

Klaus Pichhardt

Lebensmittel- mikrobiologie

Grundlagen für die Praxis

Vierte, überarbeitete Auflage

Mit 106 Abbildungen



Springer

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	
1.1	Präventive Lebensmittelhygiene	1
1.1.1	Aufgabe und Bedeutung der Lebensmittelmikrobiologie	1
1.1.2	Anforderung an die lebensmittelmikrobiologische Analytik	5
1.1.3	Bakterien-Systematik	6
1.1.4	Bakterienklassifikation nach physiologischen Merkmalen	7
1.1.5	Temperatur als Selektionshilfe	8
1.1.6	Mikroorganismen für die Beurteilung von Lebensmitteln	9
1.2	Umgang mit Mikroorganismen	10
1.2.1	Kriterien für die Klassifikation von Mikroorganismen und Krankheitserregern nach Gefährdungspotential und Infektionsrisiko	11
1.2.1.1	Klassifizierung der Bakterien	12
1.2.1.2	Klassifizierung der Pilze	13
1.2.2	Grundregeln guter mikrobiologischer Technik	13
1.2.3	Anforderung an Laboratorien für das Arbeiten mit Bakterien und Pilzen	14
2	Techniken - Verfahren - Nährböden - Untersuchungsmethoden	
2.1	Laboraausstattung	15
2.1.1	Ausrüstung für das mikrobiologische Labor	15
2.1.1.1	Apparate und technische Hilfsmittel	15
2.1.1.2	Glas- und Kunststoffartikel	18
2.1.1.3	Utensilien für die Probenahme	18

2.2	Nährböden	19
2.2.1	Herstellung von Nährböden	20
2.2.1.1	Wasserqualität für Nährmedien	21
2.2.1.2	Lösen von Trockennährmedien	21
2.2.1.3	pH-Wert-Einstellung	22
2.2.1.4	Sterilisieren von Nährmedien	22
2.2.1.5	Gießen der Nährböden	22
2.2.1.6	Trocknen und Vorbebrühen der Nährböden	22
2.2.2	Nährböden in Kulturröhrchen	23
2.2.3	Lagerung gebrauchsfertiger Nährböden	24
2.3	Sterilisationsverfahren	24
2.3.1	Sterilisation durch feuchte Hitze	24
2.3.1.1	Tyndallisation	27
2.3.2	Sterilisation durch trockene Hitze	27
2.3.3	Sterilisation durch Ausglühen oder Abflammen	27
2.3.4	Sterilisation durch Filtration	28
2.3.5	Sterilitätsprüfung von Medien und Laborgeräten	28
2.4	Untersuchungsgang	28
2.4.1	Die Probenahme	28
2.4.1.1	Produktspezifische Probenahmetechniken und Probeaufbereitungen	29
2.4.2	Verdünnung der Lebensmittelprobe	31
2.4.3	Verhältnis der Probemenge zur Verdünnungsflüssigkeit	31
2.4.4	Verdünnungsreihe	32
2.4.4.1	Verdünnungsreihe in Reagenzgläsern	32
2.4.4.2	Verdünnungsreihe in Flaschen	34
2.4.5	Kultivierungsverfahren	34
2.4.5.1	Kochsches Plattengußverfahren	34
2.4.5.2	Oberflächenspatelverfahren	36
2.4.5.3	Plattentropfverfahren	37
2.4.5.4	Petrifilmverfahren	37
2.4.6	Auswertung der bebrüteten Agarplatten	39
2.4.7	Keimzahl- und Mittelwertberechnung	40
2.4.7.1	Keimzahlberechnung	40
2.4.7.2	Mittelwertberechnung	40
2.4.7.3	Einfaches arithmetisches Mittel	42
2.4.7.4	Gewogenes arithmetisches Mittel	42
2.4.8	Anreicherung - Vorkultur	43

