: Standardabweichungen – Ergänzung zu Abbildung 30

E. coli	***Konzentration A***	***Konzentration B***	***Konzentration C***
KbE/mL	194,35	28,24	1,22
RLU	1.906	1.528	1.677
h (BacT/ALERT)	0,11	0,29	0,50
h (MicroFoss)	0,19	0,23	0,08

Die Ergebnisse der mit *Enterobacter* spp. inokulierten Milchproben sind in Abbildung 31 und der zugehörigen Tabelle 13 dargestellt. Im Plattengussverfahren mit VRBD-Agar wurde für Konzentration A ein Mittelwert von 768 KbE/mL ermittelt, für Konzentration B 43 KbE/mL und für Konzentration C 7 KbE/mL. Die Standardabweichungen lagen bei 202,04; 49,48 und 1,52.

Abbildung 31: Mittelwerte der mit *Enterobacter* spp. inokulierten Milchproben in drei Konzentrationen nach 24- bzw. 48-stündiger Lagerung bei 7- bzw. 22 °C

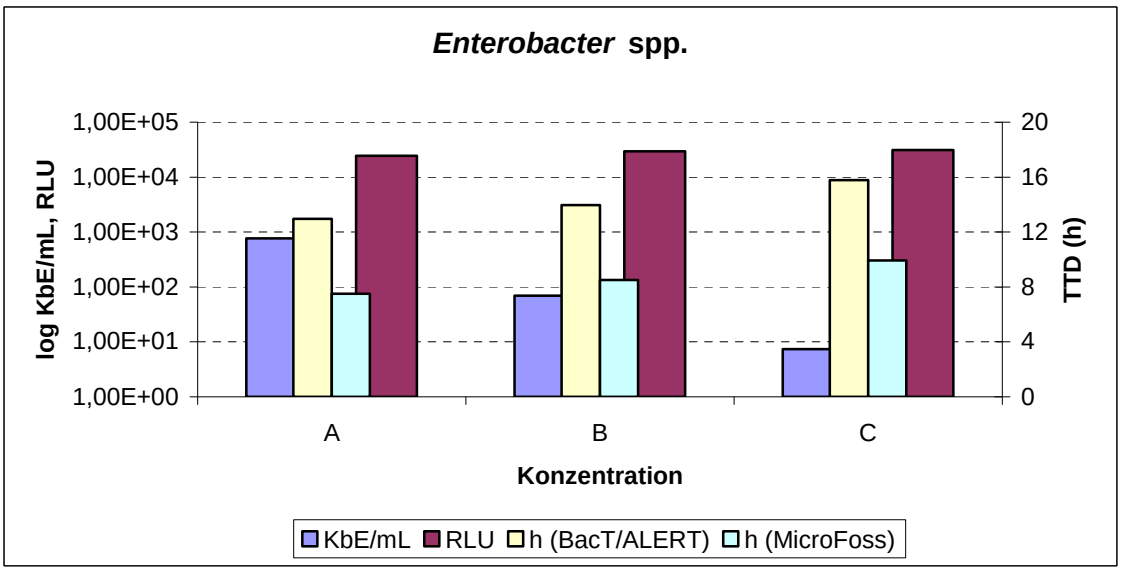


Tabelle 13: Standardabweichungen – Ergänzung zu Abbildung 31

***Enterobacter* spp.**	***Konzentration A***	***Konzentration B***	***Konzentration C***
KbE/mL	202,04	49,48	1,52
RLU	4.347	2.921	3.981
h (BacT/ALERT)	0,17	0,84	0,36
h (MicroFoss)	0,36	0,57	0,49

Die Biolumineszenzmessung ergab im Vergleich zu den mit *E. coli* inokulierten Proben im Mittel in allen Konzentrationen höhere RLU-Werte und auch eine jeweils höhere Standardabweichung.

Bei der Messung mit BacT/ALERT für die Konzentrationen in abnehmender Inokulationsdichte wurden Mittelwerte der Detektionszeiten von 12,96 h, 13,97 h und 15,79 h mit den dazugehörigen Standardabweichungen von 0,17; 0,84 und 0,36 detektiert.

Mit MicroFoss wurden Ergebnisse um rund fünf Stunden schneller erzielt als mit BacT/ALERT, wobei die Detektionszeit für Konzentration A bei 7,50 h, bei Konzentration B bei 8,50 h und bei Konzentration C bei 9,92 h lag. Die Standardabweichungen betrugen 0,36; 0,57 und 0,49.

Die Ergebnisse der Messungen von künstlich inokulierter Milch mit einer Mischflora, bestehend aus *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *E. coli* sind in Abbildung 32 sowie Tabelle 14 dargestellt.

Abbildung 32: Mittelwerte der mit einer Mischflora inokulierten Milchproben in drei Konzentrationen nach 24- bzw. 48-stündiger Lagerung bei 7- bzw. 22 °C

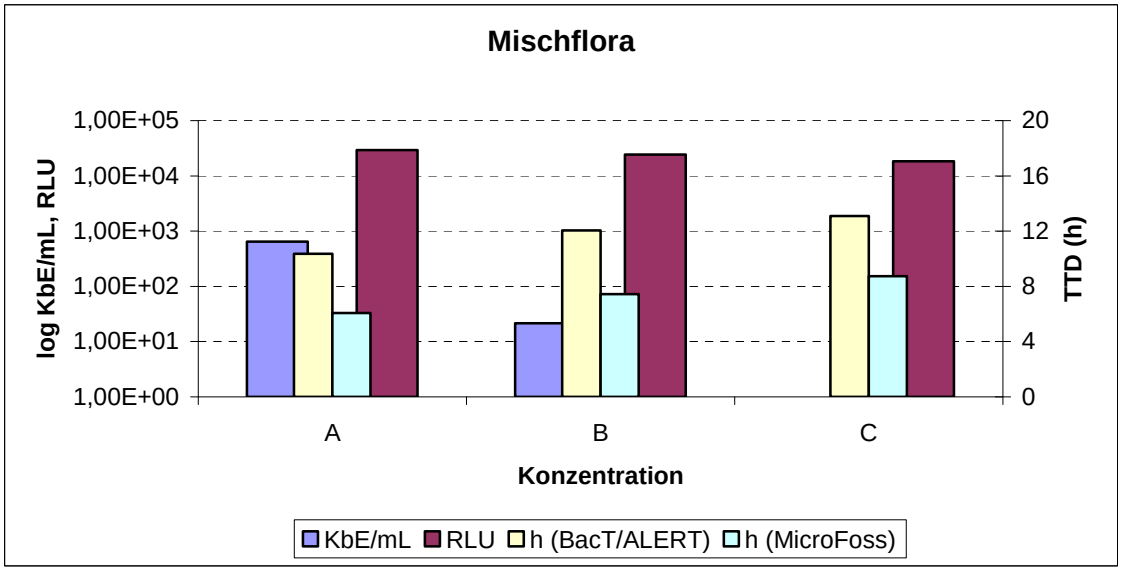


Tabelle 14: Standardabweichungen – Ergänzung zu Abbildung 32

Mischflora	***Konzentration A***	***Konzentration B***	***Konzentration C***
KbE/mL	150,32	4,51	0,71
RLU	7.800	6.281	3.561
h (BacT/ALERT)	0,20	0,43	0,63
h (MicroFoss)	0,19	0,18	0,43

Im Plattengussverfahren wurden Mittelwerte der Proben von 642 KbE/mL und 22 KbE/mL in der Konzentration A und B erhalten. Die Ergebnisse der Messungen von Proben der Konzentration C sind zu niedrig um sie zufriedenstellend auswerten zu können. Die Standardabweichungen für Konzentration A und B betrug 150,32 respektive 4,51 respektive.

Die Messungen mit CellScan ergaben Mittelwerte von 29.152 RLU, 24.261 RLU und 18.303 RLU und dazugehörende Standardabweichungen von 7.800; 6.281 und 3.561.

Mit BacT/ALERT ließen sich Mittelwerte von 10,37 h, 12,05 h und 13,10 h ermitteln. Die Standardabweichungen mit 0,20; 0,43 und 0,63 sind mit den Ergebnissen der isoliert beprobten *Enterobacteriaceae*-Species vergleichbar. Ähnlich sind die durch Messung mit MicroFoss erhaltene Standardabweichungen von 0,19; 0,18 und 0,43. Wiederum wurden, verglichen mit BacT/ALERT, die Proben um einige Stunden früher als positiv detektiert.

4.1.2.3 Produktionsbegleitende Anwendung der Methoden

Insgesamt wurden innerhalb von drei Monaten 16 Produktionen laut Probenahme- und Untersuchungsplan im Betrieb begleitet.

Ausgehend von den bis dahin erhaltenen Ergebnissen, die zeigten, dass BacT/ALERT und MicroFoss bei der Überwachung der Gesamtkeimzahl vergleichbare Ergebnisse liefern, wurde für diesen Teil der Arbeit entschieden, MicroFoss mit *Enterobacteriaceae*-Medium einzusetzen und die Gesamtkeimzahl zusätzlich zur Referenzmethode mit CellScan und BacT/ALERT zu überwachen.

Messungen mit CellScan erfolgten direkt nach Erhalt der Proben, sowie nach 24 h Inkubation der Proben bei Raumtemperatur. Die Inkubationszeit wurde von 48 h (Herstellervorschrift) auf 24 h verkürzt, weil sich in der Vorversuchsphase zeigte, dass bereits nach einem Tag Bebrütung ein Trend erkennbar ist. Zum Vergleich wurde die Probe auch direkt nach Erhalt im CellScan gemessen.

Folgende mikrobiologische Kriterien wurden definiert bzw. kamen zur Anwendung:

- Rohmilchkeimzahl < 300.000[8]
- BacT/ALERT Werte für Proben Rahm nach Erhitzer, MF nach Pasteur, Steriltank und Abfüllung < 24 h TTD
- MicroFoss *Enterobacteriaceae*-Medium Werte für Proben MF nach Pasteur, Steriltank und Abfüllung negativ, ansonsten wird Rekontamination angenommen
- *Enterobacteriaceae*-Bestimmung auf VRBD-Agar nach 24 h Inkubation der Probe <1 KbE/mL für Proben MF nach Pasteur, Steriltank und Abfüllung, ansonsten wird Rekontamination angenommen
- Für die Messung mit CellScan nach 24 h Probeninkubation wurden die im Labor festgesetzten Grenzwerte für ESL-Milch zur Beurteilung der mikrobiologischen Probenbeschaffenheit berücksichtigt:
  0-300: „OK“
  301-500: „Retest”
  501-∞: „Contaminated”

[8] VO (EG) Nr. 853/2004: Rohe Kuhmilch unmittelbar vor Verarbeitung; Keimzahl bei 30 °C.

Nachfolgend werden vier repräsentative Fälle von begleiteten Produktionen dargestellt und besprochen.

Tabelle 15 zeigt die Ergebnisse eines Produktionsmonitorings, bei dem nicht alle definierten mikrobiologischen Kriterien erfüllt wurden. Die Rohmilch war jedenfalls von einwandfreier mikrobiologischer Qualität. Auf Stufe des Steriltanks bei Abfüllungsbeginn kam es zu einer Rekontamination. Diese lag entweder an einer Unsterilität bei der Produktion oder war zumindest teilweise auch in einer unsterilen Probenahme begründet.

Tabelle 15: Ergebnisse eines Produktionsmonitorings mit erfolgter Rekontamination auf Stufe des Steriltanks und nicht erfüllten Kriterien

Probenahmen	*Frisch*				*24 h*	
	GKZ	*BacT/ALERT*	*MicroFoss Ent*	*CellScan*	*CellScan*	*VRBD 1:1*
Rohmilch	70.000	7,68		2.968	72.273	
MM vor MF Anfang	40.000	7,92		1.275	250	
MM vor MF Mitte	30.000	8,4		1.338	32	
MM vor MF Ende	30.000	8,88		1.423	74	
MM nach MF Anfang	310	13,92		996	462	
MM nach MF Mitte	160	15,12		896	860	
MM nach MF Ende	120	15,6		1.048	38.436	
Rahm nach Erhitzer Anfang	<1	neg.		104	99	
Rahm nach Erhitzer Mitte	<1	neg.		148	2031	
Rahm nach Erhitzer Ende	<1	neg.		160	217	
MF nach Pasteur Anfang	90	27,84	neg.	393	230.470	<1
MF nach Pasteur Mitte	60	neg.	neg.	425	83	<1
MF nach Pasteur Ende	20	neg.	neg.	467	162	<1
Steriltank Anfang	>3.000	4,08	4,6	43.698	21.622	<1
Steriltank Mitte	10	19,2	neg.	278	3.435	<1
Steriltank Ende	10	20,88	neg.	219	19.521	<1
Abfüllung Anfang[9]	240	13,04	neg.	418	3.359	<1
Abfüllung Stündlich[10]	20	17,76	neg.	414	5.863	<1
Abfüllung Ende[11]	14	17,28	neg.	374	3.512	<1

Bei der Gesamtkeimzahlbestimmung mit dem Referenzverfahren, wie auch mit BacT/ALERT und CellScan – frisch sowie nach 24 h Inkubation - zeigt deutlich erhöhte Werte. Die Annahme der Rekontamination kann durch die Messung mit MicroFoss

[9], [10], [11] es wurden fünf Packungen beprobt, der Mittelwert aus diesen Bestimmungen ist dargestellt.

(*Enterobacteriaceae*-Medium), welche eine Detektionszeit von 4,6 h ergab getroffen werden. Die alleinige Verwendung von VRBD-Agar nach 24-stündiger Probenbebrütung alleine zeigte jedoch keine erhöhten Werte. Dies könnte eventuell auf ungenügende Homogenisation der Proben zurückzuführen sein. In dem vorliegenden Fall zeigte CellScan direkt nach Erhalt der Probe eine erhöhte Keimbelastung an. Mit BacT/ALERT wurde ebendies nach etwa vier Stunden deutlich. Mittels Koloniezählverfahren mit Koch'schem Plattenguß wurde diese Erkenntnis nach 72 h bestätigt.

Ein weiteres Produktionsmonitoring zeigt Tabelle 16. Auch diesmal war die Rohmilchkeimzahl innerhalb des gesetzlich definierten Rahmens. Bis zu der Stufe der MF nach Pasteur ist mit allen angewandten Methoden eine kontinuierliche Reduktion der mikrobiellen Belastung zu erkennen.

Tabelle 16: Ergebnisse eines Produktionsmonitorings mit Rekontamination auf Stufe des Steriltanks

Probenahmen	***Frisch***				***24 h***	
	GKZ	***BacT/ALERT***	***MicroFoss Ent***	***CellScan***	***CellScan***	***VRBD 1:1***
Rohmilch	110.000	7,44		4.629	30.760	
MM vor MF Anfang	70.000	8,64		1.246	10.757	
MM vor MF Mitte	40.000	9,12		1.034	6.759	
MM vor MF Ende	40.000	9,36		869	11.264	
MM nach MF Anfang	130	14,64		530	1.290	
MM nach MF Mitte	130	16,32		432	2.357	
MM nach MF Ende	140	16,08		647	217	
Rahm nach Erhitzer Anfang	<1	neg.		219	87	
Rahm nach Erhitzer Mitte	<1	neg.		157	58	
Rahm nach Erhitzer Ende	<1	neg.		194	64	
MF nach Pasteur Anfang	60	28,32	neg.	521	261	<1
MF nach Pasteur Mitte	10	33,36	neg.	486	256	<1
MF nach Pasteur Ende	40	neg.	neg.	568	283	<1
Steriltank Anfang	70	21,36	neg.	531	276	<1
Steriltank Mitte	20	neg.	neg.	569	286	<1
Steriltank Ende	2.800	14,4	neg.	403	5.608	<1
Abfüllung Anfang	26	38,28	neg.	578	339	<1
Abfüllung Stündlich	24	32,98	neg.	609	367	<1
Abfüllung Ende	35	27,84	neg.	545	358	<1

Ein deutlicher Anstieg der Gesamtkeimzahl ist an den Ergebnissen der Steriltank Ende-Probe ablesbar. Bei den Messungen mit BacT/ALERT sowie CellScan nach 24 h Inkubation und auch unter Verwendung des Koloniezählverfahrens konnten die definierten Kriterien nicht mehr erfüllt werden. Die beprobten Packungen unmittelbar nach der Abfüllung genügten wiederum den festgelegten Grenzwerten.

