

Hochschule Neubrandenburg
Fachbereich Agrarwirtschaft &
Lebensmittelwissenschaften
Studiengang Lebensmitteltechnologie
Sommersemester 2009

Diplomarbeit

Thema: „Eignung der ATP-Messung für den
Sterilitätsnachweis in der Fruchtsaftindustrie“

Verfasser: Marie Schoknecht

Betreuender Professor: Prof. Dr. Karl Steffens

Betriebliche Betreuer: Ulrike Schmitz
Frank König

URN: urn:nbn:de:gbv:519-thesis2009-0247-6

Bad Fallingb., den 04.08.2009

Abstract

The aim of this diploma thesis is the evaluation of the applicability of a method to determine the microbiological safety of fruit juices in the company Eckes Granini Deutschland. The functionality of the regarded measurement instrument “Promilite III” provided by the manufacturer Promicol is based on bioluminescence. In the context of this work different tests were conducted. At first the alteration of the ATP-concentration of the microbiological cells over a fixed period was observed. Furthermore a comparison between “Promilite III”, the currently used technique of flow cytometry with the instrument “D-Count” and the conventional method for the detection of microorganisms with culture media was drawn. For this purpose different products were inoculated with several dilutions of *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida parapsilosis*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Aspergillus niger*. Moreover the daily controls of the products were performed with “Promilite III”. Consequently the resemblance of the results obtained from “Promilite III” and “D-Count” was assessed. Concerning the low sample volume demanded by “Promilite III” the possibility to increase this by means of centrifugation was also examined. As a result the effects of this procedure on the measured values were observed.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	1
Inhaltsverzeichnis.....	2
Verzeichnis der verwendeten Formelzeichen, Symbole und Abkürzungen	5
1 Einleitung	6
2 Theoretische Grundlagen	8
2.1 Fruchtsäfte, -nektare und –schorlen.....	8
2.1.1 Rechtliche Bestimmungen	8
2.1.2 Mikrobiologie der Fruchtsäfte, -nektare und –schorlen.....	9
2.2 Schnellnachweismethoden.....	11
2.2.1 Impedanzmessung.....	11
2.2.2 Biolumineszenzmethode	12
2.2.3 Durchflusszytometrische Messung (D-Count)	12
3 Material und Methode	16
3.1 Mikroorganismen.....	16
3.1.1 <i>Candida parapsilosis</i>	16
3.1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
3.1.3 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	16
3.1.4 <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	17
3.1.5 <i>Aspergillus niger</i>	17
3.2 Untersuchungsproben	18
3.3 Geräte.....	18
3.3.1 allgemeine Geräte	18
3.3.2 Promilite III.....	19
3.3.2.1 Geräteaufbau	19
3.3.2.2 Reagenzien	20
3.3.2.2 Vorbereitung und Verwendung unter Nutzung der Software Proscreen.....	20
3.3.2.3 Probenmessung.....	22
3.3.2.4 Darstellung der Ergebnisse.....	23

3.3.3 D-Count.....	24
3.3.3.1 Geräteaufbau	24
3.3.3.1.1 Pipettierautomat	24
3.3.3.1.2 Analysator	25
3.3.3.1.3 Computer	26
3.3.3.2 Reagenzien	26
3.3.3.3 Vorbereitung und Verwendung des Gerätes unter Nutzung der D- Count Software	28
3.3.3.4 Probenmessung.....	29
3.3.3.5 Darstellung der Messergebnisse.....	32
3.4 Kulturmedien	33
3.5 Allgemeine Methoden	35
3.5.1 Kulturenaufbewahrung,, Stammsammlung und Pflege	35
3.5.2 Kultivierung und Anreicherung	35
3.5.3 Sicherstellung der Kulturqualität	35
3.5.4 Keimzahlbestimmung	35
3.6 Versuche für den Eignungstest der ATP-Methode für die mikrobiologische Keimzahlbestimmung.....	37
3.6.1 Versuche zur Ermittlung des optimalen Messzeitpunktes der Mikroorganismen für die ATP-Messung	37
3.6.2 Keimzahlbestimmung mittels Promilite III, D-Count und kultureller Nachweismethode im Vergleich.....	38
3.6.3 Versuche zum Vergleich der Routineuntersuchung mit Hilfe des D-Counts mit dem Promilite III.....	38
3.6.4 Versuche zur Erhöhung des Probevolumens für die Messung mittels Promilite III.....	39
4 Ergebnisse	40
4.1 Auswertung der Ermittlung des optimalen Messzeitpunktes der Mikroorganismen für die ATP-Messung.....	40
4.2 Keimzahlbestimmung mittels Promilite III, D-Count und kultureller Nachweismethode im Vergleich	41

4.2.1 Vergleich der ermittelten Keimzahlen von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mittels der 3 Verfahren	41
4.2.2 Vergleich der ermittelten Keimzahlen von <i>Candida Parapsilosis</i> mittels der 3 Verfahren	45
4.2.3 Vergleich der ermittelten Keimzahlen von <i>Lactobacillus rhamnosus</i> mittels der 3 Verfahren	48
4.2.4 Vergleich der ermittelten Keimzahlen von <i>Aspergillus niger</i> mittels der 3 Verfahren	52
4.3 Vergleich der Routineuntersuchung mit Hilfe des D-Counts mit dem Promilite III.....	55
4.4 Zentrifugationstest	58
5 Diskussion	61
6 Zusammenfassung	64
7 Literatur	67
Abbildungsverzeichnis	68
Tabellenverzeichnis.....	70
Formelverzeichnis	70
Verzeichnis der Anlagen	71
Anhang	74
Erklärung über die selbstständige Anfertigung der Arbeit.....	113

Verzeichnis der verwendeten Formelzeichen, Symbole und Abkürzungen

AFAC	Apfel Acerolasaft
AMP	Adenosinmonophosphat
AS	<i>Aspergillus niger</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BA	Bananennektar
CP	<i>Candida parapsilosis</i>
hc	hohes C
KbE	Koloniebildende Einheiten
LB	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
n.a.	nicht auszählbar
OR	Orangensaft
PET	Polyethylenterephthalat
PGN	Pink Grapefruitnektar
RLU	Relative Light Units
SC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TG	Trinkgenuss

1 Einleitung

Fruchtsäfte und -nektare besitzen nach wie vor einen hohen Stellenwert in der Getränkeindustrie, besonders die Deutschen genießen die Vielfalt, die diese Branche zu bieten hat. Laut des Verbandes der deutschen Fruchtsaftindustrie e.V. (2009) liegt der Pro-Kopf-Verbrauch hier zu Lande für das Jahr 2008 bei 37,4l, womit Deutschland Spitzenreiter in der europäischen Fruchtsaftindustrie ist. Auch wenn der Konsum von Fruchtsäften mit 22l etwas zurückgegangen ist, wurde bei den Nektaren mit 14,2l ein leichter Zuwachs festgestellt. Der Verbrauch von Fruchtsaftschorlen stieg ebenfalls, hier konnte ein Mehrbedarf von 1l zum Vorjahr verzeichnet werden. Die Fruchtsaftbranche konnte im Jahr 2008 einen Gesamtumsatz von 4,1 Mrd. Euro erwirtschaften, auch wenn gleich die Absatzmenge einen Rückgang um 2,5 % verzeichnet. Ursache hierfür sind u.a. Preisanpassungen aufgrund der Rohstoffpreiserhöhungen. Aufgrund der weltweiten Wirtschaftskrise wird für das Jahr 2009 ein erhöhter Druck für die Märkte erwartet, da die Nachfrage nach Produkten aus dem Niedrigpreissegment ansteigen wird. Doch trotzdem setzt die deutsche Fruchtsaftindustrie auf Qualität. So auch die Eckes Granini Gruppe, die im letzten Jahr einen Umsatz von 917 Mio. Euro mit einem Absatz von 1086 Mio. Litern erzielen konnte.

Mit einem wertmäßigen Anteil von 12,3% auf dem europäischen Markt für fruchtsafthaltige Getränke nimmt die Eckes Granini Gruppe eine führende Position ein. Mit Hilfe kaltseptischer Anlagen werden Fruchtsäfte, -nektare und fruchtsafthaltige Getränke, sowie Fruchtsaftschorlen in PET-Flaschen und Kartonverpackungen abgefüllt. Zur Sicherung der einwandfreien und gleichbleibenden Qualität der hergestellten Produkte werden zahlreiche Kontrollen auf dem Weg vom Rohstoff bis hin zur Fertigware durchgeführt. Wichtig ist hierbei die Mikrobiologie. Um den Verderb eines Produktes oder auch Bombagen zu verhindern, werden mikrobiologische Fertigwarenkontrollen durchgeführt. Der Firma Eckes Granini Deutschland GmbH steht dafür das D-Count der Firma AES Chemunex zur Verfügung, welches auf der Durchflusszytometrie basiert.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit soll in Zusammenarbeit mit der Firma Promicol die Einsetzbarkeit der Biolumineszenz-Methode mit Hilfe des Promilite III für die mikrobiologische Endproduktkontrolle von Fruchtsäften erarbeitet werden. Gegenüber dem D-Count ist die Anschaffung des Promilite III, die Wartung sowie die Materialkosten für die einzelnen Proben günstiger. Ein weiterer Vorteil ist die Zeitersparnis hinsichtlich der Probenaufbereitung und Messung.

Durch den Vergleich der Biolumineszenzmethode mit der kulturellen Nachweismethode und der Durchflusszytometrie, soll gezeigt werden, ob die Endproduktkontrolle mittels Promilite III den

Anforderungen an die mikrobiologische Sicherheit der Eckes Granini Gruppe entspricht. Zudem wird die Routineeignung der ATP-Methode getestet, sowie die Veränderung des ATP-Gehaltes innerhalb der Inkubationszeit. Des Weiteren wird, aufgrund der geringen Probenmenge, die beim Promilite III eingesetzt wird, ein Zentrifugationstest zur Erhöhung des Probevolumens durchgeführt.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Fruchtsäfte, -nektare und –schorlen

2.1.1 Rechtliche Bestimmungen

Die Definition der Fruchtsaftarten, -produkte, -erzeugnisse ist in den EG-Richtlinien, sowie in den deutschen Leitsätzen und Verordnungen geregelt.

Laut der Fruchtsaftverordnung vom 9.10.2006 gilt Fruchtsaft als „das gärfähige, jedoch nicht gegorene, aus gesunden und reifen Früchten (frisch oder durch Kälte haltbar gemacht) einer oder mehrerer Fruchtarten gewonnene Erzeugnis, das die für den Saft dieser Frucht/Früchte charakteristische Farbe, das dafür charakteristische Aroma und den dafür charakteristischen Geschmack besitzt.“ Dazu zählen auch Fruchtsäfte aus Fruchtsaftkonzentraten „[...] das gewonnen wird, indem das dem Saft bei der Konzentrierung entzogene Wasser dem Fruchtsaftkonzentrat wieder hinzugefügt wird und die dem Saft verloren gegangenen Aromastoffe sowie gegebenenfalls Fruchtfleisch und Zellen, die beim Prozess der Herstellung des betreffenden Fruchtsaftes oder von Fruchtsaft derselben Art zurückgewonnen wurden, zugesetzt werden. Das zugefügte Wasser muss, insbesondere unter chemischen, mikrobiologischen und organoleptischen Gesichtspunkten, geeignet sein, die wesentlichen Merkmale des Saftes zu gewährleisten.“ (http://www.gesetze-im-internet.de/frsaftv_2004/BJNR101600004.html, 2009).

Fruchtnektare gehören ebenso zum Sortiment von Eckes Granini Deutschland GmbH, diese sind laut der Verordnung für Fruchtsaft §1 (1) „[...] das gärfähige, jedoch nicht gegorene Erzeugnis, das durch Zusatz von Wasser und Zuckerarten oder Honig zu den unter den Nummern 1 bis 3 genannten Erzeugnissen zu Fruchtmark oder zu einem Gemisch dieser Erzeugnisse hergestellt wird und außerdem der Anlage 5 entspricht.“ (http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/frsaftv_2004/gesamt.pdf, 2008).

In den Leitsätzen für Erfrischungsgetränke vom 27.11.2002 sind die Regelungen für Fruchtsaftschorlen festgeschrieben. Laut dieser sind Fruchtschorlen „[...] Getränke, die Trinkwasser, natürliches Mineralwasser, Quellwasser und/oder Tafelwasser,-geschmackgebende Zutaten, enthalten, mit oder ohne Zusatz von Kohlensäure, Mineralstoffen, Vitaminen, Zuckerarten, aus Früchten hergestellten zuckerhaltigen Konzentraten, ganz oder teilweise entsäuert, entbittert, entmineralisiert und/oder entfärbt, Aromen, Zusatzstoffen oder ggf. weiteren Zutaten, mit Ausnahme von Alkohol oder alkoholischen Getränken.“ (<http://www.bmelv.de/cae/servlet/contentblob/379756/publicationFile/25947/LeitsaetzeErfrischungsgetraenke.pdf>, 2009).

2.1.2 Mikrobiologie der Fruchtsäfte, -nektare und –schorlen

Das Vorkommen von Mikroorganismen in Frucht- und Gemüsesäften und aus ihnen hergestellte Erzeugnisse kann dazu führen, dass die Qualität des Produktes gemindert wird oder dieses verdirbt. Somit gilt es, bei der Herstellung von Säften die Keimgehalte so gering wie möglich zu halten. Dies beginnt bereits bei der Auswahl der Rohware. Wurmstichiges, angefaultes oder auch Fallobst besitzen eine höhere Keimbelastung. Daher sollte Obst und Gemüse verwendet werden, welches von höherer Qualität ist. Auch bei den Anlagen zur Safterzeugung und Abfüllung, muss die Hygiene eine große Rolle spielen, denn auch hier kann es zur Kontamination mit Mikroorganismen kommen. Deshalb sollte der Eintrag von schädlichen Keimen auf jeder Etappe des Herstellungsprozesses soweit minimiert werden, dass der Verderb durch Kontamination ausgeschlossen werden kann (Dittrich, 1992).

Besonders die chemische Zusammensetzung der Fruchtsäfte und –erzeugnisse bieten für einen Teil der Mikroorganismen einen guten Nährboden. Sie weisen nähr- und wuchsstoffreiche Substrate auf, wie bspw. Zucker, Stickstoffverbindungen. Im Gegensatz dazu steht jedoch der pH-Wert, der den Säften und Erzeugnissen einen guten Eigenschutz liefert, da dieser meist im sauren Bereich (3,0-4,0) liegt. Somit können sich hauptsächlich säuretolerante Mikroorganismen vermehren (Dittrich, 1992).

Am häufigsten verdirbt ein Produkt durch Hefegärung, aber auch Schimmelpilze und Milch- oder Essigsäurebakterien sind am Verderb maßgeblich beteiligt (Dittrich, 1992).

Die Hefegärung wird größtenteils durch den Vertreter *Saccharomyces cerevisiae* verursacht, denn dieser kann sich aufgrund seiner Durchsetzungsfähigkeit in dem im Saft herrschenden Milieu gut vermehren und wachsen. Es handelt sich hierbei um eine sehr gärkräftige Hefeart, welche zu der am häufigsten verbreiteten und gefährlichsten Gattung gehört. Vermehrung und Wachstum findet nicht nur in stillen Getränken statt, sondern auch in karbonisierten Getränken. *Saccharomyces cerevisiae* ist in der Lage den im Fruchtsaft enthaltenen Zucker, wozu hauptsächlich Glucose, Fructose und Saccharose gehören, zu verstoffwechseln. Dies führt zu Geruchs- und Geschmacksfehlern, sowie zu massiven Gärungen und folglich zu Bombagen. Die Verkehrsfähigkeit der Fruchtsäfte wird ebenfalls durch die pektolytische Aktivität einiger Stämme von *Saccharomyces cerevisiae* beeinträchtigt. Hierbei kommt es zur Wasserkragenbildung, zu Ausklarungen, Flockenbildung und starker Bodensatzbildung (Dittrich, 1992).

Eine ebenfalls weitverbreitete Hefegattung ist *Candida parapsilosis*, welche zu den Kahlmhefen gehört und gärschwach ist. Die Vermehrung findet auf zucker- oder alkoholhaltigen Getränken

statt, wobei vorzugsweise Glucose und Fructose vergoren wird. Bombagen sind jedoch nicht zu befürchten, da aufgrund der schwachen Gärung nur ein geringer CO₂-Druck entsteht. Geruchs- und Geschmacksfehler können die Folge der Kontamination mit einer höheren Anzahl an Zellen dieser Hefeart und längerer Inkubationszeiten sein. Durch pektolytische Aktivität kann es ebenfalls zu Ausklarungen kommen. Durch die Sauerstoffbedürftigkeit wächst *Candida parapilosis* hauptsächlich in stillen Getränken, in karbonisierten hingegen bleibt das Wachstum auch bei hohen Keimzahlen aus. Hier liegt die Hefe lediglich latent vor (Dittrich, 1992).

Nach Fiedler (2009) sind Hefen wenig anspruchsvoll, denn es sind kaum organische Substrate oder Lebensmittel vorhanden, welche Hefen nicht befallen können. Zudem können sie unter aeroben, aber auch unter anaeroben Bedingungen wachsen. Das Temperaturoptimum der Hefen liegt im Bereich von 20 – 25°C. Es gibt aber auch Hefearten, die sich außerhalb dieses Optimums vermehren und wachsen können, hier liegen die Grenzen bei ca. 0 – 40°C. Auch hinsichtlich des pH-Wertes sind sie anpassungsfähig. Bevorzugt wird der schwach saure Bereich, allerdings wachsen sie auch im Bereich zwischen pH-Wert 1,5 – 8,5.

Schimmelpilze, wie *Aspergillus niger*, sind ebenfalls säuretolerante Mikroorganismen, können sich aber nur unter aeroben Bedingungen vermehren und wachsen. Somit werden hauptsächlich stille Getränke von ihnen befallen, während karbonisierte Säfte oder Erzeugnisse verschont bleiben. Ist ein Saft o.ä. kontaminiert, kommt es zur Vermehrung des Pilzes an der Flüssigkeitsoberfläche. Durch den Schimmel wird die Sensorik der Produkte beeinträchtigt, es entstehen ein Schimmel- oder Muffton, sowie ein bitterer Geschmack. Ebenfalls negativ wirkt sich die pektolytische Aktivität der Pilze aus, denn dadurch werden Ausklarungen von naturtrüben Säften verursacht (Dittrich, 1992).

Das Vorkommen von Schimmelpilzen in Fruchtsäften ist aber eher selten, Ursache hierfür ist die Behandlung der Produkte mit Hitze, wie bspw. die Pasteurisation (90 – 98°C), die einer kalt-aseptischen Abfüllung vorausgeht. Hierbei werden auch hitzeresistente Ascosporen von *Byssoschlamys*-Arten abgetötet. Trotz durchgeführter Maßnahmen zur Entkeimung der Produkte kann es zum Verderb kommen. Grund dafür ist die Sekundärkontamination, durch in der Luft vorkommenden Konidien, die sich im Abfüllbereich niederlassen. Auch wenn sich die Abfüllung in einem Reinraum befindet, kann man eine Kontamination nicht hundertprozentig ausschließen (Dittrich, 1992, Schlegel, 1992).

Eine Qualitätsminderung kann neben Hefen und Schimmelpilzen auch durch Milchsäurebakterien verursacht werden. Dieser Organismus ist in der Lage, in stillen, aber auch karbonisierten Getränken, Glucose in Milchsäure, Ethanol und Kohlenstoffdioxid abzubauen (Krämer, 2002), wodurch es zu einer pH-Wert Senkung im Fruchtsaft kommt. Ebenso verursacht

das Stoffwechselnebenprodukt Diacetyl Geschmacks- und Geruchsveränderung. Die sensorische Beschaffenheit kann ebenfalls von den Mikroorganismus *Alicyclobacillus acidoterrestris* negativ beeinflusst werden. Denn dieser verursacht einen „medizinischen“ Fehlgeschmack in den Fruchtsäften und ähnlichen Produkten. Zudem kommt es zum Verderb des Produktes durch die Bildung von Di-Bromphenol. Auch die Klärung von Trubsäften durch pektolytische Aktivität kann bewirkt werden. Alicyclobacillen sind Thermophil und extrem säuretolerant, sie überleben und vermehren sich bei pH-Werten im Bereich von 2,2 – 6,0 und Temperaturen um die 46°C. Hinzu kommt, dass die Sporen des Alicyclobacillus hitzeresistent sind und handelsübliche Pasteurisationstemperaturen diese nicht abtöten (Krämer, 2002).

Um eine Kontamination des Endproduktes und somit den Verderb dieses zu verhindern, ist es notwendig, dass nicht nur die Rohware so gut wie möglich keimfrei ist, sondern auch Ausmisch- und Abfüllanlagen. Wichtig ist hierbei die Sauberkeit für die Hygiene im Betrieb, denn nur wenn die Keimzahlen niedrig gehalten werden, können Hitzeanwendung und auch Desinfektion erfolgreich gegenüber Mikroorganismen sein und somit auch die risikofreie Produktion von Fruchtsäften und ähnlichen Erzeugnissen sichergestellt werden (Dittrich, 1992).

2.2 Schnellnachweismethoden

Die Haltbarkeit und Genießbarkeit eines Produktes hängt von seiner mikrobiologischen Qualität ab, somit ist es wichtig die Lebendkeimzahl eines Erzeugnisses bestimmen zu können, um für eine gleichbleibende Güte garantieren und dessen Verderb verhindern zu können. Für die Erfassung der Mikroorganismen kann man die Methoden nach Baltes (1995) in 3 Kategorien einteilen:

Sehr schnelle Verfahren - hierbei liegen die Ergebnisse in weniger als einer Stunde vor,

Schnellverfahren - die Ergebnisse bestehen nach ca. 4-8 Stunden und

Länger dauernde Verfahren - wobei Resultate erst nach 12, 48 oder auch 72 Stunden angezeigt werden.

In den nachfolgenden Kapiteln werden einige Schnellverfahren kurz erläutert.

2.2.1 Impedanzmessung

Die Impedanzmessung ist ein indirektes kulturelles Verfahren, bei der Widerstands- oder Leitfähigkeitsänderungen, welche durch Mikroorganismen verursacht werden, gemessen werden. Durch die Mikroorganismen werden Stoffwechselprodukte gebildet, die in einem flüssigen

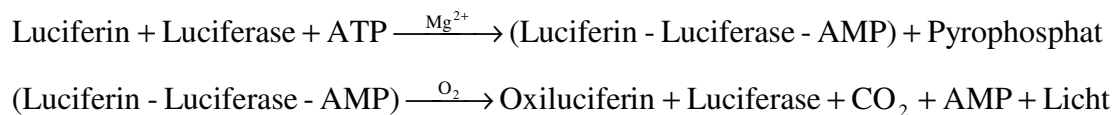
Medium dazu führen, dass der elektrische Widerstand abnimmt bzw. die Leitfähigkeit zunimmt (Pichhardt, 1998).

Nach Baltes (1995) kann eine Widerstandsveränderung erst bei einer Zellzahl von ca. $10^6 - 10^7$ /ml registriert werden, demzufolge ist eine längere Bebrütungszeit bei geringen Keimzahlen einzuhalten, um das gewünschte Ergebnis zu erzielen.

2.2.2 Biolumineszenzmethode

Laut Baltes (1995) ist die Biolumineszenzmethode ein ebenfalls indirektes Verfahren zur Keimdetektion, wobei aufgrund des mikrobiellen ATP-Gehaltes auf den Keimgehalt der Untersuchungsprobe geschlossen werden soll.

Bei diesem Verfahren wird das in den lebenden Mikroorganismen enthaltene Adenosintriphosphat (ATP) extrahiert und dieses reagiert dann mit einem Luciferin/Luciferase-System. Bei dieser Reaktion kommt es zu einer Oxidation von Luciferin zu Oxiluciferin, wobei das ATP und die Magnesiumionen als Cofaktoren dienen. Katalysiert wird dieses durch das Enzym Luciferase. Durch Decarboxylierung und weitere Zwischenschritte geht das Oxiluciferin aus seinem Übergangszustand in den angeregten Zustand über. Fällt dieser in den Grundzustand zurück, wird Energie frei, die in Form von Licht abgegeben wird. Die dabei entstehende Lichtintensität ist dabei der Konzentration an ATP in den mikrobiellen Zellen direkt proportional (Krämer, 2002).



Um bei der Reaktion nicht auch somatisches ATP zu messen, kann dieses vor der Extraktion des mikrobiellen ATP's aus den Zellen durch ATPasen abgebaut werden. Laut Pichhardt liegt die unterste Nachweisgrenze bei Reinkulturen bei ca. 10^6 Keimen/ml.

2.2.3 Durchflusszytometrische Messung (D-Count)

Zur quantitativen Bestimmung von Mikroorganismen kann die Durchflusszytometrie genutzt werden. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass entstehendes Fluorochrom mit Hilfe von Anregungslicht zum Fluoreszieren angeregt wird und die dabei emittierte Wellenlänge mit einem Analysegerät detektiert wird.