2.5	Tauchverfahren zur Ermittlung von Keimgehalten	44
2.5.1	Eintauch- und Kontaktobjektträger	44
2.5.1.1	Anwendungsbereich	45
2.5.1.2	Untersuchungsgang	46
2.5.1.3	Auswertung	46
2.5.1.4	Vorsichtsregeln	46
2.6	Nichtkulturelle und indirekte kulturelle	
v	Keimzahlbestimmungen	47
2.6.1	Direkte Epifluoreszenz-Filter-Technik (DEFT).	48
2.6.2	Limulus-Testverfahren (LAL).	48
2.6.3	Impedanzmessung	49
2.6.4	Adenosintriphosphat-(ATP)-Messung	50
2.6.5	Messung der Gasveränderung	50
2.7	Kultivierungsverfahren	51
2.7.1	Isolierung und Reinkultivierung von Mikroorganismen.	51
2.7.1.1	Ausstrichmethoden	52
2.7.2	Übertragungsmethoden von Mikroorganismen.	53
2.7.2.1	Abimpfverfahren	53
2.7.2.2	Beimpfungsverfahren	53
2.7.3	Aufbewahrung von Mikroorganismen	54
2.7.4	Anaerobierkultur	54
2.7.4.1	Anaerobiertopf	55
2.7.4.2	Anaerobierfolienbeutel	56
2.7.4.3	Deckelgußverfahren (Marinoplatte).	57
2.7.4.4	Wright-Burri-Röhrchen	58
2.8	Membranfilterverfahren	58
2.8.1	Das Filtrationsgerät	59
2.8.2	Filtermaterial	59
2.8.3	Membranfilternährböden	60
2.8.3.1	Agarnährböden	61
2.8.3.2	Nährkartonscheiben (NKS).	61
2.8.4	Untersuchungsmethoden	61
2.8.4.1	Leichtlösliche Lebensmittel	62
2.8.4.2	Schwerlösliche Lebensmittel	63
2.8.4.3	Unlösliche Lebensmittel	63
2.8.5	Membranfilter-Mikrokolonie-Schnellverfahren	63
2.8.5.1	Membranfilter-Mikrokolonie-Methode	64
2.8.5.2	Membranfilter-Mikrokolonie-Fluoreszenz-Methode (MMCF-Methode).	64

2.9	Titer- und Most Probable Number Technik	66
2.9.1	Titerbestimmung	66
2.9.1.1	Beziehung zwischen Titer und Keimzahl	67
2.9.1.2	Beispiel und Auswertung einer Titerbestimmung	67
2.9.2	Most Probable Number-Technik (MPN).	68
2.9.2.1	Durchführung der 9-Röhrchen-Technik	69
2.9.2.2	Durchführung der Methode nach Hess et al. (1969).	71
2.9.3	Rekontaminationstiter	71
2.9.3.1	Durchführung	74
2.9.3.2	Ermittlung der Keimzahl	76
2.10	Färbeverfahren	76
2.10.1	Vitalfärbung - Färbung von Nativpräparaten	77
2.10.2	Intensivfärbung - Färbung von Ausstrichpräparaten	77
2.10.2.1	Herstellung von Ausstrichpräparaten	77
2.10.2.2	Einfache Färbung	79
2.10.3	Sporenfärbung	79
2.10.3.1	Malachit-Safranin-Sporenfärbung	79
2.10.3.2	Carbolfuchsin-Methylenblau-Sporenfärbung	80
2.10.4	Gramfärbung	80
2.10.4.1	Gramnegative Bakterien	82
2.10.4.2	Grampositive Mikroorganismen	82
2.10.4.3	Kristallviolett-Safranin-Gramfärbung	82
2.10.5	Lipidkörperfärbung	83
2.10.6	Färbebank	83
2.10.7	Farbstofflösungen	84
2.11	Betriebshygiene, Bedarfsgegenstände, Keimzahlbestimmungen von Oberflächen, Behältnissen und Luft	84
2.11.1	Abklatschverfahren	84
2.11.1.1	Rodac-Platten - Agaroid-Stangen	85
2.11.2	Abstrichverfahren	85
2.11.3	Abschwemmverfahren	88
2.11.4	Überschichtungsverfahren	89
2.11.5	Keimzahlbestimmung in Flaschen	89
2.11.5.1	Rollflaschen-Methode	90
2.11.5.2	Flaschen-Spül-Methode	91
2.11.6	Bestimmung der Luftkeimzahl	91
2.11.6.1	Sedimentationstest	91