Wie in Tabelle 17 abgebildet, war die für die Produktion verwendete Rohmilch von guter mikrobiologischer Qualität. Bei der mikrofiltrierten Milch nach dem Pasteurisieren sind im Vergleich zu den vorangehend besprochenen Produktionsbegleitungen leicht erhöhte Keimzahlbelastungen erkennbar.

Tabelle 17: Ergebnisse eines Produktionsmonitorings mit erfolgter Rekontamination nach der Erhitzung

Probenahmen	***Frisch***				***24 h***	
	GKZ	***BacT/ALERT***	***MicroFoss Ent***	***CellScan***	***CellScan***	***VRBD 1:1***
Rohmilch	100.000	7,2		8.650	43.760	
MM vor MF Anfang	80.000	8,4		1.365	239	
MM vor MF Mitte	70.000	8,4		1.497	129	
MM vor MF Ende	60.000	9,84		968	54	
MM nach MF Anfang	420	16,32		1.428	1.226	
MM nach MF Mitte	380	16,56		1.566	1.105	
MM nach MF Ende	280	16,8		1.411	1.204	
Rahm nach Erhitzer Anfang	<1	neg.		111	69	
Rahm nach Erhitzer Mitte	<1	neg.		168	72	
Rahm nach Erhitzer Ende	<1	neg.		170	104	
MF nach Pasteur Anfang	330	14,88	neg.	620	251	<1
MF nach Pasteur Mitte	240	14,4	neg.	659	249	<1
MF nach Pasteur Ende	120	16,8	neg.	643	283	<1
Steriltank Anfang	210	15,6	7,8	653	349	>300
Steriltank Mitte	190	16,56	8,4	501	385	280
Steriltank Ende	220	16,56	6,2	527	482	>300
Abfüllung Anfang	250	15,06	6,4	650	332	>300
Abfüllung Stündlich	310	16,8	8,8	597	398	130
Abfüllung Ende	255	16,56	10	628	410	160

Nach dem Pasteurisierungsvorgang kam es zu einer Rekontamination, was sich anhand der mit MicroFoss erhaltenen Werte sowie der Bestimmung der *Enterobacteriaceae*-Keimzahl mit VRBD-Agar zeigte. Dies konnte mit MicroFoss nach 6–10 h, mittels Plattengussverfahren und vorangehender Probeninkubation 48 h nach Einlangen der

Probe im Labor festgestellt werden. Bei der Gesamtkeimzahlbestimmung zeigten sich leicht erhöhte Keimzahlen beim Koloniezählverfahren und leicht erniedrigte Detektionszeiten bei der Messung mit BacT/ALERT. Die Messung der Biolumineszenz nach 24 h Bebrütung zeigte keine überhöhte Keimbelastung an.

Tabelle 18 zeigt die Ergebnisse einer Produktion, in der sämtliche erhaltene Werte den definierten mikrobiologischen Kriterien entsprechen. Die Keimzahl der Rohmilch war sehr niedrig. Es kam entlang des Produktionsprozesses zu keiner Rekontamination. Die Gesamtkeimzahlen nach der Pasteurisation liegen alle unter 50 KbE/mL. Die mit BacT/ALERT ermittelten Detektionszeiten waren bis auf eine Probe nach dem Pasteur über 30 h. Die mit CellScan erhaltenen Werte waren allesamt kleiner als 280 RLU.

Tabelle 18: Ergebnisse eines Produktionsmonitorings, die definierten mikrobiologischen Kriterien werden erfüllt

Probenahmen	***Frisch***				***24 h***	
	GKZ	***BacT/ALERT***	***MicroFoss Ent***	***CellScan***	***CellScan***	***VRBD 1:1***
Rohmilch	40.000	7,2		46.209	85.764	
MM vor MF Anfang	12.000	9,1		2.479	39	
MM vor MF Mitte	14.000	9,6		3.298	41	
MM vor MF Ende	14.000	9,6		3.469	11.036	
MM nach MF Anfang	175	18,69		1.142	4.387	
MM nach MF Mitte	100	17,76		1.205	320	
MM nach MF Ende	60	18,24		1.101	186	
Rahm nach Erhitzer Anfang	<1	neg.		234	48	
Rahm nach Erhitzer Mitte	<1	neg.		430	57	
Rahm nach Erhitzer Ende	<1	neg.		190	61	
MF nach Pasteur Anfang	80	39,6	neg.	390	182	<1
MF nach Pasteur Mitte	40	21,6	neg.	494	244	<1
MF nach Pasteur Ende	10	neg.	neg.	514	237	<1
Steriltank Anfang	30	neg.	neg.	489	257	<1
Steriltank Mitte	40	neg.	neg.	490	247	<1
Steriltank Ende	20	38,4	neg.	534	270	<1
Abfüllung Anfang	33	neg.	neg.	463	278	<1
Abfüllung Stündlich	30	30	neg.	587	190	<1
Abfüllung Ende	22	neg.	neg.	436	283	<1

4.2 Diskussion

Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche mit künstlich kontaminierten Milchproben zeigen, dass mit BacT/ALERT und MicroFoss bereits innerhalb einiger Stunden, in Abhängigkeit des Inokulats und seiner Konzentration, Ergebnisse vorliegen. Die eingesetzten Keime wurden von BacT/ALERT in allen Konzentrationsstufen erfasst. MicroFoss erzielte leicht kürzere Detektionszeiten für die einzelnen Proben, bei einer ähnlichen Genauigkeit, wie der Versuch 2 zeigte. Allerdings konnten die im Rahmen der Arbeit eingesetzten Inokulate von *Pseudomonas* spp. mit dieser Methode nicht detektiert werden. Bei stark kontaminierten Proben mit einer Keimzahl > 10^5 KbE/mL liegen mit BacT/ALERT und MicroFoss innerhalb von 2–4 h Ergebnisse vor. Im Vergleich dazu bringt die Messung mit CellScan nach 48 h Inkubation innerhalb von 15 min ein Ergebnis, während das routinemäßig angewandte Koloniezählverfahren erst nach 72 h und teilweise aufwändiger Auszählung Resultate liefert.

Ergebnisse aus Versuch 1 – wo erst nach einer Woche Kühllagerung ein Anstieg der RLU Werte deutlich wurde – zeigen, dass die ATP-Messung nur mit vorheriger Inkubation der Probe eingesetzt werden kann. Griffiths berichtet 1993 noch von einer dreitägigen Inkubation vor der Messung. Die Weiterentwicklung vor allem in der Sensitivität der Methode [REYBROECK, 1999] erlauben eine verkürzte Inkubationszeit der Probe. Dies veranschaulichen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Der Einsatz der Biolumineszenzmessung kann als Momentaufnahme des mikrobiellen Status von Milchprodukten angewandt werden. Haltbarkeitsprognosen sind mit dieser Methode nicht möglich.

Bei Einsatz an Produkten mit einer natürlichen Keimbelastung, im Rahmen einer Produktionsbegleitung von mikrofiltrierter, wärmebehandelter Milch ermöglichten die Schnellmethoden, und dabei vor allem jene auf colorimetrischer Basis arbeitende, eine rasche Beurteilung des Produktstatus. Die im Betrieb produzierte Milch zeigte bei optimalen Bedingungen Reduktionsraten und Gesamtkeimzahlen wie sie auch in der Literatur beschrieben wurden [vgl. KIESNER et al., 2005]. Anhand der im Betrieb durchgeführten sensorischen Begleituntersuchungen wurde festgelegt, dass die ESL-

Milch eine Detektionszeit von mindestens 24 h in BacT/ALERT erreichen muss um eine entsprechende sensorische Qualität und damit Haltbarkeit zu erzielen. White et al. (2006) bescheinigten dem nach selbigen Prinzip arbeitenden MicroFoss System ebenfalls eine Eignung zur Haltbarkeitsvorhersage mit höherer Genauigkeit und wesentlich reduzierter Testdauer im Vergleich zu herkömmlichen Haltbarkeitstest.
BacT/ALERT und auch MicroFoss sind in der Lage durch die Generierung von Wachstumskurven den dynamischen Prozess des Keimwachstums aufzuzeichnen. Die im Rahmen des Versuch 1 erhaltenen BacT/ALERT Wachstumskurven zeigen für jede jede der eingesetzten Keimgattung einen charakteristisches Kurvenverlauf.

Der Einsatz eines großen Probenvolumens (10 mL bei BacT/ALERT und 2 bzw. 5 mL bei MicroFoss) bedingt eine höhere Sensitivität der Methode, so konnten mit BacT/ALERT und MicroFoss selbst Proben mit sehr geringen Keimzahlen als positiv detektiert werden. In Versuch 1 war beispielsweise die Inokulation der Milchproben mit *Bacillus* spp. über 48 h lang mittels Referenzverfahren nicht detektierbar. Mit BacT/ALERT und MicroFoss war eine positive Detektion bereits nach etwa 11 bis 12 h möglich. Dieses Ergebnis deckt sich mit jenem von Firstenberg-Eden et al., die MicroFoss als die genauere und sensitivere Methode im Vergleich mit dem Referenzverfahren bei der Untersuchung coliformer Keime und *Enterobacteriaceae* befanden [FIRSTENBERG-EDEN et al., 2002].

Es wurde deutlich gezeigt, dass sich die Zeitspanne bis zum Erhalt des Ergebnisses mit den Schnellmethoden, insbesondere jenen, die auf einem colorimetrischen Messprinzip beruhen, deutlich verringern lässt. Während für die ATP-Messung eine vorherige Inkubation der Proben für mindestens 24 h bei Raumtemperatur Vorraussetzung für den Erhalt einer positiven Detektion ist, kann bei BacT/ALERT und MicroFoss in jedem Fall auf eine Vorbebrütung der Proben verzichtet werden, was einen noch schnelleren Erhalt der Ergebnisse bedingt.
Beim Koloniezählverfahren zur Ermittlung der Gesamtkeimzahl ist eine Inkubation der Petrischalen von 72 h vorgeschrieben, wohingegen Kontaminationen in der Milch innerhalb von einigen Stunden, in Abhängigkeit der mikrobiellen Belastung, vorliegen.

Hinsichtlich des Arbeitsaufwands und Materialbedarfs der Methoden sind alle drei angewandten Schnellmethoden im Vergleich zur Referenzmethode im Vorteil. Beim Koloniezählverfahren wird eine große Anzahl an Petrischalen, Pipetten und Eprouvetten benötigt. Bei der Benutzung von Glaspipetten und Eprouvetten muss neben dem hohen Materialbedarf auch der zusätzliche Aufwand der Reinigung und Sterilisation der Utensilien berücksichtigt werden. Die Vorbereitung für die ATP-Messung, also das Einpipettieren der Probe in die Mikrotiterplatte kann auf sehr engem Raum erfolgen. Neben dem Platzbedarf für das relativ kompakte Gerät ist ein Kühlschrank zur Aufbewahrung der Reagenzien nötig. Gleiches gilt für BacT/ALERT und MicroFoss: für das Einbringen der Proben in die Vials werden lediglich Einwegspritzen und Pipetten benötigt. Das MicroFoss Gerät ist Dank seiner kompakten Bauweise relativ platzsparend unterzubringen. BacT/ALERT hingegen nimmt eine relativ große Stellfläche in Anspruch. Da die Proben unverdünnt eingesetzt werden, ist bei keiner Schnellmethode ein zusätzlicher Materialbedarf für Verdünnungsreihen gegeben.

Hohe Kosten in der Anschaffung der Geräte, sowie die im Fall der colorimetrischen Schnellmethoden einfach zu berechnende und ebenfalls hohe Preis pro Analyse - d.h. der Preis für ein Probenfläschchen – sind möglicherweise ein Grund für Laborverantwortliche vom Kauf des Geräts Abstand zu nehmen.

Hinsichtlich der Kosten-Nutzen Frage sollte neben den bereits erwähnten Vorteilen der Schnellmethoden bezüglich des Arbeits-, Material- und Platzbedarfs auch berücksichtigt werden, dass die Vials für die Schnellmethoden standardisiert sind und hinsichtlich ihrer Qualität zur Eignung von Analysen strengen Kontrollen durch den Hersteller unterliegen. Wird der Nährboden hingegen im Betrieb von wechselndem Laborpersonal selbst hergestellt, so ist neben einer gründlichen Einschulung eine laufende, ebenfalls zeitaufwändige Qualitätskontrolle der Nährmedien zu betreiben.

Im konkreten Fall stellt die Überwachung des hygienischen Status der ESL-Milch nur einen Teil der in der mikrobiologischen Qualitätssicherung im Betrieb anfallenden Proben dar. Davon ausgehend, gestaltet sich die Verwendung der evaluierten Schnellmethoden für die Routineanalytik schwierig: So haben Joghurts einen zu

niedrigen pH-Wert um mit BacT/ALERT iAST untersucht werden zu können. Von MicroFoss wird zwar eine spezielles Medium für den Nachweis von Schimmelpilzen in Joghurt angeboten, der Anfall einer sehr großen Anzahl an Proben, sowie die Notwendigkeit mehrere Parameter gleichzeitig zu erfassen, gestalten den Einsatz der Schnellmethode wiederum äußerst schwierig.

Für den Einsatz zur Validierung bzw. Evaluierung einer neu angeschafften Anlage oder Einführung eines neuen Prozesse können die colorimetrischen Methoden gut eingesetzt werden, was anhand der produktionsbegleitenden Analyse von mikrofiltrierter und anschließend wärmebehandelter Milch gezeigt wurde.

5 Schlussbetrachtung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Praxistauglichkeit der Schnellmethoden im Hinblick auf ihre Empfindlichkeit, Möglichkeiten und Grenzen, Eignung zur Haltbarkeitsvorhersage, Antwortzeit, Kosten und Arbeitsaufwand evaluiert und mit der Referenzmethode verglichen werden. Die Versuche zeigten, dass alle eingesetzten Schnellmethoden ein schnelleres Ergebnis als die Referenzmethode liefern und weniger Manipulationsschritte bedürfen. Die mit BacT/ALERT und MicroFoss erhaltenen Ergebnisse ermöglichen zusätzlich eine Haltbarkeitsabschätzung des Produkts. Die in dieser Arbeit eingesetzten Schnellmethoden zum mikrobiologischen Monitoring von Milchprodukten zeichnen sich durch Genauigkeit und gute Wiederholbarkeit aus und erfassen selbst geringe Keimgehalte.

In anderen Studien erhaltene Ergebnisse stimmen weitgehend mit den erhaltenen Resultaten dieser Arbeit überein.

Im Betrieb wird im Einsatz der Schnellmethode BacT/ALERT eine gute Möglichkeit zur Anlagenvalidierung und dem Einsatz bei der Einführung neuer Prozesse gesehen. Besonders für ein Hygienemonitoring von Sterilmilchprodukten oder quasi-Sterilmichlprodukten wie beispielsweise ESL-Milch kann der Einsatz dieser Schnellmethode zielführend sein. Für die Routineanalytik im Betrieb ist das Personal rasch auf den neuen Geräten einschulbar, die Handhabung ist sehr einfach und alle eingesetzten Schnellmethoden bieten die Möglichkeit die Ergebnisse ins LIMS einzuspeisen.

Aufgrund der stetigen Weiterentwicklung und Verbesserung mikrobiologischer Schnellverfahren werden in Zukunft immer mehr Schnellmethoden validiert werden und damit Anerkennung in den Gesetzen zur Lebensmittelhygiene finden. Das sollte den bisher zögerlichen Einsatz mikrobiologischer Schnellmethoden in der Lebensmittelindustrie weiter vorantreiben.

