

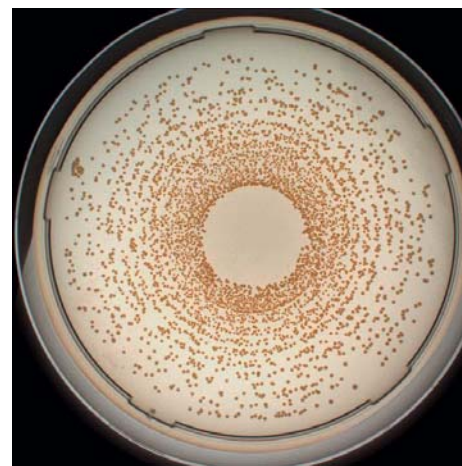
# Keimauszählung früher und heute

Zur Qualitätssicherung von Lebensmitteln ist die Bestimmung der Keimzahl ein wichtiges Verfahren. Was vor vierzig Jahren noch zeit- und materialaufwendig war, lässt sich heute in wenigen Sekunden einfach und kostengünstig ermitteln.

Die Bestimmung der Keimzahl setzt sich aus vielen einzelnen Arbeitsabläufen zusammen und gehört in vielen Labors zu den etablierten Routineprozeduren. Mit der Entwicklung des ersten Prototypen eines Spiralplattierers 1973 setzte die Automatisierung des Verdünnungs- und des Ausplattierschrittes ein. Experten haben Spiralplattierer in den vergangenen vier Jahrzehnten immer weiterentwickelt. Die Spiralplattierer stellen heute eine gleichwertige Alternative zur klassischen seriellen Verdünnung inklusive Ausplattierung bei erheblich niedrigeren Kosten dar.

**Die Erfindung des Spiralplattierens.** Die serielle Verdünnung war lange Zeit die klassische Methode zum Auszählen von Bakterienkolonien. Doch dafür mussten vorgängig Labormitarbeiter sowohl das Verdünnungsmedium als auch das Medium für die Agarplatten her-

stellen (autoklavieren) und kühl lagern. Das konnte jedoch nach der Anzahl der Proben einen erheblichen Zeit-, Material-, Energie- und Kostenaufwand darstellen. J.E. Gilchrist und seine Kollegen revolutionierten jedoch die altbewährte Methode mit ihrem 1973 veröffentlichten Artikel «Spiral Plate Method for Bacterial Determination». Darin präsentierten die Wissenschaftler eine damals völlig neue Methode zur seriellen Verdünnung von Bakterienkulturen – das Spiralplattieren. Damit liess sich der Einsatz an Material, Energie und Zeit schlagartig um 80 Prozent reduzieren. Der Artikel zeigte, dass sich durch das Aufbringen einer Archimedes-Spirale auf eine rotierende Agar-scheibe ein ähnlicher Verdünnungseffekt erreichen lässt, wie durch eine serielle Verdünnung im Reagenzglas. Durch die Rotation der Agarplatte werden im Inneren der Platte mehr  $\mu\text{l}$  pro Millimeter aufgetragen als aussen. Das Resultat ist eine serielle Verdünnung über fünf Größenordnungen (Log-Einheiten) auf einer

