

Step by step

Eine Teilautomatisierung bei der Probenvorbereitung kann die Zuverlässigkeit der Keimzahlbestimmung erhöhen.

Die serielle dekadische Verdünnung von homogenisierten Proben zur Keimzahlbestimmung in Lebensmittelproben gehört zur Standardtechnik jedes mikrobiologischen Kontrolllabors. Mit dem Inlabtec Serial Diluter wird das Mischen und Verdünnen der Proben in Übereinstimmung mit ISO 6887-1 automatisiert und standardisiert. Das erhöht die Effizienz und Zuverlässigkeit der Keimzahlbestimmungen. Die Personenabhängigkeit der Qualität von Keimzahlbestimmungen wird entscheidend reduziert.

Viele Analysenprozesse werden mit Hilfe innovativer Laborautomatisierung standardisiert und beschleunigt; die Qualität der Resultate wird verbessert. Ein hoher Probendurchsatz ist oft die Voraussetzung dafür, die damit verbundenen Investitionskosten zu rechtfertigen. Zusätzlich müssen etablierte Laborprozesse den neuen Erfordernissen der Automation angepasst werden und das benötigte technische Fachwissen im Laborteam muss vorhanden sein oder aufgebaut werden. Die Teilautomation von Prozessschritten, deren Ausführung und Resultate von der individuellen Arbeitstechnik der einzelnen Mitarbeiter abhängt, ist eine effektive Lösung, Prozesse zu beschleunigen. Auch die Genauigkeit und Zuverlässigkeit einer Analysenmethode kann so erhöht und das Risiko für Fehler minimiert werden. Zudem kann auf die komplette Umstellung etablierter Laborprozesse sowie auf hohe Investitionen in Laborgeräte und Personal verzichtet werden.

Im Vergleich zur manuellen Reagenzglas-methode zeigen Laboruntersuchungen und Ringversuche, dass die automatisierten Probenverdünnungen zur Keimzahlbestimmung mit dem Inlabtec Serial Diluter die Zuverlässigkeit und die Genauigkeit der Lebensmitteluntersuchungen erhöhen und so das Risiko für Fehler bei Befunden praktisch ausschließen. Mit der automatischen Verdünnung wird eine völlige Unabhängigkeit der hergestellten

Verdünnungen von den unterschiedlichen Arbeitstechniken und Erfahrungen der Mitarbeiter erreicht – und so die Qualität der Befunde eines Testlabors zusätzlich abgesichert.

Die serielle dekadische Verdünnung von homogenisierten Proben zur Keimzahlbestimmung von Lebensmittelproben, Getränken, Futtermitteln, Kosmetika, etc. gehört zur Standardtechnik jedes mikrobiologischen Kontrolllabors. Dazu wird über mehrere Verdünnungsstufen 1 ml der homogenisierten Probe in 9 ml steriler Verdünnungslösung zehnfach verdünnt und Nährböden wird beimpft. Nach der vorgegebenen Inkubationszeit werden die gewachsenen Kolonien gezählt und die Konzentration der Keime in der Ausgangsprobe wird bestimmt. Eine repräsentative Ausgangsprobe und die korrekte Durchführung einer seriellen Probenverdünnung sind die Grundlage für zuverlässige Keimzahlbestimmungen. Die Norm ISO 6887-1:2017 definiert die technischen Voraussetzungen dazu. So wird zum Beispiel für das Mischen der Proben in einem