2.11.6.2	Gelatine-Membranfilter-Verfahren	92
2.11.6.3	Impingment-Verfahren	93
2.11.6.4	Impaction-Verfahren	93
2.12	Hemmstoffe	93
2.12.1	Konservierungsstoffe	93
2.12.1.1	Bestimmung der Mindest- oder Grenzhemmkonzentration	94
2.12.1.2	Inhibitive und mikrobizide Konzentration	95
2.12.2	Antibiotika	96
2.12.2.1	Agardiffusionsverfahren	96
2.12.2.2	Arten von Antibiotika-Tests	97
2.12.3	Desinfektionsmittel	98
2.12.3.1	Suspensionsversuch	98
2.13	Stabilitätsprüfung von Konserven und Sterilprodukten in Kartonverpackungen	99
2.13.1	Konserven in autoklavierbaren Verpackungen	99
2.13.1.1	Prüfung der äußeren Dosenbeschaffenheit	100
2.13.1.2	Prüfung bei der Öffnung bombierter Dosen	100
2.13.1.3	Dichtigkeitsprüfung von Konserven	101
2.13.1.4	Stabilitätsprüfung	101
2.13.1.5	Hilfsuntersuchungen	102
2.13.1.6	Stichprobenumfang	103
2.13.2	Kartonverpackungen	103
2.13.2.1	Stabilitätsprüfung mittels Hydrodynamik	103
2.13.2.2	Schwankung des pH-Wertes	104
2.13.2.3	Resazurin-Reduktase-Test	105
2.13.2.4	Kulturelle Prüfung	105
2.13.2.5	Packmittelprüfung	106
2.13.2.6	Stichprobenumfang	107
2.14	Ausgewählte Nährböden, Reaktionsmedien, Seren	108
2.14.1	Auflistung von Nährböden, Reaktionsmedien und Seren für verschiedene Mikroorganismen	109
2.15	Nachweismethoden	114
2.15.1	Gesamtkoloniezahl aerober Mikroorganismen	114
2.15.1.1	Nachweis der aeroben mesophilen Gesamtkoloniezahl	115

2.15.1.2	Nachweis der aeroben thermophilen Gesamtkoloniezahl115
2.15.1.3	Nachweis der aeroben psychrotrophen Gesamtkoloniezahl116
2.15.1.4	Nachweis der aeroben mesophilen Bakterien.116
2.15.2	Gesamtkoloniezahl anaerober mesophiler Keime.116
2.15.3	Unterscheidung gramnegativer und -positiver Bakterien mittels KOH-Test117
2.15.3.1	Durchführung und Prinzip der Methode.118
2.15.4	Aminopeptidase-Test zur Überprüfung des Gramverhaltens gramnegativer und grampositiver Bakterien.118
2.15.4.1	Prinzip und Durchführung der Methode.119
2.15.5	Überprüfung der mikroskopischen und makroskopischen Keim- bzw. Koloniemorphologie.120
2.15.5.1	Formgebung im mikroskopischen Bereich.120
2.15.5.2	Koloniemorphologie.120
2.15.5.3	Keimwachstum in einer Bouillon.120
2.15.6	Überprüfung des Verhaltens von Bakterien gegenüber Sauerstoff.124
2.15.6.1	Standkultur in Hochschichtröhrchen.124
2.15.6.2	Stichkultur in Hochschichtröhrchen.125
2.15.7	Oxidations-Fermentations-Test zum Nachweis der Kohlenhydratverwertung.125
2.15.7.1	Durchführung und Auswertung.126
2.15.8	Aerobe mesophile Fremdkeime.127
2.15.8.1	Untersuchungsgang und Auswertung.127
2.15.9	Pseudomonaden.128
2.15.9.1	Auswertung, Identifizierung und Differenzierung.128
2.15.10	Enterobacteriaceen.131
2.15.10.1	Anreicherungsmedien.131
2.15.10.2	Differenzierung von Enterobacteriaceen.132
2.15.10.3	System-Differenzierung von Enterobacteriaceen.133
2.15.11	Coliforme Keime und <i>Escherichia coli</i>134
2.15.11.1	Selektivanreicherung und fraktionierter Ausstrich.135
2.15.11.2	IMViC-Differenzierungs-Test.135
2.15.11.3	SIM-Differenzierungs-Test.137
2.15.11.4	Bestimmung von <i>Escherichia coli</i> im flüssigen Medium.138
2.15.11.5	Spezifische <i>E. coli</i> Identifikations-Tests.139
2.15.11.6	Schnellbestimmung von <i>E. coli</i> mittels Direkt-Platten-Methode.141