Hierzu werden die Mikroorganismen mit einem Färbesubstrat versetzt, welches durch die Zellmembran passiv in die Zelle dringt und durch eine enzymatische Reaktion in eine

fluoreszierende Substanz (Fluorochrom) umgewandelt wird (Abbildung 1). Damit dies möglich ist, ist es notwendig, dass die Zelle Enzymaktivität und Membranintegrität aufweist. Die angefärbten Zellen werden dann in das Zytometer injiziert und in einer Messzelle mit Hilfe eines Laserstrahls mit einer Wellenlänge von 488 nm zur Fluoreszenz angeregt (Handbuch D-Count-Rapid microbiology testing).

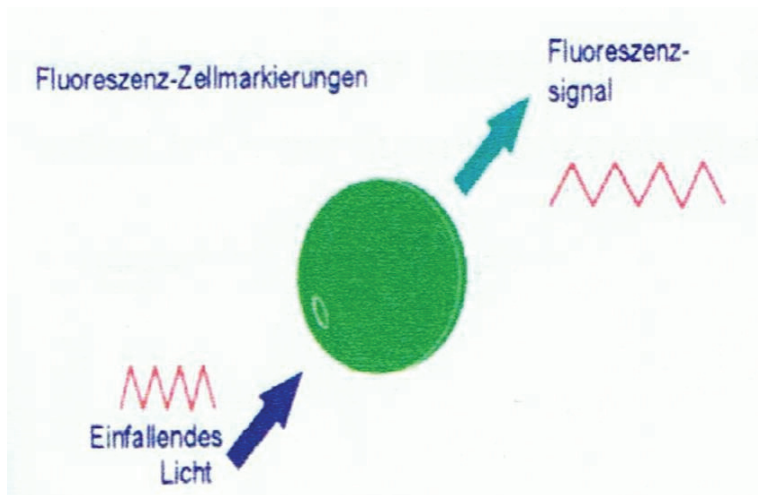


Abbildung 1: Darstellung der Fluoreszenzanregung einer MO-Zelle mit einem Laserstrahl (aus Handbuch D-Count Rapid microbiology testing, 2003)

Die Messzelle wird von den angefärbten Zellen nacheinander und umhüllt von einer Flüssigkeit (ChemSol S) durchlaufen, so dass der Laser jede einzelne Zelle erfassen kann (Abbildung 2).

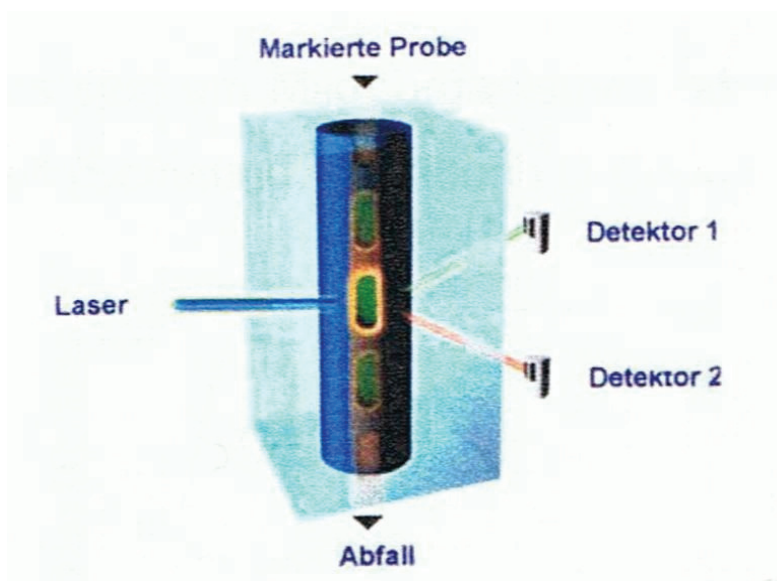


Abbildung 2: Darstellung der Messzelle im Durchflusszytometer „D-Count“ (aus Handbuch D-Count Rapid microbiology testing, 2003)

In der folgenden Abbildung 3 ist eine Übersicht dargestellt, wie die Fluoreszenz erfasst wird. Hierbei ist erkennbar, dass die emittierte Fluoreszenz mit Hilfe eines Filters in rotes und grünes Licht aufgetrennt und über Photomultiplier gesammelt wird. Mit Hilfe der Photomultiplier werden die Lichtsignale in elektronische Signale umgewandelt und die Daten digital verarbeitet. Die Angabe des Ergebnisses erfolgt in Counts/ml, welches den KfE/ml gleichzusetzen ist.

Optische Bank

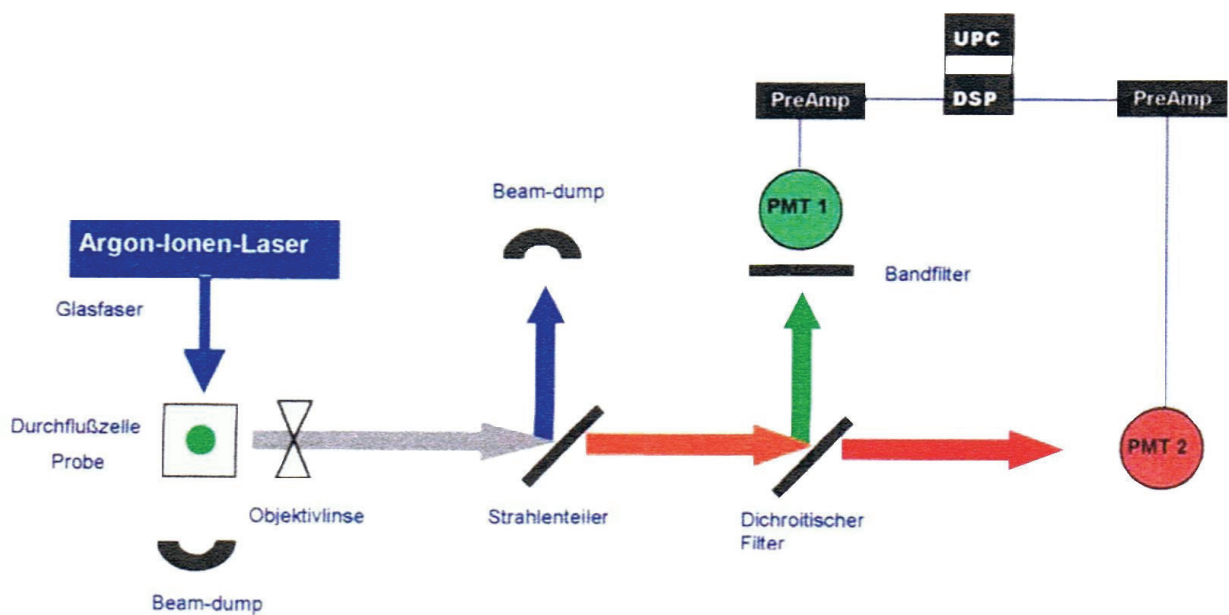


Abbildung 3: Darstellung der Messung der emittierten Fluoreszenz von MO-Zellen (aus Handbuch D-Count-Rapid microbiology testing, 2003)

Bei der Verarbeitung der Lichtsignale spielt das Farbverhältnis von roter zu grüner Fluoreszenz eine Rolle. Es wird als Diskriminierungsverhältnis herangezogen, denn für das verwendete Fluorochrom ist das Emissionsspektrum charakteristisch. Berechnet man den Quotient (Ratio) des Farbverhältnisses, wird erkennbar, ob es sich um eigenfluoreszierende Partikel handelt oder um mikrobielle Zellen. Ergibt der Quotient einen Wert von $0,9 \pm$ eines einstellbaren Toleranzbereiches, werden die eingehenden Lichtsignale von der Software als Mikroorganismen gewertet. Es handelt sich nicht um mikrobielle Zellen, wenn sich der Quotient ober- oder unterhalb des Wertes bewegt.

Neben der Ratio gibt es die Möglichkeit die verarbeiteten Signale grafisch darzustellen. Die Daten können in einem Diagramm als „Punkt-Wolke“ wiedergegeben werden. Hierbei wird das

Verhältnis von rotem zu grünem Licht grafisch sichtbar. Der Quotient $0,9 \pm$ des einstellbaren Toleranzbereiches findet man in dem Diagramm in Form eines Gates (heller Balken) wieder.

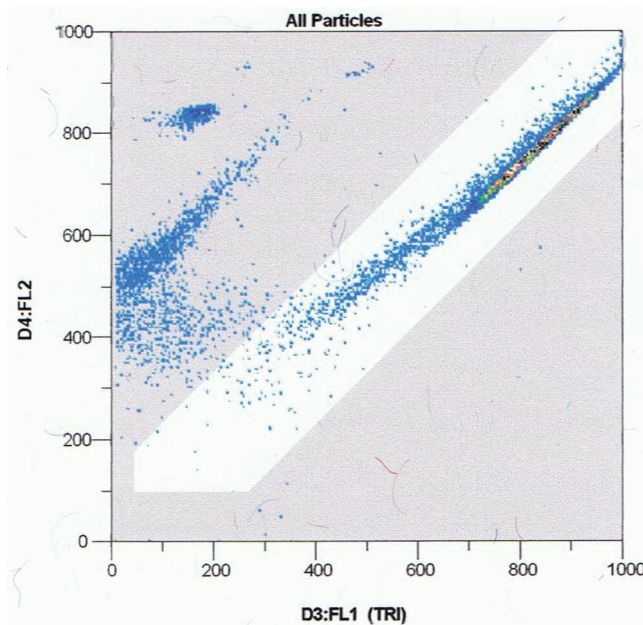


Abbildung 4: Beispiel einer Punktwolke („hohes C Apfel Acerolasaft angeimpft mit *Saccharomyces cerevisiae* gemessen am 26.06.2009)

In der Abbildung 4 ist dieses Gate zu erkennen. In diesem Bereich sind die erfassten mikrobiellen Zellen dargestellt. Oberhalb des Gates befindet sich eine Farbwolke, diese spiegelt die eigenfluoreszierenden Partikel des Saftes wieder. Gemessen wurde hier „hohes C“ Apfel Acerolasaft, angeimpft mit der Hefegattung *Saccharomyces cerevisiae*.

3 Material und Methode

3.1 Mikroorganismen

3.1.1 *Candida parapsilosis*

Die Hefegattung *Candida parapsilosis*, welche für die Untersuchungen verwendet wird, ist ein Wildisolat aus einem Apfelsaft der Marke Trinkgenuss im November 2001.

Candida parapsilosis besitzt runde, ovale, zylindrische oder langgestreckte Zellen, welche ca. 3 x 6 µm groß sind und einzeln, paarweise oder in Ketten vorliegen. Die Kolonien sind weiß bis cremefarben, rund, aber auch unregelmäßig, leicht erhoben, schwach glänzend und weich mit glatter Oberfläche. Zudem sind sie in der Lage Pseudomycelien aus verzweigten Ketten langgestreckter Zellen zu bilden. Die Vermehrung dieser Hefegattung findet durch multilaterale Sprossung statt (Dittrich, 1993).

3.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Die in dieser Arbeit genutzte Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde aus dem DSM Stamm 70457 isoliert.

Die Zellen der Gattung *Saccharomyces cerevisiae* haben eine durchschnittliche Größe von (5-8) x (5-12) µm. Sie kommen häufig in ovaler oder elliptischer Form, aber auch fadenförmig vor und treten als Einzelzellen oder in Paaren auf. Es werden weißliche bis cremefarbene Kolonien gebildet, welche erhoben, gewölbt oder konvex sind. Sie besitzen einen runden oder auch welligen Kolonierand. Das Erscheinungsbild ist undurchsichtig, leicht glänzend, weich, glatt oder mit feinen Furchen (Dittrich, 1993).

3.1.3 *Lactobacillus rhamnosus*

Der hier verwendete *Lactobacillus rhamnosus* stammt aus einem unbekanntem Rohstoff IM Frühjahr 2003.

Das Milchsäurebakterium *Lactobacillus rhamnosus* gehört zu der Gruppe der heterofermentativen Gärer. Lactobacillen sind gram-positive Bakterien, die fakultativ anaerob sind, sowie Katalase und Oxidase negativ. Sie kommen als Kurzstäbchen (0,9 x 2,0 µm) mit runden Enden vor, welche einzeln, in Paaren oder Ketten auftreten. Die Kolonien haben einen relativ kleinen Durchmesser von 1-2mm und sind rund, weich, leicht konvex, von weißer oder beiger Farbe mit glatter leicht glänzender Oberfläche (Dittrich, 1993).

3.1.4 *Alicyclobacillus acidoterrestris*

Der *Alicyclobacillus acidoterrestris* ist aus DSM Stamm 2498 isoliert.

Das gram-positive thermophile Stäbchenbakterium, dessen Größe ca. 1 µm beträgt, ist ein säuretoleranter Sporenbildner, dessen pH-Optimum bei 3,0 – 5,0 liegt. Die von diesem Organismus gebildeten Sporen sind sehr hitzetolerant, so dass sie durch handelsübliche Pasteurisation nicht abgetötet werden (Krämer, 2002).

3.1.5 *Aspergillus niger*

Der im Rahmen dieser Diplomarbeit genutzte Schimmelpilz stammt aus einer Stammkultur der FH Lippe 1998 (DMSZ) welcher im Frühjahr 2003 isoliert wurde.

Aspergillus niger ist ein weitverbreiteter schnellwüchsiger Schimmelpilz, welcher auf der Oberfläche von Fruchtsäften ein weißliches bis gelbliches Mycel bildet, welches bei Ausbildung von Konidien eine grünliche bis schwarze Farbe bekommt. Die Träger der Konidien sind „glattwandig, transparent oder leicht bräunlich und bis 3 µm lang“ (Dittrich, 1993).

3.2 Untersuchungsproben

In der folgenden Tabelle 1 werden die Fruchtsäfte, -nektare und deren Erzeugnisse aufgelistet, die für die Untersuchungen im Rahmen dieser Diplomarbeit verwendet wurden.

Tabelle 1: Auflistung der im Rahmen der Diplomarbeit verwendeten Produkte

Produkt	Eigenschaft	
„hohes C“ Apfel- Acerola Saft	Volumen	1.0l
	Zusammensetzung	Apfelsaft aus Apfelsaftkonzentrat (97%), Acerolasaft aus Acerolasaftkonzentrat (3%)
„hohes C“ Orangensaft	Volumen	1.0l
	Zusammensetzung	Orangensaft aus Orangensaftkonzentrat (100 %)
„Trinkgenuss“ Bananennektar	Volumen	1.0l
	Zusammensetzung	Wasser, Bananenmark (25 %), Zucker, Säuerungsmittel Citronensäure, Antioxidationsmittel Ascorbinsäure
„Trinkgenuss“ Pink Grapefruitnektar	Volumen	1.0l
	Zusammensetzung	Pink Grapefruitsaft aus Pink Grapefruitsaftkonzentration (52 %), Wasser, Zucker, Pink Grapefruitfruchtfleisch (3 %)

3.3 Geräte

3.3.1 allgemeine Geräte

Die Geräte des allgemeinen Gebrauches sind in der Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Eingesetzte Geräte des allgemeinen Gebrauchs

Gerät	Hersteller
Waage	Fa. Satorius
Autoklav	Fa. KSG, Olching
Brutschrank	Fa. Memmert
	Fa. Köttermann
Keimzählgerät	Fa. WTW
Sterilbank	Fa. Köttermann
Wasserbad	Fa. Memmert

3.3.2 Promilite III

Für die im Rahmen dieser Diplomarbeit durchgeführten Versuche wurden u.a. das ATP-Messgerät Promilite III der Firma Promicol genutzt. Die quantitative Bestimmung der Keimzahl basiert hier auf der Biolumineszenz. Gesteuert wird das Gerät mit Hilfe der Software Proscreen Version 2.11.

3.3.2.1 Geräteaufbau



Abbildung 5: Mikrotiterplatte (A), Promilite III System (B) mit Reagenzien (Diplomarbeit - Methodenvergleich zur Keimdetektion in Erfrischungsgetränken und Fruchtsäften, 2008)

In der obigen Abbildung 5/A und 5/B sind eine Mikrotiterplatte mit Pipette und das Gerät Promilite III der Firma Promicol dargestellt.

Für die Untersuchung der Proben, werden 50 µl dieser mit Hilfe der Pipette in die Mikrotiterplatte pipettiert. Die Platte, welche 96 Kavitäten umfasst, gelangt dann über das Schubfach (1), welches sich im vorderen Bereich des Gerätes befindet, in die Apparatur. Der Untergrund, auf dem sich die Platte befindet ist beweglich. Auf diese Weise können die Proben im Inneren des Promilite III zu den jeweiligen Injektionsorten, sowie zum Photomultiplier automatisch gesteuert werden. Auf dem Gerät befinden sich die Reagenzien (2), die über die Injektionsnadeln (3) zu den Proben in der Mikrotiterplatte in einem bestimmten Pipettierschema zudosiert werden. Nach Ablauf der Reaktion, welche ebenfalls in den Kavitäten erfolgt, werden die entstandenen Lichtsignale mit Hilfe des Photomultipliers (4) gemessen, verstärkt und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Mit Hilfe der Software Proscreen wird dieses dann in RelativLightUnits (RLU) angezeigt.

3.3.2.2 Reagenzien

Proase/Prosox:

Dieses Reagenz führt zur Zerstörung der Zellwand von Fruchtzellen, dadurch wird somatisches ATP frei. Das somatische und das freie ATP, welches sich im Saft befindet, werden durch dieses Reagenz zerstört.

Promex:

Dieses Reagenz bewirkt, dass ATP, welches sich in den Mikroorganismen befindet, frei wird.

Prolux:

Mit Hilfe dieses Reagenz kommt es zum Reaktionsschema, welches im Punkt 2.2.2 angegeben ist.

Proclean:

Dieses Reagenz dient zur Reinigung des Gerätes, inklusive der Injektionsnadeln und den daran befindlichen Schläuchen.

Proflush:

Dieses Reagenz dient zur Neutralisation des Gerätes, inklusive der Injektionsnadeln und den daran befindlichen Schläuchen.

3.3.2.2 Vorbereitung und Verwendung unter Nutzung der Software Proscreen

Die Nutzung des Gerätes Promilite III wird durch die Software Proscreen Version 2.11 unterstützt. Diese steuert die Reinigung, die Vorbereitung, sowie die Probenmessung.

Vorbereitung und Reinigung:

Die untere Abbildung 6 zeigt die Bedieneroberfläche über die die Initialisierung und die Reinigung des Gerätes gesteuert werden. Im Bereich (1) kann durch Klick auf den Button das Gerät direkt initialisiert werden. Über die Schaltflächen unter (2) „Open“ und „Close“ kann das Schubfach für die Mikrotiterplatte geöffnet und geschlossen werden. Der Teil (3) ist für die Vorbereitung sowie für die Reinigung zu verwenden. Vor Betätigung der Schaltfläche „Start Up“ ist die Reinigungslösung „Proclean“ in die jeweiligen Halterungen auf dem Gerät zu positionieren. Durch Klick auf die Schaltfläche werden die Schläuche und Injektoren mit der Reagenz gespült. Dieses bewirkt die Reinigung der Schläuche, sowie Injektionsnadeln und das Entfernen von eventuell enthaltender Luft. Nach dem Vorgang erfolgt die Aufforderung

„Proclean“ durch „Proflush“ auszutauschen, wonach das System nochmals mit der Neutralisationslösung gespült wird. Im Anschluss erfolgt der Ersatz von „Proflush“ durch die jeweiligen Reagenzien und mit Klicken auf die Fläche „Prime“ erfolgt das Spülen der Injektoren und Schläuche mit diesen. Nach Ablauf dieser Prozedur kann die Messung der Proben vorbereitet werden. Ist eine Messung durchgeführt worden und wird das Gerät nicht weiter genutzt, werden die Reagenzien entfernt und die Injektoren an Proflush angeschlossen. Die Spülung wird mit „Close Down“ gestartet. Nach Beendigung des Spülvorganges und Aufforderung, wird „Proflush“ durch „Proclean“ ersetzt und der Ablauf wiederholt sich. Im rechten Bereich (4) der Bedieneroberfläche können die Füllstände der Reagenzien überprüft werden.

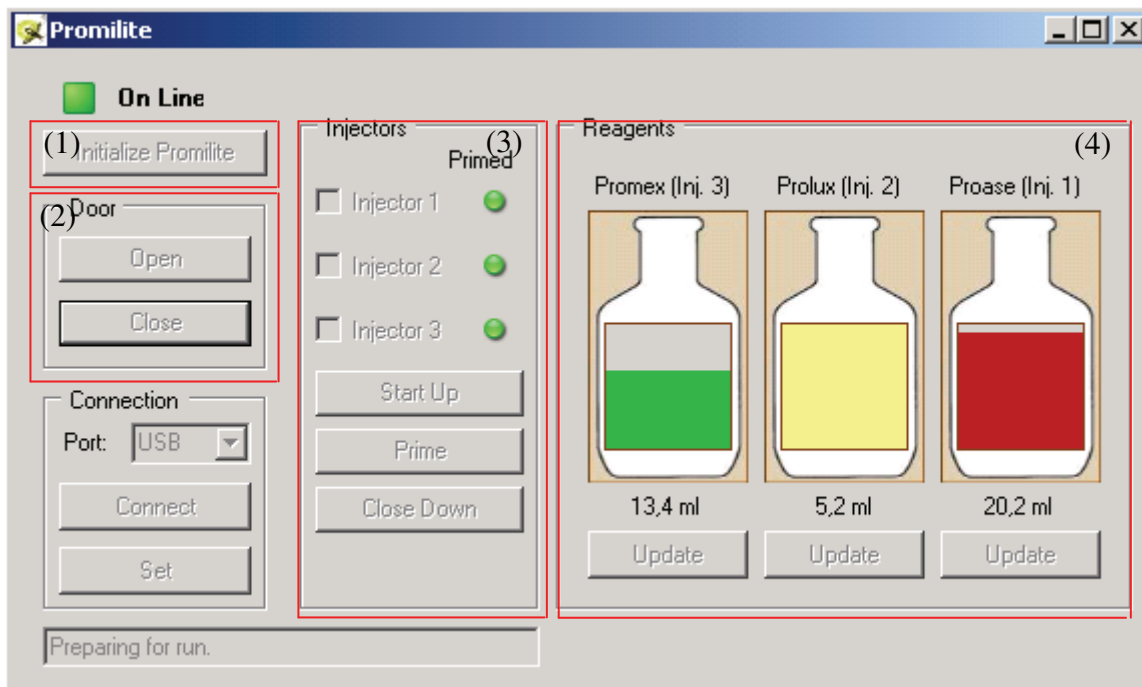


Abbildung 6: Bedieneroberfläche der Software Proscreen Version 2.11 zum Initialisieren des Gerätes (Diplomarbeit - Methodenvergleich zur Keimdetektion in Erfrischungsgetränken und Fruchtsäften, 2008)

Um nun eine Probemessung durchführen zu können, muss im Vorfeld gewährleistet werden, dass in das Innere des Gerätes kein Licht einfällt, das die Reagenzien frei von Keimen und reaktionsfähig sind. Hierzu sind Reaktionsabläufe programmiert, die durch die Software bedient werden.

Für die Lichtkontrolle wird eine leere Mikrotiterplatte in das Gerät gefahren. Im Anschluss daran wird über die Menüleiste die Oberfläche einer „neuen Platte“ geöffnet. Durch Auswahl des Protokolls „Lichtkontrolle“ und Betätigung der Schaltfläche „Run“ misst der Photomultiplier die

96 Kavitäten einer leeren Mikrotiterplatte nacheinander. Tritt Licht in das System oder hat die Platte UV-Licht gespeichert, sind die Messwerte sehr hoch. Ist dies der Fall muss der Test mit einer neuen Platte wiederholt werden. Kommt es hier ebenfalls zu einem positiven Befund, muss das System auf Lichteintritt überprüft werden, dieses kann von außen durch eventuell lose Anschlüsse der Fall sein. Bei einem negativen Ergebnis folgt die Kontrolle der Reagenzien. Um die Keimfreiheit dieser zu überprüfen, wird über eine „neue Platte“, das Protokoll „Negativkontrolle“ ausgewählt und für bspw. eine Doppelbestimmung zwei Kavitäten markiert. Mit „Run“ wird die Reaktion gestartet. Die Reagenzien werden hierbei über die Injektoren in die Kavitäten injiziert und mittels Photomultiplier gemessen. Bei Detektion eines Lichtsignals besteht die Gefahr einer Kontamination und die Reagenzien sollten ausgetauscht werden. Im Anschluss folgt der Test der Reaktionsfähigkeit der Reagenzien. Dazu werden 50µl einer Positivprobe in eine Platte injiziert und über das Protokoll „Positivkontrolle“ gemessen. Werden die Mikroorganismen der Positivprobe detektiert, ist gewährleistet, dass auch eventuelle Kontaminationen in den Untersuchungsproben erfasst werden können.

3.3.2.3 Probenmessung

Vor Untersuchung der Proben ist für eine saubere Arbeitsfläche zu sorgen. Nach gutem Durchmischen der Probe, werden 50 µl mit einer Pipette entnommen und die Spitze mit einem Einmaltuch von Mikrospritzern entfernt. Anschließend wird die Probe in die Mikrotiterplatte pipettiert. Die Abbildung 7 zeigt die Oberfläche, über die die Daten über das Produkt und das dazugehörige Protokoll eingegeben werden. In diesem Protokoll ist genau festgelegt, welches Reagenz zu welchem Zeitpunkt in die Mikrotiterplatte zu den Proben zu dosiert wird und wie lange dessen Einwirkzeit ist. Bei dem hier verwendeten „Fruit Juice“-Protokoll wird zunächst „Proase/Prosox“ zu den Proben pipettiert. Die Wirkzeit beträgt 40 min. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden im Wechsel „Promex“ und „Prolux“ zu den Proben injiziert.