6 Zusammenfassung

Milch und Milchprodukte mit verlängerter Haltbarkeit gewinnen Dank des frischmilchähnlichen Geschmacks, erzielt durch neue Verfahren zur schonenden Produktbehandlung und dem gleichzeitigen Vorteil der verlängerten Haltbarkeit durch nahezu Elimination in der Rohmilch vorhandener Verderbskeime, immer mehr an Bedeutung auf dem europäischen Markt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mikrobiolgische Schnellmethoden auf ihre Eignung zur mikrobiolgischen Qualitätssicherung im Molkereibetrieb evaluiert. Die eingesetzten Schnellmethoden – CellScan Innovate™ System, BacT/ALERT® 3D, MicroFoss™ 32 System beruhen auf der Erfassung von Stoffwechselprodukten von Mikroorganismen und wurden mit routinemässig angewandten Koloniezählverfahren hinsichtlich Praxistauglichkeit mit besonderem Fokus auf ihre Empfindlichkeit, Möglichkeiten und Grenzen, Eignung zur Haltbarkeitsvorhersage, Antwortzeit, Kosten und Arbeitsaufwand verglichen.

Die Proben wurden mit zuvor isolierten und spezifizierten Mikroorganismen kontaminiert und in unterschiedlichen Konzentrationsstufen beimpft. Die Entwicklung der Keimzahl wurde in Mehrfachbestimmungen sowie über eine Lagerdauer von zwei Wochen mit den Schnellmethoden und der Referenzmethode erfasst.

Mittels ATP-Messung kann ein schneller Hygienestatus ermittelt werden. Allerdings ist dafür eine Inkubation der Milchprobe bei Raumtemperatur erforderlich. BacT/ALERT und MicroFoss kommen ohne Vorinkubation aus und liefern, abhängig von der vorliegenden Keimflora und Konzentration innerhalb weniger Stunden ein Ergebnis.

Hinsichtlich der praktischen Benutzbarkeit zeichnen sich die Schnellmethoden bei vorhandenen Anschaffungskosten durch einen geringeren Arbeits-, Material- und Medienbedarf sowie durch eine hohe Sensitivität und Genauigkeit im Vergleich mit der Referenzmethode aus.

7 Abstract

Milk and milk products with extended shelf life gain more and more relevance on the European market. This development is due to sophisticated manufacturing-procedures that preserve the fresh taste of consumer milk and the advantage of an extended shelf life through the elimination of spoilage microorganisms at the same time.

The aim of this work was to check the validity and qualification of BacT/ALERT® 3D, MicroFoss™ 32 System and CellScan Innovate™ System, respectively, for the use in routine microbiological quality control on dairy-scale application. The rapid methods applied operate by detecting metabolites of microorganisms and were evaluated with reference to the routinely applied plate count technique regarding accuracy, possibilities and limitations, their ability to predict shelf life, labour input and usability.

Samples were inoculated with isolated and specified microorganisms at different concentrations. Changes of microbial growth were monitored during storage time, using three rapid methods and plate count technique.

ATP-bioluminescence measurement provides rapid information about the current microbial status. To obtain satisfactory results this method requires pre-incubation of the samples. With BacT/ALERT and MicroFoss an incubation prior to the measurement can be omitted. Depending on the microflora and its concentrations the colorimetric methods provide results within a few hours.

Regarding usability, rapid methods – albeit acquisition cost have to be considered - are characterized by reduced labour input, high sensitivity and accuracy in comparison to the plate count technique.

8 Literaturverzeichnis

BAUMGART J., BECKER B., BECKER H., BOCKEMÜHL J., EHRMANN M., LEHMACHER A., MÄRTLBAUER E., VOGEL R. F. Nachweis von Mikroorganismen. In: BAUMGART J., BECKER B. Milch und Milcherzeugnisse. In: Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. Behr's Verlag, Hamburg, 2004; 147-430.

BIOMÉRIEUX Industries. Food Applications. Microbial Detections. BacT/ALERT® 3D Food. Internet: http://www.biomerieux-industry.com/servlet/srt/bio/industry-microbiology/dynPage?open=NDY_IND_FDA_PRD&doc=NDY_FDA_PRD_G_PRD_NDY_5&pubparams.sform=1&lang=en (letzter Zugriff am 13.03.10).

BOENEKE C.A., ARYANA K.J., OLSON D.W., VARGAS J.L. Various aspects of pasteurized and ultra-pasteurized fluid milk during storage. Milchwissenschaft 2008; 63: 394-397.

BGBl Bundesgesetzblatt für die Republik Österreich Jahrgang 2006 Teil II. 106. Verordnung der Bundesministerin für Gesundheit und Frauen über Rohmilch und Rohrahm (Rohmilchverordnung).

CELSIS Infobroschüre zu Biolumineszenzmessung. Undatiert

CELSIS RapiScreen™ Dairy. Version 2007. Internet: http://www.celsis.com/media/pdf/rdpdfs/RD - Rapi Dairy sell sheet 004-2.pdf (letzter Zugriff am 13.03.10).

CHAMBERS J. V. The Microbiology of Raw Milk. In: ROBINSON R. K. Dairy Microbiology Handbook. Wiley Interscience, New York, 2002; 39-90.

COUSIN M. A. Presence and Activity of Psychrotrophic Microorganisms in Milk and Dairy Products: A Review. Journal of Food Protection 1982; 45: 172-207.

De BOER E., BEUMER R. R. Methodolgy for detection and typing of foodborne microorganisms. International Journal of Food Microbiology 1999; 50: 119-130.

DUDEN deutsches Universalwörterbuch. Dudenverlag, Mannheim, 2003.

ELWELL M. W., BARBANO D. M. Use of Microfiltration to Improve Fluid Milk Quality. Journal of Dairy Science 2006; 89: E20-E30.

ENEROTH Å., AHRNÉ S., MOLIN G. Contamination of milk with Gram-negative spoilage bactaria during fillling of retail containers. International Journal of Food Microbiology 2000a; 57: 99-106.

ENEROTH Å., AHRNÉ S., MOLIN G. Contamination routes of Gram-negative spoilage bacteria in the production of pasteurised milk, evaluated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). International Dairy Journal 2000b; 10: 325-331.

ENEROTH Å., CHRISTIANSSON A., BRENDEHAUG J., MOLIN G. Critical Contamination Sites in the Production Line of Pasteurised Milk, with Reference to the Psychrotrophic Spoilage Flora. Interational Dairy Journal 1998; 8: 829-834.

ENEROTH Å., SVENSSON B., MOLIN G., CHRISTIANSSON A. Contamination of pasteurized milk by *Bacillus cereus* in the filling machine. Journal of Dairy Research 2001; 68: 189-196.

FIL-IDF. International IDF Standard 100B:1991. Milk and milk products. Enumeration of Microorganisms. Colony Count Technique at 30 °C.

FIRSTENBERG-EDEN R., FOTI D. L., McDOUGAL S. T., BAKER J. Optical instrument for the rapid detection of microorganisms in dairy products. International Dairy Journal 2002; 12: 225-232.

FIRSTENBERG-EDEN R., FOTI D. L., McDOUGAL S. T., BECK S. Performance Comparison of the BioSys Optical Assay and the Violet Red Bile Agar Method for Detecting Coliforms in Food Products. Journal of Food Protection 2004; 67: 2760-2766.

FOSS Analytical A/S. MicroFoss 32/128. Type 78900 Operator's Manual. Issue November 2004.

FUNG D. Y. C. Rapid Methods and Automation in Microbiology. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 2002; 1: 3-22.

FUNG D. Y. C. What's needed in Rapid Detection of Foodborne Pathogens. Food Technology 1995; 6: 64-67.

GARCIA M. L., SANZ B., GARCIA-COLLIA P., ORDONEZ J. A. Activity and thermostability of the extracellular lipases and proteinases from pseudomonads isolated from raw milk. Milchwissenschaft 1989; 44: 547-550.

GOULAS A., GRANDISON A. S. Applications of Membrane Separation. In: BRITZ T. J., ROBINSON R. K. Advanced Dairy Science and Technology. Blackwell Publishing, Oxford, 2008; 35-74.

GRIFFITHS M. W. Applications of Bioluminescence in the Dairy Industry. Journal of Dairy Science 1993; 76: 3118-3125.

GRIFFITHS M. W. ATP Bioluminescence. Application in Hygiene Monitoring. In: ROBINSON R. K. Milk and Milk Products. In: Encyclopedia of food microbiology. Academic Press, London, 1999; 94-101.

HELLER K. Mikrobiologie der Dauermilcherzeugnisse. In: WEBER H. Mikrobiologie der Lebensmittel. Milch und Milchprodukte. Behr's Verlag, Hamburg, 2006; 419-442.

HENYON B. K. Extended shelf-life milks in North America: a perspective. International Journal of Dairy Technology 1999; 52: 95-101.

HOFFMANN W., KIESNER C., CLAWIN-RÄDECKER I., MARTIN D., EINHOFF K., LORENZEN P. C., MEISEL H., HAMMER P., SUHREN G., TEUFEL P. Processing of extended shelf life milk using microfiltration. International Journal of Dairy Technology 2006; 59: 229-235.

HOLM S., MALMBERG R., SVENSSON K. Method and plant producing milk with low bacterial content. 1986; World Patent WO 86/01687.

HÜLSEN U., RADEMACHER B. Länger haltbare Trinkmilch Teil I. dmz 2005; 19: 22-26 und Teil II. dmz 2005; 20: 24-26.

IDF International Dairy Federation. International IDF Standard 100B:1991 – Milk and Milk Products Enumeration of Microorgansims – Colony Count Technique at 30 °C.

ISO – International Organization for Standardization. Official Method: International Standard ISO 21528-2:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* – Part 2: Colony-count method.

ISO – International Organization for Standardization. Official Method: International Standard ISO 4833:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for the enumeration of microorganismsn – Colony-count technique at 30 degrees C.

KAUFMANN V. Haltbarkeitsverlängerung von Milch mittels Kombination aus Mikrofiltration und thermischer Behandlung: Einflussfaktoren auf die Produktqualität und –stabilität. In: Wissenschaftszentrum Weihenstephan, TU München, Jahresbericht Milchwissenschaftliche Forschung Weihenstephan, 2007; 113-114.

KAUFMANN V., KULOZIK U. Factors limiting quality and storage stability of E(xtended) S(helf) L(ife)-milk. Poster, Milchkonferenz Wien, 2009.

KAUFMANN V., KULOZIK U. Kombination von Mikrofiltration und thermischen Verfahren zur Haltbarkeitsverlängerung von Lebensmitteln. Chemie Ingenieur Technik 2006; 78: 1647-1654.

KAUFMANN V., KULOZIK U. Verfahrenstechnische Einflussfaktoren auf die Qualität und Stabilität von ESL-Milchprodukten. dmz 2008; 24: 28-30.

KAUFMANN V., SCHERER S., KULOZIK U. Stoffliche Veränderungen in Konsummilch durch haltbarkeitsverlängernde Verfahren. Deutsche Milchwirtschaft 2009; 7: 262-266.

KELLY P. M., TUOHY J. J. The effectiveness of microfiltration for the removal of microorganisms. Bulletin of the IDF 1997; 320: 26-31.

KESSLER H. G. Changes in Milk and Cream Produced by Heating and Storage. In: KESSLER H. G. Food and Bio Process Engineering Dairy Technology. Verlag A. Kessler, München, 2002; 179-187.

KIESNER C., HOFFMANN W., LORENZEN P. C., CLAWIN-RÄDECKER I., MARTIN D., MEISEL H., EINHOFF K., HAMMER P., TEUFEL P., SUHREN G. Anwendung von Mikrofiltration bei der Herstellung von Konsummilch mit verlängerter Haltbarkeit. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 2005; 57: 139-190.

KOTTFEROVÁ J., PIPOVÁ M., ONDRAŠOVIC M., NAGY J., VARBOVÁ M. Practical validation of the ATP bioluminescence method for determination of the extent of microbial contamination. Milchwissenschaft 2003; 58: 264-266.

KURZWEIL R., und BUSSE M. Untersuchung des Einflusses neuzeitlicher Stalltypen auf die Bakteriologie der Milchgewinnung. Bayerisches Landwirtschaftliches Jahrbuch 1973; 50: 899.

LIN S., SCHRAFT H., ODUMERU J. A., GRIFFITHS M. W. Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. International Journal of Food Microbiology 1998; 43: 159-171.

MADIGAN M. T., MARTINKO J. M., DUNLAP P. V., CLARK D. P. Brock biology of microorganisms. Pearson, San Fransisco, 2009.

MALMBERG R., HOLM S. Producing Low-bacteria Milk by Microfiltration. North European Food and Dairy Journal 1988; 54: 30-32.

MATISSEK R. W. Schnellmethoden in der Lebensmittelanalytik – Möglichkeiten und Grenzen. In: BALTES W. Schnellmethoden zur Beurteilung von Lebensmitteln und ihren Rohstoffen. Behr's Verlag, Hamburg, 2006; 1-30.

MAYR R., GUTSER K., BUSSE M., SEILER H. Gram positive non-sporeforming recontaminants are frequent spoilage organisms of German retail ESL (Extended Shelf Life) milk. Milchwissenschaft 2004; 59; 262-266.

MAYR R., GUTSER K., BUSSE M., SEILER H. Indigenous aerobic sporeformers in high heat treated (127 °C, 5 s) German ESL (Extended Shelf Life) milk. Milchwissenschaft 2004; 59: 143-146.

MURPHY S. C., KOZLOWSKI S. M., BANDLER D. K., BOOR K. J. Evaluation of Adenosine Triphosphate-Bioluminescence Hygiene Monitoring for Trouble-Shooting Fluid Milk Shelf-Life Problems. Journal of Dairy Science 1998; 81: 817-820.

ODUMERU J. A., BELVEDERE J., Van DONKERSGOED C. Evaluation of the MicroFoss system for the detection of *Listeria* species in environmental samples. Journal of Microbiological Methods 2004; 57: 1-7.

OLESEN N., JENSEN F. Microfiltration. The influence of operation parameters on the process. Milchwissenschaft 1989; 44: 476-479.

OTTE-SÜDI I. Mikrobiolgie der pasteurisierten Trinkmilch. In: WEBER H. Mikrobiologie der Lebensmittel. Milch und Milchprodukte. Behr's Verlag, Hamburg, 2006; 39-72.

OTTE-SÜDI I. Mikrobiologie der Rohmilch. In: WEBER H. Mikrobiologie der Lebensmittel. Milch und Milchprodukte. Behr's Verlag, Hamburg, 2006; 1-38.

PENG H., SHELEF L. A. Rapid detection of low levels of Listeria in foods and next-day confirmation of *L. monocytogenes*. Journal of Microbiological Methods 2000; 41: 113-120.

POULIOT Y. Membrane processes in dairy technology – From a simple idea to worldwide panacea. International Dairy Journal 2008; 18: 735-740.

REYBROECK W. ATP Bioluminescence. Application in Dairy Industry. In: ROBINSON R. K. Milk and Milk Products. In: Encyclopedia of food microbiology. Academic Press, London, 1999; 88-94.

RIEMELT I. Milchwirtschaftliche Mikrobiologie. Behr's Verlag, Hamburg, 2003; 71, 149f, und194f.

RYSSTAD G., KOLSTAD J. Extended shelf life milk – advances in technology. International Journal of Dairy Technology 2006; 59: 85-96.

RYSSTAD G., SPIKKESTAD N. ESL-Milch – Technologie und Marktchancen. Deutsche Milchwirtschaft 2005; 14: 584-587.

SABOYA L. V., MAUBOIS J-L. Current developments of microfiltration technology in the dairy industry. Lait 2000; 80: 541-553.

SALUSTIANO V. C., ANDRADE N. J., SOARES N. F. F., LIMA J. C., BERNARDES P. C., LUIZ L. M. P., FERNANDES P. E. Contamination of milk with *Bacillus cereus* by post-pasteurization surface exposure as evaluated by automated ribotyping. Food Control 2009; 20: 439-442.