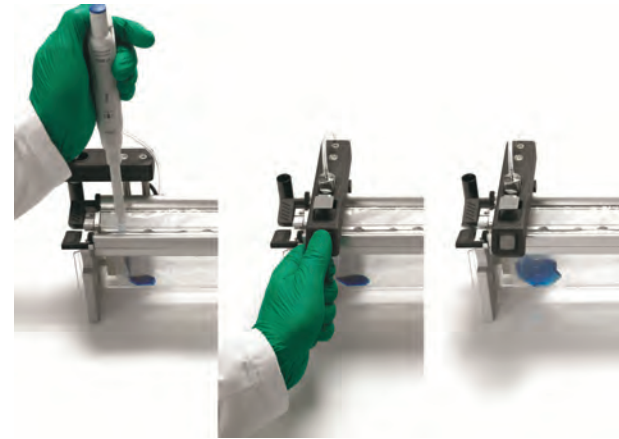


Bild 1: Automatische Verdünnung in Inlabtec Serial Dilution Bags. Die Probe wird mit der Pipettenspitze in den Beutel abgegeben und der Dosierarm wird nach vorne geschwenkt. Per Tastendruck strömt die Verdünnungslösung präzise durch die Spitze in den Beutel. Dabei entsteht ein intensiver Wirbel, der zusammen mit einem sterilen Luftstoß für eine homogene Mischung in <4 s sorgt. (s. dazu Videos auf der Herstellerwebsite). (Bild: Inlabtec)

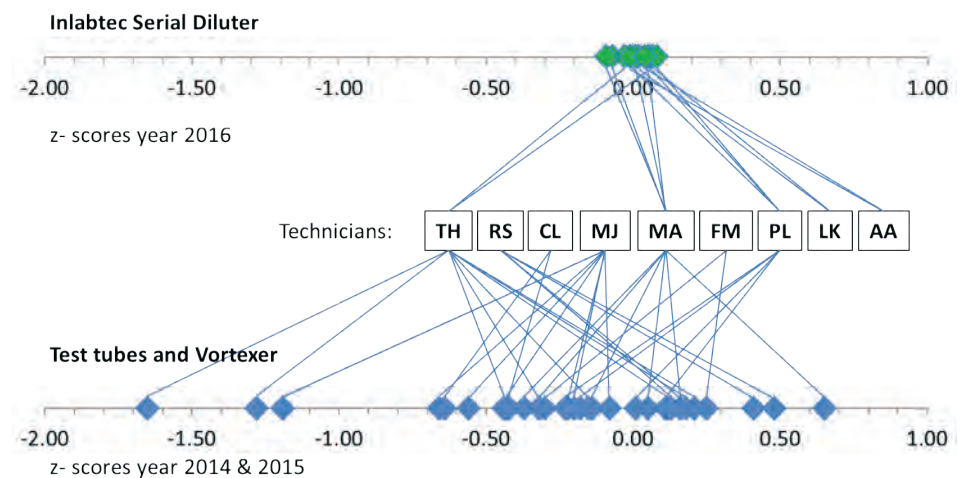


Bild 2: Vergleich der z-score-Werte verschiedener Mitarbeiter – erhalten mit der manuellen seriellen Verdünnung und mit dem Serial Diluter.

Reagenzglas mit 9 ml Diluent eine Mischzeit von 5–10 s mit einem Vortexer empfohlen. Der erfahrene Leser weiß, dass neben der Dauer des Mischens die Frequenz/Drehzahl der Vortexbewegung, sowie der Anstellwinkel

der Reagenzgläser auf dem Vortexmischer die Homogenisierung beeinflussen. Eine sorgfältige Arbeitsweise ist die Voraussetzung für homogene Verdünnungen und zuverlässige Resultate bei den Keimzahlbestimmungen.

Mit dem Inlabtec Serial Diluter wird das Mischen und Verdünnen von Lebensmittelproben in Übereinstimmung mit ISO 6887-1 automatisiert und standardisiert, was die Keimzahlbestimmungen effizienter und zuverlässiger macht. Die Personenabhängigkeit der Qualität von Keimzahlbestimmungen wird entscheidend reduziert, wie folgende Untersuchungsergebnisse zeigen.