Im Bereich (1) erfolgt die Vergabe der Plattenidentifikation. Diese gibt das Untersuchungsdatum, sowie die Anzahl, der an diesem Datum gemessenen Platten wieder. Hier erfolgt auch die Auswahl des Protokolls und der Person, die die Messung durchführt. Die Wahl der Produktgruppe und des jeweiligen Produktes wird in der oberen Mitte (2) ausgeführt. Durch diesen Vorgang erscheinen automatisch die jeweiligen Grenzwerte eines Produktes. Der Bereich (3) stellt die Mikrotiterplatte dar. Hier wird durch Markierung die Platzierung der Proben in den jeweiligen Kavitäten angegeben, aber auch zusätzliche Informationen können eingefügt werden. Durch Klick auf die Schaltfläche „Run“ wird dann die Untersuchung gestartet.

Plate: 16112007-2

Plate Id: 16112007-2

Protocol: Fruit Juice

Technician: GREGOR

Kit Lot No:

Product to Assign

Group: (Select)

Product: (Select)

Pass: Retest: Fail:

Sample Detail

Sample Id: TG Ananas 1 Row: 1

Product: Fruchtsäfte Allgemein Col: 1

Pass: 100 Retest: 150 Fail: 200

Result: 53

View: Setup Run

Created: 16.11.2007 09:34:13 Has Run: Loaded from file: Background Subtraction: Stopped:

Modified: 16.11.2007 09:34:13 Test Date: 16.11.2007 09:34:24 Background RLU: 5 Stop Well:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	53	49	28	53	30	29	66	61	38	61	23	24
B	52	63	32	44	27	30	34	34	36	41	17	29
C	49	56	29	18	24	25	42	52	30	58	20	18
D	51	62	32	29	27	27	33	53	23	76	22	25
E	48	52	29	69	12	25	53	47	26	49	17	27
F	70	60	45	43	29	31	31	34	31	52	26	27
G	76	46	28	40	24	24	33	42	36	33	39	57
H	67	63	26	41	31	19	45	22	33	45	33	16

Abbildung 7: Bedieneroberfläche der Software Proscreen Version 2.11 für die Probeneingabe (Diplomarbeit - Methodenvergleich zur Keimdetektion in Erfrischungsgetränken und Fruchtsäften, 2008)

3.3.2.4 Darstellung der Ergebnisse

Im Anschluss an die Messung werden die Ergebnisse über die Bedienersoftware Proscreen (siehe Abbildung 7) angezeigt. Für den besseren Überblick werden die Resultate mit einer Farbe unterlegt. Wird ein Messwert mit der Farbe Grün hinterlegt, bedeutet das, dass keine Kontamination vorhanden ist, die Probe ist negativ. Bei einem suspekten Ergebnis erfolgt die Kennzeichnung mit gelb und eine kontaminierte Probe erscheint rot.

Die Angabe der Messergebnisse erfolgt in RLU, hierbei ist die Intensität des entstehenden Lichtes direkt proportional der Zellkonzentration an ATP. Für die Auswertung und weitere Verarbeitung der Daten, besteht die Möglichkeit, die Ergebnisse in eine Excel-Datei zu exportieren.

3.3.3 D-Count

Die Firma Eckes Granini stellte für die Untersuchungen im Rahmen der Diplomarbeit, dass Durchflusszytometer „D-Count“ der Firma Chemunex zur Verfügung.

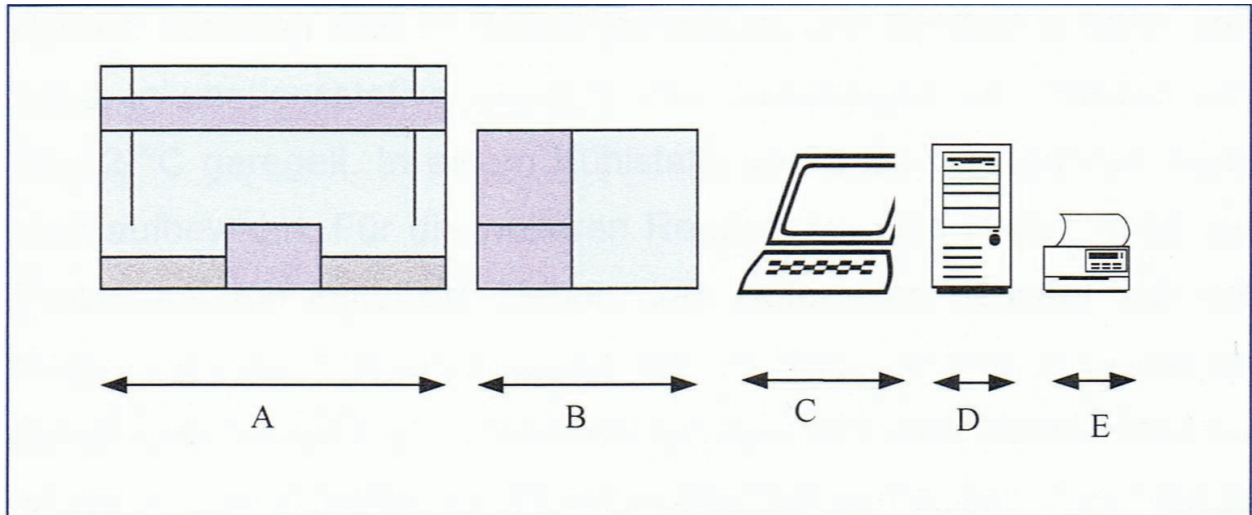


Abbildung 8: Schematische Darstellung des D-Count Systems (aus Handbuch D-Count Rapid microbiology testing, 2003)

Das System des „D-Count“ der Firma Chemunex besteht aus dem Pipettierautomaten (A), dem Analysator (B) und dem dazugehörigen Computersystem (C-E) (Abbildung 8).

3.3.3.1 Geräteaufbau

3.3.3.1.1 Pipettierautomat



Abbildung 9: Pipettierautomat des D-Counts (aus Handbuch D-Count Rapid microbiology testing, 2003)

Der Pipettierautomat, welcher in der Abbildung 9 gezeigt wird, enthält neben den Proben auch die für die Reaktion nötigen Reagenzien, sowie zwei Injektionsnadeln. Ein Durchlauf kann maximal 50 Proben (Batch) umfassen, welche sich in kleinen Röhrchen (Tubes) befinden. Die Tubes werden in temperierte Inkubationsstative ($30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) gesetzt. Für die Reagenzien sind ebenso Halterungen vorgesehen. Das für das Färbesubstrat, ist ebenfalls temperiert ($3 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$). Die Trägerflüssigkeit befindet sich neben dem Pipettierautomaten, diese wird über ein Schlauchsystem mit zwei Saugstäben zu den Injektionsnadeln befördert. Ein Abfallbehälter befindet sich ebenfalls außerhalb des Automaten. Für das Spülen der Injektionsnadeln und das Injizieren der Proben steht jeder Nadel eine Waschstation mit Injektionsöffnung zur Verfügung. Mit Hilfe des Automaten werden dann die Reagenzien mit Hilfe der zwei Injektionsnadeln zu den Proben pipettiert und anschließend in den Analysator injiziert.

3.3.3.1.2 Analysator

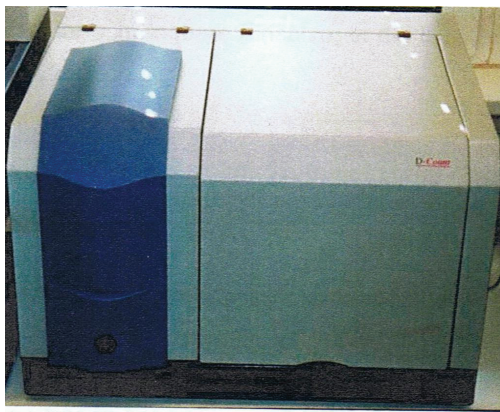


Abbildung 10: Analysator des D-Counts (aus Handbuch D-Count Rapid microbiology testing, 2003)

Der Analysator (Abbildung 10) enthält die Durchflusszytometereinheit mit Laser und Messzelle, zum Schutz des Systems ist eine lichtundurchlässige Abdeckung angebracht. Das vom Laser erzeugte Licht trifft genau auf die Durchflusszelle (Quarz Flow cell) und wird auf den Probendurchfluss zentriert. Der Pipettierautomat injiziert $100\mu\text{l}$ Analysevolumen in die Messzelle ($250 \times 250\mu\text{m}$). Die Probe wird mit einer ChemSol S Hülle versehen, wodurch es zu einem schmalen Flüssigkeitsstrom kommt. Aufgrund dessen können die angefärbten Mikroorganismen das anregende Licht des Lasers einzeln passieren. Proben, die schon geprüft worden sind, gelangen anschließend in einen Abfallbehälter.

Kommt es zu fluoreszenten Signalen, werden diese von sensitiven Detektoren aufgenommen und die Daten digital verarbeitet.

3.3.3.1.3 Computer

Der hier verwendete Computer ist ein Gerät der Marke Dell, Model: OptiPlex GX 260. Für die Bedienung der gesamten Apparatur, ist die D-Count Software installiert. Über die Software werden die Analysedaten angezeigt und die Reinigung, sowie die Steuerung des Pipettierautomaten und des Analysators kann kontrolliert werden. Zudem erfolgt die Eingabe der Probennummern, damit nachzuvollziehen ist, welches Ergebnis welcher Probe zugeordnet ist.

3.3.3.2 Reagenzien

ChemSol S (304-R3065-01):

Dieses Reagenz dient als Träger- und Spülflüssigkeit. Die Lagerung erfolgt bei Zimmertemperatur. Geöffnete Kanister müssen nach 3 Tagen, aufgrund von Kontaminationsgefahr verworfen werden.

Standard A (301-R5068-01) / Standard G (306-R5095-01):

Dieses Reagenz dient als Kalibrator. Die Lagerung erfolgt bei Zimmertemperatur. Vor Gebrauch mindestens 30 Sekunden schütteln.

ChemSol A7 (306-R2082-02):

Dieses Reagenz dient als Lösungspuffer. Lagerung bei Zimmertemperatur. Eine Flasche reicht für eine Serie (Batch) Serie d.h. 50 Proben. Geöffnete Flaschen können im Kühlschrank bis zur Verwendung am nächsten Tag (max. 1 Tag) gelagert werden. Das Risiko einer Kontamination muss allerdings berücksichtigt werden.

ChemSol B24 (306-R2051-03):

Diese Reagenzien dienen als Markierungspuffer. Lagerung bei Zimmertemperatur. Eine Flasche reicht für eine komplette Serie, d.h. für 50 Proben. Geöffnete Flaschen können im Kühlschrank bis zur Verwendung am nächsten Tag gelagert werden. Das Risiko einer Kontamination muss dabei aber berücksichtigt werden.

ChemChrome V26 (306-R1001-01):

Diese Reagenzien dienen als Färbesubstrate. Die Lagerung erfolgt sofort nach Erhalt bei 2 - 8 C°. Eine Flasche reicht für eine ganze Serie, d.h. für 50 Proben. Nach Entnahme aus dem Kühlschrank muss das geöffnete Fläschchen sofort in das Temperierack bei 1 - 3 C° auf den Automaten gestellt werden.

CSV (306-R4102-01):

Dieses Reagenz dient als Gegenfärbereagenz. Die Lagerung erfolgt sofort nach Erhalt bei 2 - 8 C°. Dieses Reagenz enthält auch den internen Standard zur Kontrolle des Durchflusses im Zytometer. Vor der Benutzung ist das Reagenz deshalb zu schütteln, für mindestens 15 Sekunden. Wird die Probe nicht in ausreichender Menge gefunden, so wird das Ergebnis als nicht validiert ausgegeben. Eine Flasche reicht für eine Serie, d.h. 50 Proben. Geöffnete Flaschen können im Kühlschrank zur Verwendung am nächsten Tag (max. 1 Tag) gelagert werden. Das Risiko einer Kontamination muss dabei jedoch berücksichtigt werden.

CS 26 A (306-R4105-01):

Dieses Reagenz dient als Gegenfärbereagenz. Die Lagerung erfolgt sofort nach Erhalt bei 2 - 8 C°. Dieses Reagenz enthält auch den internen Standard zur Kontrolle des Durchflusses im Zytometer. Vor der Benutzung ist das Reagenz deshalb zu schütteln, für mindestens 15 Sekunden. Wird die Probe nicht in ausreichender Menge gefunden so wird das Ergebnis als nicht validiert ausgegeben. Eine Flasche reicht für eine Serie, d.h. 50 Proben. Geöffnete Flaschen können im Kühlschrank bis zur Verwendung am nächsten Tag (max. 1 Tag) gelagert werden. Das Risiko einer Kontamination muss dabei jedoch berücksichtigt werden.

CS 13 (306-R-4108-01):

Dieses Reagenz dient zur Verhinderung unspezifischer Färbung. Die Lagerung erfolgt bei Zimmertemperatur. Eine Flasche reicht für eine Serie, d.h. 50 Proben. Geöffnete Flaschen können im Kühlschrank zur Verwendung am nächsten Tag (max. 1 Tag) gelagert werden. Das Risiko einer Kontamination muss dabei jedoch berücksichtigt werden.

CSYK (300-R4101-02):

Bestehend aus 10 ml Diluent II (306-R3085-02) und 0.8g CSR Pulver (312-R4095-01). Diese Reagenzien dienen als Reduktionsmittel. Die Lagerung erfolgt bei Zimmertemperatur, das CSR Pulver ist trocken zu lagern (Vorzugsweise in einem Exsikkator). Vor der Verwendung wird das Pulver in das Diluent II gemischt und genau 30 Sekunden geschüttelt. Hinterher ist zu prüfen, dass die vollständige Lösung des Pulvers erreicht wurde. Das vollständig gemischte Reagenz wird mit 15 Tropfen IsoRed überschichtet. Dieses zusammen gemischte Reagenz ist nur für 2 h stabil und muss für jede Serie neu vorbereitet werden.

IsoRed (301-R3079-01):

Dieses Reagenz dient als Schutz für CSYK vor Oxidation. Lagerung bei Zimmertemperatur.

Cleaning 5 (306-R3107-02):

Dieses Reagenz dient als Spülflüssigkeit zum Verhindern des Carry Over bei den Messungen. Die Lagerung erfolgt bei Zimmertemperatur.

Cleaning 3 (306-R3064-01):

Dieses Reagenz dient zur täglichen Reinigung des D-Count Systems. Lagerung erfolgt bei Zimmertemperatur.

Für alle Reagenzien liegen Sicherheitsdatenblätter vor.

3.3.3.3 Vorbereitung und Verwendung des Gerätes unter Nutzung der D- Count Software

Bevor das Gerät in Betrieb genommen wird, werden die Ansaugstäbe in einen Kanister ChemSol S gestellt, sowie ein leerer Behälter für die Abfallflüssigkeiten neben dem Pipettierautomaten positioniert. In den Analysator werden ebenfalls eine sterile Flasche mit ChemSol S und ein Abfallbehälter platziert. Im Anschluss daran kann das D-Count, in der Reihenfolge: Pipettierautomat, Analysator, Computer, Bildschirm und Drucker, eingeschaltet werden.

Reinigung:

Die Reinigung des Systems sollte vor und nach jedem Untersuchungstag („Daily Clean“) erfolgen, sowie eine Extrareinigung am Ende der Woche mit einem Filter- und Flaschenwechsel („Weekly Clean“).

Bei einem „Daily Clean“ werden das Reagenz Cleaning 3 in die jeweilige Position gebracht. Über die Oberfläche der Software gelangt man über die Schaltfläche „Clean System“ auf die Übersicht der Reinigungsprogramme. Durch Anklicken der Fläche „Daily Clean“ wird die Reinigung gestartet. Nach Ablauf der Hälfte der Zeit werden die Reagenzien gegen einen Kanister und eine Flasche ChemSol S ausgetauscht.

Das „Weekly Clean“ wird mit den Reagenzien Firstsinald, Cleaning 3 und ChemSol aufeinanderfolgend durchgeführt. Gestartet wird dieses Programm durch Betätigung der Schaltfläche „Weekly Clean“ in der Übersicht des „Clean System“.

Die Reinigung dient dazu Rückstände, schon abgelaufener Messungen aus dem System, wozu die Injektionsnadeln, Schläuche, Spritzen usw. gehören zu entfernen. Um eine Kontamination des Gerätes zu verhindern, sollten die Abfallkanister regelmäßig geleert werden.

Kalibration:

Die Kalibration kann erst nach der Aufwärmphase des Lasers erfolgen, dies dauert ca. 20 min. Erst nach dem das Gerät kalibriert ist, können auch Probemessungen und Spülvorgänge durchgeführt werden. Zudem sollte die Kalibration täglich durchgeführt werden, damit eventuelle Gerätefehler, Veränderungen in der Empfindlichkeit, Bewegungen der Durchflusszelle, sowie Abweichungen im Brennpunkt des Lasers erkennbar werden.

Für die Kalibration wird der Standard G genutzt, dies ist eine Suspension, die aus Latexkügelchen mit einer Größe von 1 μm bestehen, die mit Fluorescein beladen sind. Diese sollen angefärbte zur Fluoreszenz angeregte Mikroorganismen widerspiegeln. Bevor der Standard G benutzt wird, sollte dieser im Ultraschallbad homogenisiert und auf dem Vortex ca. 30 s geschüttelt werden. Anschließend wird die Flasche im Pipettierautomaten in die dafür vorgesehene Position gebracht und die Kalibration über die Software gestartet. Dazu betätigt man im Hauptmenü die Schaltfläche „Run Calibration“ und das Fenster „Create Calibration“ wird geöffnet. Hier werden nun die Bezeichnung für die Batch-Identifikation eingegeben, sowie die Anzahl der Kalibrierungen. Mit Betätigung der Schaltfläche „Run Batch“ wird der Vorgang gestartet.

Für eine erfolgreiche Kalibration sollten die Ergebnisse zwischen 5000 und 15000 Counts liegen. Ist dies der Fall erscheint ein grüner Ergebnispunkt, entsprechen die Werte nicht der Spezifikation, war die Kalibration nicht erfolgreich und es erscheint ein roter Ergebnispunkt.

Nach der Kalibration folgt das Spülen (1 - 2 mal) mit ChemSol S. Hierzu wird eine kleine Flasche mit der Lösung im Pipettierautomaten an die dafür vorgesehene Position gebracht und der Spülvorgang im Hauptmenü ebenfalls über „Run Calibration“ gestartet. Das Ergebnis sollte bei 0 Counts liegen und es erscheint ein roter Ergebnispunkt, da im Kalibrationsfeld gemessen wird.

3.3.3.4 Probenmessung

Vor Beginn der Untersuchung sollte die Arbeitsfläche gereinigt und desinfiziert werden, um eine Fremdkontamination ausschließen zu können. Im Anschluss daran werden die Einmalröhrchen (Tubes) für die Proben, die vorher ca. 72 h bei 25-30 °C inkubiert worden sind, in Stative platziert. Nachdem die Probe durch Schütteln gut durchmischt wurde, wird jeweils 1 ml in ein „Tube“ pipettiert. Anschließend werden 6 ml ChemSol A7 über eine Dispensette zur Probe dosiert und die Röhrchen mit sogenannten „Stoppfern“ (Deckel) verschlossen und geschüttelt. Für das weitere Vorgehen, wird ein zweites Stativ mit „Tubes“ und entsprechenden Filtern vorbereitet. Die gut geschüttelten Proben werden dann in diese überführt. Die Röhrchen werden

samt der Filter und der Probe in einer Zentrifuge platziert und 8 min bei 3200 rpm geschleudert. Nach diesem Vorgang werden die Filter entsorgt und der Überstand verworfen. In den „Tubes“ bleibt ein sogenanntes „Pellet“ zurück, welches die vorhandenen Mikroorganismen enthält. Diese werden dann mit 90µl der Reagenz CS 13 versehen und auf dem Vortex für ca. 45s geschüttelt. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur werden die Röhrchen in die Temperier racks des Pipettierautomaten, jeweils von oben nach unten, positioniert. Ein Kanister ChemSol S wird neben den Automaten gestellt und mit dem längeren Ansaugstab versehen, in eine Flasche ChemSol B24 (Markierungspuffer) kommt der kürzere Ansaugstab. Das Färbesubstrat ChemChromeV26 wird in das Temperier rack, sowie das Cleaning 5 (Spülflüssigkeit) im Automaten platziert. Im Anschluss wird das CSYK aus der Reduktionslösung Diluent II und dem Pulver CSR gut gemischt mit 15 Tropfen der Überschichtungsreagenz Isored benetzt. Die Gegenfärbereagenz CSV wird auf dem Vortex gut geschüttelt und mit dem CSYK im Automaten in Position gebracht. Der Abfallkanister neben dem Automaten wird ebenso bereitgestellt, wie eine Flasche mit ChemSol S und eine für den Abfall im Analysator.

Im Hauptmenü gelangt man über „Analyse“ zur Eingabe der Batch-Identifikation (Abbildung 11) und der Anzahl des Probenumfangs, sowie der Applikation für Gesamtkeimzahl (A0715-01).

Create New Batch

Batch Settings

Batch ID:

Application:

Session: 2008-05-07

Number of Samples:

Start Position in: Rack No. 1

1 21 26 46

5 25 30 50

Reload Batch

Application Settings

Change Session

Cancel

Next

Abbildung 11: Bedieneroberfläche zur Batcheingabe (aus Handbuch D-Count Rapid microbiology testing, 2003)

Durch Betätigung der Schaltfläche „Next“ gelangt man in eine Übersichtstabelle (Abbildung 12), in die man die Positionen der jeweiligen Proben eingeben kann. Durch Klicken auf „Run Batch“ wird der Vorgang gestartet.

Create Batch

	Sample ID	Lot Nr	Sampling	Manuf.	Comments
01					
02					
03					
04					
05					
06					
07					
08					
09					
10					
11					
12					
13					
14					
15					

Print ... Save Add Sample Run Batch < Back

Abbildung 12: Übersichtstabelle für die Ergebnisdarstellung (aus Handbuch D-Count Rapid microbiology testing, 2003)

3.3.3.5 Darstellung der Messergebnisse

Sample ID		Raw Count Volume	FL2/FL1	FL1 Mean FL2 Mean	FL1 Base. FL2 Base.	Validation Beads	Results
01	neg	1540 101.1 µl			0.619 0.629	4126	0
02	hc-AFAC-S	11761 101.2 µl	0.71±0.19	815.8±125.5 762.7±104.2	0.620 0.629	5730	278140
03		12556 101.4 µl	0.71±0.20	809.2±123.2 756.4±100.9	0.620 0.629	5860	297257
04		16685 101.2 µl	0.71±0.20	795.7±123.0 743.1±100.5	0.619 0.629	5543	423236
05		13588 101.4 µl	0.72±0.21	787.0±127.5 736.8±103.7	0.619 0.629	5523	333742
06		22308 101.4 µl	0.70±0.18	789.4±112.7 735.4±91.8	0.619 0.629	5472	578029
07		13859 101.3 µl	0.69±0.17	806.4±112.1 749.0±93.6	0.619 0.629	5597	338380
08		1875 101.3 µl	0.77±0.05	754.8±43.7 746.3±42.9	0.620 0.629	5864	207
09		1712 101.4 µl	1.64±0.14	252.0±36.4 323.5±48.6	0.619 0.629	6403	59
10		1806 101.4 µl	1.36±0.52	390.8±196.3 425.0±148.5	0.619 0.629	6656	976
11		1858 101.5 µl	1.23±0.47	418.5±232.0 439.1±184.8	0.619 0.629	6121	414
12		2615 101.3 µl	0.77±0.26	781.0±169.8 737.7±140.3	0.619 0.628	6769	12877
13		2224 101.2 µl	0.80±0.29	755.5±188.5 715.8±157.7	0.619 0.629	5829	13990
14		2555 101.1 µl	1.25±0.58	430.1±233.9 447.1±183.4	0.619 0.629	6911	5665
15		1886 101.4 µl	1.28±0.58	430.7±253.8 451.5±204.2	0.620 0.629	6026	2012
16		2254 101.3 µl	0.79±0.02	698.8±10.9 665.3±14.1	0.619 0.629	6408	59

Abbildung 13: Ausschnitt aus der Darstellung der Messergebnisse von „hohes C“ Apfel Acerolasaft vom 26.06.2009

Nach Ablauf der Reaktion werden die Messergebnisse tabellarisch dargestellt (Abbildung 13), dabei entsprechen die Counts/ml den KbE/ml im untersuchten Produkt. Für jede Applikation sind spezifische Grenzwerte festgelegt, welche auf die gemessenen Counts/ml bezogen sind.

Nach diesen entscheidet sich, ob ein Ergebnis negativ, suspekt oder positiv ist. Bei einem negativen Ergebnis erscheint ein Grüner Punkt, dies bedeutet, dass sich die Counts unterhalb des unteren Grenzwertes liegen. Bei einem gelben Punkt ist das Ergebnis suspekt und bewegt sich zwischen dem unteren und oberen Grenzwert. Liegen die Counts über dem oberen Grenzwert, ist die Probe positiv und ein roter Punkt wird angezeigt.