2.15.12	Salmonellen	144
2.15.12.1	Biochemische Identifikation (Screening)	146
2.15.12.2	Serologische Diagnose	150
2.15.12.3	Identifikation durch Phagolyse	152
2.15.12.4	Enzymimmunologische Nachweise	155
2.15.13	Shigellen	156
2.15.13.1	Schema der Shigellen-Untersuchung	156
2.15.14	<i>Yersinia enterocolitica</i>	158
2.15.14.1	Anreicherungsmedien und Selektivnährböden	158
2.15.14.2	Untersuchungsgang	159
2.15.14.3	Auswertung verdächtiger Kolonien	161
2.15.15	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	162
2.15.15.1	Verdünnungsflüssigkeit und Selektivbouillon	162
2.15.15.2	Analysengang	163
2.15.15.3	Nährböden für die Diagnostik	166
2.15.15.4	Kanagawa-Test	166
2.15.16	<i>Campylobacter jejuni</i>	167
2.15.16.1	Selektivanreicherung	167
2.15.16.2	Nachweis und Beurteilung	168
2.15.16.3	Bestätigung	168
2.15.17	Enterokokken	169
2.15.17.1	Streptokokken-Latex-Agglutination	173
2.15.18	<i>Staphylococcus aureus</i>	173
2.15.18.1	Anreicherung und direkter quantitativer Nachweis	173
2.15.18.2	Bestätigungstests	174
2.15.18.3	ELISA-Test zum Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen	176
2.15.18.4	Nachweis der Thermonuclease bei Staphylokokken-Kulturen	177
2.15.19	<i>Bacillus cereus</i>	178
2.15.19.1	Nährböden und Untersuchungsgang, Identifikation	178
2.15.19.2	Ermittlung der aeroben Sporenzahl	179
2.15.20	<i>Clostridium perfringens</i>	180
2.15.20.1	Untersuchungsgang, Auswertung und Bestätigung	181
2.15.21	<i>Clostridium perfringens</i> -Sporen	182
2.15.21.1	Analysengang	182
2.15.21.2	Beschreibung der Nährböden	184
2.15.22	Qualitativer Anaerobier-Nachweis	185
2.15.22.1	Durchführung	185
2.15.23	Quantitativer Nachweis anaerober Sporen	185

2.15.24	Listerien	187
2.15.24.1	Nachweise und Nährböden, Prüfung verdächtig gewachsener Kolonien	188
2.15.24.2	Grobdifferenzierung	193
2.15.25	Milchsäurebakterien	195
2.15.25.1	Nachweisverfahren, Auswertung und Bestätigung	195
2.15.26	Proteolyten	195
2.15.26.1	Nachweis	196
2.15.27	Lipolyten	196
2.15.27.1	Nachweis	197
2.15.28	Halophile - Halotolerante	197
2.15.28.1	Nachweis	198
2.15.28.2	Halotoleranz-Test	198
2.15.29	Hefen und Schimmelpilze, Gesamtzahl	199
2.15.30	Osmotolerante Hefen	199
2.15.30.1	Quantitativer Nachweis	200
2.15.30.2	Qualitativer Nachweis	200
2.15.30.3	MPN-Zählung hoch osmotoleranter Hefen	201
2.15.31	<i>Aspergillus flavus</i> und <i>Aspergillus parasiticus</i>	202
2.15.31.1	Nachweis	202
2.15.32	<i>Penicillium expansum</i>	203
2.15.32.1	Nachweis	203
2.15.33	<i>Byssochlamys-Ascosporen</i>	203
2.15.33.1	Nachweis	204
2.15.34	Flora-Analyse von Konserven	204
2.15.34.1	Nährmedien und Inkubationsbedingungen - Untersuchungsschema	205
2.15.34.2	Interpretation von Ergebnissen	208
2.16	Physikalische Hilfsuntersuchungen	208
2.16.1	Wasseraktivität	208
2.16.2	pH-Wert	210
3	Gute Herstellungspraxis (GHP), HACCP- und Produktrückrufkonzept als Präventivmaßnahmen	
3.1	Gute Herstellung	213
3.1.1	GHP-interne Richtlinien	213