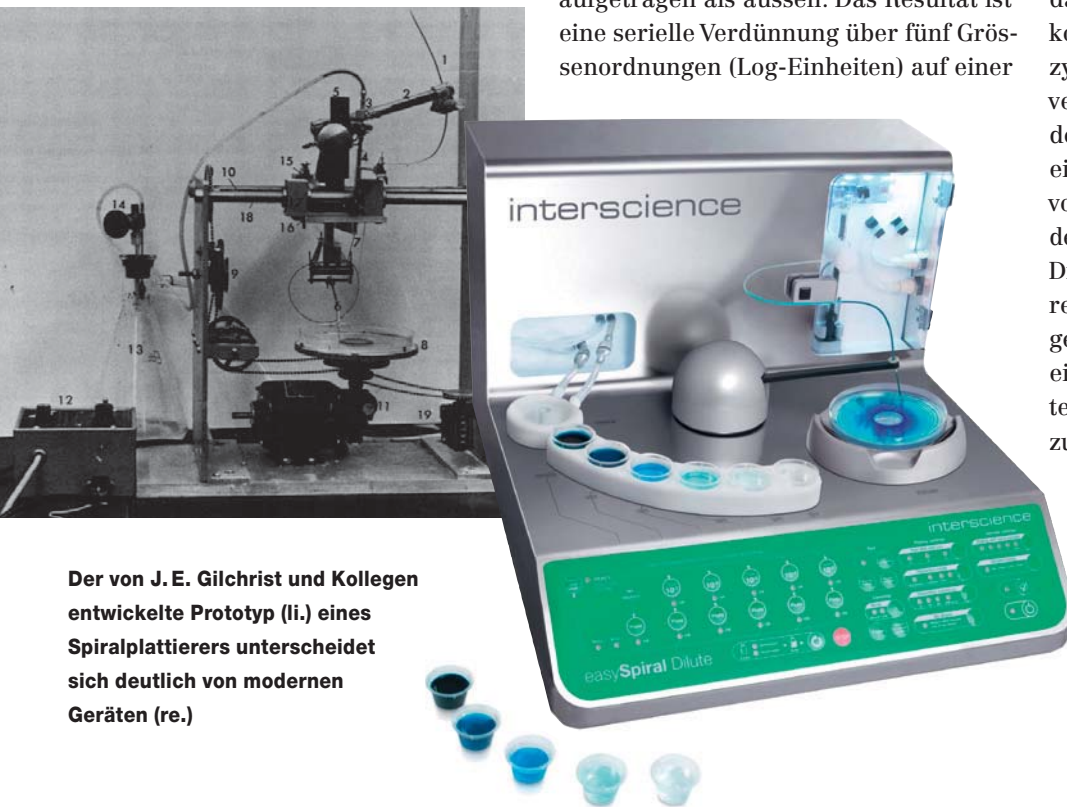


**Spiralplattierte Bakterienkolonien nach der Bebrütung**

einzigsten Agarplatte. Die Autoren zeigten, dass Spiralplattieren den herkömmlichen Verdünnungsmethoden hinsichtlich der Resultate völlig ebenbürtig ist, dazu aber den Vorteil der teils massiven Einsparungen an Material und Zeit hat.

**Spiralplattieren heute.** Auch wenn Gilchrist-Prototypen die erwähnten Einsparungen brachten, benötigte dieses Verfahren aber immer noch zwei Minuten für eine Plattierung. Auch die Reinigung des Teflon-Stylus war recht umständlich. Im Vergleich zu den ersten Plattierern benötigen die neuen Generationen nur noch rund 30 Sekunden für eine Plattierung. Auch die Reinigung läuft entweder vollautomatisch ab oder ist gar nicht nötig, da Einweg-Pipettenspitzen zum Einsatz kommen. Für einen vollen Verdünnungszyklus (10 Logeinheiten) inklusive Vorverdünnung, Ausplattieren und Reinigen des Stylus (Auftragsröhrchens) benötigt ein Gerät 220 Sekunden. Lars Bosshard vom Labor für Lebensmittelmikrobiologie der ETH Zürich hat unter der Leitung von Dr. Rainer Lehmann einen Spiralplattierer der neuen Generation unter die Lupe genommen. Dieses Gerät ist in der Lage, eine Vorverdünnung um fünf Logeinheiten der zu bestimmenden Lösung durchzuführen. Jede der so erhaltenen Verdünnungsstufen lässt sich ausplattieren und somit um weitere fünf (10-cm-Teller) oder sieben (15-cm-Teller) Logeinheiten verdünnen.

**Wissenschaftlicher Methodenvergleich.** Lars Bosshard führte einen statistischen Vergleich der klassischen Methodik mit der Spiralmetho-