3.4 Kulturmedien

Würze Agar

Verwendung: Zur Züchtung, Isolierung und Keimzählung bzw. Anreicherung von Pilzen, insbesondere von Hefen.

Hersteller: Fa. Merck, Darmstadt

Zusammensetzung (g/l): 15g Malzextrakt, 0,75g Universalpepton, 12,75g Maltose, 2,75g Dextrin, 2,35g Glycerin, 0,4g Kaliumhydrogenphosphat, 1g Ammoniumchlorid, 20g Agar Agar

Herstellung: 55g/l lösen und autoklavieren (15 Minuten bei 121°C)

Rogosa Agar

Verwendung: Zur Isolierung und Keimzahlbestimmung von Milchsäurebakterien.

Hersteller: Fa. Merck, Darmstadt

Zusammensetzung (g/l): 10g Pepton aus Casein, 5g Hefeextrakt, 20g D(+) Glucose, 6g Kaliumdihydrogenphosphat, 2g Ammoniumcitrat, 1g Tween 80, 15g Natriumacetat, 0,575g Magnesiumsulfat, 0,034g Eisen(II)-sulfat, 0,12g Mangansulfat, 15g Agar Agar

Herstellung: 74,5 g/l lösen, mit Eisessig 96% auf pH 5,5 einstellen

BAT Agar

Verwendung: Zur Isolierung und Keimzahlbestimmung von Hitze- und Säuretoleranten Bakterien

Hersteller: Fa. Merck, Darmstadt

Zusammensetzung (g/l): 2g Hefeextrakt, 5g Glucose, 0,25g Calciumchlorid, 0,5g Magnesiumsulfat, 0,2g Ammoniumsulfat, 3g Kaliumdihydrogenphosphat, 0,00018g Zinksulfat, 0,00016g Kupfersulfat, 0,00015g Mangansulfat, 0,00018g Kobaltchlorid, 0,0001g Borsäure, 0,0003g Natriummolybdat, 18g Agar Agar

Herstellung: 29g/l lösen und 15 Minuten bei 121 °C autoklavieren

Würze Bouillon

Verwendung: Zur Züchtung, Isolierung und Keimzählung bzw. Anreicherung von Pilzen insbesondere Hefen.

Zusammensetzung (g/L): 15g Malzextrakt, 0,75g Universalpepton, 12,75g Maltose, 2,75g Dextrin, 0,4g Kaliumhydrogenphosphat, 1,0g Ammoniumchlorid, 2,5ml Glycerin

Herstellung: 33g/l lösen und autoklavieren (15 min bei 121°C)

MRS Bouillon

Verwendung: Zur Anreicherung, Züchtung und Isolierung sämtlicher Lactobacillus Spezies aus allen Arten von Untersuchungsmaterial.

Hersteller: Fa. Merck, Darmstadt

Zusammensetzung (g/l): 10g Pepton aus Casein, 8g Fleischextrakt, 4g Hefeextrakt, 20g D(+) Glucose, 2g Di-Kaliumhydrogenphosphat, 1g Tween 80, 2g Di-Ammoniumhydrogencitrat, 5g Natriumacetat, 0,2g Magnesiumsulfat, 0,04g Mangansulfat

Herstellung: 52,2 g/l lösen und autoklavieren (15 Min. bei 118°C), pH-Wert-Einstellung auf 6,5 ± 0,1 erfolgt mit Essigsäure

BAM Bouillon

Zum Nachweis von Säure- und Hitzetoleranten Bakterien wie z.B. Alicyclobacillen geeignet.

Zusammensetzung (g/l): 3,95g Nährsalz Mischung [0,25g Calciumchlorid, 0,5g Magnesiumsulfat, 3g Kaliumhydrogenphosphat, 0,2g Di-Ammoniumsulfat], 2g Hefeextrakt, 5g Glucose, 1ml Spurenelemente Mischung [0,66g Calciumchlorid, 0,18g Zinksulfat, 0,16g Kupfersulfat, 0,15g Mangansulfat, 0,18g Kobaltchlorid, 0,1g Hydrogenbromid, 0,3g Natriumhypomolybdat, 1000 ml destilliertes Wasser], 1,7ml/l 1 N Schwefelsäure

Herstellung: Die Mischung bei 121°C 15 Min. autoklavieren.

Ringerlösung:

Die Suspensions- bzw. Verdünnungslösung wird aus Ringertabletten und demineralisiertem Wasser hergestellt. Hinsichtlich der Bakterien wirkt die Lösung isotonisch und verhindert somit, bei Entnahme aus dem Kultivierungsmedium, einen osmotischen Schock.

Zusammensetzung (g/l): ¼ starke Lösung, 9g Natriumchlorid, 0,42g Kaliumchlorid, 0,2g Natriumhydrogencarbonat, 0,24g Calciumchlorid (wasserfrei)

Herstellung: 1 Tablette in 500ml destilliertem Wasser auflösen und bei 121 °C 15min autoklavieren, zur dezimalen Verdünnung werden 9ml in Reagenzgläser abgefüllt.

3.5 Allgemeine Methoden

3.5.1 Kulturenaufbewahrung,, Stammsammlung und Pflege

Die Keime werden in der Regel als Schrägagarkultur bei 4°C gelagert. Für die Versuche wurden die Hefen, sowie der *Aspergillus niger* mit einer sterilen Impföse vom Schrägagar abgenommen und auf Würzeagarplatten ausgestrichen und bei den entsprechenden Temperaturen bebrütet. Im Anschluss daran werden diese im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Das Milchsäurebakterium wird in MRS-Bouillon überimpft und 24 h bei 32°C bebrütet. Auch der *Alicyclobacillus acidoterestris* liegt als Flüssigkultur vor. Dieser wird in BAM-Bouillon bei 44°C vier Tage angezüchtet.

3.5.2 Kultivierung und Anreicherung

Für die Nutzung der Hefekulturen zur Animpfung der Säfte, wird mit einer sterilen Impföse Zellmaterial in 100ml Würzebouillon überführt und bei 28°C 24h bebrütet.

Die in den jeweiligen Bouillons angereicherten Bakterien können direkt für eine Verdünnungsreihe verwendet.

Für den Einsatz des Schimmelpilzes wird dieser mit steriler Ringerlösung von der Würzeagarplatte abgeschwemmt und für die Verdünnungsreihe genutzt.

3.5.3 Sicherstellung der Kulturqualität

Für die Beimpfung der Säfte werden jeweils 24h alte Vorkulturen verwendet, um gewährleisten zu können, dass sich die Mikroorganismen in derselben logarithmischen Wachstumsphase befinden. Die Bestimmung der Keimzahl, der jeweiligen Verdünnungsstufe und den Nachweis der Lebens- und Vermehrungsfähigkeit der Mikroorganismen erfolgt dann mittels Plattengussverfahren bzw. Oberflächenausstrichverfahren (20ml, Dreifachbestimmung).

Zur Gewährleistung der Gerätefunktionalität des ATP-Messgerätes und des Durchflusszytometers wird bei jedem Durchlauf ein Positiv-Standard mitgeschickt. Somit kann sichergestellt werden, dass das Gerät lebende mikrobielle Zellen erfassen kann, auch wenn bei den Untersuchungsproben lediglich negative Ergebnisse vorliegen.

3.5.4 Keimzahlbestimmung

Vor Animpfung der jeweiligen Proben mit den Mikroorganismen, wird von diesen eine dezimale Verdünnungsreihe angesetzt. Hierzu wird 1ml der mit den Keimen angereicherten Bouillon in 9ml steriler Ringerlösung (Reagenzglas) pipettiert und dann auf dem Reagenzglasschüttler

gründlich durchmischt. Es werden die Verdünnungsstufen $10^{-1} - 10^{-10}$ angesetzt, wovon die ersten drei verworfen wurden, da hier für die Untersuchung zu hohe Resultate erwartet werden.

Die Keimzahlbestimmung erfolgt mit Hilfe des Koch'schen Plattengussverfahrens. Hierbei wird 1ml der jeweiligen Verdünnungen auf sterile Petrischalen pipettiert und mit flüssigem Nährmedium (10 - 15ml) vermengt und anschließend bei den entsprechenden Temperaturen bebrütet.

Bei den Mikroorganismen *Aspergillus niger* und *Alicyclobacillus acidoterestris* erfolgt die Bestimmung der Keimzahl mittels des Oberflächenausstrichverfahrens. Hierzu werden 0,1ml der Verdünnungsstufen jeweils auf dem entsprechenden festen Nährmedium mit Hilfe eines Drigalksispatels ausgestrichen und im Anschluss daran bebrütet. Um ein Austrocknen der Petrischalen mit *Alicyclobacillus acidoterestris* bei den hohen Bebrütungstemperaturen (44°C) zu verhindern, werden diese in Plastikbeuteln (feuchte Kammer) bebrütet.

Das Plattengussverfahren und das Oberflächenausstrichverfahren wird ebenfalls bei den angeimpften Saftproben, nach der Inkubationszeit von 3 Tagen, durchgeführt, um die Ergebnisse für den Vergleich der Methoden heranziehen zu können.

Die jeweiligen Bestimmungen der Verdünnungen und Saftproben erfolgt jeweils als Doppelbestimmung.

Koloniezählung

Die Petrischalen werden nach vorgegebener Bebrütungszeit ausgezählt. Dabei wird ein Koloniezählgerät für eine einfachere Auswertung genutzt.

Beim Auszählen werden die Platten herangezogen, die Koloniezahlen zwischen 1 und 300 besitzen, wobei mindestens eine Verdünnungsstufe 20 bis 300 Kolonien haben sollte. Zur Auswertung der Ergebnisse wird das einfache arithmetische Mittel verwendet.

Formel 1: Berechnungsformel für das arithmetische Mittel

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n} * d$$

\bar{x} arithmetisches Mittel

$\sum x$ Summe der Kolonien der Platten

n Anzahl der ausgezählten Platte

d Faktor der Verdünnung

Beispiel:

Verdünnung $10^{-3} = 345/387/368$ (Dreifachbestimmung)

$$\bar{x} = \frac{345 + 387 + 368}{3} * 10^3 = 3,6 * 10^5 \text{ Kbe/ml}$$

3.6 Versuche für den Eignungstest der ATP-Methode für die mikrobiologische Keimzahlbestimmung

Das Durchflusszytometer D-Count der Firma AES Chemunex wird momentan für die mikrobielle Keimzahlbestimmung der Säfte in der Firma Eckes Granini Deutschland verwendet. Diese Methode ist schon jahrelang im Einsatz und zuverlässig. Die Methode erfordert allerdings eine umfangreiche Probenvorbereitung. Hohe Investitions- und Wartungskosten sowie Gebühren für die Instandhaltung und nicht zuletzt die hohen Kosten für das benötigte Verbrauchsmaterial stellen die wesentlichen Nachteile der Methode dar. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht geprüft werden, ob das Promilite III der Firma Promicol eine Alternative darstellt. Mit den durchgeführten Untersuchungen sollte geprüft werden, ob die Biolumineszenzmethode des Promilite III für die Keimzahlbestimmung der Säfte bezüglich Sicherheit und Genauigkeit für die Qualitätssicherung der Firma Eckes Granini Deutschland geeignet ist.

3.6.1 Versuche zur Ermittlung des optimalen Messzeitpunktes der Mikroorganismen für die ATP-Messung

Für die Ermittlung des Keimgehaltes mittels der Biolumineszenzmethode ist es wichtig, in welcher Wachstumsphase sich die Mikroorganismen befinden. Denn je nachdem in welcher Phase diese sind, schwankt der ATP-Gehalt der Mikroorganismen. Um dies zu bestätigen und um festzustellen, ob es Unterschiede hinsichtlich des Keimgehaltes zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei der Messung mit dem D-Count und dem Plattengussverfahren gibt, werden die Produkte „hohes C“ Apfel Acerolasaft, „hohes C“ Orangensaft, „Trinkgenuss“ Pink Grapefruitnektar und „Trinkgenuss“ Bananennektar mit Mikroorganismen-Kulturen angeimpft und in bestimmten Zeitabständen mit Hilfe der jeweiligen Bestimmungsmethoden gemessen.

Das Bakterium *Alicyclobacillus terrestris* wird in der Ergebnisaufstellung, sowie bei der Auswertung außen vor gelassen, da sich bei den Untersuchungen herausgestellt hat, dass dieser nicht lebensfähig war.

Die eingesetzten Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida parapsilosis* werden, wie in Kapitel 3.5.2 *Kultivierung und Anreicherung*, angesetzt und bebrütet. Nach der Bebrütungszeit wird von der Suspension der jeweiligen Hefen eine dezimale Verdünnungsreihe vorbereitet und

zur Keimzahlbestimmung dieser, mit Hilfe des Plattengussverfahrens untersucht. Gleichzeitig wird je 1ml ausgewählter Verdünnungsstufen in die verschiedenen Saftprodukte (unter sterilen Bedingungen) pipettiert. Diese werden bei den vorgegebenen Temperaturen von ca. 25-30°C inkubiert und nach 24, 48 und 72h mit Hilfe des Promilite III der Keimgehalt bestimmt. Der auf Würze-Agarplatten ausgestrichenen und bebrüteten Schimmelpilz *Aspergillus niger* wird mit 9ml Ringerlösung und einem Drigalskispatel unter sterilen Bedingungen zur Gewinnung der Sporen abgeschwemmt. Die Suspension wird mit Hilfe einer Einmalspritze in ein Reagenzglas überführt und gut durchmischt. Im Anschluss daran wird eine dezimale Verdünnungsreihe angesetzt, wobei je 1ml ausgewählter Verdünnungsstufen zum Beimpfen der jeweiligen Produkte genutzt wird. Die beimpften Produkte wurden dann ebenfalls bei 25 bis 30°C inkubiert und nach 24, 48 und 72 h mit Hilfe der ATP-Messung untersucht.

Von den Milchsäurebakterien, die bereits in MRS-Bouillon vorlagen, werden direkt eine dezimale Verdünnungsreihe angesetzt und die Säfte beimpft. Nach Inkubation bei 25 bis 30°C werden auch diese Produkte mit der ATP-Bestimmungsmethode kontrolliert.

3.6.2 Keimzahlbestimmung mittels Promilite III, D-Count und kultureller Nachweismethode im Vergleich

Um testen zu können, ob das Promilite III vergleichbare Ergebnisse zum D-Count sowie zur kulturellen Bestimmungsmethode liefert, werden nach Kultivierung und Anreicherung (beschrieben in Punkt 3.5.2) der Mikroorganismen *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida parapsilosis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Aspergillus niger* und *Acidobacter acidoterestris* eine dezimale Verdünnungsreihe angesetzt. Hierbei wird je 1ml der Verdünnungen 10^{-3} bis 10^{-10} in die zu untersuchenden Proben pipettiert. Dabei wird jede Verdünnungsstufe dreifach angesetzt. Die beimpften Säfte werden anschließend 3 Tage bei 25-30°C inkubiert. Die Ermittlung der Keimzahl erfolgt nach der Bebrütungszeit als Doppelbestimmung mit Hilfe des Durchflusszytometers, dem ATP-Messgerät und dem Plattenguss- bzw. Oberflächenausstrichverfahren. Verwendet werden bei diesem Versuch die Produkte hohes C Apfel-Acerolasaft, hohes C Orangensaft, Trinkgenuss Bananennektar und Trinkgenuss Pink Grapefruitnektar.

3.6.3 Versuche zum Vergleich der Routineuntersuchung mit Hilfe des D-Counts mit dem Promilite III

Die mikrobiologische Sicherheit der produzierten Säfte wird täglich mit Hilfe des D-Count Gerätes überprüft. Für diese Routineuntersuchungen werden von der Abfüllanlage die ersten 100

Flaschen (erste Füllerrunde), die letzten 100 Flaschen (letzte Füllerrunde), sowie jede 3000. Flasche automatisch angefüllt ausgeschleust. Dabei werden je 96 Flaschen der jeweiligen Füllerrunden nummeriert und in „Batches“ sortiert. Da der Probenumfang eines Durchlaufes beim D-Count nur 48 Proben umfasst, werden die Flaschen „gepoolt“, nach 4-tägiger Bebrütung bei 25-30°C, mit Hilfe des Durchflusszytometers untersucht. „Gepoolt“ bedeutet dabei, dass die anteilige Probenmenge von 0,5ml von je 2 Flaschen in ein Proberöhrchen (Tube) pipettiert wird. Ist eines der Ergebnisse positiv, werden die Flaschen nochmals einzeln als Dreifachbestimmung kontrolliert. Das „poolen“ dient hauptsächlich der Kosten- und Zeitersparnis.

Jede 3000. Flasche wird ebenfalls gesammelt, durchnummeriert und in „Batches“ zu je 48n Proben zusammengefasst. Diese werden nach 3-tägiger Inkubation bei 25-30°C gemessen.

Einige der Füllerrunden und Batches werden ebenfalls mit Hilfe des Promilite III untersucht. Dabei soll sich herausstellen, ob auch das ATP-Messgerät positive Befunde, wenn welche vorliegen, detektieren kann. Aber auch, ob das Promilite III Kontaminationen misst, die vom Durchflusszytometer nicht erkannt wurden.

3.6.4 Versuche zur Erhöhung des Probevolumens für die Messung mittels Promilite III

Da das eingesetzte Probevolumen bei der Keimzahlbestimmung mit Hilfe des ATP-Messgerätes nur 50µl beträgt, wird zur dessen Erhöhung ein Zentrifugationstest durchgeführt. Dazu wird 1ml der Untersuchungsprobe in ein Tube (Einmalröhrchen) pipettiert, mit 6 ml A7 (Ringerlösung der Firma Chemunex) versetzt und über einen Filter gegeben. Anschließend erfolgt die Zentrifugation der Probe mit samt dem Filter für 8 min bei 3200rpm. Nach dem Zentrifugationsschritt wird der Filter entfernt, der Flüssigkeitsüberstand abgegossen, das entstandene Pellet mit 100µl Ringerlösung versehen und auf dem Reagenzglasschüttler gut miteinander vermischt. 50µl dieser Suspension werden in die Mikrotiterplatte pipettiert und mit dem ATP-Messgerät gemessen. Durchgeführt wird der Versuch mit den Keimen *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida parapsilosis* der Verdünnungen 10^{-4} bis 10^{-10} als Dreifachbestimmung. Die ermittelten Werte, welche in RLU angegeben sind, werden anschließend verdoppelt, da nur 50µl aus der 100µl-Probe entnommen wird. Da für die Zentrifugation 1ml Probevolumen eingesetzt wurde, werden die Ergebnisse für einen direkten Vergleich der zentrifugierten Probe und der auf vorgeschriebene Art gemessenen nochmals mit 20 dividiert.

4 Ergebnisse

4.1 Auswertung der Ermittlung des optimalen Messzeitpunktes der Mikroorganismen für die ATP-Messung

Um zu testen, ob sich der ATP-Gehalt der Mikroorganismen über einen Zeitraum hinweg verändert, wurden die in der Tabelle 1 aufgelisteten Produkte mit den Mikroorganismen *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida parapsilosis*, *Lactobacillus rhamnosus* und *Aspergillus niger* angeimpft. Angegeben sind die durchschnittlichen ATP-Gehalte der gemessenen Proben der folgenden gemessenen Verdünnungen:

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10^{-7} ; 10^{-8}
<i>Candida parapsilosis</i>	10^{-6} ; 10^{-7}
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	10^{-4} ; 10^{-5}
<i>Aspergillus niger</i>	10^{-3} ; 10^{-4}

Tabelle 3: Mittelwerte der ATP-Gehalte zu bestimmten Zeitpunkten

Produkt	Keim	24h	48h	72h
hc-AFAC-S	Saccharomyces cerevisiae	32	30	1293
hc-OR-S		115	115	227
T-PG-N		50	37	165510
TG-BA-N		47	49	5136
hc-AFAC-S	Candida parapsilosis	28	33	34
hc-OR-S		105	119	104
T-PG-N		38	43	333
TG-BA-N		50	51	275
hc-AFAC-S	Lactobacillus rhamnosus	31	38	38
hc-OR-S		133	240	6318
T-PG-N		40	44	36
TG-BA-N		43	338	123695
hc-AFAC-S	Aspergillus	49	31	30
hc-OR-S		287	68	357
T-PG-N		29	83	853
TG-BA-N		52	147	353

Anhand der Daten wird deutlich, dass sich, vorausgesetzt eine Kontamination liegt vor, der ATP-Gehalt über den Zeitraum von 72h verändert. Ursache hierfür ist das Wachstumsverhalten der jeweiligen Keime. Denn diese besitzen in der Anlaufphase einen anderen ATP-Gehalt, als in der stationären oder Absterbe-Phase. Aber auch die Menge der Zellen wirken sich auf den Gehalt aus, denn die Mikroorganismen vermehren sich im Laufe der Zeit und somit sind mehrere Keime vorhanden, die ATP bilden.

4.2 Keimzahlbestimmung mittels Promilite III, D-Count und kultureller Nachweismethode im Vergleich

4.2.1 Vergleich der ermittelten Keimzahlen von *Saccharomyces cerevisiae* mittels der 3 Verfahren

Untersucht wurden die Säfte hohes C Apfel Acerola, hohes C Orangensaft, Trinkgenuss Pink Grapefruitnektar und Trinkgenuss Bananennektar. Diese wurden wie im Punkt 3.6.2 beschrieben behandelt und die Keimzahl mit Hilfe des D-Count, des Promilite III und der kulturellen Nachweismethode bestimmt. In der folgenden Tabelle 4 sind die Mittelwerte der Ergebnisse der ermittelten Keimzahlen der jeweiligen Säfte aufgeführt. Hierbei werden die Ergebnisse des Promilite III in „RelativeLightUnits“ und die des D-Counts in Counts/ml, welches den KbE/ml gleichzusetzen ist, angegeben. Zudem sind die Daten der Schnellnachweismethoden für einen übersichtlichen Vergleich in den Abbildungen 12 - 20 grafisch dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht über die Mittelwerte der Messwerte mit *Saccharomyces cerevisiae* der einzelnen Bestimmungsmethoden

Mikroorganismus	Verdünnung	hc-AFAC-S			hc-OR-S			TG-PG-N			TG-BA-N		
		Promilite III in RLU	D-Count in Counts/ml	Kult. NV in KbE/ml	Promilite III in RLU	D-Count in Counts/ml	Kult. NV in KbE/ml	Promilite III in RLU	D-Count in Counts/ml	Kult. NV in KbE/ml	Promilite III in RLU	D-Count in Counts/ml	Kult. NV in KbE/ml
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10 ⁻⁴	4,7E+02	2,0E+05	n.a	6,2E+03	2,6E+05	n.a	2,1E+04	1,3E+05	n.a	2,8E+04	1,1E+06	n.a
	10 ⁻⁵	3,6E+02	3,3E+04	n.a	1,2E+04	1,2E+04	n.a	2,5E+03	5,2E+04	n.a	4,5E+03	1,3E+05	n.a
	10 ⁻⁶	6,4E+01	3,1E+03	n.a	1,9E+02	1,3E+03	n.a	4,4E+02	1,3E+04	n.a	8,4E+02	2,0E+04	n.a
	10 ⁻⁷	4,6E+01	1,9E+02	n.a	1,3E+02	2,5E+02	n.a	1,2E+02	1,8E+03	n.a	1,0E+02	5,2E+02	n.a
	10 ⁻⁸	3,5E+01	5,0E+00	<1	1,2E+02	8,4E+01	<1	5,5E+01	1,5E+01	<1	5,8E+01	3,8E+02	<1
	10 ⁻⁹	3,8E+01	2,5E+01	<1	1,2E+02	0,0E+00	<1	6,5E+01	0,0E+00	<1	5,1E+01	2,6E+02	<1
	10 ⁻¹⁰	3,9E+01	1,0E+01	<1	1,3E+02	5,0E+00	<1	6,1E+02	0,0E+00	<1	5,1E+01	2,0E+02	<1

Erkennbar wird, dass bei den Verdünnungsstufen 10^{-4} und 10^{-5} ein positiver Nachweis bei den drei Methoden zu verzeichnen ist. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnte ebenfalls eine Kontamination bei einer Verdünnung von 10^{-6} detektiert werden, während die ATP-Methode, bis auf den Trinkgenuss Bananennektar und Trinkgenuss Pink Grapefruitnektar, bei dieser Verdünnungsstufe negative Ergebnisse liefert.

Betrachtet man die Ergebnisse der kulturellen Nachweismethode, sind eindeutig positive Befunde bei den Verdünnungsstufen 10^{-4} bis 10^{-7} vorhanden. Eine Anzahl der Kbe/ml kann nicht angegeben werden, da die Platten völlig überwachsen waren.