Ringversuche bestätigen: Automatisierung steigert Zuverlässigkeit

Nach DIN EN ISO/IEC 17025 akkreditierte mikrobiologische Prüflaboratorien nehmen regelmäßig an Ringversuchen teil. Das ermöglicht, die Qualität der aktuellen Prüfungen, sowie die Leistung und Zuverlässigkeit des Laboratoriums und seiner Mitarbeiter über die Zeit zu beurteilen. Ein wichtiger Leistungsparameter von Ringversuchen ist der Wert z (z-score). Er gibt den Abstand eines Messwertes vom Mittelwert in der Anzahl Standardabweichungen an: $z = (X - \mu) / \sigma$. Dabei ist X der zu beurteilende Messwert, μ ist der Mittelwert (Referenzwert) und σ ist die Standardabweichung der normalverteilten Messwerte der am Ringversuch beteiligten Laboratorien. Die Beurteilung des z-scores basiert auf folgenden Kriterien:

- $|z| \leq 2$ akzeptabler Messwert
- $2 < |z| < 3$ fragwürdiger Messwert
- $|z| \geq 3$ unbefriedigender Messwert

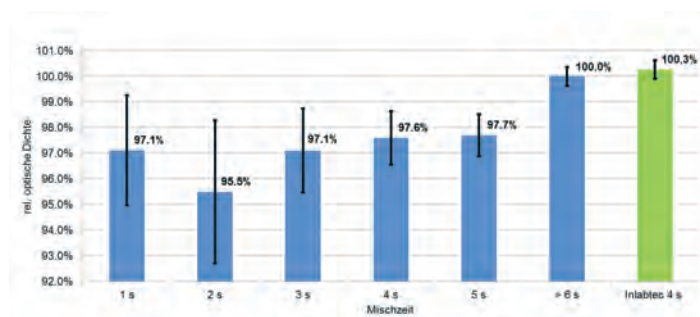


Bild 3: Probenhomogenität in Abhängigkeit von der Mischzeit der Reagenzgläser. Die homogene Verdünnung von 1 ml UHT-Milch in 9 ml Wasser ist mit der Reagenzglasermethode in >6 s Mischzeit sichergestellt (rel. optische Dichte bei 820 nm = 100 %) und mit der Automation von Inlabtec in standardmäßig 4 s. Mischzeiten von <5 s mit der Reagenzglasermethode ergeben systematisch zu tiefe OD-Werte mit zunehmender Streuung, je kürzer die Mischzeit ist.

Die statistische Grundlage dafür ist, dass normalverteilte Analyseergebnisse mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % innerhalb von \pm zwei Standardabweichungen liegen und mit 99,7 % innerhalb von \pm drei Standardabweichungen. Die z-score-Werte aus der Teilnahme eines Lebensmittelprüflabors an Ringversuchen im Jahr 2014 und 2015 mit der manuellen Probenverdünnungstechnik mit Reagenzgläsern liegen zwischen -1,65 und 0,65 und somit innerhalb des akzeptablen Bereichs (Bild 2). Die maximale Differenz der z-score-Werte zwischen zwei Mitarbeitern beträgt 2,3 Standardabweichungen für die gleichen Proben, obwohl die identischen vorbereiteten Reagenzgläser und Geräte verwendet wurden. Als Grund dafür kommen einzig individuelle Unterschiede beim Pipettieren und Mischen der Probe in Frage.

Das Labor hat im Jahr 2016 auf den Inlabtec Serial Diluter umgestellt. Das Gerät automatisiert die Verdünnung einer 1-ml-Probe mit 9 ml

Verdünnungslösung in einem funktions- und ressourcenoptimierten Polyethylen-Beutel (Bild 1). Zudem wird das Pipettieren präziser, da die Probe automatisch aus der Pipettenspitze gespült wird und so vollständig am Verdünnungsprozess teilnimmt.

