

Methodenvergleich

## **Inhomogene Verdünnungen sind ein Risiko für korrekte Qualitätsbefunde**

*Die Norm ISO 6887-1:1999 definiert für die serielle Verdünnung von Proben in Reagenzgläsern jeweils eine optimale Mischzeit von 5 bis 10 Sekunden mit einem mechanischen Mixer (Vortexer). Trübungsmessungen mit verdünnter UHT Milch bestätigen, dass Mischzeiten unterhalb von 5 Sekunden zu inhomogenen Verdünnungen mit grossen Abweichungen zwischen den einzelnen Proben führen können. Die Probenkonzentrationen liegen dabei systematisch unterhalb des Sollwertes. Der Mischprozess in Reagenzgläsern hat bei einer zu kurzen Mischzeit zur Folge, dass die Probenkeimzahl als zu tief bestimmt wird, was ein potentielles Risiko für Fehlentscheide bezüglich der attestierten Produktsicherheit darstellt.*

*Im Gegensatz dazu liefert der Inlabtec Serial Diluter innerhalb 4 Sekunden genaue Verdünnungen mit einer minimalen Streuung und demzufolge die Basis für verlässliche Keimzahlbestimmungen und korrekte Lebensmittelqualitätsbefunde. Dabei wird das Risiko für Schmerzen in Gelenken und Muskeln, verursacht durch das repetitive Vortexen und Handling der Reagenzgläser, komplett eliminiert (Repetitive Strain Injury, RSI-Syndrom).*

### **Einleitung**

Mit der herkömmlichen Technik für die dekadische serielle Verdünnung zur Keimzahlbestimmung wird 1 ml Probe mit 9 ml Verdünnungslösung gemischt. Für die Reagenzglasermethode definiert die Norm ISO 6887-1 eine optimale Mischzeit von 5 bis 10 Sekunden mit einem mechanischen Mixer (Vortexer). Im Labor besteht die Gefahr, dass das wiederholte Vortexen zeitlich auf weniger als 5 s reduziert wird. Einerseits will man möglichst speditiv arbeiten und andererseits die Belastung durch häufiges, wiederholtes Vortexen minimieren, welches zu verschiedenartigen Schmerzen der Gliedmassen führen kann (Repetitive Strain Injury, RSI-Syndrom).

Anhand von Trübungsmessungen soll der Homogenisierungsgrad von Verdünnungen nach unterschiedlichen Mischzeiten bestimmt werden. Die Trübung ist die Verringerung der Durchsichtigkeit einer Flüssigkeit, verursacht durch die Gegenwart ungelöster Komponenten, wie Partikel, Vesikel, Mikroorganismen, etc. Haben Proben der gleichen Verdünnungsstufe und der gleichen Flüssigkeit eine unterschiedliche Trübung, so ist die Menge der ungelösten Komponenten in der Probe unterschiedlich und die Flüssigkeit wurde demzufolge nicht homogen verdünnt. Die Trübung kann durch die Messung der Durchlichtschwächung (optische Dichte) sehr einfach und präzise bestimmt werden.

### **Methode**

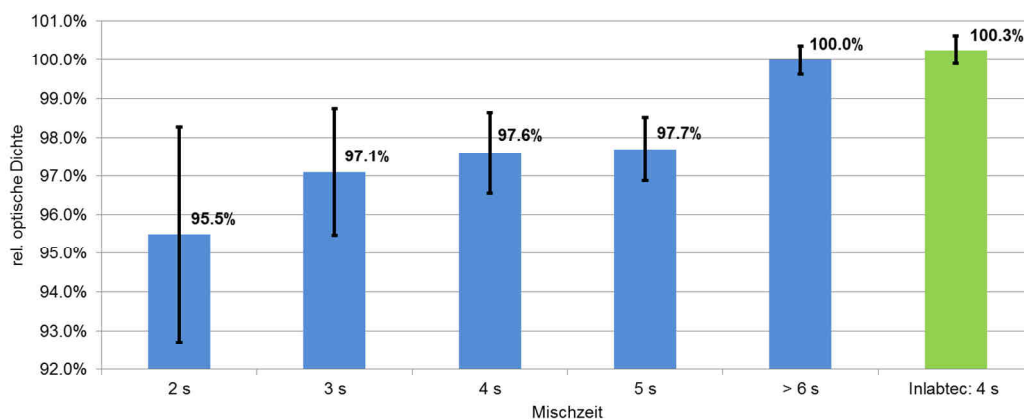
Als Modell für die Bestimmung der Homogenität wurde UHT Milch gewählt. UHT Milch ist einfach verfügbar, unproblematisch und eine stabile Fett-in-Wasser-Emulsion, in der das ungelöste Fett in Fettkügelchen in der Milchflüssigkeit verteilt ist. Durch die Homogenisierung werden diese Milchfettkügelchen auf einen Durchmesser von ca. 1 µm standardisiert, was dem Durchmesser der meisten Bakterien entspricht. Das lässt ähnliche Anforderungen an den Mischprozess für homogene Verdünnungen erwarten, wie für bakterienbelastete Lebensmittelproben.