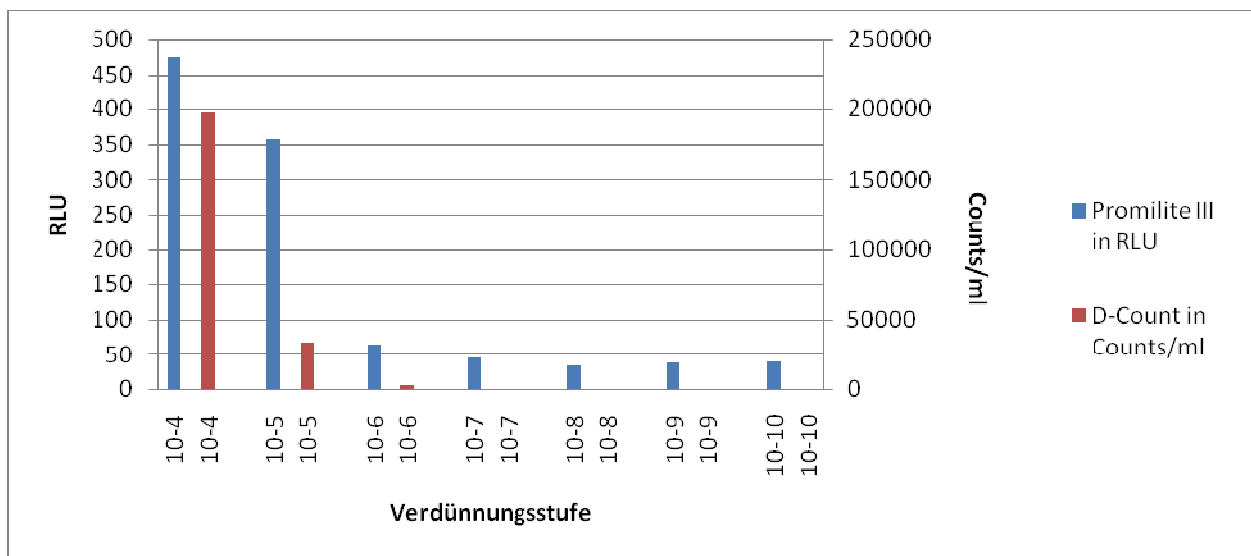


Abbildung 14: Vergleich D-Count und Promilite am Beispiel hc-AFAC-S

Die positiven Resultate des D-Counts bewegen sich jenseits der Tausendermarke in Counts/ml und liegen somit meist um zwei bis drei Zehnerpotenzen höher als die positiven Befunde des Promilite III in RLU.

Betrachtet man die negativen Befunde, bewegen sich die Werte der ATP-Methode um den negativen Blankwert der jeweiligen Säfte, während die Counts/ml gegen 0 gehen.

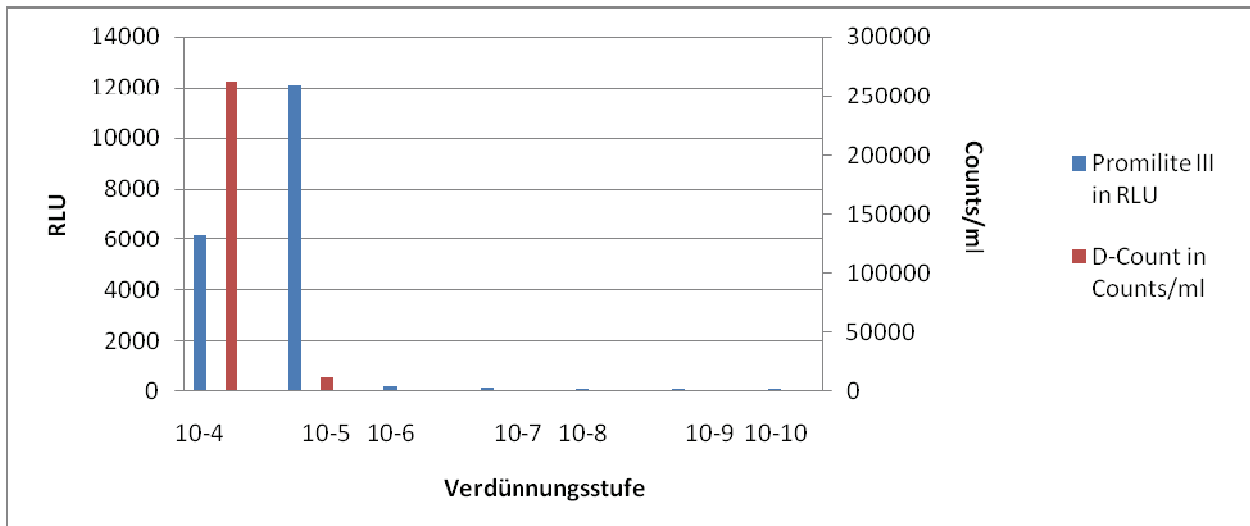


Abbildung 15: Vergleich D-Count und Promilite am Beispiel hc-OR-S

Die Messwerte der Anzahl der Mikroorganismen ist bei den hundertprozentigen Fruchtsäften etwas geringer als bei den Nektaren. Dies ist in den Abbildungen 15 und 16 nachzuvollziehen. Aufgrund des Zuckergehaltes in den Nektaren haben die Hefezellen der Gattung *Saccharomyces cerevisiae* eine bessere Nahrungsgrundlage für Wachstum und Vermehrung. Vergleicht man bspw. die Counts/ml des „Trinkgenuss Bananenektars“ ($1,1E+06$ Counts/ml) mit denen des „hohes C Orangensaftes“ ($2,6E+05$) der Verdünnungsstufe 10^{-4} , beträgt der Anteil der Mikroorganismen im Fruchtsaft nur ca. ein Viertel von denen im Bananennektar. Dies verhält sich ähnlich bei den Ergebnissen des Promilite III, hier beträgt der Anteil rund 20%. Zudem konnte ein positiver Nachweis von Mikroorganismen im Bananennektar auch bis zur Verdünnung von 10^{-8} beim D-Count und 10^{-7} bei der ATP-Methode aufgezeigt werden.

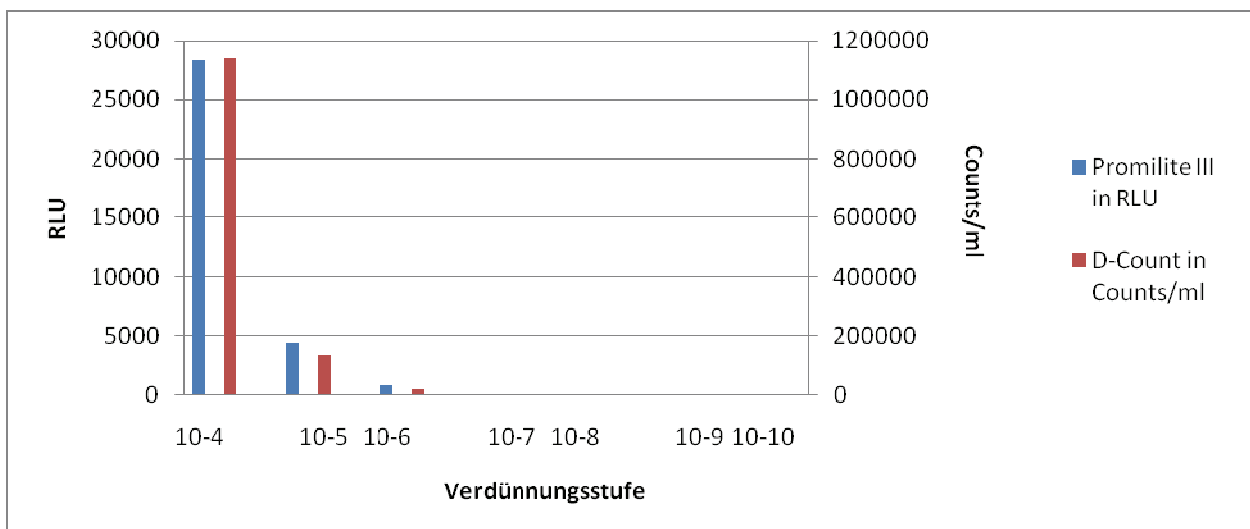


Abbildung 16: Vergleich D-Count und Promilite am Beispiel TG-BA-N

4.2.2 Vergleich der ermittelten Keimzahlen von *Candida Parapsilosis* mittels der 3 Verfahren

Die Vermehrung der Hefegattung *Candida parapslosis* in den vier Produkten ist sehr unterschiedlich. Dies wird deutlich, wenn man die Messwerte in Tabelle 5 miteinander vergleicht. Im Fruchtsaft „hohes C Apfel-Acerola“ und in den Nektaren „Trinkgenuss Banane“ und „Trinkgenuss Pink Grapefruit“ ist die Hefe gut angewachsen. Im Gegensatz dazu ist bei dem Orangensaft von „hohes C“ nur eine Kontamination mittels Durchflusszytometrie bei der Verdünnungsstufe von 10^{-4} nachzuweisen. Im Gegensatz zu den Schnellnachweismethoden, konnten allerdings mit dem Plattengussverfahren das Vorhandensein der Mikroorganismen in allen Verdünnungsstufen aufgezeigt werden.

Tabelle 1: Übersicht über die Mittelwerte der Messwerte mit *Candida parapsilosis* der einzelnen Bestimmungsmethoden

Mikroorganismus	Verdünnung	Promilite III in RLU	D-Count in Counts/ml	Kult. NV in KbE/ml	Promilite in III in RLU	D-Count in Counts/ml	Kult. NV in KbE/ml	Promilite in III in RLU	D-Count in Counts/ml	Kult. NV in KbE/ml	Promilite in III in RLU	D-Count in Counts/ml	Kult. NV in KbE/ml
		hc-AFAC-S			hc-OR-S			TG-PG-N			TG-BA-N		
Candida parapsilosis	10 ⁻⁴	3,E+03	4,E+05	n.a.	8,E+02	4,E+04	n.a.	3,E+04	3,E+05	n.a.	1,E+05	5,E+07	n.a.
	10 ⁻⁵	1,E+02	5,E+03	n.a.	8,E+01	5,E+01	n.a.	2,E+03	3,E+05	n.a.	7,E+03	4,E+05	n.a.
	10 ⁻⁶	4,E+01	1,E+03	n.a.	7,E+01	5,E+00	n.a.	3,E+03	2,E+05	n.a.	2,E+02	1,E+04	n.a.
	10 ⁻⁷	4,E+01	5,E+02	n.a.	8,E+01	2,E+01	n.a.	5,E+01	3,E+02	n.a.	2,E+02	6,E+03	n.a.
	10 ⁻⁸	4,E+01	1,E+03	79	7,E+01	1,E+01	n.a.	1,E+02	0,E+00	<1	4,E+01	5,E+01	<1
	10 ⁻⁹	4,E+01	5,E+01	<1	7,E+01	2,E+01	120	7,E+01	4,E+01	<1	3,E+01	2,E+02	<1
	10 ⁻¹⁰	4,E+01	6,E+01	<1	6,E+01	1,E+01	n.a.	7,E+01	3,E+01	<1	5,E+01	9,E+01	<1

Die Abbildung 17 zeigt die Messergebnisse für den Apfel Acerolasaft von „hohes C“. Erkennbar ist, dass auch hier bei den Verdünnungsstufen 10^{-4} und 10^{-5} positive Befunde bei den zwei Nachweismethoden vorhanden sind. Während ein Nachweis der Mikroorganismen mit Hilfe der Durchflusszytometrie und dem Plattengussverfahren bei den Verdünnungen 10^{-6} bis 10^{-8} (Tabelle 5) gelungen ist, konnte mittels der ATP-Methode keine Kontamination festgestellt werden.

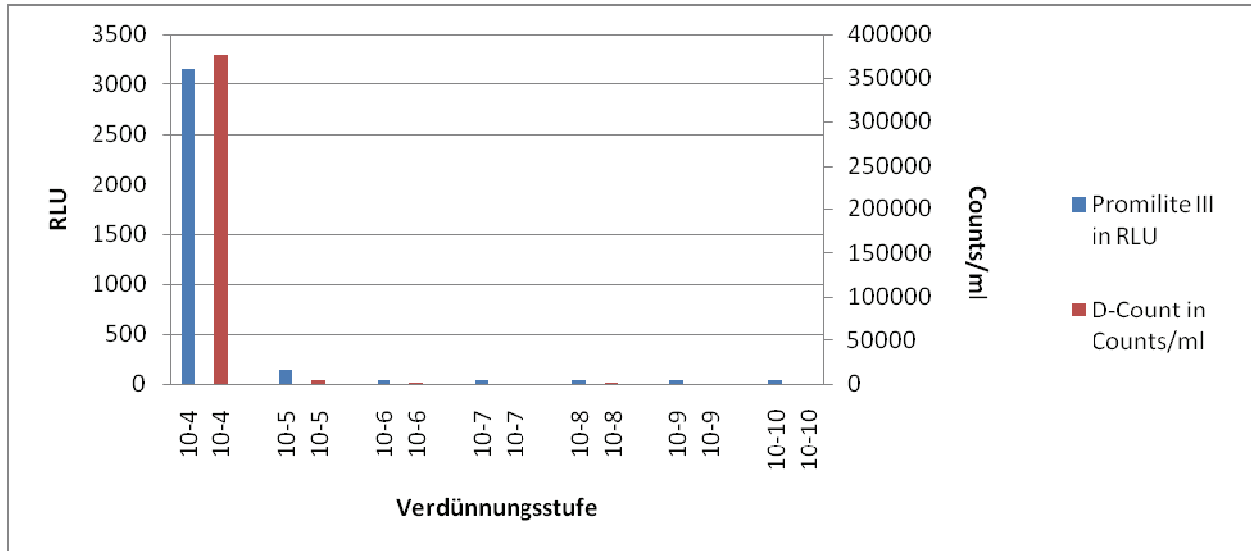


Abbildung 17: Vergleich D-Count und Promilite am Beispiel hc-AFAC-S

Anders verhält sich dieses bei den Nektaren der Marke „Trinkgenuss“. Wurden positive Resultate beim D-Count ermittelt, konnte dies auch mit dem Promilite III nachgewiesen werden. Dies wird deutlich in der Abbildung 18, welche die Mittelwerte der Messergebnisse vom „Trinkgenuss Pink Grapefruitnektar“ grafisch darstellt. Auch hier ist auffällig, dass die Counts/ml des D-Counts um ein bis zwei Zehnerpotenzen über den relativen Lichteinheiten der Biolumineszenzmethode liegen.

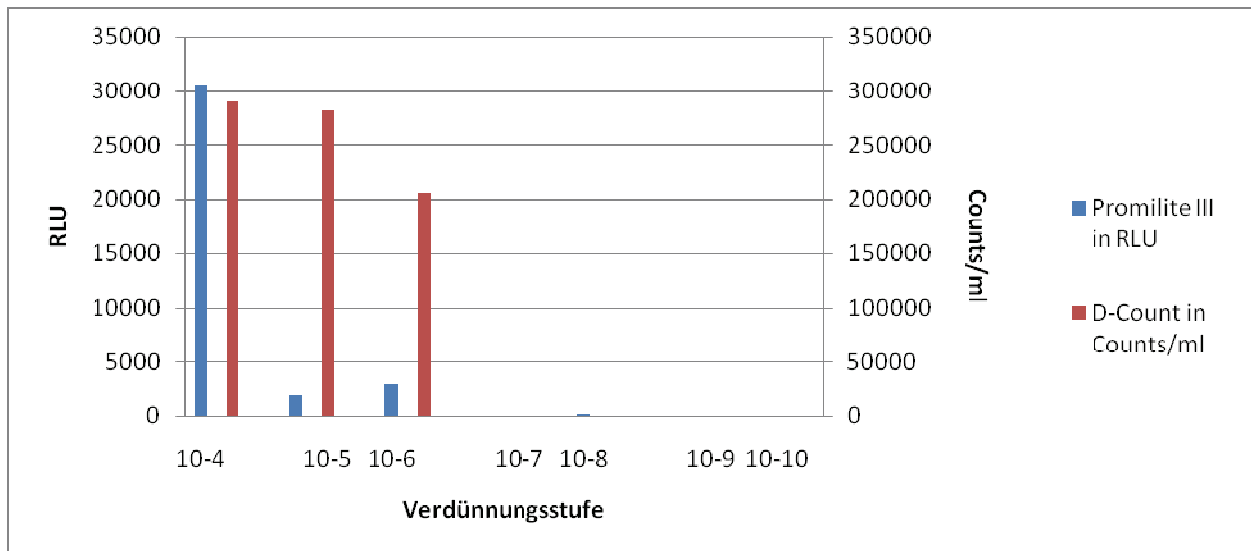


Abbildung 18: Vergleich D-Count und Promilite am Beispiel TG-PG-N

4.2.3 Vergleich der ermittelten Keimzahlen von *Lactobacillus rhamnosus* mittels der 3 Verfahren

Die in der Tabelle 6 aufgelisteten Mittelwerte der Messergebnisse zeigen, dass sich die Milchsäurebakterien im Orangensaft von „hohes C“ und im Bananennektar von „Trinkgenuss“ gut vermehrt haben. Hingegen das Wachstum im „hohes C“ Apfel Acerolasaft und dem „Trinkgenuss“ Pink Grapefruitnektar eher gering ist.

Die Abbildungen 19 und 20 zeigen die Ergebnisse des „hohen C“ Apfel Acerolasaftes und Tringenus“ Pink Grapefruitnektar, welche mit dem Milchsäurebakterium *Lactobacillus rhamnosus* angeimpft wurden. Erkennbar ist, dass mittels der ATP-Schnellnachweismethode kein positiver Befund ermittelt werden konnte. Die Daten bewegen sich um die negativen Blankwerte des Apfelsaftes und des Pink Grapefruitnektars. Auch die Messergebnisse des D-Counts liegen im negativen Bereich, bis auf die Verdünnungsstufe 10^{-4} des Nektars. Mikrobielle Zellen konnten zwar nachgewiesen werden, jedoch liegt die Anzahl unter dem kritischen Bereich von 200 Counts/ml.

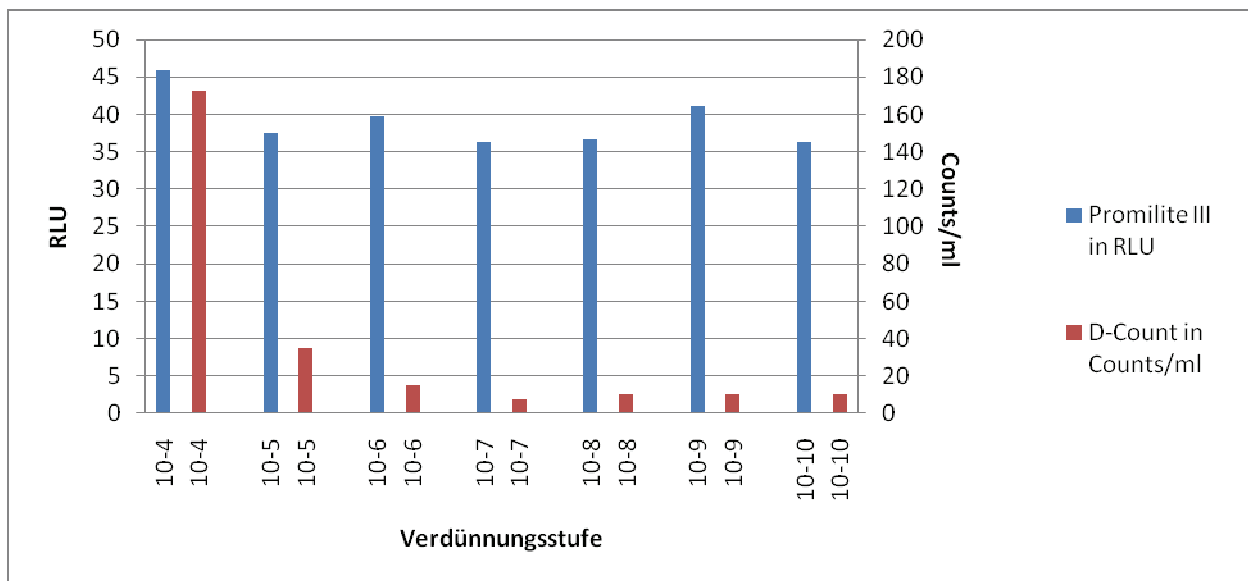


Abbildung 19: Vergleich D-Count und Promilite III am Beispiel hc-AFAC-S

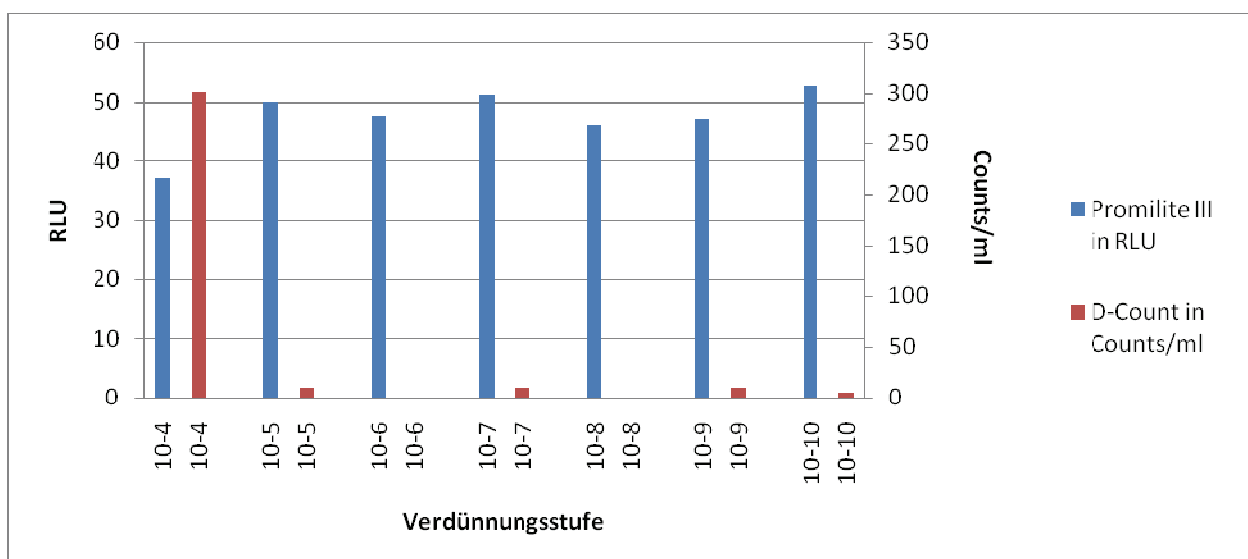


Abbildung 20: Vergleich D-Count und Promilite am Beispiel TG-PG-N

Im Gegensatz zum Apfelsaft wurden positive Befunde beim Orangensaft der Marke „hohes C“ ermittelt. Vergleicht man die Messwerte des D-Count mit denen des Promilite III in der Abbildung 21, wird deutlich, dass die Proben, die als positiv mittels Durchflusszytometrie detektiert wurden, auch bei der ATP-Methode positiv sind. Auch die Plattengussmethode liefert Resultate, die eine Kontamination in den jeweiligen Verdünnungsstufen aufweisen.

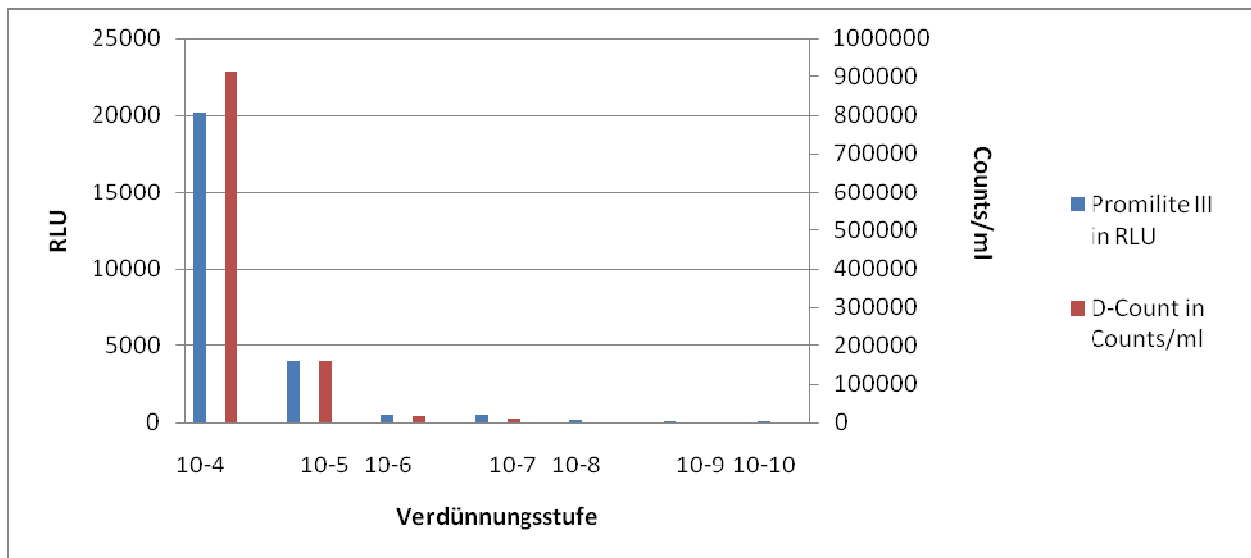


Abbildung 21: Vergleich D-Count und Promilite III am Beispiel hc-OR-S

Wie schon erwähnt, haben sich die Milchsäurebakterien im Bananennektar gut vermehrt. Dementsprechend konnte eine positive Kontamination in den niedrigen Verdünnungsstufen 10^{-4} bis 10^{-7} beim D-Count und 10^{-4} bis 10^{-6} beim Promilite III aufgezeigt werden.