Die z-scores aus dem Jahr 2016 nach der Umstellung auf den Inlabtec Serial Diluter bestätigen die Erwartungen bei der Präzision und Reproduzierbarkeit der Resultate (Bild 2). Mit dem Serial Diluter erreichen sämtliche Mitarbeiter des Laboratoriums z-score Werte im Bereich zwischen $\pm 0,1$, d.h. sämtliche Mitarbeiter, unabhängig vom Erfahrungsstand mit Ringversuchen oder individueller Unterschiede bei der Arbeitstechnik liefern fast identische Testresultate.

Weiter zeigt Bild 2, dass sechs z-score Werte $< -0,5$ sind und nur ein Wert ist $> 0,5$ (Bild 2). Negative z-score-Werte bedeuten, dass die gemessenen Keimzahlen tiefer sind, als die effektiv in den Proben vorhandenen Keime. Woher kommt diese Tendenz zu negativen z-score-Werten mit der Reagenzglasermethode, welche beim automatischen Verdünnen mit dem Serial Diluter nicht feststellbar ist?

Unvollständiges Vortexen als Risiko für falsche Befunde

Interne Untersuchungen zum Einfluss der Mischzeit auf die Homogenität von Verdünnung zeigen, dass mit zu kurzem Mischen von Lebensmittelproben systematisch zu tiefe Keimzahlen gemessen werden (Bild 3). Damit besteht ein Risiko, dass die Befunde zur Sicherheit der untersuchten Lebensmittel auf Grund von Keimzahlbestimmungen anhand von Verdünnungsreihen falsch sind. Die systematische, negative Abweichung vom Sollwert 100 % durch Mischzeiten < 6 s ist die Folge der Probenzugabe und des Mischprozesses im Reagenzglas. Bei der Probenzugabe mit der 1-ml-Pipette wird die wässrige Probe als Flüssigkeitsstrahl in den unteren Teil des Reagenzglases befördert. Beim Mischen (Vortexen) verteilt sich die Probe im gefüllten Reagenzglas von unten nach oben. Die anschließende Probenentnahme mit der Pipette erfolgt knapp unterhalb der Flüssigkeitsoberfläche.

Extinktionswerte < 100 % bedeuten, dass sich die Probe nicht vollständig homogen in der Verdünnungslösung von unten nach oben verteilen konnte (rel. optische Dichte von Wasser bei 820 nm = 0 %) und die ausgeführte Mischzeit zu kurz für die homogene Verdünnung der Probe war. Manuelles Mischen mit einem Vortexer ist unangenehm und kann zu Beschwerden beim Anwender führen. Möglichst kurzes Mischen ist daher verständlich. Zudem gibt es keine zuverlässige visuelle Beurteilung einer ausreichenden Mischzeit. Die ISO-Norm schreibt eine Mischzeit von 5–10 s vor, was mit einem Vortexmischer nicht automatisch gewährleistet ist. In Bezug auf die Beurteilung der Lebensmittelsicherheit ist die manuelle Reagenzglasermethode nicht optimal, da v.a. unter Zeitdruck systematisch zu tiefe Keimzahlen erreicht werden.

Mit der Automation der Verdünnung und dem wirkungsvollen Mischprozess in den Serial Dilution Bags wird dieses Risiko ausgeschlossen (s. Bild 2). Zudem wird der Arbeitsvorgang mit dem Einsatz des Inlabtec Serial Diluters im Vergleich zur Röhrenmethode merklich verkürzt, da das manuelle Mischen und das Hantieren mit Reagenzgläsern und Verschlusskappen wegfällt.

Gewaschen ist nicht unbedingt sauber

Für eine Verifizierung des Inlabtec Serial Diluters wurden in einem mikrobiologischen Testlabor parallel Keimzahlbestimmungen verschiedener Lebensmittelproben mit Hilfe selbst vorbereiteter Reagenzgläser