SCHWERMANN S., SCHWENZOW U. Verfahrenskonzepte zur Herstellung von ESL-Milch. Teil 1. Deutsche Milchwirtschaft 2008; 11: 384-391, Teil 2. Deutsche Milchwirtschaft 2008; 12: 428-432 und Teil 3. Deutsche Milchwirtschaft 2008; 13: 462-467.

SHELEF L. A., EDEN G. Optical Instrument Rapidly Detects and Enumerates Microorganisms in Food. Food Technology 1996; 50: 82-85.

SHELEF L. A., FIRSTENBERG-EDEN R. Novel selective and non-selective optical detection of microorganisms. Letters in Applied Microbiology 1997; 25: 202-206.

SHELLEY A. W., DEETH H. C., MacRAE I. C. A numerical taxonomic study of psychrotrophic bacteria associated with lipolytic spoilage of raw milk. Journal of Applied Bacteriology 1987; 62: 197-207.

STEPANIAK L., ABRAHAMSEN R.K. Effect of sampling, recontamination and temperature on microbial quality of pasteurized milk. Milchwissenschaft 1995; 50: 22-26.

TAN W., SHELEF L. A. Automated detection of *Salmonella* spp. in foods. Journal of Microbiological Methods 1999; 37: 87-91.

Te GIFFEL M. C., BEUMER R. R., LANGEVELD L. P. M., ROMBOUTS F. M. The role of heat exchangers in the contamination of milk with *Bacillus cereus* in dairy processing plants. International Journal of Dairy Technology 1997; 50: 43-47.

Te GIFFEL M. C., MEEUWISSE J., de JONG P. Control of milk processing on rapid detection of micro-organisms. Food Control 2001; 12: 305-309.

TERPLAN G., RUNDFELDT H., ZAADHOF K.-J. Zur Eignung verschiedener Nährböden für die Bestimmung der Gesamtkeimzahl der Milch. Archiv für Lebensmittelhygiene 1967; 1: 9-11.

TETRA PAK Deutschland. Tetra Alcross. Internet: http://www.tetrapak.com/de/products_and_services/processing_equipment/molkereianlagen/filtrieren/tetra alcross/pages/default.aspx (letzter Zugriff am 13.03.10).

TROUVÉ E., MAUBOIS J. L., PIOT M., MADEC M. N., FAUQUANT J., ROUAULT A., TABARD J., BRINKMAN G. Rétention de différentes espèces microbiennes lors de l'épuration du lait par microfiltration en flux tangentiel. Lait 1991; 71: 1-13.

VO (EG) 1441/2007 der Kommission zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel.

VO (EG) 178/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit.

VO (EG) 2074/2005 der Kommission zur Festlegung von Durchführungsvorschriften für bestimmte unter die Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates fallende Erzeugnisse und für die in den Verordnungen (EG) Nr. 854/2004 des Euroäischen Parlaments und des Rates und (EG) Nr. 882/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vorgesehenen amtlichen

Kontrollen, zur Abweichung von der Verordnung (EG) Nr. 852/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 853/2004 und (EG) Nr. 854/204.

VO (EG) 852/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates über Lebensmittelhygiene.

VO (EG) 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs.

WHITE C. H., WILSON J., SCHILLING M. W. An Investigation of the Use of the MicroFoss as an Indicator of the Shelf Life of Pasteurized Fluid Milk. Journal of Dairy Science 2006; 89: 2459-2464.

ZANGERL P. Milchwirtschaftliche Mikrobiologie. In: KRÖMKER V. Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene. Parey, Stuttgart, 2007; 110-203.

ZSCHALER R. Mikrobiologische Schnellmethoden. In: BALTES W. Schnellmethoden zur Beurteilung von Lebensmitteln und ihren Rohstoffen. Behr's Verlag, Hamburg, 2006; 305-322.

9 Anhang

9.1 BacT/ALERT Wachstumskurven (iAST-Medium)

Abbildung 33: *Pseudomonas* spp. in Konzentration C nach 24 h Lagerung bei 7 °C

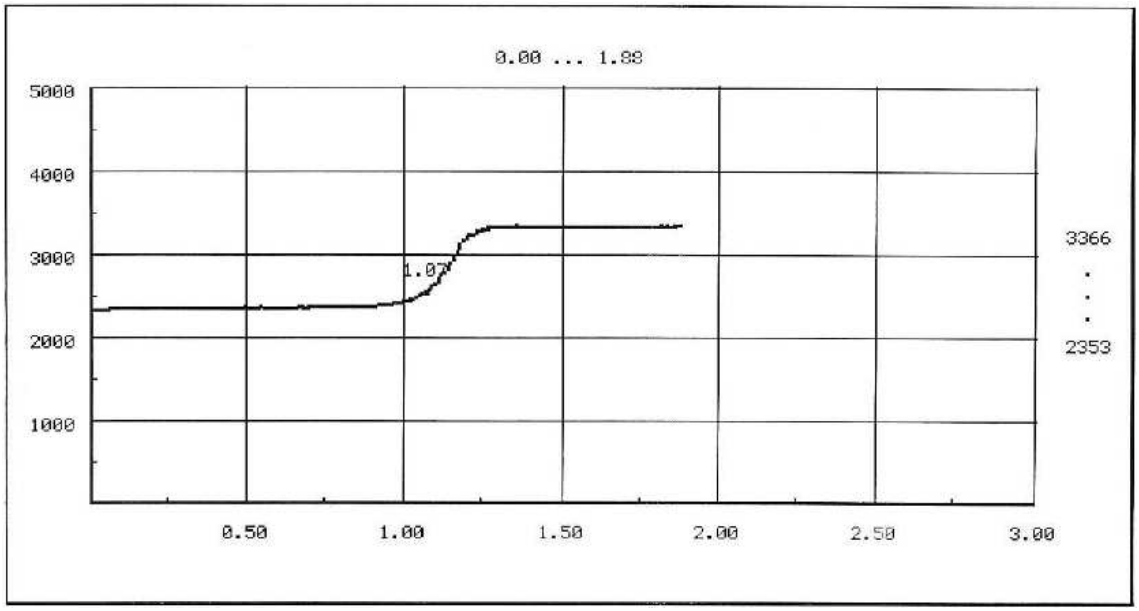


Abbildung 34: *Pseudomonas* spp. in Konzentration C nach einer Woche Lagerung bei 7 °C

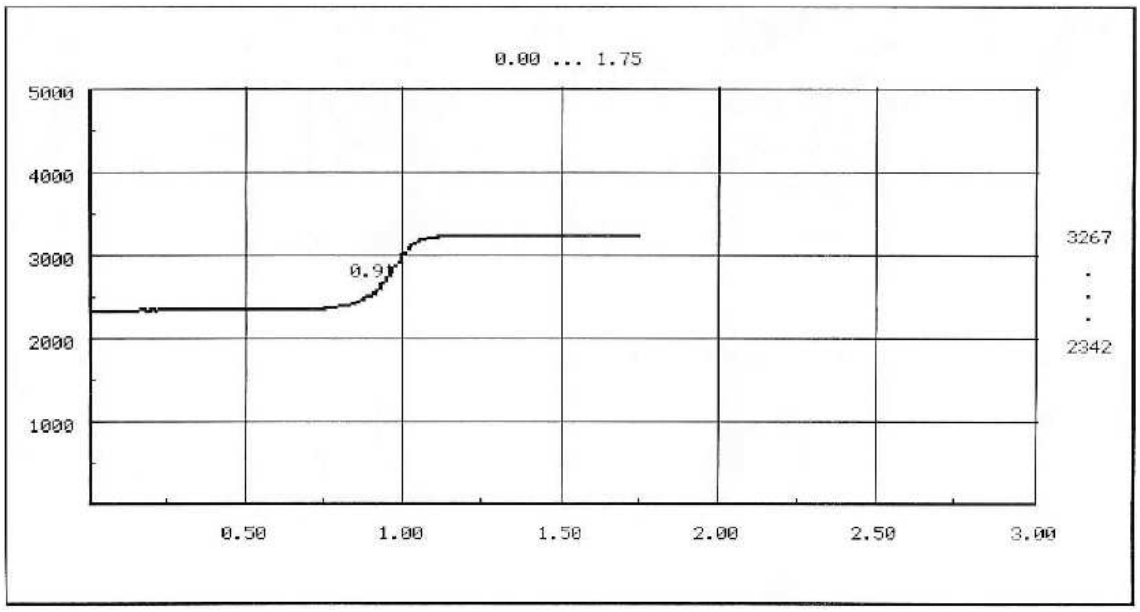


Abbildung 35: *Pseudomonas* spp. in Konzentration C nach zwei Wochen Lagerung bei 7 °C

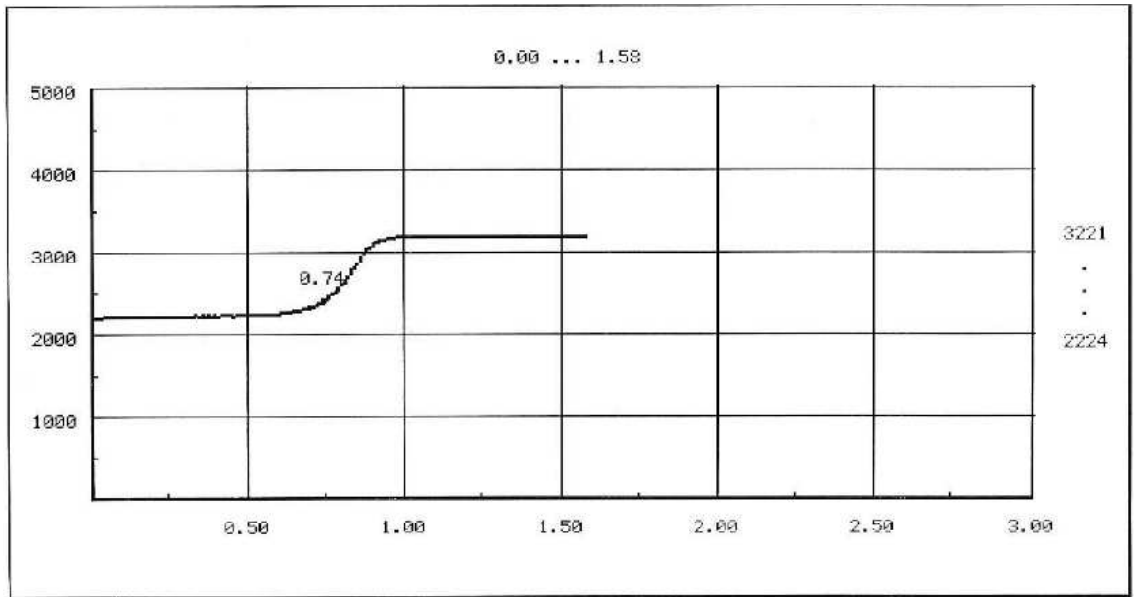


Abbildung 36: *Bacillus* spp. in Konzentration C nach 24 h Lagerung bei 7 °C

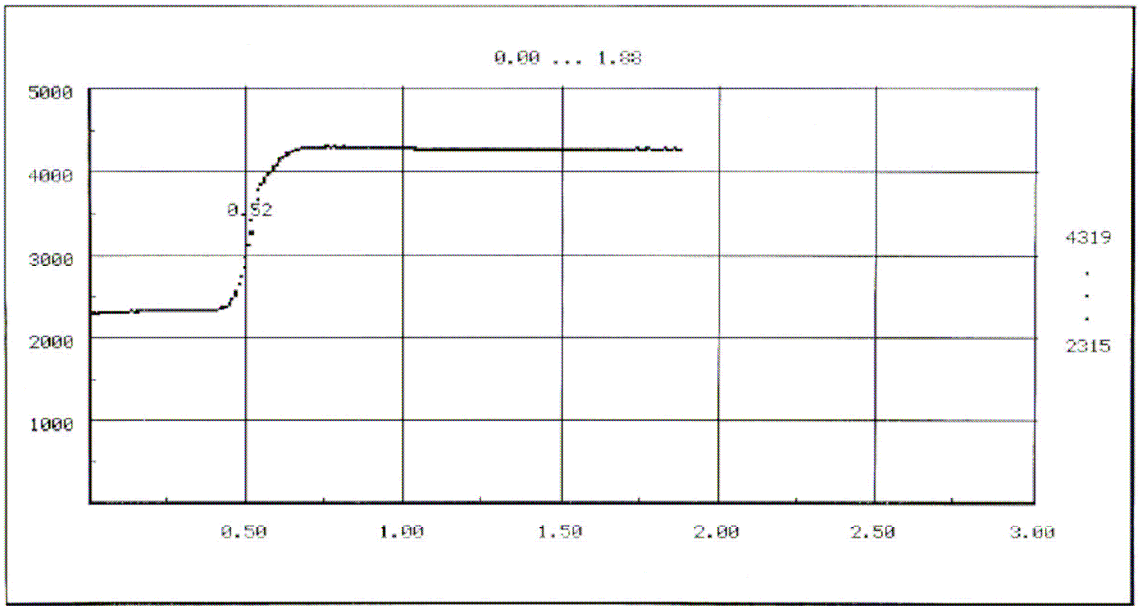


Abbildung 37: *Bacilluss* spp. in Konzentration C nach einer Woche Lagerung bei 7 °C

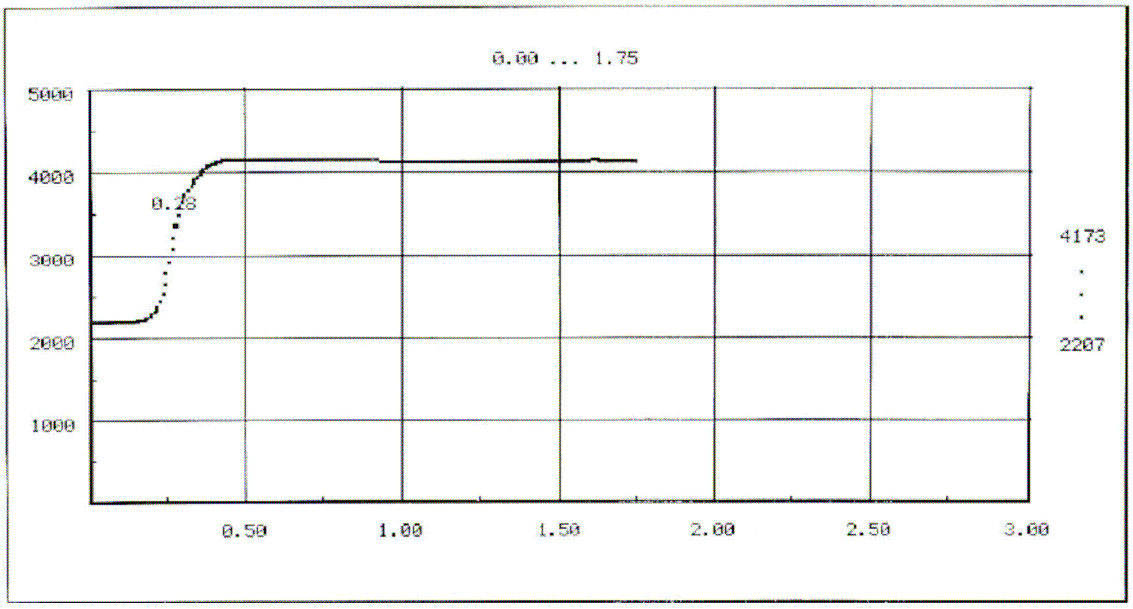


Abbildung 38: *Bacillus* spp. in Konzentration C nach zwei Wochen Lagerung bei 7 °C