Betrachtet man auch hier beim Orangensaft und beim Bananennektar (Abbildung 21 und 22) die positiven Resultate der ATP-Methode mit denen des D-Counts, wird erkennbar, dass diese wiederum um ein bis zwei Zehnerpotenzen auseinander liegen.

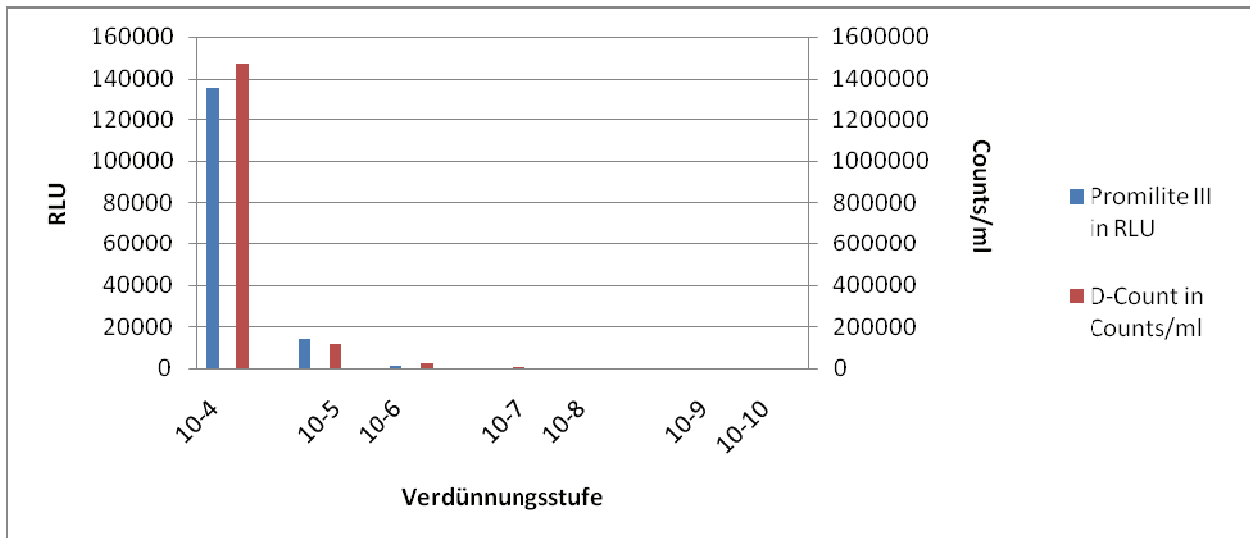


Abbildung 22: Vergleich D-Count und Promilite III am Beispiel TG-BA-N

4.2.4 Vergleich der ermittelten Keimzahlen von *Aspergillus niger* mittels der 3 Verfahren

Mit Hilfe der Schnelldetektionsmethoden konnte keine Kontamination der Saftprodukte (Tabelle 7), welche mit dem Schimmelpilz *Aspergillus niger* angeimpft wurden, detektiert werden. Dabei wurden lebensfähige Mikroorganismen zum Beimpfen der Fruchtsäfte und –nektare verwendet. Dies geht aus der Tabelle 8 hervor, welche die Anzahl der Schimmelpilzkolonien enthält, die sich in den jeweiligen Verdünnungen befanden und mittels dem Oberflächenausstrichverfahren ermittelt wurden. Während die Anzahl der Schimmelpilze in den Verdünnungen mit zunehmender Verdünnungsstufe geringer wird, spiegelt sich dies nicht in den beimpften Saftprodukten wieder. Hier liegen bei der kulturellen Nachweismethode positive Ergebnisse bspw. beim naturtrüben Apfelsaft der Marke „hohes C“ bei 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁷ und 10⁻⁹ vor, dies ist bei den übrigen Verdünnungen nicht der Fall. Ursache hierfür ist, dass das gebildete Mycel des Schimmelpilzes schlecht zu pipettieren ist, somit können negative Ergebnisse gemessen werden, trotzdem eine Kontamination vorliegt.

Betrachtet man z.B. die Resultate des Bananennektars ist das Produkt mit dem Schimmelpilz *Aspergillus niger* kontaminiert. Anhand der Befunde des Oberflächenausstrichverfahrens wird das deutlich. Laut diesen kommt der Mikroorganismus in jeder Verdünnungsstufe vor, jedoch reicht die Anzahl nicht aus, um ein positives Ergebnis mit Hilfe der Schnelldetektionsmethoden zu detektieren. Mit Ausnahme des Ergebnisses, welches mittels Promilite III bei der Verdünnung 10⁻⁴ gemessen wurde. Hier liegt ein positiver Befund vor. Das D-Count jedoch konnte hier nur ca. 70 Counts/ml zählen.

Tabelle 8: Darstellung der Ergebnisse ermittelt mit Hilfe kultureller Nachweismethoden

Verdünnung	Ergebnis	
	1	2
10^{-4}	n.a.	n.a.
10^{-5}	n.a.	n.a.
10^{-6}	50	47
10^{-7}	7	9
10^{-8}	2	<1
10^{-9}	<1	<1
10^{-10}	<1	<1

4.3 Vergleich der Routineuntersuchung mit Hilfe des D-Counts mit dem Promilite III

Für den Vergleich des D-Counts mit dem Promilite III wurden die durchgeführten Routineuntersuchungen (Batches und Füllerrunden) stichprobenweise auch mit dem ATP-Messgerät untersucht.

Dazu wurden die Proben, wie unter 3.6.3 *Versuche zum Vergleich der Routineuntersuchung mit Hilfe des D-Counts mit dem Promilite III* beschrieben, behandelt.

Tabelle 9: Auszug der durchgeführten Routineuntersuchung von Füllerrunden mittels D-Count und Promilite III

TG-AFKI-N-1.0l vom 15.05.2009					
Promilite III	D-Count	Promilite III	D-Count	Promilite III	D-Count
[RLU]	[Counts/ml]	[RLU]	[Counts/ml]	[RLU]	[Counts/ml]
34	0	37	0	35	0
32	0	35	0	38	0
32	30	31	0	75	0
30	30	46	0	34	0
27	0	32	0	37	0
38	0	39	0	39	0
TG-PG-N-1.0l vom 08.05.2009					
Promilite III	D-Count	Promilite III	D-Count	Promilite III	D-Count
[RLU]	[Counts/ml]	[RLU]	[Counts/ml]	[RLU]	[Counts/ml]
45	0	32	59	38	30
42	0	56	59	42	30
51	0	48	0	49	30
48	0	39	0	44	0
57	0	10166	50860	45	0
54	30	56	50860	34	0
TG-AFKI-N-1,0l vom 15.05.2009					
Promilite III	D-Count				
[RLU]	[Counts/ml]				

46	0
59	30
45	0
29	0
46	0
24	0
33	30

Die Ergebnisse der ATP-Messung werden in RelativeLightUnits (RLU) angegeben. Die des Durchflusszytometers in Counts/ml. Die Tabelle 9 stellt einen Ausschnitt der Ergebnisse der Routineuntersuchungen der Füllerrunden dar. Die vollständige Auflistung ist im Anhang in den Tabellen 38 - 47 zu finden. Die hier verwendeten Grenzwerte sind auf die Belegarbeit des Praxissemesters „*Evaluierung der ATP-Messung als mikrobiologische Schnellmethode für fruchtsafthaltige Getränke*“ (Schoknecht, 2008) zurückzuführen.

Anhand der Tabelle 9 ist erkennbar, dass die Befunde, die laut D-Count negativ sind, auch als negativ mittels Promilite III detektiert worden sind. In der ersten Füllerrunde Trinkgenuss Apfel-Kirschnektar wird der positive Befund von 75 RLU nicht in die Wertung genommen, da es sich hier um einen Pipettierfehler handelt. Würde es sich hier um einen Positivbefund handeln, wäre das Ergebnis wesentlich höher.

Eine Kontamination mit Mikroorganismen einer Probe konnte in der 1. Füllerrunde Trinkgenuss Pink Grapefruitnektar vom 08.05.2009 festgestellt werden. Hier wurde der positive Befund sowohl vom ATP-Messgerät, als auch vom Durchflusszytometer detektiert. Auch die Nachkontrolle (Tabelle 10) mittels des Promilite III bestätigte dieses Ergebnis. Da es sich hierbei um ein „gepooltes“ Batch handelt, wurden die 2 Proben die hier zusammen kontrolliert wurden, nochmals einzeln als Doppelbestimmung gemessen. Daraus resultierte, dass die Probe 31 kontaminiert gewesen ist, hingegen das Ergebnis der Probe 31 A negativ war. Wobei der Wert von 248 RLU als Pipettierfehler anzusehen ist. Auch die suspekte Probe bestätigte sich als Negativbefund mit 44 und 38 RLU bei der Nachkontrolle. Das positive Ergebnis der Probe 36 wurde ebenfalls wiederholt mit dem Promilite III gemessen. Hier wurde allerdings der negative Befund, der mittels des D-Count detektiert wurde, bestätigt. Somit ist dieser Wert auf einen Pipettierfehler zurückzuführen.

Tabelle 10: Übersicht über die Nachproben der positiven Ergebnisse der Füllerrunde TG-PG-N-1.01

TG-PG-N-1.01 vom 08.05.2009		Nachprobe
Promilite III	D-Count	Promilite III
[RLU]	[Counts/ml]	[RLU]
129	0	44
		38
10166	50860	8029
		8009
		248
		58
1628	0	46
		56

Die Anwendung der zwei Methoden bei den Routineuntersuchungen sollte zeigen, ob das Promilite III die gleichen Befunde liefert wie das D-Count. Oder ob eventuell Kontaminationen vom ATP-Messgerät detektiert werden, die vom Durchflusszytometer nicht erfasst worden sind. Bis auf die eine positive Probe in der 1. Füllerrunde Trinkgenuss Pink Grapefruitnektar sind allerdings keine weiteren Kontaminationen aufgetreten, welches in den nachstehenden Ergebnissen zu sehen ist.

In der Tabelle 11 sind auszugsweise Ergebnisse der Batches aufgelistet, die parallel auch mit dem ATP-Messgerät gemessen wurden. Auch hier wurden die negativen Befunde des D-Counts von dem Promilite III bestätigt. Zudem konnte mit der Biolumineszenz-Methode keine mikrobielle Kontamination nachgewiesen werden, die vom D-Count nicht detektiert wurde.

Tabelle 11: Auszug der durchgeführten Routineuntersuchung von Batches mittels D-Count und Promilite III

Batch	Produkt	Promilite III [RLU]	D-Count [Counts/ml]
Batch 13 aus KW 17	hc-ORFF-S-1.0l	95	60
		83	60
Batch 3 aus KW 18	hc-MV-S-1.0l	76	30
		87	30
Batch 4 aus KW 18	CB hc-ORM-S1.0l	62	148
		72	31
		67	31
Batch 4 aus KW 18	hc-ORCA-S-1.0l	131	92
		131	92
		199	0
Batch 4 aus KW 19	CB hc-FS-S	62	0
		47	0
Batch 4 aus KW 19	FP-EX-G	42	0
		43	0
Batch 4 aus KW 19	FP-AFCA-G	32	0
		37	0
Batch 4 aus KW 20	TG-ORMN-N-1.0l	51	0
		54	30
		41	30

4.4 Zentrifugationstest

Für die Probemessung mittels Promilite III der Firma Promicol werden 50µl Probevolumen eingesetzt. Im Verhältnis zur Gesamtmenge der jeweiligen Untersuchungsproben ist diese Einsatzmenge sehr gering. Dies kann bei unsicherer Handhabung zu falschen Ergebnissen führen. Aufgrund dessen wurde zusätzlich überprüft, welchen Einfluss eine Erhöhung des Probenvolumens durch Konzentration der jeweiligen Probe haben kann. Hierzu wurde das zu untersuchende Produkt, wie unter Punkt 3.6.4 beschrieben, behandelt und gemessen. Die in der folgenden Tabelle 12 aufgelisteten Daten, gibt die Mittelwerte der Messdaten der Produkte wieder, welche mit den einzelnen Verdünnungsstufen angeimpft wurden. Verwendet wurden hier die Keime *Candida parapsilosis* und *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabelle 12: Mittelwerte der Messdaten mit und ohne Zentrifugation

Produkt	Verdünnung	Keim	RLU	RLU/10	Keim	RLU	RLU/10
hc-AFAC-S	10 ⁻⁴	CP	3149	2960	SC	474	21996
	10 ⁻⁵		134	5		356	587
	10 ⁻⁶		41	6		64	5
	10 ⁻⁷		41	4		46	5
	10 ⁻⁸		37	4		35	4
	10 ⁻⁹		37	4		38	5
	10 ⁻¹⁰		41	4		39	4
hc-OR-S	10 ⁻⁴		817	2478		6217	16597
	10 ⁻⁵		76	9		708	1954
	10 ⁻⁶		74	7		186	182
	10 ⁻⁷		78	8		132	30
	10 ⁻⁸		69	8		123	34
	10 ⁻⁹		69	10		118	10
	10 ⁻¹⁰		59	12		125	9
TG-PG-N	10 ⁻⁴		30602	50310		20929	14088
	10 ⁻⁵		1901	671		2507	159
	10 ⁻⁶		51	12		738	536
	10 ⁻⁷		47	4		121	8
	10 ⁻⁸		55	4		55	4
	10 ⁻⁹		66	6		65	5
	10 ⁻¹⁰		71	25		68	4
TG-BA-N	10 ⁻⁴		127508	53496		28345	1970
	10 ⁻⁵		7332	6549		4479	1152
	10 ⁻⁶		168	54		843	136
	10 ⁻⁷		57	15		103	4
	10 ⁻⁸		39	4		58	5
	10 ⁻⁹		34	4		51	4
	10 ⁻¹⁰		46	5		51	4

Um die Resultate der zentrifugierten mit der unter normalen Bedingungen gemessenen Probe direkt vergleichen zu können, müssen die Ergebnisse verdoppelt und anschließend mit 20 dividiert werden (siehe Punkt 3.6.4). Auffällig wird hierbei, dass die Werte, aufgeführt in der Tabelle 12, der negativen Befunde deutlich unter den für die Säfte ermittelten Blankwerten (Tabelle 13) liegen. Erkennbar wird zudem, dass die Ergebnisse größtenteils geringer ausfallen,

als die der nicht zentrifugierten Probe. Bei den positiven Befunden gibt es Ausnahmen. Zu nennen wären hier „hohes C“ Orangensaftes, angeimpft mit *Candida parasilosis* und *Saccharomyces cerevisiae*, mit *Saccharomyces cerevisiae* inokolierten „hohes C“ Apfel Acerolasaft und bei „Trinkgenuss“ Pink Grapefruit, beimpft mit *Candida parasilosis*. Liegt eine Kontamination vor, spiegelt sich dies auch in der Zentrifugation wieder. Sind die positiven Resultate eher gering, wie bspw. bei „hohes C“ Apfel Acerolasaft bei *Candida parasilosis* Verdünnungsstufe 10^{-5} mit einem Wert von 134 RLU oder 168 RLU bei „Trinkgenuss“ Bananennektar (10^{-6}), wird in der konzentrierten Probe ein negativ Befund gemessen. Die suspekten Ergebnisse werden nicht durch die Zentrifugation bestätigt.

Tabelle 13: Grenzwerte der genutzten Produkte

Produkt	neg	sus	pos
AFAC	20	40	60
OR	137	274	411
PGN	57	114	171
BA	36	72	108

5 Diskussion

Mit dem Promilite III der Firma Promicol kann grundsätzlich eine Kontamination mit Mikroorganismen nachgewiesen werden. Die Alltagstauglichkeit der Biolumineszenzmethode wurde mit verschiedenen Versuchen getestet.

Zunächst sollte mit Überprüfung des ATP-Gehaltes, über einen festgelegten Zeitraum hinweg, ermittelt werden, ob es einen optimalen Zeitpunkt für die Messung kontaminierter Produkte gibt. Im Anschluss daran erfolgte ein Vergleich der ATP-Methode mit der Durchflusszytometrie (D-Count). Dieser Hauptversuch soll zeigen, ob sich das Promilite III ebenso für die tägliche Fertigproduktkontrolle eignet. Abschließend sollte ein Zentrifugationstest darlegen, ob sich mit Erhöhung des Probevolumens die Sensitivität der Methode beeinflussen lässt.

Bestimmung des ATP-Gehaltes zu einem bestimmten Zeitpunkt:

Die Veränderung des ATP-Gehaltes wurde mit den unter Punkt 4.1 aufgelisteten Keimen durchgeführt. Nach Animpfen der Produkte (Tabelle 1) mit den ausgewählten Mikroorganismen erfolgte eine Messung nach 24, 48 und 72h. Dieser Versuch zeigt, dass die mikrobiellen Zellen, über den gewählten Zeitraum hinweg, wachsen und sich vermehren. 24h nach der Inokulation ist noch keine Kontamination in den Säften nachzuweisen. Die Tabelle 3 zeigt zudem, dass sich nach 48h in nur einem Produkt (TG-BA-N), angeimpft mit *Lactobacillus rhamnosus* und *Aspergillus niger*, ein Wachstum der Mikroorganismen nachzuweisen ist. Eine weitere Messung nach Ablauf von 72h zeigt eine eindeutige Vermehrung der Keime bei einigen der übrigen Produkte. Bspw. liegt eine Kontamination der Produkte „hohes C“ Apfel Acerolasaft, „Trinkgenuss“ Pink Grapefruitnektar und „Trinkgenuss“ Bananennektar mit *Saccharomyces cerevisiae* vor. Der Nachweis der Hefe *Candida parapsilosis* und dem Schimmelpilz ist ebenfalls bei „Trinkgenuss“ Pink Grapefruitnektar und „Trinkgenuss“ Bananennektar gelungen. Das Wachstum von Milchsäurebakterien konnte nur in „hohes C“ Orangensaft und „Trinkgenuss“ Bananennektar detektiert werden.

Somit kann bestätigt werden, dass die Mikroorganismen mindestens einen Zeitraum von 72 h benötigen, um sich zu vermehren und auch für die Produktion von ausreichend ATP für die Messung mit Hilfe des Promilite III. Nach dieser Zeit befinden sich die mikrobiellen Zellen in ihrer aktiven Phase (log-Phase), in der in den Keimen hauptsächlich Stoffwechselreaktionen für das Wachstum und Vermehrung stattfinden und die höchsten ATP-Gehalte gebildet werden. Wird die Inkubationszeit nicht eingehalten, können falschnegative Ergebnisse detektiert werden.

Vergleich des Promilite III mit dem D-Count und der kulturellen Nachweismethode

Betrachtet man die Durchschnittswerte, die in den Tabellen 4, 5 und 6 aufgelistet sind, wird deutlich, dass es Unterschiede zwischen den drei Methoden gibt. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie und dem Plattengussverfahren bzw. dem Oberflächenausstrichverfahren können wesentlich geringere Kontaminationen nachgewiesen werden, als mit dem Promilite III. Bspw. wird bei den Produkten die mit *Saccharomyces cerevisiae* (Tabelle 4) angeimpft wurden deutlich, dass die ATP-Methode höhere Kontaminationen detektieren kann. Allerdings werden in den Produkten, in denen ein geringerer Gehalt an mikrobiellen Zellen vorhanden ist, keine Positivbefunde mit Hilfe des Promilite III gefunden. Das Vorhandensein von Kontaminanten wird aber durch die Resultate des D-Counts und das Plattengussverfahren bestätigt.

Die Befunde der mit *Candida parapsilosis* und *Lactobacillus rhamnosus* inokulierten Produkte (aufgeführt in den Tabellen 5 und 6) bestätigen ebenfalls dieses Ergebnis. Teilweise liegen bspw. beim „Trinkgenuss“ Banane (Tabelle 5) und bei „hohes C“ Orangensaft (Tabelle 6) positive Ergebnisse bei der ATP-Methode und der Durchflusszytometrie vor. Hier ist der Keimgehalt der jeweiligen Produkte relativ hoch. Bei der kulturellen Nachweismethode sind die Keimzahlen sehr hoch. Zudem ist ein Nachweis von Mikroorganismen in den Produkten gelungen, die mit den niedrigsten Verdünnungsstufen angeimpft worden sind und in denen mit Hilfe des D-Count und des Promilite III keine Keime detektiert wurden. Grund hierfür ist, dass die Hefen, Bakterien und Schimmelpilze optimale Bedingungen für das Wachstum in den Nährmedien finden. In den Substraten ist spezifisch für die Mikroorganismen das Nährmaterial vorhanden, welches diese für die Vermehrung benötigen. Zudem werden die Platten bei den für die Mikroorganismen optimalen Temperaturen inkubiert.

Betrachtet man die detektierten Ergebnisse der mit *Aspergillus niger* inokulierten Produkte (Tabelle 7), zeigt sich, dass der Nachweis des Schimmelpilzes mit Hilfe der Schnellnachweismethoden relativ schwierig ist. Anhand der kulturellen Nachweismethode ist zu erkennen, dass eine Kontamination mit Schimmelpilzen vorliegt. Deutlich wird dies besonders an den Produkten „Trinkgenuss“ Banane und „Trinkgenuss“ Pink Grapefruitnektar. Kontaminationen konnten auch mit dem Durchflusszytometer nachgewiesen werden, auch wenn die Befunde nicht ausreichend sind für positive Ergebnisse. Mit Hilfe des Promilite III wurde der Schimmelpilz nicht nachgewiesen. Ist ein Mycel in der Untersuchungsprobe vorhanden, kann es passieren, dass man aufgrund der geringen Probemenge am Mycel vorbei pipettiert. Dies kann dann zu falsch negativen Ergebnissen führen. Hinzu kommt, dass die Sporen, die von den Schimmelpilzen gebildet werden, kein ATP enthalten und somit nicht nachweisbar sind.

Durch den Versuch wird deutlich, dass es Grenzen beim Nachweis von Kontaminationen in Saftprodukten beim Promilite III gibt. Liegen hohe Keimzahlen > 1000 KbE/ml vor können diese vom Promilite III detektiert werden. Bei dieser Menge an Mikroorganismen ist genug ATP in der Probe vorhanden, um bei der Reaktion mit dem Luciferase/Luciferinsystem genügend Licht für einen Positivbefund zu erzeugen. Bei niedrigeren Keimgehalten werden diese mit Hilfe der ATP-Methode nicht gemessen.

Ergebnisse mit dem Bakterium *Alicyclobacillus acidoterrestris* konnten nicht aufgeführt werden, da dieser Mikroorganismus bei der Anzucht und Kultivierung nicht lebensfähig war.

Vergleich der Ergebnisse der Routinebatches und Füllerrunden ermittelt durch Promilite III und D-Count:

Die tägliche Fertigproduktkontrolle mit Hilfe des D-Counts wurde stichprobenweise zusätzlich mit dem Promilite III durchgeführt. Die Befunde dieser Untersuchungen waren hauptsächlich negativ. Dies ist in den Tabellen 17 bis 33 nachzuvollziehen. Ergebnisse die mittels Durchflussszytometrie als negativ detektiert wurden, waren auch bei der ATP-Methode negativ. Zudem konnte mit dem Promilite III kein positiver Befund nachgewiesen werden, der nicht auch mit dem D-Count ermittelt wurde.

Positiv anzumerken ist, dass der positive Befund in der Füllerrunde „Trinkgenuss“ Pink Grapefruitnektar mit der Durchflussszytometrie, als auch mit der Biolumineszenzmethode gefunden wurde. Aufgrund der Hygienemaßnahmen und der kaltseptischen Abfüllung der Produkte sind keine weiteren Kontaminationen zu verzeichnen gewesen. Daher waren in der Routine keine weiteren Vergleiche möglich.

Zentrifugationstest:

Durch den Zentrifugationstest sollte gezeigt werden, ob sich die Probenmenge erhöhen lässt und ob dies eine Auswirkung auf die Befunde der einzelnen Produkte hat. Betrachtet man die Ergebnisse des Versuches (Tabelle 12), wird ersichtlich, dass Veränderungen hinsichtlich der Messergebnisse vorliegen. Sind positive Befunde vorhanden, werden diese durch die zentrifugierte Probe bestätigt. Hinsichtlich der negativen Resultate der konzentrierten Probe ist anzumerken, dass diese deutlich unter den Blankwerten der jeweiligen Produkte liegen. Dementsprechend werden die unkontaminierten Proben als negativ detektiert. Bei den zentrifugierten Proben treten ebenfalls negative Befunde bei zuvor positiven Resultaten mit niedrigen RLU und suspekten Ergebnissen auf.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Zentrifugation Auswirkungen auf die Befunde der untersuchten Proben hat. Allerdings ist zu überlegen, ob die Blankwerte für die zentrifugierten Proben die gleichen sind, im Vergleich zu den Proben, die auf herkömmliche Weise gemessen wurden

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Eignung des ATP-Messgerätes Promilite III der Firma Promicol für die mikrobiologische Fertigproduktkontrolle von Fruchtsäften und –nektaren der Firma Eckes Granini Deutschland getestet.