Mit der Standardmethode (vorgefüllte Reagenzgläser) wurden jeweils zwölf 1:10 Verdünnungen von UHT Milch mit Wasser bei Mischzeiten von 2, 3, 4, 5 und > 6 Sekunden erstellt (insgesamt 60 Verdünnungen). Für die Messreihe > 6 Sekunden wurden die 1 ml UHT Milch durch mehrmaliges abgeben und ansaugen aus der Pipettenspitze gespült und die Probe anschliessend für 6 - 8 Sekunden mit einem Vortexer gemischt. Nach dem Mischen wurde 1 ml Probe entnommen und mit einem

Photometer (LKB Novaspec II) die optische Dichte (OD) im Infrarotbereich bei 820 nm gemessen. Es wurde der Mittelwert und die Standardabweichung (Streuung) der jeweils 12 Messungen bestimmt. Die mittlere optische Dichte von mischen > 6 Sekunden wurde als 100% relative optische Dichte definiert (homogene Probe/ Sollwert)

Als Vergleich zur Reagenzglasermethode wurden zwölfmal 1 ml UHT Milch mit dem Serial Diluter verdünnt und die optische Dichte bei 820 nm gemessen.

## Resultate



**Abb. 1:** Probenhomogenität in Funktion der Mischzeit. Eine homogene Verdünnung ist mit der Reagenzglasermethode erst nach > 6 Sekunden Mischzeit sichergestellt (rel. optische Dichte = 100%). Optische Dichte und Streuung der Inlabtec Technik (4 Sekunden Mischzeit) entspricht derjenigen der klassischen Technik mit einer Mischzeit > 6 Sekunden. Mischzeiten von 5 Sekunden und weniger ergeben systematisch zu tiefe OD Werte mit zunehmender Streuung, je kürzer die Mischzeit ist.

100% relative optische Dichte, d.h. grösstmögliche Homogenität wird mit der Mischzeit > 6 Sekunden und mit Inlabtec (4 Sekunden Mischzeit) gemessen. Der Unterschied der Mittelwerte (0.3 %) ist nicht signifikant und mit grosser Wahrscheinlichkeit das Resultat von Volumenunterschieden bei den Verdünnungen. Die Streuung beträgt für beide Methoden jeweils nur 0.4 %.

Signifikant tiefere optische Dichten und entsprechend tiefere Konzentrationen von MilCHFettkügelchen werden in Proben nach Mischzeiten von 2 bis 5 Sekunden gemessen (t-Test). Die mittlere optische Dichte beträgt rund 97 %. Sämtliche gemessenen optischen Dichten liegen dabei unterhalb 100 % relativer optischer Dichte. Die maximale Streuung beträgt bis bei 2 Sekunden Mischzeit 2.8 %, bei 5 Sekunden Mischzeit noch 0.8 %.

## Diskussion

Die Messungen bestätigen, dass bei der Reagenzglasermethode die Mischzeit mit dem Vortexer die Qualität und Aussagekraft der Analysen stark beeinflusst. Der Einfluss der Mischzeit auf die Homogenität der verdünnten Probe und die systematische, negative Abweichung vom Sollwert lässt sich anhand der Probenzugabe und dem Mischprozess wie folgt erklären. Durch die Zugabe der Probe mit der Pipette wird die Probe in den unteren Teil des Reagenzglases befördert, was im hier angewandten Modell von Auge gut erkennbar ist. Durch das anschliessende Mischen (Vortexen) muss sich die Probe im gefüllten Reagenzglas von unten nach oben verteilen. Die Probenentnahme nach dem Mischen erfolgt oben, nahe der Probenoberfläche, da für eine genaue Probenentnahme die Pipettenspitze nicht zu tief eintauchen darf. Extinktionswerte unterhalb 100 % bedeuten, dass sich die Probe noch nicht vollständig in der Verdünnungslösung verteilen konnte. In einem solchen Fall war die gewählte Mischzeit zu kurz für eine homogene Verdünnung und es bestehen noch

Konzentrationsunterschiede zwischen der unteren und oberen Zone im Reagenzglas, wo die Probe üblicherweise mit der Pipette entnommen wird.

Die Messungen bestätigen die Relevanz der in der ISO Norm 6887-1:1999 empfohlenen Mischzeiten von 5 bis 10 Sekunden und sollten mit der Reagenzglasmethode unbedingt eingehalten werden. Mischzeiten unter 4 Sekunden können bereits Abweichungen von bis zu - 7.5 % pro Verdünnungsstufe zur Folge haben. Nach 3 Verdünnungsstufen ist dadurch eine Ungenauigkeit von - 20.8 % möglich. Keimzahlbestimmungen mit zu kurzen Mischzeiten bei den Verdünnungen können zu tiefe Werte für die Keimzahlen ergeben und sind eine potentielle Fehlerquelle bezüglich der Qualitätsbeurteilung von Lebensmitteln.

Mit dem Inlabtec Serial Diluter wird innerhalb der Mischzeit von 4 Sekunden die Probe perfekt verdünnt (Abb. 1). Die hohe Geschwindigkeit, mit welcher die Probe zusammen mit der Verdünnungslösung in den Beutel gespült wird, erzeugt sofort eine intensive Verwirbelung. Nach der Abgabe der Flüssigkeit folgt ein Luftstoss, der zum Abschluss der Verdünnung eine chaotische Durchmischung erzeugt. Dieser Prozess erfolgt in hoher Präzision automatisch per Tastendruck und garantiert eine konstante Korrektheit der Analyseresultate und der daraus beruhenden Befunde (Abb.1). Auch besteht kein RSI Risiko, da das repetitive Vortexen und das Handling der Reagenzgläser entfällt.

#### **Referenzen**

ISO 6887-1:1999: Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen - Teil 1: Allgemeine Regeln für Herstellung von Erstverdünnungen und Dezimalverdünnungen