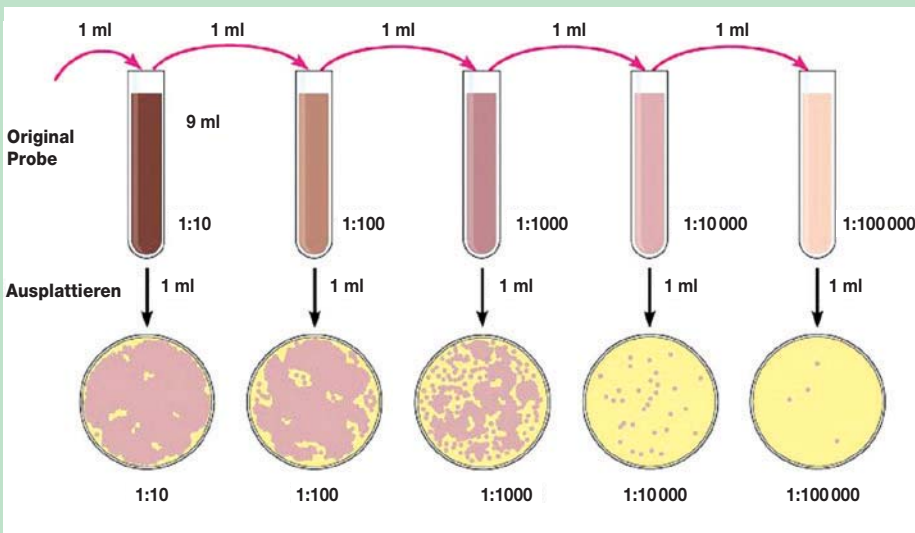


Der von J. E. Gilchrist und Kollegen entwickelte Prototyp (li.) eines Spiralplattierers unterscheidet sich deutlich von modernen Geräten (re.)

## DIE KLASSISCHE SERIELLE VERDÜNNUNG

Bis 1973 gehörten Agarplatten in der Mikrobiologie zu Routineprozeduren zur Bestimmung der Bakterienzellzahl. Diese Methode erarbeitete 1880 Robert Koch im Zuge der Entwicklung von Wachstumsmedien. Dazu wird auf der Oberfläche einer Agarplatte eine Probe mit Bakterien verteilt. Da die Bakterien in diesem Milieu ideale Lebensbedingungen vorfinden, teilen sie sich so, dass aus jedem vorhandenen Bakterium eine sogenannte Kolonie entsteht. Da jedes am Anfang in der Probe vorhandene Bakterium genau eine Kolonie bildet, lässt sich durch Auszählen der Kolonien die Lebendzellzahl an Bakterien in der ausplattierten Bakteriensuspension ermitteln. Die Herausforderung besteht nun darin, die vorhandene Probe so

zu verdünnen, dass nach der Inkubation eine auszählbare Anzahl Kolonien auf der Platte vorhanden ist. Bis 1973 behelfen sich Laboratorien damit, von der Ausgangssuspension eine serielle Verdünnung um den Faktor zehn herzustellen. So stellten sie zum Beispiel fünf Verdünnungen von 1/10 bis 1/100 000 her. Da in diesem Beispiel die Probe und die 1/10- bis 1/1000-Verdünnungen der Probe zu viele Kolonien enthalten, die 1/100 000 jedoch zu wenige, wird die 1/10 000-Verdünnung ausgezählt und die Anzahl gezählter Kolonien mit dem Faktor 10 000 multipliziert. Es ist durchaus möglich, dass eine Probe  $10^{10}$  Keime pro ml enthält und das Labor die Verdünnung bis  $10^{-8}$  durchführen muss.



dik durch. Dabei verdünnte und verglich der Wissenschaftler Suspensionen von *Staphylococcus aureus* und *Klebsiella pneumoniae* der Zelldichte  $5 \times 10^2$  bis  $5 \times 10^5$  cfu/ml nach der klassischen und der Spiralmethodik. Für die *Staphylococcus-aureus*-Proben fand der Forscher eine sehr gute Übereinstimmung. Für *Klebsiella pneumoniae* konnte er keinen statistisch relevanten Unterschied zwischen den beiden Methoden finden. Die heutigen Spiralplattierer sind der manuellen Methode völlig ebenbürtig, sparen aber viel Zeit, Energie und Geld. Die Uniformität der Kolonienmuster ist bei der automatischen Kolonienzählung von Vorteil, was Gilchrist schon 1973 vorhergesehen hatte.

So sind nach vierzig Jahren Weiterentwicklung Spiralplattierer heute

in vielen Laboratorien im Einsatz. Die Anwender kommen aus der Lebensmittelkontrolle, der pharmazeutischen Industrie, medizinischen Mikrobiologie, mikrobiellen Grundlagenforschung oder der Produktion von Schmierölen.

Andreas Lamanda,  
Lars Bosshard und Rainer Lehmann,  
IFNH der ETH Zürich ■