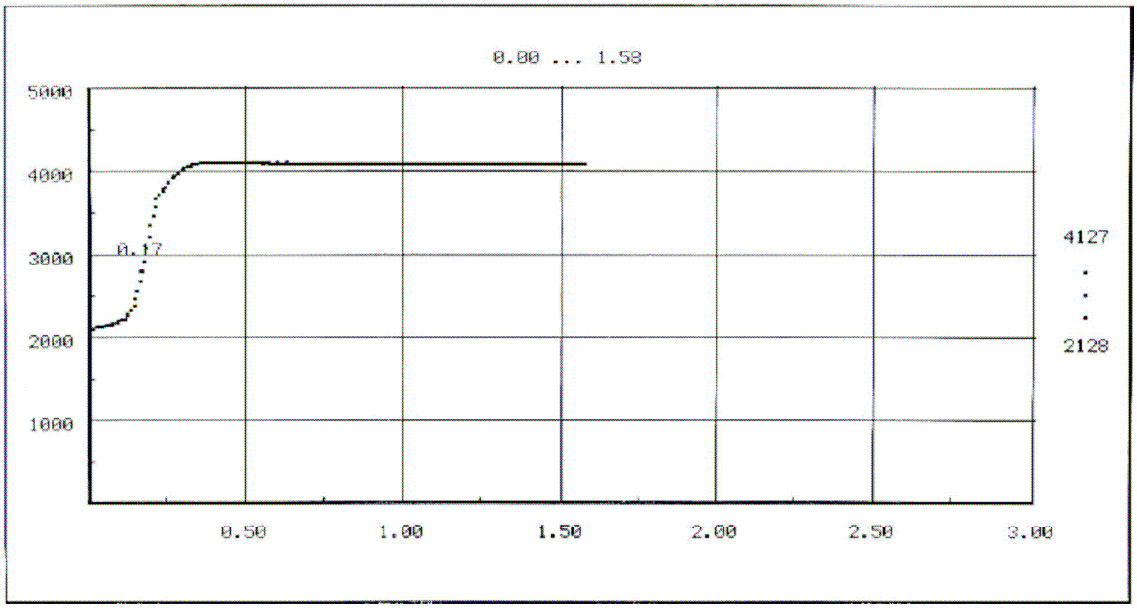


Abbildung 39: *Staphylococcus* spp. in Konzentration C nach 24 h Lagerung bei 7 °C

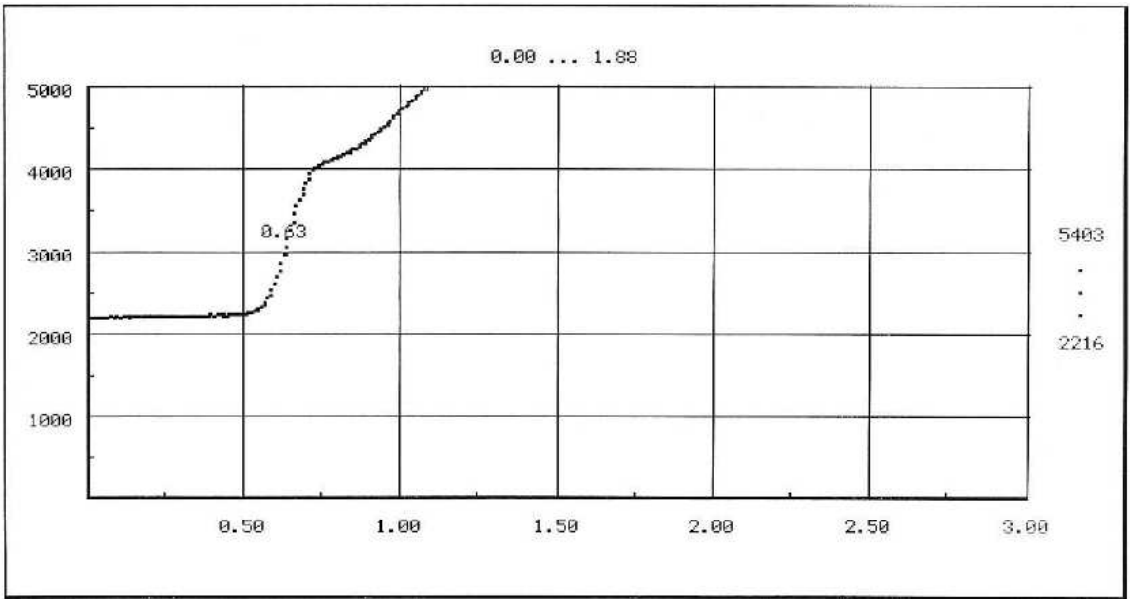


Abbildung 40: *Staphylococcus* spp. in Konzentration C nach einer Woche Lagerung bei 7 °C

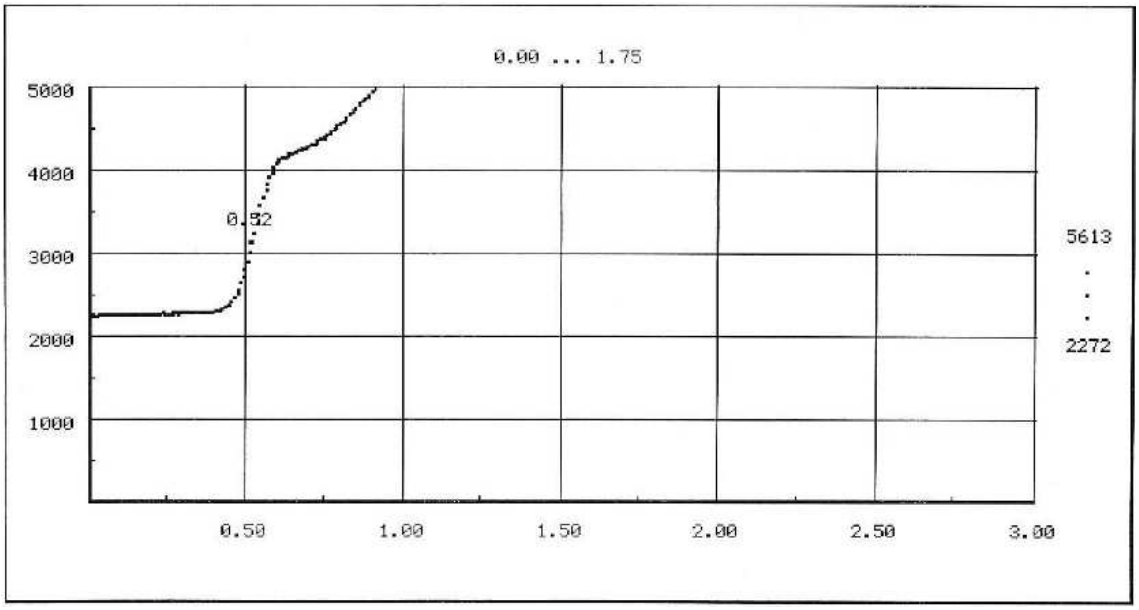


Abbildung 41:*Staphylococcus* spp. in Konzentration C nach zwei Wochen Lagerung bei 7 °C