Zunächst wurde untersucht, wie sich der ATP-Gehalt über einen bestimmten Zeitraum hinweg verhält, um den optimalen Zeitpunkt für die Messung der Produkte mit der Biolumineszenzmethode zu bestimmen. Im Anschluss daran wurden Vergleichsmessungen zwischen dem D-Count der Firma Chemunex und dem Promilite III der Firma Promicol durchgeführt. Zusätzlich wurden die Proben mittels kultureller Nachweismethoden untersucht. Hierzu wurden die ausgewählten Produkte „hohes C“ Apfel Acerolasaft, „hohes C“ Orangensaft, „Trinkgenuss“ Pink Grapefruitnektar und „Trinkgenuss“ Bananennektar verwendet. Zum Beimpfen der Säfte wurden dezimale Verdünnungsreihen der Mikroorganismen *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida Parapsilosis*, *Lactobacillus rhamnosus* und *Aspergillus niger* verwendet. Ebenso wurden die Routineuntersuchungen, die mit Hilfe des Durchflusszytometers durchgeführt wurden, mit dem Promilite III kontrolliert. Zur Erhöhung des Probevolumens wurde ein Zentrifugationstest durchgeführt. Dieser sollte zeigen, ob die Konzentrierung Auswirkung auf die ermittelten Befunde hat.

Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche lassen Aussagen über die Eignung der ATP-Messung mit Hilfe des Promilite III zu. Anhand des ATP-Zeittests wurde gezeigt, dass sich der ATP-Gehalt der Mikroorganismen innerhalb von 72h verändert. Demzufolge ist eine Inkubation von mindestens 3 Tagen nötig, bevor ein eindeutiges Ergebnis detektiert werden kann. Wird die Zeit nicht eingehalten, kann es zu falsch negativen Aussagen kommen, da sich die Keime nicht ausreichend entwickeln konnten. Liegen trotz der 72h Bebrütungszeit suspekta Befunde vor, sollten die Proben nochmals einige Stunden inkubiert und gemessen werden, um ein eindeutigeres Ergebnis zu erzielen.

Die Untersuchung der Batches und Füllerrunden der täglichen Kontrolle mit dem D-Count und dem Promilite III zeigten, dass beide Methoden ähnliche Resultate liefern. Liegen negative Befunde bei der Durchflusszytometrie vor, werden diese auch bei der ATP-Methode detektiert. Mit Hilfe des D-Counts wurde ein Positivbefund in der Füllerrunde „Trinkgenuss“ Pink Grapefruitnektar festgestellt. Dieser wurde ebenfalls mittels Promilite III detektiert. Dies zeigt, dass auch die Biolumineszenzmethode in der Lage ist, in der Routinekontrolle Kontaminationen festzustellen. Leider konnte dies durch weitere Resultate nicht bestätigt werden, da keine weiteren positiven Ergebnisse vorlagen. Jedoch können die Ergebnisse, der mit den Verdünnungsreihen angeimpften Produkte für diesen Vergleich mit herangezogen werden.

Deutlich wird, dass Kontaminationen mittels der Methoden detektiert werden konnten. Während mit Hilfe der kulturellen Nachweismethode und des D-Count geringere Gehalte an mikrobiellen Zellen nachzuweisen sind, ist dies bei der ATP-Methode oft nicht der Fall. Liegen hohe Keimzahlen von bspw. rund 1000 Kbe/ml vor, wird dies vom D-Count, der kulturellen Nachweismethode und dem Promilite III gemessen. Sind geringere Keimzahlen vorhanden, können diese vom ATP-Gerät nicht detektiert werden. Mit der Biolumineszenzmethode konnten keine Kontaminationen gefunden werden, die das D-Count oder das Plattengussverfahren nicht auch detektieren konnten.

Der Zentrifugationstest liefert interessante Resultate. Liegt eine Kontamination der Produkte vor, zeigt sich dies in den Ergebnissen der zentrifugierten Probe wieder. Besteht keine Verkeimung mit Mikroorganismen, bleiben die Ergebnisse ebenfalls im negativen Bereich. Das bedeutet, dass zur Erhöhung des Probevolumens die Zentrifugation ein hilfreiches Mittel ist und zu eindeutigeren Ergebnissen, was eine Kontamination betrifft, führt. Allerdings sollte diese Methode weiterentwickelt werden, da in dieser Arbeit die angewendete Probenaufbereitung für das D-Count patentrechtlich geschützt ist. Da die negativen Ergebnisse des Zentrifugationstestes sehr niedrig sind, sollte überprüft werden, ob sich die Blankwerte der zentrifugierten Proben von denen, der nicht behandelten Probe unterscheidet. Ist dies der Fall, ergeben sich andere Grenzbereiche und somit auch andere Befunde hinsichtlich eventuell vorhandener Kontaminationen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich das Promilite III der Firma Promicol für die Bestimmung von Kontaminationen eignet. Sind mikrobielle Zellen in einem Produkt vorhanden und wird diese Probe bei den vorgegebenen Temperaturen und Inkubationszeiten bebrütet, kann diese Kontamination mit Hilfe der Biolumineszenzmethode detektiert werden. Zudem ist es einfach zu bedienen und die Probenvorbereitung und –messung ist von geringer Zeitdauer. Vorteil gegenüber dem D-Count sind zudem die geringeren Investitions- und Wartungskosten. Außerdem sind die laufenden Kosten pro Probe wesentlich günstiger.

Allerdings ist anzumerken, dass das eingesetzte Probevolumen sehr gering ist, wodurch es zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann. Der Anwender muss sehr geübt im Pipettieren sein, denn durch Mikrospritzen oder Tropfen an der Wandung der Kavitäten kommt es zu falschpositiven Resultaten. Der Nachweis von Schimmelpilzen ist ebenfalls kritisch zu beurteilen. Ist ein Mycel vorhanden, kann es vorkommen, dass man an diesem vorbei pipettiert, wodurch ebenfalls falschnegative Befunde detektiert werden. Zudem lassen sich Schimmelpilzsporen nicht nachweisen, da diese kein ATP enthalten. Somit ist die Methode auf den Nachweis von Hefen und Bakterien begrenzt.

Im Gegensatz dazu steht das Durchflusszytometer D-Count der Firma AES Chemunex. Trotz hoher Investitions- und Wartungskosten, sowie Kosten für die Proben, liefert dieses Gerät sichere Ergebnisse hinsichtlich mikrobieller Kontamination. Denn die Befunde können nicht nur anhand der ermittelten Counts beurteilt werden, auch die für die Ergebnisse angegebenen Punktwolken und Ratios lassen Aussagen über die detektierten Ergebnisse zu. Mit Hilfe dieser Schnellmethode können ebenfalls niedrigere Keimgehalte detektiert werden, welches mittels Promilite III nicht möglich war. Zusätzlich zur quantitativen Bestimmung der Mikroorganismen ist eine partielle Keimdifferenzierung möglich, dies ist bei der Biolumineszenzmethode nicht der Fall.

Abschließend ist zu sagen, dass das D-Count nicht mit dem Promilite III ersetzt werden sollte. Trotz des geringeren Zeit- und Kostenaufwandes bei der Biolumineszenzmethode ist die Gefahr der falschpositiven oder falschnegativen Ergebnisse, aufgrund des geringen Probevolumens sehr hoch. Somit könnte man den Versuch der Zentrifugation dazu nutzen, das Probevolumen zu erhöhen und somit eventuell sichere Ergebnisse zu erzielen. Allerdings muss diese Methode weiterentwickelt und Fragen hinsichtlich abweichender Blankwerte geklärt werden.

7 Literatur

Antranikian, G.: Angewandte Mikrobiologie. Berlin: Springer Verlag, 2006.

Baltes, W. B.: Schnellmethoden zur Beurteilung von Lebensmitteln und ihren Rohstoffen. Hamburg: Behr's Verlag GmbH & Co., 1995.

Dittrich, H.: Mikrobiologie der Lebensmittel. Getränke. 1. Auflage. Hamburg: Behr's Verlag GmbH & Co., 1993.

Fiedler, B.: Pathogene Mikroorganismen: Hefen. 1. Auflage. Hamburg: Behr's Verlag GmbH & Co., 2009.

Handbuch D-Count-Rapid microbiology testing, 2003.

http://www.gesetze-im-internet.de/frsaftv_2004/BJNR101600004.html, 21.5.2009

<http://www.bmelv.de/cae/servlet/contentblob/379756/publicationFile/25947/LeitsaetzeErfrischungsgetraenke.pdf>, 21.5.2009

Krämer, J.: Lebensmittel-Mikrobiologie. 4. Auflage. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co., 2002.

Pichardt, K.: Lebensmittelmikrobiologie. Grundlagen für die Praxis. 4. Auflage. Berlin: Springer Verlag, 1998.

Schlegel, H. G.: Allgemeine Mikrobiologie. 7. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1992.

Schoknecht, M.: Belegarbeit: Evaluierung der ATP-Messung als mikrobiologische Schnellmethode für fruchtsafthaltige Getränke, 06.02.2009.

Schwindl, G.: Methodenvergleich zur Keimdetektion in Erfrischungsgetränken und Fruchtsäften, 13.02.2008.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Fluoreszenzanregung einer MO-Zelle mit einem Laserstrahl (aus Handbuch D-Count Rapid microbiology testing, 2003)	13
Abbildung 2: Darstellung der Messzelle im Durchflusszytometer „D-Count“ (aus Handbuch D-Count Rapid microbiology testing, 2003)	13
Abbildung 3: Darstellung der Messung der emittierten Fluoreszenz von MO-Zellen (aus Handbuch D-Count-Rapid microbiology testing, 2003)	14
Abbildung 4: Beispiel einer Punktwolke („hohes C Apfel Acerolasaft angeimpft mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i> gemessen am 26.06.2009)	15
Abbildung 5: Mikrotiterplatte (A), Promilite III System (B) mit Reagenzien (Diplomarbeit -	19
Abbildung 6: Bedieneroberfläche der Software Proscreen Version 2.11 zum Initialisieren des Gerätes (Diplomarbeit - Methodenvergleich zur Keimdetektion in Erfrischungsgetränken und Fruchtsäften, 2008).....	21
Abbildung 7: Bedieneroberfläche der Software Proscreen Version 2.11 für die Probeneingabe (Diplomarbeit - Methodenvergleich zur Keimdetektion in Erfrischungsgetränken und Fruchtsäften, 2008).....	23
Abbildung 8: Schematische Darstellung des D-Count Systems (aus Handbuch D-Count Rapid microbiology testing, 2003)	24
Abbildung 9: Pipettierautomat des D-Counts (aus Handbuch D-Count Rapid microbiology testing, 2003).....	24
Abbildung 10: Analysator des D-Counts (aus Handbuch D-Count Rapid microbiology testing, 2003).....	25
Abbildung 11: Bedieneroberfläche zur Batcheingabe (aus Handbuch D-Count Rapid microbiology testing, 2003)	31
Abbildung 12: Übersichtstabelle für die Ergebnisdarstellung (aus Handbuch D-Count Rapid microbiology testing, 2003)	32
Abbildung 13: Ausschnitt aus der Darstellung der Messergebnisse von „hohes C“ Apfel Acerolasaft vom 26.06.2009	32
Abbildung 14: Vergleich D-Count und Promilite am Beispiel hc-AFAC-S.....	43
Abbildung 15: Vergleich D-Count und Promilite am Beispiel hc-OR-S.....	44
Abbildung 16: Vergleich D-Count und Promilite am Beispiel TG-BA-N.....	44
Abbildung 17: Vergleich D-Count und Promilite am Beispiel hc-AFAC-S.....	47
Abbildung 18: Vergleich D-Count und Promilite am Beispiel TG-PG-N.....	48
Abbildung 19: Vergleich D-Count und Promilite III am Beispiel hc-AFAC-S.....	50

Abbildung 20: Vergleich D-Count und Promilite am Beispiel TG-PG-N.....	50
Abbildung 21: Vergleich D-Count und Promilite III am Beispiel hc-OR-S.....	51
Abbildung 22: Vergleich D-Count und Promilite III am Beispiel TG-BA-N.....	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der im Rahmen der Diplomarbeit verwendeten Produkte.....	18
Tabelle 2: Eingesetzte Geräte des allgemeinen Gebrauchs.....	18
Tabelle 3: Mittelwerte der ATP-Gehalte zu bestimmten Zeitpunkten.....	40
Tabelle 4: Übersicht über die Mittelwerte der Messwerte mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i> der einzelnen Bestimmungsmethoden.....	42
Tabelle 5: Übersicht über die Mittelwerte der Messwerte mit <i>Candida parapsilosis</i> der einzelnen Bestimmungsmethoden.....	46
Tabelle 6: Übersicht über die Mittelwerte der Messwerte mit <i>Lactobacillus rhamnosus</i> der einzelnen Bestimmungsmethoden.....	49
Tabelle 7: Übersicht über die Mittelwerte der Messwerte mit <i>Aspergillus niger</i> der einzelnen Bestimmungsmethoden.....	53
Tabelle 8: Darstellung der Ergebnisse ermittelt mit Hilfe kultureller Nachweismethoden.....	54
Tabelle 9: Auszug der durchgeführten Routineuntersuchung von Füllerrunden mittels D-Count und Promilite III.....	55
Tabelle 10: Übersicht über die Nachproben der positiven Ergebnisse der Füllerrunde TG-PG-N-1.0l.....	57
Tabelle 11: Auszug der durchgeführten Routineuntersuchung von Batches mittels D-Count und Promilite III.....	58
Tabelle 12: Mittelwerte der Messdaten mit und ohne Zentrifugation.....	59
Tabelle 13: Grenzwerte der genutzten Produkte.....	60

Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnungsformel für das arithmetische Mittel.....	36
---	----

Verzeichnis der Anlagen

Anlage 1: Tabelle 14: Messwerte des ATP-Gehaltes zu einem bestimmten Zeitpunkt bei hc-AFAC-S.....	74
Anlage 2: Tabelle 15: Messwerte des ATP-Gehaltes zu einem bestimmten Zeitpunkt bei hc-OR-S.....	75
Anlage 3: Tabelle 16: Messwerte des ATP-Gehaltes zu einem bestimmten Zeitpunkt bei TG-PG-N.....	76
Anlage 4: Tabelle 17: Messwerte des ATP-Gehaltes zu einem bestimmten Zeitpunkt bei TG-BA-N.....	77
Anlage 5: Tabelle 18: Ergebnisse der Verdünnungsreihe mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in Ringerlösung	78
Tabelle 19: Ergebnisse der Verdünnungsreihe mit <i>Candida Parapsilosis</i> in Ringerlösung.....	78
Tabelle 20: Ergebnisse der Verdünnungsreihe mit <i>Lactobacillus rhamnosus</i> in Ringerlösung ...	78
Tabelle 21: Ergebnisse der Verdünnungsreihe mit <i>Aspergillus niger</i> in Ringerlösung.....	78
Anlage 6: Tabelle 22: Zusammenfassung der Ergebnisse des Promilite III, des D-Count und des Kulturellen Nachweismethode von hc-AFAC-S beimpft mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	79
Anlage 7: Tabelle 23: Zusammenfassung der Ergebnisse des Promilite III, des D-Count und des Kulturellen Nachweismethode von hc-OR-S beimpft mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	80
Anlage 8: Tabelle 24: Zusammenfassung der Ergebnisse des Promilite III, des D-Count und des Kulturellen Nachweismethode von TG-PG-N beimpft mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	81
Anlage 9: Tabelle 25: Zusammenfassung der Ergebnisse des Promilite III, des D-Count und des Kulturellen Nachweismethode von TG-BA-N beimpft mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	82
Anlage 10: Tabelle 26: Zusammenfassung der Ergebnisse des Promilite III, des D-Count und des Kulturellen Nachweismethode von hc-AFAC-S beimpft mit <i>Candida parapsilosis</i>	83
Anlage 11: Tabelle 27: Zusammenfassung der Ergebnisse des Promilite III, des D-Count und des Kulturellen Nachweismethode von hc-OR-S beimpft mit <i>Candida parapsilosis</i>	84
Anlage 12: Tabelle 28: Zusammenfassung der Ergebnisse des Promilite III, des D-Count und des Kulturellen Nachweismethode von TG-PG-N beimpft mit <i>Candida parapsilosis</i>	85
Anlage 13: Tabelle 29: Zusammenfassung der Ergebnisse des Promilite III, des D-Count und des Kulturellen Nachweismethode von TG-BA-N beimpft mit <i>Candida parapsilosis</i>	86
Anlage 14: Tabelle 30: Zusammenfassung der Ergebnisse des Promilite III, des D-Count und des Kulturellen Nachweismethode von hc-AFAC-S beimpft mit <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	87
Anlage 15: Tabelle 31: Zusammenfassung der Ergebnisse des Promilite III, des D-Count und des Kulturellen Nachweismethode von hc-OR-S beimpft mit <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	88

Anlage 16: Tabelle 32: Zusammenfassung der Ergebnisse des Promilite III, des D-Count und des Kulturellen Nachweismethode von TG-PG-N beimpft mit <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	89
Anlage 17: Tabelle 33: Zusammenfassung der Ergebnisse des Promilite III, des D-Count und des Kulturellen Nachweismethode von TG-BA-N beimpft mit <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	90
Anlage 18: Tabelle 34: Zusammenfassung der Ergebnisse des Promilite III, des D-Count und des Kulturellen Nachweismethode von hc-AFAC-S beimpft mit <i>Aspergillus niger</i>	91
Anlage 19: Tabelle 35: Zusammenfassung der Ergebnisse des Promilite III, des D-Count und des Kulturellen Nachweismethode von hc-ORC-S beimpft mit <i>Aspergillus niger</i>	92
Anlage 20: Tabelle 36: Zusammenfassung der Ergebnisse des Promilite III, des D-Count und des Kulturellen Nachweismethode von TG-PG-N beimpft mit <i>Aspergillus niger</i>	93
Anlage 21: Tabelle 37: Zusammenfassung der Ergebnisse des Promilite III, des D-Count und des Kulturellen Nachweismethode von TG-BA-N beimpft mit <i>Aspergillus niger</i>	94
Anlage 22: Tabelle 38: Messwerte der Füllerrunde TG-AFKI-N-1.0l vom 15.05.2009	95
Anlage 23: Tabelle 39: Messwerte der Füllerrunde TG-PG-N-1.0l vom 08.05.2009	96
Anlage 24: Tabelle 40: Messwerte der Füllerrunde TG-AFKI-N-1,0l vom 15.05.2009	97
Anlage 25: Tabelle 41: Messwerte des Batches 13 aus KW 17.....	98
Anlage 26: Tabelle 42: Messwerte des Batches 14 aus KW 17.....	99
Anlage 27: Tabelle 43: Messwerte des Batches 16 aus KW 17.....	100
Anlage 28: Tabelle 44: Messwerte des Batches 3 aus KW 18.....	101
Anlage 29: Tabelle 45: Messergebnisse des Batches 4 aus KW 18.....	102
Anlage 30: Tabelle 46: Messergebnisse des Batches 4 aus KW 19.....	103
Anlage 31: Tabelle 47: Messergebnisse des Batches 4 aus KW 20.....	104
Anlage 32: Tabelle 48: Messergebnisse des Zentrifugationstestes von hc-AFAC-S angeimpft mit <i>Candida parapsilosis</i>	105
Anlage 33: Tabelle 49: Messergebnisse des Zentrifugationstestes von hc-OR-S angeimpft mit <i>Candida parapsilosis</i>	106
Anlage 34: Tabelle 50: Messergebnisse des Zentrifugationstestes von TG-PG-N angeimpft mit <i>Candida parapsilosis</i>	107
Anlage 35: Tabelle 51: Messergebnisse des Zentrifugationstestes von TG-BA-N angeimpft mit <i>Candida parapsilosis</i>	108
Anlage 36: Tabelle 52: Messergebnisse des Zentrifugationstestes von hc-AFAC-S angeimpft mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	109
Anlage 37: Tabelle 53: Messergebnisse des Zentrifugationstestes von hc-OR-S angeimpft mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	110

Anlage 38: Tabelle 54: Messergebnisse des Zentrifugationstestes von TG-PG-N angeimpft mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	111
Anlage 39: Tabelle 55: Messergebnisse des Zentrifugationstestes von TG-BA-N angeimpft mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	112

Anhang

Anlage 1

Tabelle 14: Messwerte des ATP-Gehaltes zu einem bestimmten Zeitpunkt bei hc-AFAC-S

Produkt	Keim	Zeitpunkt		
		24h	48h	72h
hc-AFAC-S	Saccharomyces cerevisiae	24h	48h	72h
		32	37	34
		34	34	28
		27	40	1232
		31	19	25
		37	22	5733
		34	28	209
		28	32	1789
		32	30	1293
	Candida parapsilosis	28	33	36
		22	42	55
		34	29	29
		27	23	26
		27	38	35
		32	32	25
				28
	Lactobacillus rhamnosus	29	36	34
		40	42	27
		30	67	32
		28	23	25
		22	41	68
		37	19	40
				31
	Aspergillus	60	25	24
		44	35	37
		44	34	29
		49	31	30

Anlage 2

Tabelle 15: Messwerte des ATP-Gehaltes zu einem bestimmten Zeitpunkt bei hc-OR-S

Produkt	Keim	Zeitpunkt		
		24h	48h	72h
hc-OR-S	Saccharomyces cerevisiae	24h	48h	72h
		61	151	93
		134	99	82
		121	117	77
		102	162	89
		98	205	460
		168	2	118
		122	69	667
		115	115	227
	Candida parapsilosis	67	112	66
		98	122	114
		77	130	97
		162	189	121
		101	72	90
		123	90	137
				105
	Lactobacillus rhamnosus	109	201	5265
		122	689	26289
		159	59	429
		164	60	3146
		114	180	882
		130	248	1898
				133
	Aspergillus	134	64	128
		131	72	533
		595	69	409
		287	68	357

Anlage 3

Tabelle 16: Messwerte des ATP-Gehaltes zu einem bestimmten Zeitpunkt bei TG-PG-N

Produkt	Keim	Zeitpunkt		
		24h	48h	72h
TG-PG-N	Saccharomyces cerevisiae	47	36	42
		54	33	30
		53	50	1563
		41	15	535542
		51	28	621347
		49	48	28
		52	48	18
		50	37	165510
	Candida parapsilosis	38	49	53
		36	54	38
		33	27	1812
		50	36	35
		42	46	26
		30	46	34
		38	43	333
	Lactobacillus rhamnosus	54	36	43
		53	53	53
		38	57	15
		27	40	13
		36	36	59
		29	41	35
		40	44	36
	Aspergillus niger	20	64	2217
		33	48	319
		35	138	22
		29	83	853

Anlage 4

Tabelle 17: Messwerte des ATP-Gehaltes zu einem bestimmten Zeitpunkt bei TG-BA-N

Produkt	Keim	Zeitpunkt		
		24h	48h	72h
TG-BA-N	Saccharomyces cerevisiae	31	73	48
		45	47	46
		63	32	1580
		57	48	5610
		33	47	27505
		46	45	26
		54	48	1138
		47	49	5136
	Candida parapsilosis	36	53	427
		44	54	785
		67	51	64
		41	50	229
		59	46	37
		53	54	105
		50	51	275
	Lactobacillus rhamnosus	50	45	3233
		39	710	118121
		41	70	108931
		45	230	198789
		36	87	115631
		44	885	197467
		43	338	123695
	Aspergillus	34	108	289
		54	70	323
		69	264	448
		52	147	353

Anlage 5**Tabelle 18:** Ergebnisse der Verdünnungsreihe mit *Saccharomyces cerevisiae* in Ringerlösung

Verdünnung	Ergebnis	
10 ⁻⁴	n.a.	n.a.
10 ⁻⁵	n.a.	n.a.
10 ⁻⁶	n.a.	n.a.
10 ⁻⁷	287	273
10 ⁻⁸	40	31
10 ⁻⁹	1	12
10 ⁻¹⁰	<1	<1

Tabelle 19: Ergebnisse der Verdünnungsreihe mit *Candida Parapsilosis* in Ringerlösung

Verdünnung	Ergebnis	
10 ⁻⁴	n.a.	n.a.
10 ⁻⁵	321	315
10 ⁻⁶	56	62
10 ⁻⁷	3	2
10 ⁻⁸	<1	<1
10 ⁻⁹	<1	<1
10 ⁻¹⁰	<1	<1

Tabelle 20: Ergebnisse der Verdünnungsreihe mit *Lactobacillus rhamnosus* in Ringerlösung

Verdünnung	Ergebnis	
10 ⁻⁴	n.a.	n.a.
10 ⁻⁵	n.a.	n.a.
10 ⁻⁶	482	482
10 ⁻⁷	55	71
10 ⁻⁸	4	5
10 ⁻⁹	2	2
10 ⁻¹⁰	<1	<1

Tabelle 21: Ergebnisse der Verdünnungsreihe mit *Aspergillus niger* in Ringerlösung

Verdünnung	Ergebnis	
10 ⁻⁴	n.a.	n.a.
10 ⁻⁵	n.a.	n.a.
10 ⁻⁶	50	47
10 ⁻⁷	7	9
10 ⁻⁸	2	<1
10 ⁻⁹	<1	<1
10 ⁻¹⁰	<1	<1

Anlage 6

Tabelle 22: Zusammenfassung der Ergebnisse des Promilite III, des D-Count und des Kulturellen Nachweismethode von hc-AFAC-S beimpft mit *Saccharomyces cerevisiae*