und dem Inlabtec Serial Diluter durchgeführt. Dabei wurde bei der Bestimmung der aeroben mesophilen Keime (AMK) in den Proben nach den Verdünnungen mit dem Serial Diluter durchschnittlich bis zu rund fünfmal höhere Gesamtkeimzahlen gezählt, als bei der Verwendung der selbst vorbereiteten Reagenzgläser (Tab. 1). Bei den parallel bestimmten Enterobakterien in denselben Proben wurde allerdings kein signifikanter Unterschied bei den Keimzahlen zwischen den beiden Verdünnungstechniken festgestellt. Die durchschnittliche Differenz der koloniebildenden Einheiten (KBE) betrug dort lediglich 0,017 log KBE/g. Ein Benutzerfehler mit dem Serial Diluter konnte damit ausgeschlossen werden, und die verwendeten Nährböden und die Verdünnungslösung waren identisch.

Auf Grund dieser Resultate wurde die Verifizierung mit eingekauften Einwegverdünnungsröhrchen eines externen Lieferanten wiederholt. Bei den AMK sowie bei den Enterobakterien konnte mit den Einwegverdünnungsröhrchen kein signifikanter Unterschied zum Inlabtec-Verfahren mehr festgestellt werden (Tab. 1).

Keimzahlnachweis	Aerobe Mesophile Keime (AMK)	Enterobacteriaceen
Inlabtec Serial Diluter	100%	100%
Selber vorbereitete Reagenzgläser	23%	100%
Eingekaufte, vorgefüllte Reagenzgläser	100%	100%

Tab. 1: Vergleich der relativen Keimzahlachweise nach der Probenverdünnung in Serial Dilution Bags und in selbst gefüllten Reagenzgläsern sowie in vorgefüllten Einweg-Verdünnungsröhrchen.

Die Resultate bestätigen die Vorbehalte vieler Laboratorien gegenüber der Mehrfachverwendung von Laborglaswaren, da wachstumshemmende Substanzen (z.B. Spülmittelreste oder angelagerte Sekundärmetaboliten) an den gewaschenen Probengefäßen nie völlig ausgeschlossen werden können. Aus diesem Grund empfiehlt ISO7218:2007 die regelmäßige Überprüfung der gereinigten Glaswaren auf die Absenz von inhibitorischen Substanzen. Mit dem Inlabtec Serial Diluter werden platzsparende, hochreine, sterile Einweg-Beutel aus Polyethylen verwendet, was die Anwesenheit von Inhibitoren zuverlässig ausschließt und eine regelmäßige Überprüfung von Glaswaren komplett überflüssig macht.

Fazit

Wie die hier präsentierten Resultate zeigen, werden mit der Automatisierung der Verdünnung und der Verwendung von Einweg-Beuteln der Verdünnungsprozess standardisiert und vereinfacht. Zugleich wird die Zuverlässigkeit der Resultate verbessert. Personenabhängige Arbeitstechniken und der Grad der Erfahrung spielen keine entscheidende Rolle mehr, wenn es um die Erstellung einer präzisen Verdünnungsreihe für die zuverlässige Keimzahlbestimmung geht. Für Testlaboratorien, die keine teure Vollautomatisierung der Keimzahlbestimmung anstreben und möglichst an den bewährten Prozessen festhalten wollen, eröffnet die Teilautomation mit dem Serial Diluter eine kostengünstige Möglichkeit, die Qualität der Analysenresultate zu erhöhen und abzusichern und gleichzeitig die Produktivität zu erhöhen.

Martin Jörg, Microbact AG, Langenthal, CH
Dr. Ernst Freydl, inlabtec AG, St. Gallen, CH
info@inlabtec.com
www.inlabtec.com



Methodischer Dreh

Für Analysen und Applikationen in der Food-Industrie bietet Shimadzu Hard- und Software-Gesamtlösungen für tierische und pflanzliche Produkte, Duft- und Geschmacksstoffe, Speisen und Getränke, Lebensmittelverarbeitung und -verpackung.

- **Analysesysteme für die gesamte Nahrungsmittelindustrie**
- **Sicherheit von der Produktion bis zur Verpackung**
- **Kostenloser Zugang zu Expertenwissen**