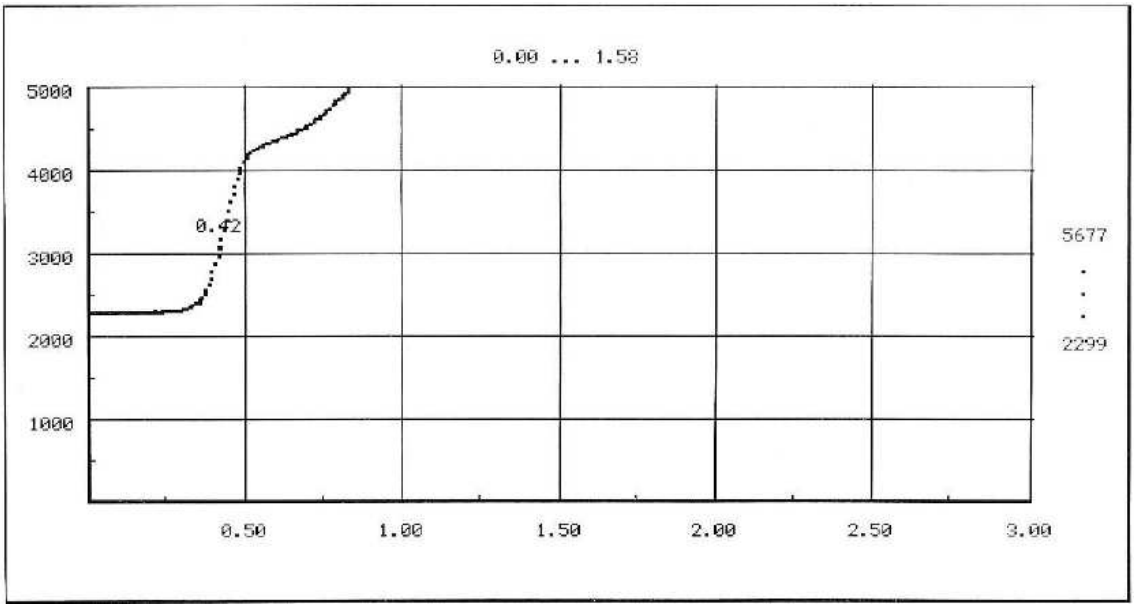


Abbildung 42: *E. coli* in Konzentration A nach 24-stündiger Lagerung bei 7 °C

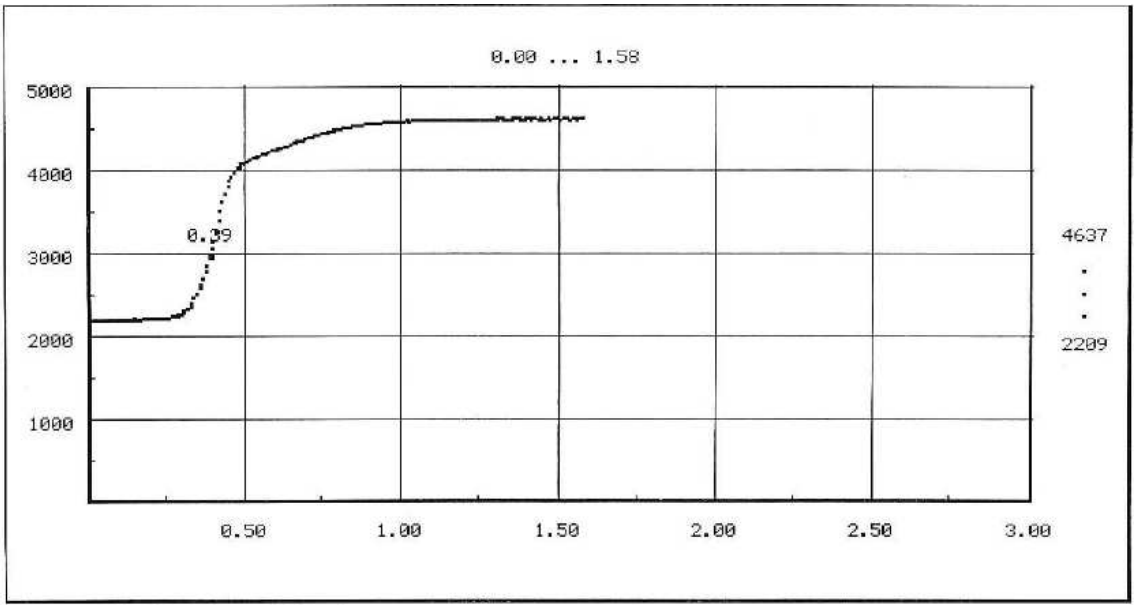


Abbildung 43: *E. coli* in Konzentration B nach 24-stündiger Lagerung bei 7 °C

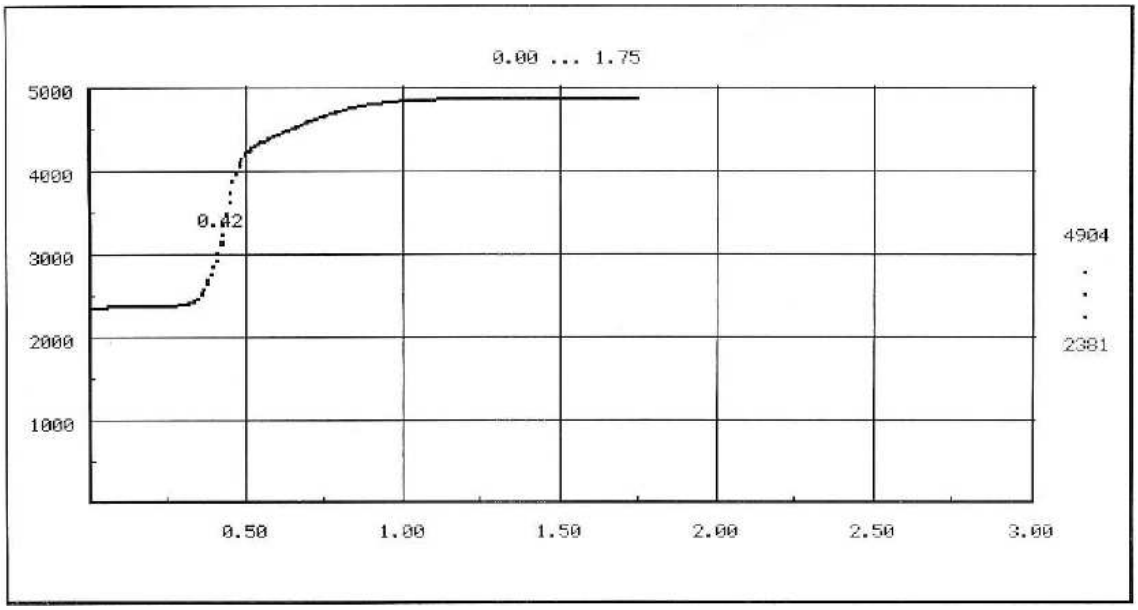


Abbildung 44: *E. coli* in Konzentration C nach 24-stündiger Lagerung bei 7 °C

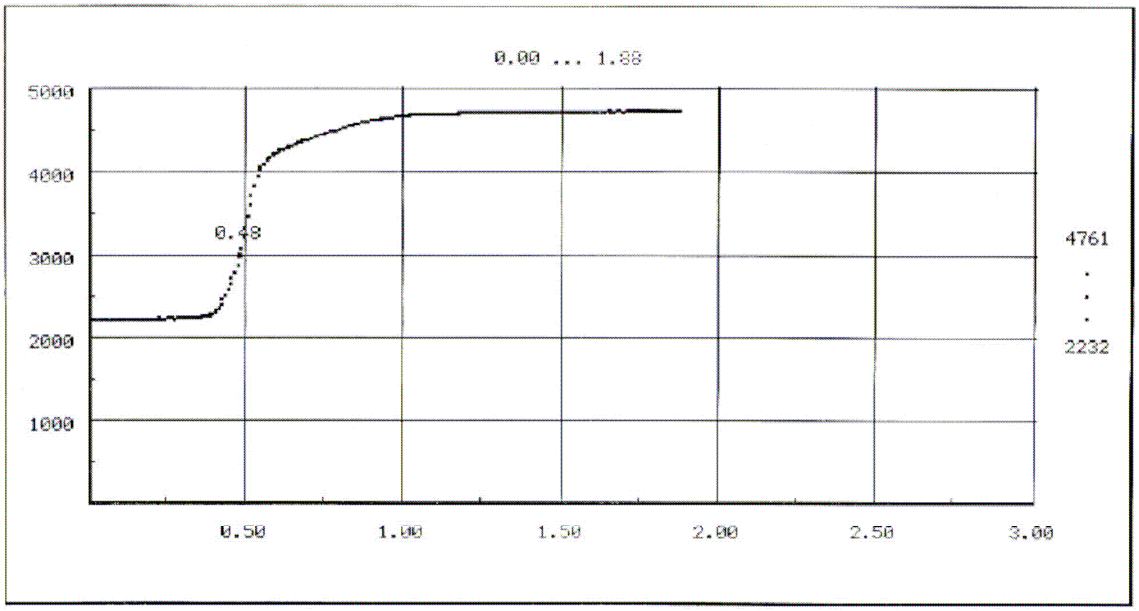


Abbildung 45: *E. coli* in Konzentration A nach einer Woche Lagerung bei 7 °C

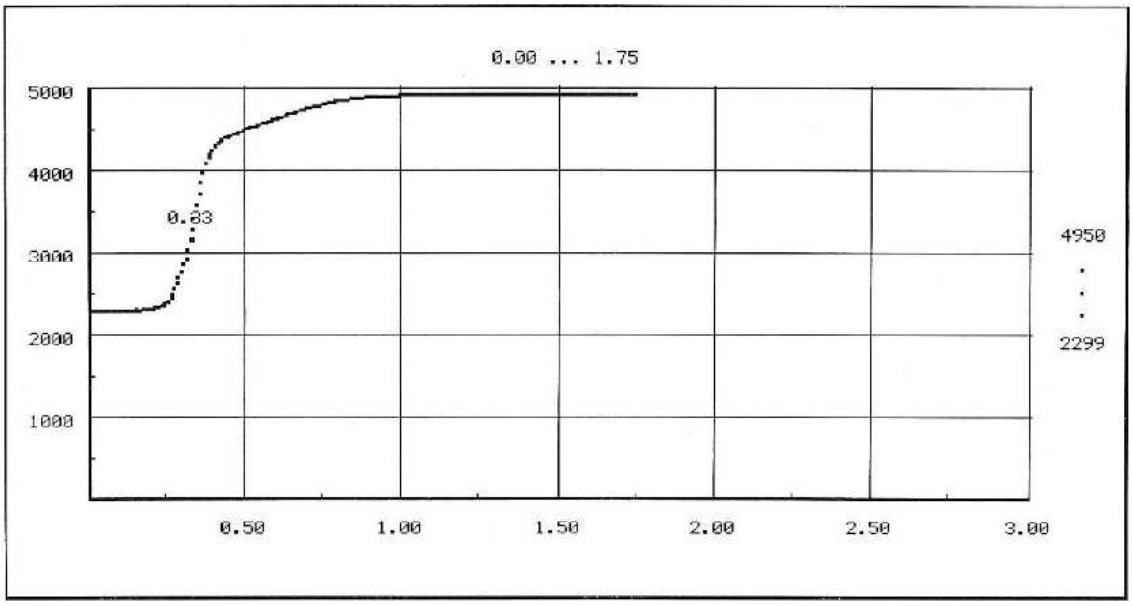


Abbildung 46: *E. coli* in Konzentration B nach einer Woche Lagerung bei 7 °C

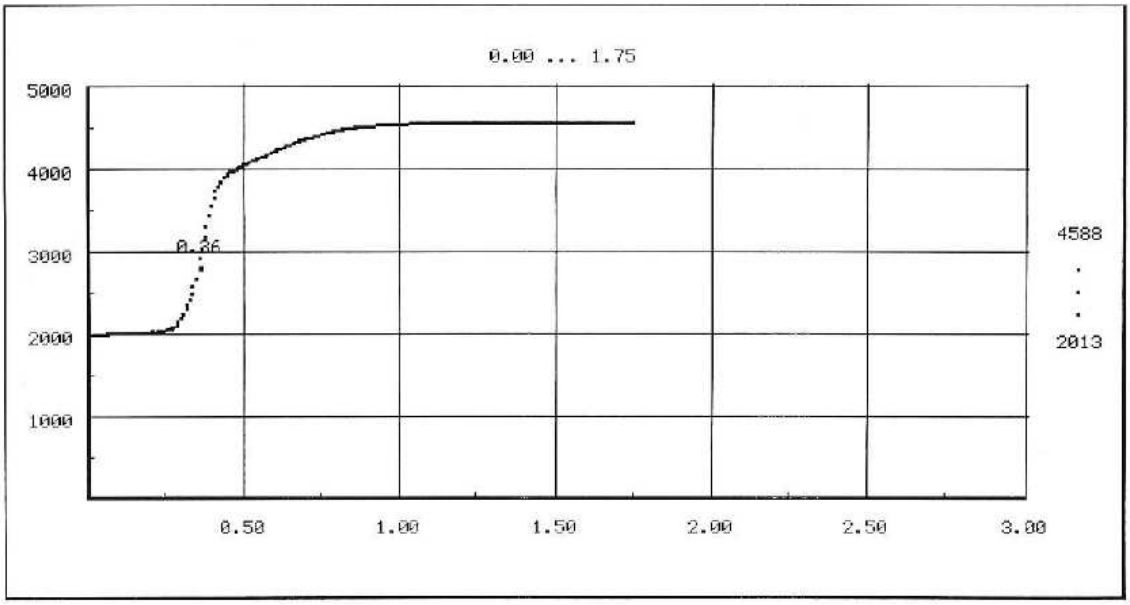
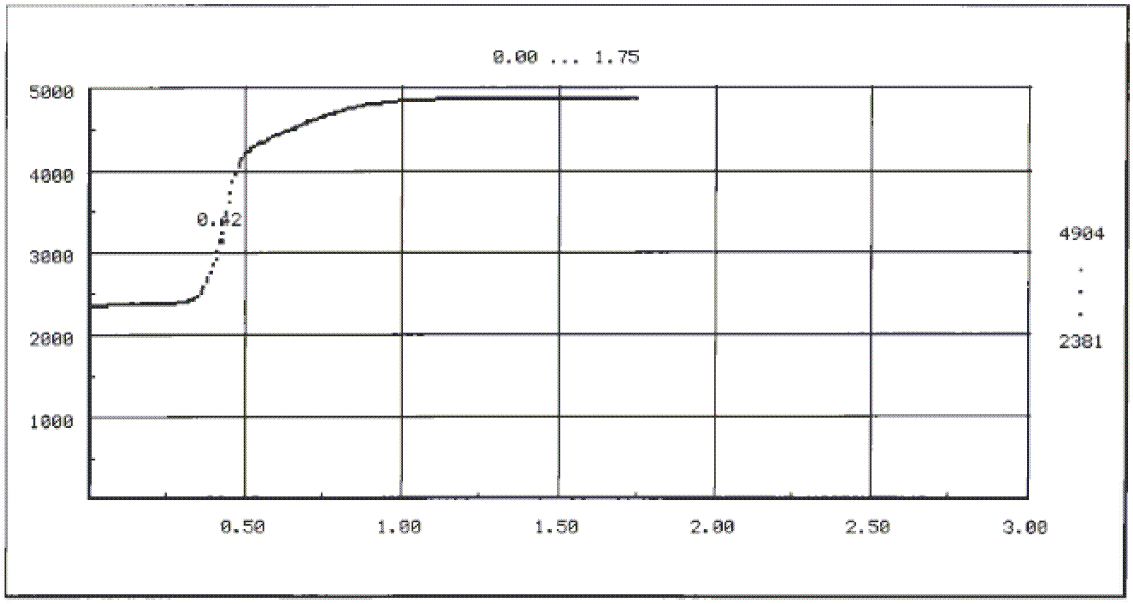


Abbildung 47: E. coli in Konzentration C nach einer Woche Lagerung bei 7 °C



9.2 MicroFoss Wachstumskurven (TVC-Medium)

Abbildung 48: *Bacillus* spp. in Konzentration A, B und C – sowie Sterilkontrolle – nach 24-stündiger Lagerung bei 7 °C

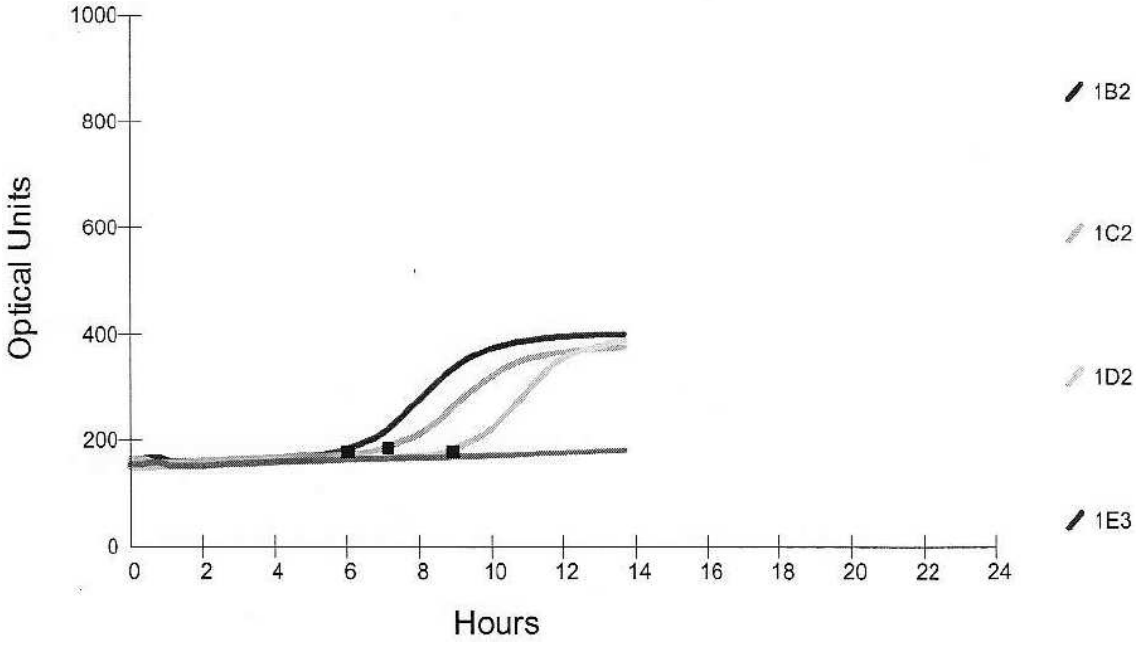


Abbildung 49: *Bacillus* spp. in Konzentration A, B und C – sowie Sterilkontrolle – nach einer Woche Lagerung bei 7 °C

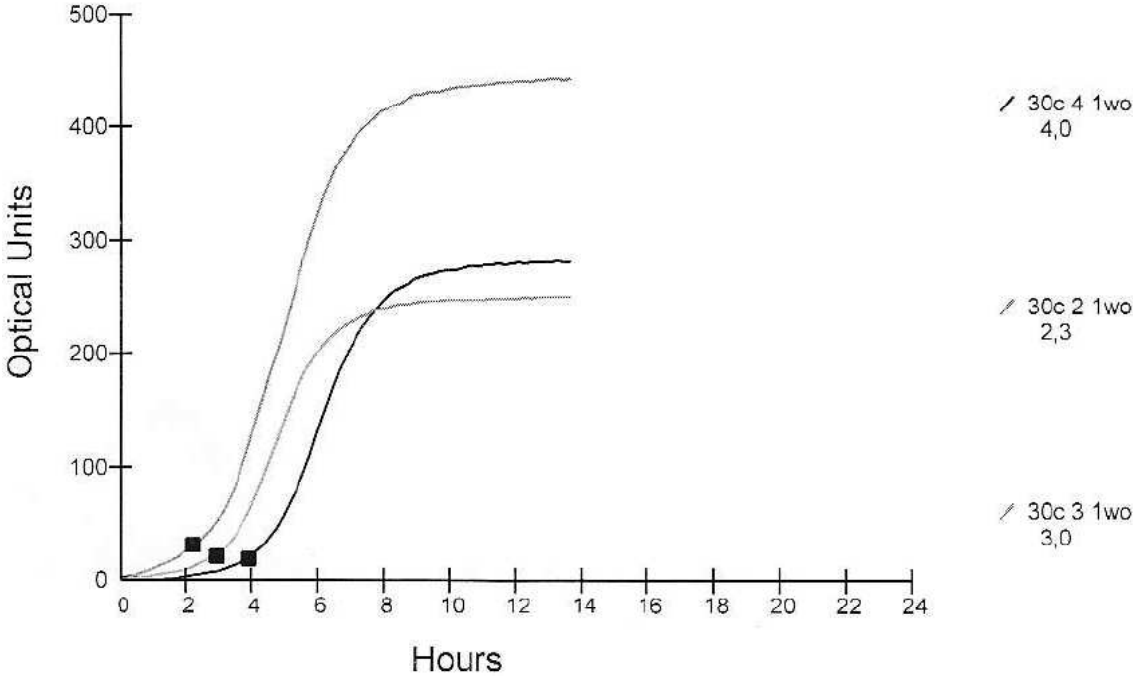


Abbildung 50: *Bacillus* spp. in Konzentration A, B und C – sowie Sterilkontrolle – nach zwei Wochen Lagerung bei 7 °C

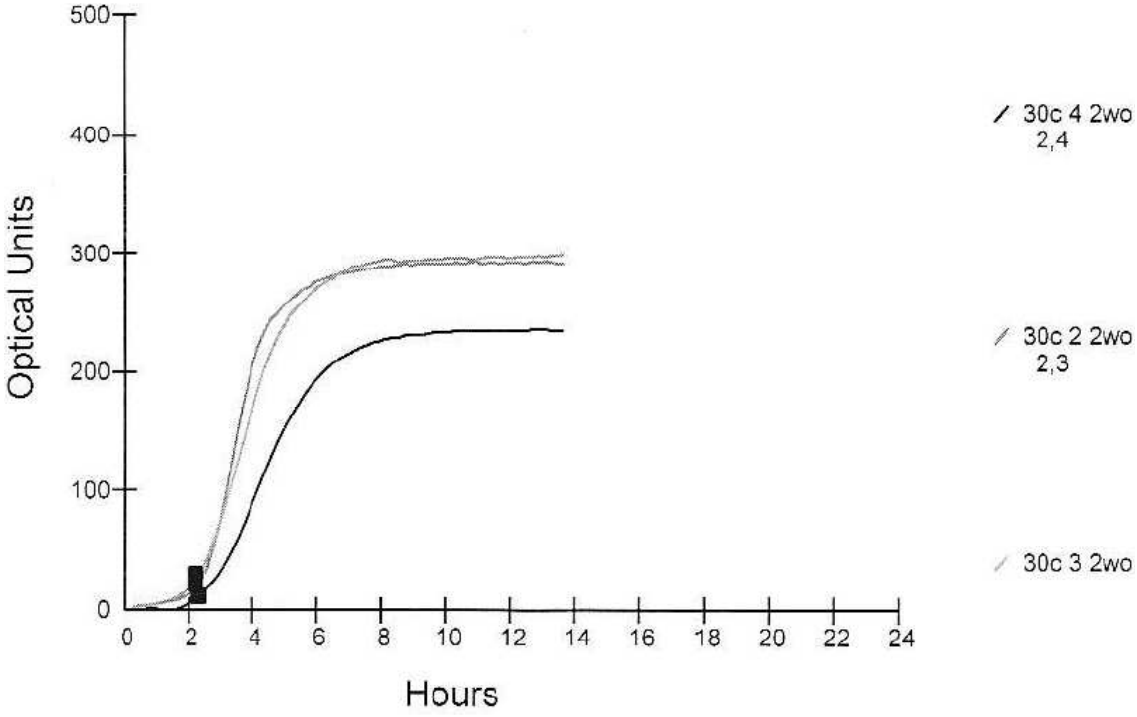


Abbildung 51: *Staphylococcus* spp. in Konzentration A, B und C – sowie Sterilkontrolle – nach 24-stündiger Lagerung bei 7 °C