3.2	HACCP-Konzept	214
3.2.1	Grundsätze	218
3.2.2	Erkennung kritischer Kontrollpunkte	221
3.2.2.1	Gefahrenarten	225
3.2.3	Abgrenzung kritischer Kontrollpunkte von In-Prozeß-Kontrollpunkten	228
3.3	Produktrückrufkonzept	228
3.3.1	Beispiel einer Fehlereinteilung in Gefahrengruppen	231
3.3.2	Checkliste für einen Produktrückruf	231
4	Stichprobenpläne - Produktklassifizierung	
4.1	Aspekte zu mikrobiologischen Stichprobenplänen	235
4.1.1	Grundlagen	236
4.1.2	Losgröße	236
4.1.3	Mikrobiologische Normen	237
4.1.3.1	Grenz- und Toleranzwerte	237
4.1.3.2	Rieht- und Warnwerte	238
4.1.3.3	Spezifikationen	238
4.1.4	Klassenplan	238
4.1.5	Kriterien zur Klassierung von Rohstoffen und Fertigwaren	241
4.1.5.1	Gefährdung der Produkte	241
4.1.6	Durchführung von Kontrollen	242
4.2	Produktklassifizierung und Stichprobenpläne	244
4.2.1	Klassifizierung von Rohstoffen und Fertigwaren	244
4.2.1.1	Rohstoffe	244
4.2.1.2	Fertige Produkte	245
4.2.2	Umfang und Häufigkeit von Bemusterungen	246
4.2.2.1	Rohstoffe	246
4.2.2.2	Fertige Produkte	246
4.2.3	Bemusterung von Konserven und UHT-Produkten	247
4.2.3.1	Konserven in starren Behältnissen	248
4.2.3.2	UHT-Produkte in Kartonverpackungen	249
4.2.4	Bemusterung und Anforderung nach international anerkannten Richtlinien	250
4.2.5	Überprüfung auf Abwesenheit von Salmonellen	250

4.2.5.1	Systematische Bemusterung kontinuierlich hergestellter Pulverprodukte.	256
---------	---	-----

5 Warengruppen - produktspezifische Hinweise, Untersuchungskriterien - Keimzahlnormen

5.1	Produktspezifische Hinweise - Untersuchungskriterien	257
5.1.1	Molkereiprodukte.	258
5.1.1.1	Rohmilch.	259
5.1.1.2	Pasteurisierte Frischmilch.	259
5.1.1.3	H-Milch und natürlich konzentrierte Milch (Kondensmilch).	260
5.1.1.4	Fermentierte Milcherzeugnisse.	260
5.1.1.5	Käse.	260
5.1.1.6	Butter.	261
5.1.1.7	Milch- und Molkenpulver, Caseinate.	262
5.1.2	Eier - Eiprodukte.	263
5.1.2.1	Untersuchungskriterien.	263
5.1.3	Pulverförmige Formula-Diäten und vergleichbare Erzeugnisse	264
5.1.3.1	Untersuchungskriterien.	264
5.1.4	Speiseeis.	265
5.1.4.1	Untersuchungskriterien.	265
5.1.5	Kristall- und Flüssigzucker.	266
5.1.5.1	Untersuchungskriterien (Strauss 1995).	266
5.1.6	Schokolade und Kakaopulver.	267
5.1.6.1	Untersuchungskriterien.	268
5.1.7	Gefüllte Backwaren, Rohmassen und Zuckerwaren.	268
5.1.7.1	Untersuchungskriterien für gefüllte Backwaren.	268
5.1.7.2	Untersuchungskriterien für Rohmassen.	269
5.1.7.3	Untersuchungskriterien für Zuckerwaren.	269
5.1.8	Trockengemüse,-suppen, Gewürze und ähnliche Erzeugnisse. . . .	269
5.1.8.1	Trockengemüse.	270
5.1.8.2	Gewürze und Gewürzmischungen.	270
5.1.8.3	Bouillon, Trocken- und Instantsuppen.	271
5.1.9	Cerealien.	272
5.1.9.1	Untersuchungskriterien.	272
5.1.10	Teigwaren.	273
5.1.10.1	Untersuchungskriterien.	273
5.1.11	Fertiggerichte, fertige Teilgerichte und Küchenzubereitungen. . . .	273