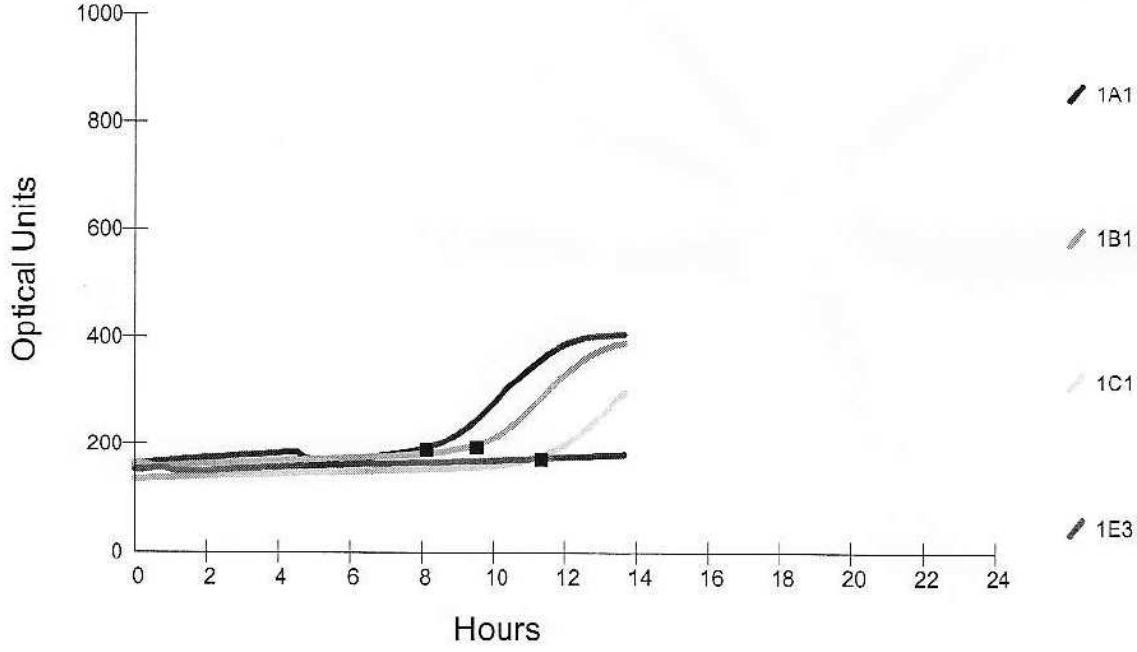


Abbildung 52: *Staphylococcus* spp. in Konzentration A, B und C – sowie Sterilkontrolle – nach einer Woche Lagerung bei 7 °C

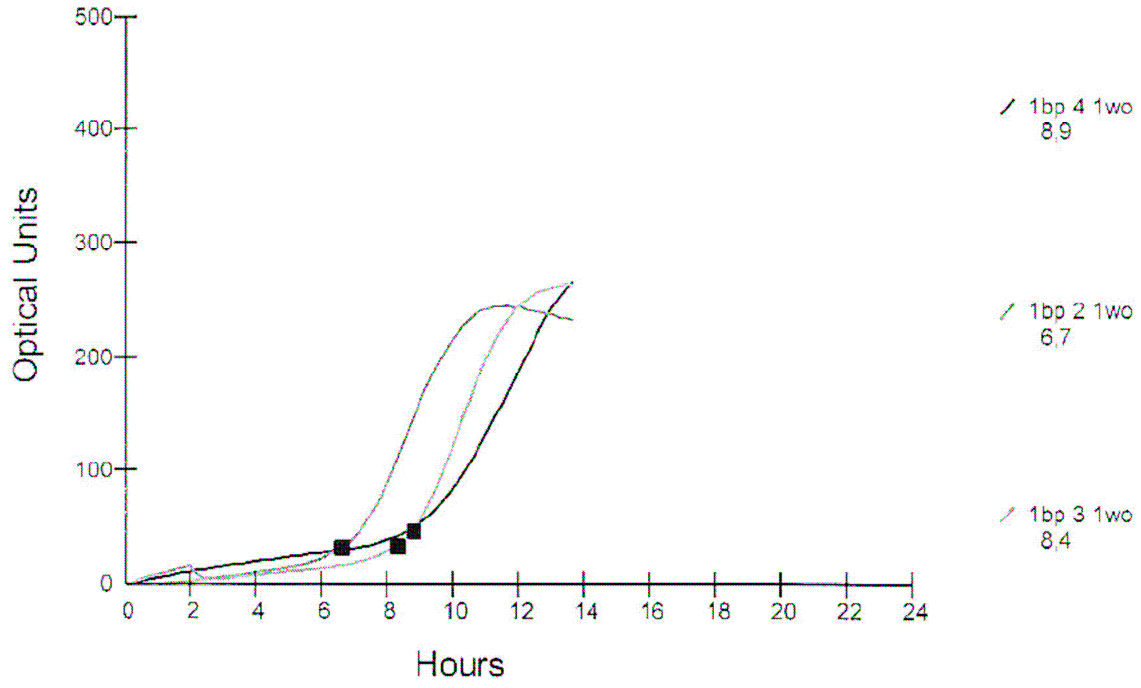


Abbildung 53: *Staphylococcus* spp. in Konzentration A, B und C – sowie Sterilkontrolle – nach zwei Wochen Lagerung bei 7 °C

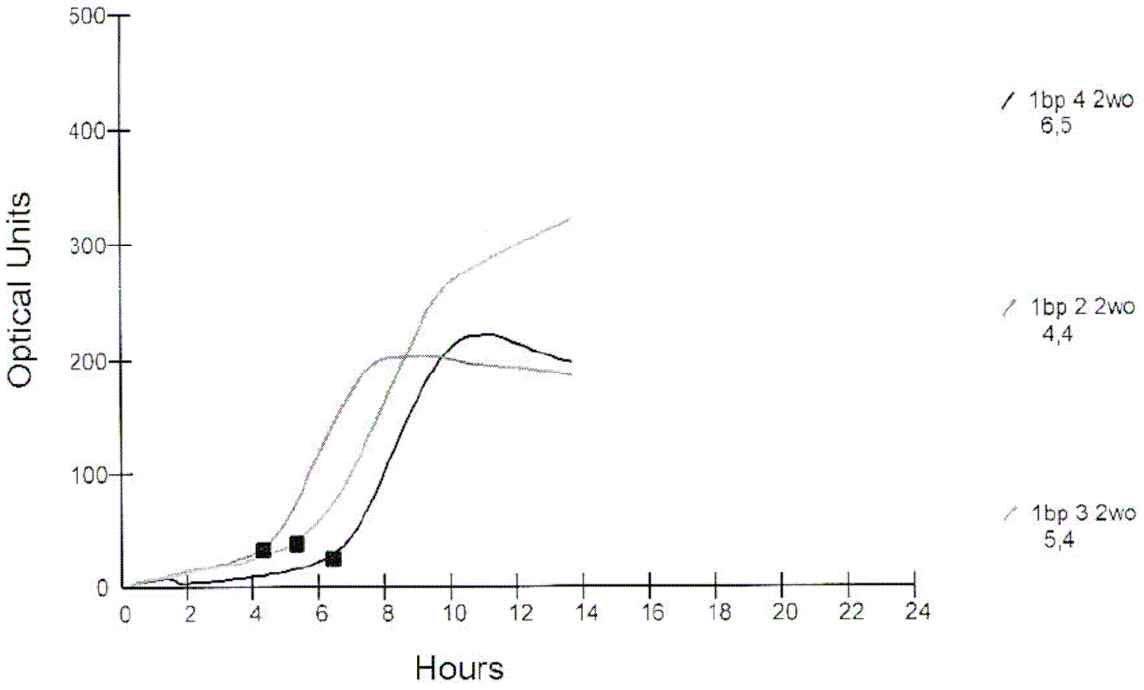


Abbildung 54: *E. coli* in Konzentration A, B und C – sowie Sterilkontrolle – nach 24-stündiger Lagerung

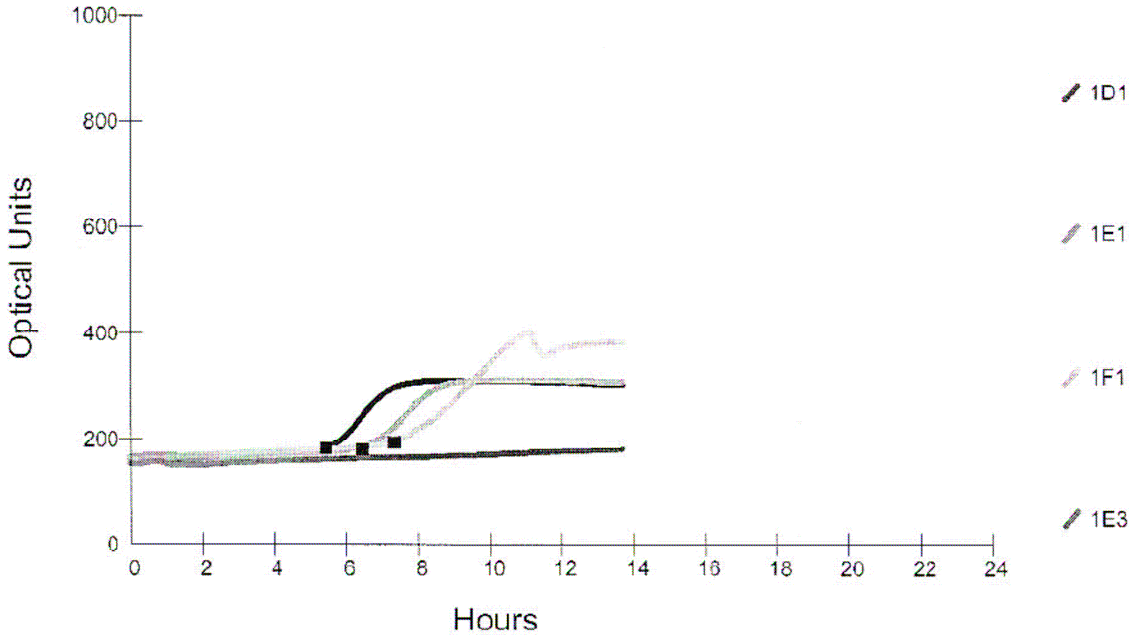


Abbildung 55: *E. coli* in Konzentration A, B und C – sowie Sterilkontrolle – nach einwöchiger Lagerung bei 7 °C

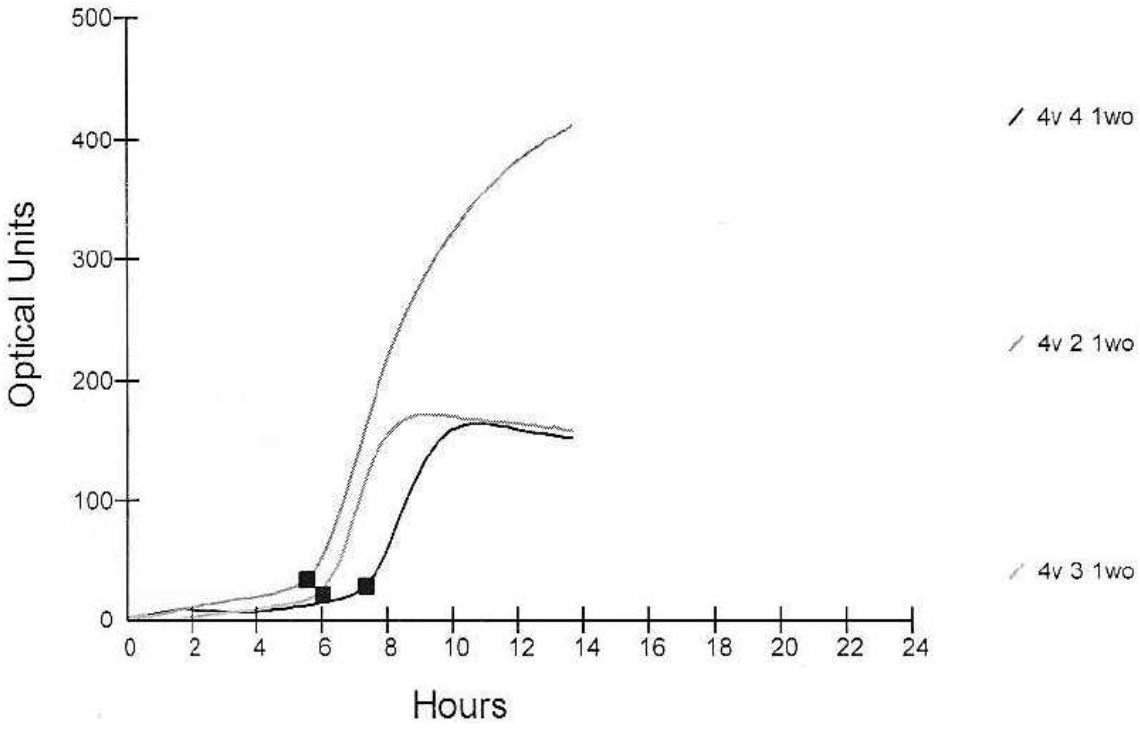
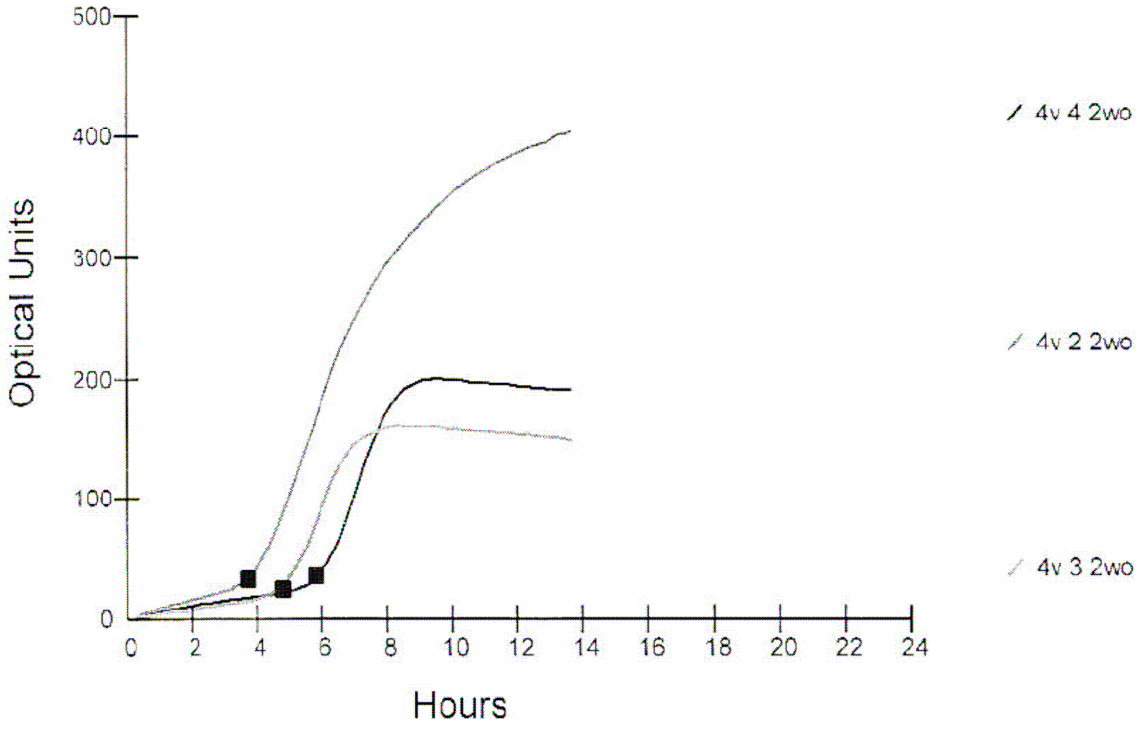


Abbildung 56: *E. coli* in Konzentration A, B und C – sowie Sterilkontrolle – nach zweiwöchiger Lagerung bei 7 °C



9.3 Ergebnisse des Versuchs 2 im Detail – Gesamtkeimzahl-bestimmung

Tabelle 19: Mittels Referenzverfahrens erhaltene Ergebnisse der Gesamtkeimzahlbestimmung nach 24-stündiger Lagerung bei 7 °C

Referenzverfahren	***Ansatz 1***	***Ansatz 2***	***Ansatz 3***	***Ansatz 4***	***Ansatz 5***	***M***	***STD***	***MEDIAN***	***MIN***	***MAX***
***Staphylococcus* spp.**										
Konzentration A	910	860	860	930	820	876	43,93	860	820	930
Konzentration B	85	94	97	84	77	87	8,08	85	77	97
Konzentration C	13	10	10	15	8	11	2,77	10	8	15
***Micrococcus* spp.**										
Konzentration A	918	982	855	973	1118	969	97,45	973	855	1118
Konzentration B	104	74	85	113	96	94	15,37	96	74	113
Konzentration C	6	12	7	8	5	8	2,70	7	5	12
***Enterobacter* spp.**										
Konzentration A	182	245	173	300	245	229	52,20	245	173	300
Konzentration B	19	13	11	15	17	15	3,16	15	11	19
Konzentration C	0	2	11	3	1	3	4,39	2	0	11
E. coli										
Konzentration A	6.200	7.000	6.200	6.580	6.080	6.412	378,84	6.200	6.080	7.000
Konzentration B	466	510	492	426	454	470	32,75	466	426	510
Konzentration C	74	66	75	69	75	72	4,09	74	66	75
Mischflora										
Konzentration A	730	890	640	1.200	990	890	220,34	890	640	1.200
Konzentration B	82	64	36	109	64	71	26,87	64	36	109
Konzentration C	8	7	8	7	6	7	0,84	7	6	8

Tabelle 20: Mittels CellScan erhaltene Ergebnisse der Gesamtkeimzahlbestimmung nach 24-stündiger Lagerung bei 7 °C

CellScan	*Ansatz 1*	*Ansatz 2*	*Ansatz 3*	*Ansatz 4*	*Ansatz 5*	*M*	*STD*	*MEDIAN*	*MIN*	*MAX*
***Staphylococcus* spp.**										
Konzentration A	28.978	25.407	31.972	40.074	37.901	32.866	6.100	31.972	25.407	40.074
Konzentration B	29.654	32.491	39.605	26.278	23.089	30.223	6.323	29.654	23.089	39.605
Konzentration C	36.571	39.942	37.329	31.354	61.860	41.411	11.849	37.329	31.354	61.860
***Micrococcus* spp.**										
Konzentration A	28.521	31.556	29.005	27.990	30.873	29.589	1.546	29.005	27.990	31.556
Konzentration B	25.179	23.720	24.745	26.245	25.234	25.025	913	25.179	23.720	26.245
Konzentration C	25.157	23.665	25.768	26.002	21.080	24.334	2.034	25.157	21.080	26.002
***Enterobacter* spp.**										
Konzentration A	38.451	41.890	37.669	39.567	35.970	38.709	2.208	38.451	35.970	41.890
Konzentration B	25.417	24.866	26.379	25.003	23.910	25.115	897	25.003	23.910	26.379
Konzentration C	26.783	25.907	27.132	24.957	28.300	26.616	1.263	26.783	24.957	28.300
E. coli										
Konzentration A	28.978	24.689	24.078	21.232	26.268	25.049	2.853	24.689	21.232	28.978
Konzentration B	30.428	27.134	34.916	30.938	31.667	31.017	2.786	30.938	27.134	34.916
Konzentration C	34.931	30.269	27.221	35.659	34.754	32.567	3.667	34.754	27.221	35.659
Mischflora										
Konzentration A	25.639	23.241	26.828	30.109	24.076	25.979	2.693	25.639	23.241	30.109
Konzentration B	29.335	29.533	26.452	28.502	31.717	29.108	1.901	29.335	26.452	31.717
Konzentration C	27.632	22.817	19.731	20.915	28.708	23.961	4.015	22.817	19.731	28.708

Tabelle 21: Mittels BacT/ALERT erhaltene Ergebnisse der Gesamtkeimzahlbestimmung nach 24-stündiger Lagerung bei 7 °C

BacT/ALERT	*Ansatz 1*	*Ansatz 2*	*Ansatz 3*	*Ansatz 4*	*Ansatz 5*	*M*	*STD*	*MEDIAN*	*MIN*	*MAX*
***Staphylococcus* spp.**										
Konzentration A	12,96	13,44	13,44	13,44	13,44	13,34	0,21	13,44	12,96	13,44
Konzentration B	14,88	15,36	15,36	15,36	14,88	15,17	0,26	15,36	14,88	15,36
Konzentration C	17,52	17,76	17,76	18,24	18,00	17,86	0,27	17,76	17,52	18,24
***Micrococcus* spp.**										
Konzentration A	14,40	14,64	14,64	14,16	13,92	14,35	0,31	14,40	13,92	14,64
Konzentration B	17,04	17,04	17,04	17,04	17,04	17,04	0,00	17,04	17,04	17,04
Konzentration C	19,20	19,20	19,20	18,72	18,72	19,01	0,26	19,20	18,72	19,20
***Enterobacter* spp.**										
Konzentration A	11,04	11,28	11,52	11,52	11,28	11,33	0,20	11,28	11,04	11,52
Konzentration B	13,20	13,20	13,44	13,20	12,96	13,20	0,17	13,20	12,96	13,44
Konzentration C	15,12	14,88	15,60	15,36	15,12	15,22	0,27	15,12	14,88	15,60
E. coli										
Konzentration A	8,64	8,40	8,64	8,40	8,40	8,50	0,13	8,40	8,40	8,64
Konzentration B	10,08	10,32	10,32	10,56	10,32	10,32	0,17	10,32	10,08	10,56
Konzentration C	12,00	12,00	12,00	11,76	12,00	11,95	0,11	12,00	11,76	12,00
Mischflora										
Konzentration A	11,76	11,76	12,00	12,00	11,76	11,86	0,13	11,76	11,76	12,00
Konzentration B	13,92	14,40	13,92	13,68	13,92	13,97	0,26	13,92	13,68	14,40
Konzentration C	17,52	15,60	16,08	15,60	14,88	15,94	0,98	15,60	14,88	17,52

Tabelle 22: Mittels MicroFoss erhaltene Ergebnisse der Gesamtkeimzahlbestimmung nach 24-stündiger Lagerung bei 7 °C

MicroFoss	*Ansatz 1*	*Ansatz 2*	*Ansatz 3*	*Ansatz 4*	*Ansatz 5*	*M*	*STD*	*MEDIAN*	*MIN*	*MAX*
***Staphylococcus* spp.**										
Konzentration A	10,20	10,60	10,80	10,60	10,50	10,54	0,22	10,60	10,20	10,80
Konzentration B	12,70	12,50	12,50	12,00	12,40	12,42	0,26	12,50	12,00	12,70
Konzentration C	14,20	14,10	14,30	14,10	14,40	14,22	0,13	14,20	14,10	14,40
***Micrococcus* spp.**										
Konzentration A	11,60	12,00	11,70	11,80	12,10	11,84	0,21	11,80	11,60	12,10
Konzentration B	14,30	14,80	13,60	14,10	13,50	14,06	0,53	14,10	13,50	14,80
Konzentration C	15,50	15,00	16,30	16,10	15,00	15,58	0,61	15,50	15,00	16,30
***Enterobacter* spp.**										
Konzentration A	8,80	8,90	9,10	8,90	9,10	8,96	0,13	8,90	8,80	9,10
Konzentration B	10,60	10,50	10,80	10,70	10,50	10,62	0,13	10,60	10,50	10,80
Konzentration C	14,50	12,50	15,40	14,70	13,10	14,04	1,20	14,50	12,50	15,40
E. coli										
Konzentration A	7,00	7,60	7,20	6,80	7,10	7,14	0,30	7,10	6,80	7,60
Konzentration B	8,80	8,80	8,50	8,60	8,60	8,66	0,13	8,60	8,50	8,80
Konzentration C	10,10	10,20	10,30	9,90	10,00	10,10	0,16	4,44	4,96	4,15
Mischflora										
Konzentration A	9,70	9,70	9,40	10,00	10,10	9,78	0,28	9,70	9,40	10,10
Konzentration B	12,90	11,80	12,70	11,30	11,90	12,12	0,66	11,90	11,30	12,90
Konzentration C	19,90	16,30	13,30	13,20	16,60	15,86	2,77	16,30	13,20	19,90

9.4 Ergebnisse des Versuchs 2 im Detail – *Enterobacteriaceae*-Keimzahl

Tabelle 23: Mittels Referenzverfahrens erhaltene Ergebnisse der *Enterobacteriaceae*-Keimzahlbestimmung nach 24-stündiger Lagerung bei 7 °C

Referenzmethode	***Ansatz 1***	***Ansatz 2***	***Ansatz 3***	***Ansatz 4***	***Ansatz 5***	***M***	***STD***	***MEDIAN***	***MIN***	***MAX***
***E. coli* 1)**										
Konzentration A	2.282	1.873	2.018	1.855	1.800	1.966	194,35	1.873	1.800	2.282
Konzentration B	138	96	95	69	130	106	28,24	96	69	138
Konzentration C	4	4	5	2	5	4	1,22	4	2	5
***E. coli 2*)**										
Konzentration A	1.040	560	690	530	935	751	227,17	690	530	1.040
Konzentration B	64	45	27	45	36	43	13,72	45	27	64
Konzentration C	2	3	2	4	2	3	0,89	2	2	4
***Enterobacter* spp.**										
Konzentration A	710	490	880	1.030	730	768	202,04	730	490	1.030
Konzentration B	36	55	155	36	64	69	49,48	55	36	155
Konzentration C	9	8	5	8	7	7	1,52	8	5	9
Mischflora										
Konzentration A	764	782	418	673	573	642	150,32	673	418	782
Konzentration B	26	24	19	24	15	22	4,51	24	15	26
Konzentration C	1	2	0	1	1	1	0,71	1	0	2

Tabelle 24: Mittels CellScan erhaltene Ergebnisse der *Enterobacteriaceae*-Keimzahlbestimmung nach 24-stündiger Lagerung bei 7 °C

CellScan	***Ansatz 1***	***Ansatz 2***	***Ansatz 3***	***Ansatz 4***	***Ansatz 5***	***M***	***STD***	***MEDIAN***	***MIN***	***MAX***
***E. coli* 1)**										
Konzentration A	15.123	14.876	11.956	17.265	15.367	14.917	1.906	15.123	11.956	17.265
Konzentration B	19.770	20.713	21.730	18.200	21.901	20.463	1.528	20.713	18.200	21.901
Konzentration C	21.284	22.340	19.230	20.105	23.410	21.274	1.677	21.284	19.230	23.410
***E. coli 2*)**						.				
Konzentration A	26.389	17.663	10.551	14.728	8.279	15.522	7.080	14.728	8.279	26.389
Konzentration B	29.571	35.432	27.484	19.434	27.362	27.857	5.737	27.484	19.434	35.432
Konzentration C	30.466	18.613	28.198	33.237	45.154	31.134	9.576	30.466	18.613	45.154
***Enterobacter* spp.**										
Konzentration A	25.740	18.623	28.732	28.034	21.481	24.522	4.347	25.740	18.623	28.732
Konzentration B	32.017	30.147	24.468	29.551	30.944	29.425	2.921	30.147	24.468	32.017
Konzentration C	24.315	34.534	32.963	32.504	31.455	31.154	3.981	32.504	24.315	34.534
Mischflora										
Konzentration A	34.992	38.422	19.050	24.560	28.734	29.152	7.800	28.734	19.050	38.422
Konzentration B	34.970	24.580	20.017	19.865	21.873	24.261	6.281	21.873	19.865	34.970
Konzentration C	19.843	16.495	13.679	23.170	18.326	18.303	3.561	18.326	13.679	23.170

Tabelle 25: Mittels BacT/ALERT erhaltene Ergebnisse der *Enterobacteriaceae*-Keimzahlbestimmung nach 24-stündiger Lagerung bei 7 °C

BacT/ALERT	***Ansatz 1***	***Ansatz 2***	***Ansatz 3***	***Ansatz 4***	***Ansatz 5***	***M***	***STD***	***MEDIAN***	***MIN***	***MAX***
***E. coli* 1)**										
Konzentration A	9,12	9,36	9,36	9,36	9,36	9,31	0,11	9,36	9,12	9,36
Konzentration B	11,04	10,80	11,04	10,80	10,32	10,80	0,29	10,80	10,32	11,04
Konzentration C	12,48	12,72	12,48	12,72	11,52	12,38	0,50	12,48	11,52	12,72
***E. coli 2*)**										
Konzentration A	12,96	13,20	13,20	13,44	12,96	13,15	0,20	13,20	12,96	13,44
Konzentration B	14,64	14,88	14,64	14,4	14,88	14,69	0,20	14,64	14,40	14,88
Konzentration C	neg.	17,76	16,80	17,04	17,04	17,16	0,42	17,04	16,80	17,76
***Enterobacter* spp.**										
Konzentration A	12,72	12,96	13,20	12,96	12,96	12,96	0,17	12,96	12,72	13,20
Konzentration B	12,96	14,40	14,88	13,20	14,40	13,97	0,84	14,40	12,96	14,88
Konzentration C	16,32	15,84	15,6	15,36	15,84	15,79	0,36	15,84	15,36	16,32
Mischflora										
Konzentration A	10,56	10,56	10,32	10,32	10,08	10,37	0,20	10,32	10,08	10,56
Konzentration B	11,28	12,24	12,24	12,24	12,24	12,05	0,43	12,24	11,28	12,24
Konzentration C	12,00	13,44	13,44	13,44	13,20	13,10	0,63	13,44	12,00	13,44

Tabelle 26: Mittels MicroFoss erhaltene Ergebnisse der *Enterobacteriaceae*-Keimzahlbestimmung nach 24-stündiger Lagerung bei 7 °C

MicroFoss	***Ansatz 1***	***Ansatz 2***	***Ansatz 3***	***Ansatz 4***	***Ansatz 5***	***M***	***STD***	***MEDIAN***	***MIN***	***MAX***
***E. coli* 1)**										
Konzentration A	5,30	5,80	5,40	5,60	5,60	5,54	0,19	5,60	5,30	5,80
Konzentration B	6,80	6,50	7,00	6,50	6,90	6,74	0,23	6,80	6,50	7,00
Konzentration C	7,60	7,70	7,70	7,60	7,80	7,68	0,08	7,70	7,60	7,80
***E. coli 2*)**										
Konzentration A	7,00	7,40	7,40	7,30	7,60	7,34	0,22	7,40	7,00	7,60
Konzentration B	8,40	8,20	8,60	8,30	8,30	8,36	0,15	8,30	8,20	8,60
Konzentration C	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.					
***Enterobacter* spp.**										
Konzentration A	7,00	7,40	8,00	7,50	7,60	7,50	0,36	7,50	7,00	8,00
Konzentration B	7,60	9,00	8,50	8,40	9,00	8,50	0,57	8,50	7,60	9,00
Konzentration C	9,70	9,60	10,70	9,50	10,10	9,92	0,49	9,70	9,50	10,70
Mischflora										
Konzentration A	6,00	6,00	5,90	6,40	6,10	6,08	0,19	6,00	5,90	6,40
Konzentration B	7,40	7,20	7,40	7,70	7,50	7,44	0,18	7,40	7,20	7,70
Konzentration C	8,50	8,50	8,70	8,50	9,50	8,74	0,43	8,50	8,50	9,50

Lebenslauf

Persönliches

Name	**Rückerl Irene**
Geburtstag und -ort	15. September 1984, Mödling

Ausbildung

2004-2010

Diplomstudium Ernährungswissenschaften

Universität Wien

1995-2003

BG Baden Biondekgasse

Praktika und studienrelevante Berufstätigkeit

Seit Juli 2009

Medizinisch-technische Fachkraft, Veterinärmedizinische Universität Wien, Institut für Milchhygiene

August bis Oktober 2008

Qualitätsmanagement – Projektdurchführung, NÖM AG

Juni 2008

Praktikantin Qualitätssicherung – Labor, NÖM AG

Oktober 2007 bis Juli 2008

Probenvorbereitung, Abteilung organische Analytik, Umweltbundesamt GmbH

August und September 2007

Praktikantin Mikrobiologielabor, LVA Lebensmittelversuchsanstalt

Februar bis Juni 2007

Mitarbeit „HELENA“-Studie, Medizinische Universität Wien, Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde, Abteilung für Ernährungsmedizin

Februar 2007

Mitarbeit „NutritionDay in European Hospitals, AKE Arbeitsgemeinschaft Klinische Ernährung