5.1.11.1	Gefrorene und tiefgefrorene Fertig- und Teilfertiggerichte.	274
5.1.11.2	Tischfertige Speisen und solche, die vor dem Genuß nochmals erwärmt werden.	275
5.1.12	Feinkosterzeugnisse.	276
5.1.13	Trinkwasser, Mineral- und Tafelwasser.	277
5.1.14	Steril- und UHT-behandelte Produkte.	279
5.1.15	Fisch und Fischprodukte, andere Seetiere.	279
5.1.16	Fleisch und Fleischerzeugnisse, Geflügel.	282
5.2	Keimzahlnormen.	284
5.3	Begriffe und Aspekte zu mikrobiologischen Kriterien und zu Stichprobenplänen.	305
6	Kosmetische Produkte	
6.1	Untersuchungsumfang und -kriterien.	307
6.1.1	Mikrobiologisches Untersuchungsprogramm.	307
6.1.1.1	Kontaminationsquellen.	307
6.1.1.2	Notwendige Kontrollen.	307
6.1.1.3	Entwicklungs- und Produktionsphase, Produktkontrolle.	308
6.1.2	Konservierungs-Belastungstest.	308
6.1.2.1	Prinzip der Methode.	309
6.1.2.2	Vorbereitung der Testkeime.	309
6.1.2.3	Temperaturbelastung des Prüfmaterials.	310
6.1.2.4	Bestimmung der Keimzahl.	310
6.1.2.5	Beurteilung des Belastungstests.	311
6.1.3	Mikrobielle Reinheit - Mikrobiologischer Status.	311
6.2	Untersuchungsmethoden - Mikrobiologische Kriterien.	312
6.2.1	Probenahme und -Vorbereitung.	312
6.2.2	Untersuchungsbeispiele zu ausgewählten Mikroorganismen.	313
6.2.3	Mikrobiologische Kriterien.	314
7	Anhang	
7.1	Rezepturen für Farbstoff- und Reagenzlösungen diverser Färbemethoden.	321

7.1.1	Farbstoff- und Reagenzlösungen	321
7.1.1.1	Methylenblaulösung für die Vitalfärbung	321
7.1.1.2	Erythrosinlösung für die Vitalfärbung	321
7.1.1.3	Methylenblaulösung	321
7.1.1.4	Carbolfuchsinlösung	322
7.1.1.5	Malachit-Safranin-Sporenfärbung	322
7.1.1.6	Carbolfuchsin-Methylenblau-Sporenfärbung	322
7.1.1.7	Carbolgentianaviolett-Fuchsin-Gramfärbung	323
7.1.1.8	Kristallviolett-Safranin-Färbung	323
7.2	Stammsammlungen für Bakterien-, Pilz- und Hefekulturen	324
7.2.1	Bakterien	324
7.2.2	Pilz- und Hefekulturen	324
7.3	Synonyma und Taxonomie lebensmittelmikrobiologisch relevanter Mikroorganismen	325
7.3.1	Bakterien	325
7.3.1.1	Taxonomie des Genus Salmonella	326
7.3.2	Pilze	326
7.4	Zufallszahlen - Zufälligkeit der entnommenen Stichprobe	327
7.4.1	Zufallszahlentafel	327
7.4.2	Vorgehensweise - Handhabung	327
7.4.2.1	Beispiel	328
7.5	ALINORM 97/13 a - Anhang 3	328
	Literatur	337
	Sachverzeichnis	349