Produkt	Keim	Verd.	Probennr.	RLU	Counts/ml	KbE/ml	Verd.	RLU	Counts/ml	KbE/ml
hc-AF-AC-S-1.01	SC	10 ⁻⁴	1/1	6,3E+01	2,8E+05	n.a.	10 ⁻⁹	4,2E+01	5,9E+01	<1
			1/2	1,1E+03	2,9E+05	n.a.		3,5E+01	3,0E+01	<1
			2/1	1,7E+02	1,4E+05	n.a.		3,6E+01	3,0E+01	<1
			2/2	4,0E+02	1,4E+05	n.a.		3,3E+01	0,0E+00	<1
			3/1	4,2E+02	1,9E+05	n.a.		3,6E+01	3,0E+01	<1
			3/2	7,4E+02	1,4E+05	n.a.		4,8E+01	0,0E+00	<1
		10 ⁻⁵	1/1	3,2E+02	4,3E+04	n.a.	10 ⁻¹⁰	4,1E+01	0,0E+00	<1
			1/2	4,5E+02	3,9E+04	n.a.		2,7E+01	0,0E+00	<1
			2/1	1,3E+02	2,5E+04	n.a.		4,0E+01	0,0E+00	<1
			2/2	2,8E+02	1,8E+04	n.a.		4,5E+01	0,0E+00	<1
			3/1	5,2E+02	3,6E+04	n.a.		4,5E+01	3,0E+01	<1
			3/2	4,4E+02	3,9E+04	n.a.		3,8E+01	3,0E+01	<1
		10 ⁻⁶	1/1	8,7E+01	4,2E+03	n.a.				
			1/2	9,7E+01	4,4E+03	n.a.				
			2/1	3,5E+01	3,4E+03	n.a.				
			2/2	5,1E+01	2,4E+03	n.a.				
			3/1	4,8E+01	2,0E+03	n.a.				
			3/2	6,3E+01	2,1E+03	n.a.				
		10 ⁻⁷	1/1	3,5E+01	8,9E+01	n.a.				
			1/2	5,8E+01	1,8E+02	n.a.				
			2/1	5,1E+01	3,0E+02	n.a.				
			2/2	4,4E+01	2,4E+02	n.a.				
			3/1	4,3E+01	2,1E+02	n.a.				
			3/2	4,5E+01	1,5E+02	n.a.				
		10 ⁻⁸	1/1	4,1E+01	0,0E+00	<1				
			1/2	3,9E+01	0,0E+00	<1				
			2/1	2,2E+01	0,0E+00	<1				
			2/2	2,8E+01	3,0E+01	<1				
			3/1	3,4E+01	0,0E+00	<1				
			3/2	4,4E+01	0,0E+00	<1				

Anlage 7

Tabelle 23: Zusammenfassung der Ergebnisse des Promilite III, des D-Count und des Kulturellen Nachweismethode von hc-OR-S beimpft mit *Saccharomyces cerevisiae*

Produkt	Keim	Verd.	Probennr.	RLU	Counts/ml	KbE/ml	Verd.	RLU	Counts/ml 1	KbE/ml
hc-OR-S-1.01	SC	10 ⁻⁴	1/1	5,2E+03	2,0E+04	n.a.	10 ⁻⁹	1,1E+02	0,0E+00	<1
			1/2	5,5E+03	2,4E+05	n.a.		1,2E+02	0,0E+00	<1
			2/1	5,7E+03	4,3E+05	n.a.		1,2E+02	0,0E+00	<1
			2/2	8,0E+03	3,4E+05	n.a.		1,1E+02	0,0E+00	<1
			3/1	6,1E+03	3,0E+05	n.a.		1,3E+02	0,0E+00	<1
			3/2	6,8E+03	2,6E+05	n.a.		4,2E+03	0,0E+00	<1
		10 ⁻⁵	1/1	7,0E+02	1,3E+04	n.a.	10 ⁻¹⁰	9,7E+01	3,0E+01	<1
			1/2	7,2E+02	9,4E+03	n.a.		1,3E+02	0,0E+00	<1
			2/1	5,4E+02	9,6E+03	n.a.		1,3E+02	0,0E+00	<1
			2/2	6,9E+02	1,2E+04	n.a.		1,5E+02	0,0E+00	<1
			3/1	8,9E+02	8,5E+03	n.a.		1,2E+02	0,0E+00	<1
			3/2	6,9E+04	1,7E+04	n.a.		1,3E+02	0,0E+00	<1
		10 ⁻⁶	1/1	1,7E+02	1,3E+03	n.a.				
			1/2	2,0E+02	1,1E+03	n.a.				
			2/1	1,7E+02	1,5E+03	n.a.				
			2/2	2,1E+02	1,2E+03	n.a.				
			3/1	1,7E+02	1,4E+03	n.a.				
			3/2	2,0E+02	1,2E+03	n.a.				
		10 ⁻⁷	1/1	1,6E+02	3,3E+02	n.a.				
			1/2	1,4E+02	3,0E+02	n.a.				
			2/1	1,3E+02	1,8E+02	n.a.				
			2/2	1,3E+02	1,2E+02	n.a.				
			3/1	1,2E+02	2,4E+02	n.a.				
			3/2	1,3E+02	3,6E+02	n.a.				
		10 ⁻⁸	1/1	1,1E+02	1,5E+02	n.a.				
			1/2	1,3E+02	1,8E+02	n.a.				
			2/1	1,3E+02	5,9E+01	n.a.				
			2/2	1,3E+02	5,9E+01	n.a.				
			3/1	1,2E+02	3,0E+01	7				
			3/2	1,3E+02	3,0E+01	4				

Anlage 7

Tabelle 24: Zusammenfassung der Ergebnisse des Promilite III, des D-Count und des Kulturellen Nachweismethode von TG-PG-N beimpft mit *Saccharomyces cerevisiae*

Produkt	Keim	Verd.	Probennr.	RLU	Counts/ml	KbE/ml	Verd.	RLU	Counts/ml	KbE/ml
TG-PG-N-1.01	SC	10 ⁻⁴	1/1	2,1E+04	6,5E+05	n.a.	10 ⁻⁹	6,7E+01	0,0E+00	<1
			1/2	2,0E+04	6,6E+05	n.a.		6,1E+01	0,0E+00	<1
			2/1	2,1E+04	8,1E+05	n.a.		5,2E+01	0,0E+00	<1
			2/2	2,3E+04	5,0E+05	n.a.		6,0E+01	0,0E+00	<1
			3/1	1,9E+04	2,2E+05	n.a.		6,6E+01	0,0E+00	<1
			3/2	2,1E+04	3,7E+04	n.a.		8,3E+01	0,0E+00	<1
		10 ⁻⁵	1/1	2,4E+03	4,8E+04	n.a.	10 ⁻¹⁰	7,0E+01	0,0E+00	<1
	1/2		2,6E+03	3,5E+04	n.a.	7,3E+01		0,0E+00	<1	
	2/1		2,5E+03	3,9E+04	n.a.	2,9E+03		0,0E+00	<1	
	2/2		2,6E+03	5,2E+04	n.a.	6,8E+01		0,0E+00	<1	
	3/1		2,5E+03	9,0E+04	n.a.	4,9E+02		0,0E+00	<1	
	3/2		2,6E+03	4,7E+04	n.a.	6,2E+01		0,0E+00	<1	
		10 ⁻⁶	1/1	4,8E+02	1,4E+04	n.a.				
	1/2		5,3E+02	1,5E+04	n.a.					
	2/1		2,8E+02	6,3E+03	n.a.					
	2/2		3,5E+02	8,8E+03	n.a.					
	3/1		4,9E+02	1,9E+04	n.a.					
	3/2		5,3E+02	1,6E+04	n.a.					
		10 ⁻⁷	1/1	1,2E+02	1,3E+03	n.a.				
	1/2		1,0E+02	1,5E+03	n.a.					
	2/1		1,6E+02	1,8E+03	n.a.					
	2/2		1,1E+02	3,5E+03	n.a.					
	3/1		1,4E+02	1,0E+03	n.a.					
	3/2		9,6E+01	1,5E+03	n.a.					
		10 ⁻⁸	1/1	6,4E+01	0,0E+00	<1				
			1/2	4,3E+01	0,0E+00	<1				
			2/1	6,6E+01	0,0E+00	<1				
			2/2	5,8E+01	5,9E+01	<1				
			3/1	5,2E+01	3,0E+01	<1				
			3/2	4,9E+01	0,0E+00	<1				

Anlage 9

Tabelle 25: Zusammenfassung der Ergebnisse des Promilite III, des D-Count und des Kulturellen Nachweismethode von TG-BA-N beimpft mit *Saccharomyces cerevisiae*

Produkt	Keim	Verd.	Probennr.	RLU	Counts/ml	KbE/ml	Verd.	RLU	Counts/ml	KbE/ml
TG-BA-N-1.01	SC	10 ⁻⁴	1/1	3,1E+04	1,5E+06	n.a.	10 ⁻⁹	4,7E+01	3,6E+02	<1
			1/2	4,7E+04	1,9E+06	n.a.		5,9E+01	2,7E+02	<1
			2/1	2,0E+04	1,1E+06	n.a.		4,6E+01	2,7E+02	<1
			2/2	3,1E+04	6,8E+05	n.a.		4,1E+01	1,2E+02	<1
			3/1	1,7E+04	5,9E+05	n.a.		5,9E+01	2,4E+02	<1
			3/2	2,4E+04	1,1E+06	n.a.		5,6E+01	3,3E+02	<1
		10 ⁻⁵	1/1	4,8E+03	1,8E+05	n.a.	10 ⁻¹⁰	4,9E+01	2,1E+02	<1
	1/2		6,4E+03	1,9E+05	n.a.	5,3E+01		4,8E+02	<1	
	2/1		5,0E+03	1,5E+05	n.a.	5,5E+01		3,0E+02	<1	
	2/2		4,3E+03	1,0E+05	n.a.	5,3E+01		3,0E+01	<1	
	3/1		2,4E+03	7,4E+04	n.a.	4,5E+01		8,9E+01	<1	
	3/2		3,9E+03	1,0E+05	n.a.	4,8E+01		8,9E+01	<1	
		10 ⁻⁶	1/1	7,9E+02	1,7E+04	n.a.				
	1/2		8,8E+02	2,7E+04	n.a.					
	2/1		6,5E+02	1,7E+04	n.a.					
	2/2		7,4E+02	1,7E+04	n.a.					
	3/1		9,6E+02	1,8E+04	n.a.					
	3/2		1,0E+03	2,3E+04	n.a.					
		10 ⁻⁷	1/1	6,8E+01	1,0E+03	n.a.				
	1/2		8,7E+01	5,1E+02	n.a.					
	2/1		1,1E+02	3,0E+03	n.a.					
	2/2		1,8E+02	1,9E+03	n.a.					
	3/1		8,7E+01	1,1E+03	n.a.					
	3/2		8,7E+01	1,6E+03	n.a.					
		10 ⁻⁸	1/1	4,9E+01	3,6E+02	<1				
	1/2		6,2E+01	1,8E+02	<1					
	2/1		7,8E+01	5,1E+02	n.a.					
	2/2		6,6E+01	8,4E+02	n.a.					
	3/1		4,4E+01	2,1E+02	12					
	3/2		5,1E+01	2,1E+02	7					

Anlage 11

Tabelle 27: Zusammenfassung der Ergebnisse des Promilite III, des D-Count und des Kulturellen Nachweismethode von hc-OR-S beimpft mit *Candida parapsilosis*

Produkt	Keim	Verd.	Probennr.	RLU	Counts/ml	KbE/ml	Verd.	RLU	Counts/ml	KbE/ml
hc-OR-S-1.01	CP	10 ⁻⁴	1/1	8,0E+02	4,4E+04	n.a.	10 ⁻⁹	7,8E+01	0,0E+00	71
			1/2	8,0E+02	4,6E+04	n.a.		8,8E+01	0,0E+00	55
			2/1	6,4E+02	2,5E+04	n.a.		6,6E+01	3,0E+01	93
			2/2	6,1E+02	2,3E+04	n.a.		5,5E+01	6,1E+01	86
			3/1	1,0E+03	5,2E+04	n.a.		6,9E+01	0,0E+00	209
			3/2	1,0E+03	6,6E+04	n.a.		5,9E+01	0,0E+00	206
		10 ⁻⁵	1/1	9,5E+01	0,0E+00	n.a.	10 ⁻¹⁰	6,5E+01	3,0E+01	n.a.
			1/2	7,4E+01	0,0E+00	n.a.		5,1E+01	0,0E+00	n.a.
			2/1	6,1E+01	1,2E+02	n.a.		5,7E+01	3,0E+01	n.a.
			2/2	6,7E+01	1,2E+02	n.a.		6,5E+01	0,0E+00	n.a.
			3/1	6,5E+01	3,0E+01	n.a.		6,2E+01	0,0E+00	n.a.
			3/2	9,4E+01	0,0E+00	n.a.		5,4E+01	0,0E+00	n.a.
		10 ⁻⁶	1/1	6,5E+01	0,0E+00	n.a.				
			1/2	8,6E+01	3,0E+01	n.a.				
			2/1	5,7E+01	0,0E+00	n.a.				
			2/2	7,4E+01	0,0E+00	n.a.				
			3/1	7,5E+01	0,0E+00	n.a.				
			3/2	8,5E+01	0,0E+00	n.a.				
		10 ⁻⁷	1/1	7,7E+01	0,0E+00	n.a.				
			1/2	8,9E+01	3,0E+01	n.a.				
			2/1	7,2E+01	0,0E+00	n.a.				
			2/2	8,4E+01	0,0E+00	n.a.				
			3/1	7,4E+01	3,0E+01	n.a.				
			3/2	7,2E+01	5,9E+01	n.a.				
		10 ⁻⁸	1/1	6,5E+01	0,0E+00	182				
			1/2	8,0E+01	0,0E+00	172				
			2/1	5,5E+01	3,0E+01	n.a.				
			2/2	5,4E+01	0,0E+00	n.a.				
			3/1	8,1E+01	3,0E+01	n.a.				
			3/2	7,8E+01	0,0E+00	n.a.				

Anlage 12

Tabelle 28: Zusammenfassung der Ergebnisse des Promilite III, des D-Count und des Kulturellen Nachweismethode von TG-PG-N beimpft mit *Candida parapsilosis*

Produkt	Keim	Verd.	Probennr.	RLU	Counts/ml	KbE/ml	Verd.	RLU	Counts/ml	KbE/ml
TG-PG N-1.01	CP	10 ⁻⁴	1/1	4,4E+04	4E+06	n.a.	10 ⁻⁹	7,7E+01	3,0E+01	<1
			1/2	4,3E+04	4E+06	n.a.		6,6E+01	0,0E+00	<1
			2/1	3,0E+04	3E+06	n.a.		6,8E+01	0,0E+00	<1
			2/2	3,4E+04	3E+06	n.a.		6,6E+01	8,9E+01	<1
			3/1	1,6E+04	951568	n.a.		4,9E+01	8,9E+01	<1
			3/2	1,6E+04	2E+06	n.a.		6,8E+01	0,0E+00	<1
		10 ⁻⁵	1/1	3,6E+03	501784	n.a.	10 ⁻¹⁰	6,7E+01	9,6E+03	<1
			1/2	3,7E+03	545994	n.a.		8,2E+01	5,4E+03	<1
			2/1	5,8E+01	26114	n.a.		6,9E+01	3,0E+01	<1
			2/2	8,2E+01	21202	n.a.		6,5E+01	3,0E+01	<1
			3/1	2,0E+03	314324	n.a.		6,2E+01	4,2E+03	<1
			3/2	2,0E+03	286245	n.a.		8,3E+01	3,7E+03	<1
		10 ⁻⁶	1/1	5,2E+01	1301	n.a.				
			1/2	3,9E+01	1664	n.a.				
			2/1	6,3E+01	6161	n.a.				
			2/2	5,0E+01	5915	n.a.				
			3/1	8,7E+03	664704	n.a.				
			3/2	9,2E+03	553091	n.a.				
		10 ⁻⁷	1/1	4,4E+01	0	n.a.				
			1/2	3,9E+01	30	n.a.				
			2/1	4,7E+01	119	n.a.				
			2/2	5,1E+01	415	n.a.				
			3/1	5,0E+01	474	n.a.				
			3/2	5,0E+01	533	n.a.				
		10 ⁻⁸	1/1	5,8E+01	0	<1				
			1/2	3,7E+02	0	<1				
			2/1	6,4E+01	5834	<1				
			2/2	5,2E+01	1959	<1				
			3/1	5,1E+01	0	<1				
			3/2	5,1E+01	0	<1				

Anlage 13

Tabelle 29: Zusammenfassung der Ergebnisse des Promilite III, des D-Count und des Kulturellen Nachweismethode von TG-BA-N beimpft mit *Candida parapsilosis*

Produkt	Keim	Verd.	Probennr.	RLU	Counts/ml	KbE/ml	Verd.	RLU	Counts/ml	KbE/ml
TG-BA-N-1.01	CP	10 ⁻⁴	1/1	130483	3E+08	n.a.	10 ⁻⁹	31	445	<1
			1/2	177624	3E+06	n.a.		23	356	<1
			2/1	63923	2E+06	n.a.		35	59	<1
			2/2	73594	1E+06	n.a.		47	119	<1
			3/1	147667	2E+06	n.a.		34	0	<1
			3/2	171755	2E+06	n.a.		33	238	<1
		10 ⁻⁵	1/1	13314	498882	n.a.	10 ⁻¹⁰	43	119	<1
			1/2	13081	621214	n.a.		44	119	<1
			2/1	4886	462395	n.a.		45	30	<1
			2/2	5687	404062	n.a.		47	149	<1
			3/1	3331	272890	n.a.		45	89	<1
			3/2	3694	277505	n.a.		51	59	<1
		10 ⁻⁶	1/1	136	6202	n.a.				
			1/2	115	7526	n.a.				
			2/1	191	13533	n.a.				
			2/2	231	13223	n.a.				
			3/1	139	9698	n.a.				
			3/2	196	8408	n.a.				
		10 ⁻⁷	1/1	68	1008	n.a.				
			1/2	70	862	n.a.				
			2/1	499	19538	n.a.				
			2/2	577	15489	n.a.				
			3/1	43	30	n.a.				
			3/2	47	89	n.a.				
		10 ⁻⁸	1/1	37	149	<1				
			1/2	31	60	<1				
			2/1	40	30	<1				
			2/2	53	30	<1				
			3/1	33	30	<1				
			3/2	38	0	<1				

Anlage 14

Tabelle 30: Zusammenfassung der Ergebnisse des Promilite III, des D-Count und des Kulturellen Nachweismethode von hc-AFAC-S beimpft mit *Lactobacillus rhamnosus*

Produkt	Keim	Verd.	Probennr.	RLU	Counts/ml	KbE/ml	Verd.	RLU	Counts/ml	KbE/ml
hc-AF-AC-S-1.0l	LB	10 ⁻⁴	1/1	4,1E+01	3,0E+02	128	10 ⁻⁹	3,0E+01	0,0E+00	<1
			1/2	5,3E+01	5,9E+01	146		5,3E+01	0,0E+00	<1
			2/1	5,2E+01	1,5E+02	144		4,1E+01	0,0E+00	<1
			2/2	4,5E+01	1,2E+02	143		5,0E+01	3,0E+01	<1
			3/1	5,3E+01	1,5E+02	122		3,9E+01	3,0E+01	<1
			3/2	3,1E+01	2,7E+02	120		3,4E+01	0,0E+00	<1
		10 ⁻⁵	1/1	3,5E+01	3,0E+01	16	10 ⁻¹⁰	4,7E+01	3,0E+01	<1
			1/2	3,9E+01	3,0E+01	17		2,9E+01	0,0E+00	<1
			2/1	3,1E+01	3,0E+01	19		3,6E+01	0,0E+00	<1
			2/2	3,3E+01	8,9E+01	16		3,1E+01	0,0E+00	<1
			3/1	4,5E+01	3,0E+01	21		4,5E+01	3,0E+01	<1
			3/2	4,2E+01	0,0E+00	22		3,0E+01	0,0E+00	<1
		10 ⁻⁶	1/1	3,6E+01	0,0E+00	<1				
			1/2	4,0E+01	0,0E+00	<1				
			2/1	4,3E+01	0,0E+00	3				
			2/2	3,3E+01	5,9E+01	1				
			3/1	4,3E+01	0,0E+00	1				
			3/2	4,3E+01	3,0E+01	1				
		10 ⁻⁷	1/1	4,2E+01	0,0E+00	<1				
			1/2	3,0E+01	0,0E+00	<1				
			2/1	4,1E+01	3,0E+01	<1				
			2/2	3,2E+01	0,0E+00	<1				
			3/1	2,8E+02	6,8E+05	<1				
			3/2	2,9E+02	3,7E+05	<1				
		10 ⁻⁸	1/1	2,7E+01	0,0E+00	<1				
			1/2	3,5E+01	0,0E+00	<1				
			2/1	3,9E+01	3,0E+01	<1				
			2/2	3,2E+01	3,0E+01	<1				
			3/1	3,6E+01	0,0E+00	<1				
			3/2	5,1E+01	0,0E+00	<1				

Anlage 15

Tabelle 31: Zusammenfassung der Ergebnisse des Promilite III, des D-Count und des Kulturellen Nachweismethode von hc-OR-S beimpft mit *Lactobacillus rhamnosus*

Produkt	Keim	Verd.	Probennr.	RLU	Counts/ml	KbE/ml	Verd.	RLU	Counts/ml	KbE/ml
hc-OR-S-1.0l	LB	10 ⁻⁴	1/1	2,2E+04	1,2E+06	n.a.	10 ⁻⁹	1,1E+02	3,0E+01	<1
			1/2	2,1E+04	8,0E+05	n.a.		1,1E+02	0,0E+00	<1
			2/1	1,9E+04	7,1E+04	n.a.		7,7E+01	2,1E+02	<1
			2/2	2,0E+04	4,7E+05	n.a.		1,1E+02	3,0E+01	<1
			3/1	2,0E+04	1,0E+06	n.a.		8,6E+01	5,9E+01	<1
			3/2	1,9E+04	1,9E+06	n.a.		9,7E+01	5,9E+01	<1
		10 ⁻⁵	1/1	4,4E+03	5,4E+04	n.a.	10 ⁻¹⁰	8,1E+01	3,0E+01	<1
			1/2	4,2E+03	2,3E+05	n.a.		9,2E+01	5,9E+01	<1
			2/1	4,0E+03	2,6E+05	n.a.		7,9E+01	0,0E+00	<1
			2/2	4,0E+03	3,0E+05	n.a.		1,1E+02	3,0E+01	<1
			3/1	3,8E+03	4,1E+04	n.a.		8,3E+01	5,9E+01	<1
			3/2	3,6E+03	4,8E+04	n.a.		9,7E+01	3,0E+01	<1
		10 ⁻⁶	1/1	5,2E+02	6,2E+02	n.a.				
			1/2	4,8E+02	2,4E+03	n.a.				
			2/1	4,6E+02	4,4E+03	n.a.				
			2/2	4,3E+02	2,2E+04	n.a.				
			3/1	4,8E+02	5,8E+04	n.a.				
			3/2	5,0E+02	4,4E+03	n.a.				
		10 ⁻⁷	1/1	4,7E+02	5,2E+04	n.a.				
			1/2	4,7E+02	9,5E+02	n.a.				
			2/1	4,7E+02	3,0E+03	n.a.				
			2/2	4,4E+02	3,0E+03	n.a.				
			3/1	1,5E+02	2,7E+02	n.a.				
			3/2	1,5E+02	2,1E+02	n.a.				
		10 ⁻⁸	1/1	1,5E+02	1,4E+03	n.a.				
			1/2	1,6E+02	2,7E+02	n.a.				
			2/1	1,2E+02	3,5E+03	n.a.				
			2/2	1,5E+02	2,7E+02	n.a.				
			3/1	9,5E+01	3,0E+01	n.a.				
			3/2	1,1E+02	3,0E+01	n.a.				

Anlage 16

Tabelle 32: Zusammenfassung der Ergebnisse des Promilite III, des D-Count und des Kulturellen Nachweismethode von TG-PG-N beimpft mit *Lactobacillus rhamnosus*

Produkt	Keim	Verd.	Probennr.	RLU	Counts/ml	KbE/ml	Verd.	RLU	Counts/ml	KbE/ml
TG-PG-N-1.01	LB	10 ⁻⁴	1/1	3,4E+01	3,27E+02	112	10 ⁻⁹	4,2E+01	3,0E+01	<1
			1/2	3,5E+01	2,37E+02	89		5,5E+01	0,0E+00	<1
			2/1	3,0E+01	1,48E+02	101		5,0E+01	0,0E+00	<1
			2/2	4,4E+01	3,27E+02	98		4,3E+01	0,0E+00	<1
			3/1	4,2E+01	1,78E+02	121		3,4E+01	3,0E+01	<1
			3/2	3,7E+01	5,92E+02	107		5,9E+01	0,0E+00	<1
		10 ⁻⁵	1/1	4,8E+01	3,00E+01	16	10 ⁻¹⁰	7,4E+01	0,0E+00	<1
			1/2	5,1E+01	0,00E+00	21		5,5E+01	0,0E+00	<1
			2/1	4,1E+01	0,00E+00	13		3,9E+01	0,0E+00	<1
			2/2	4,8E+01	0,00E+00	8		4,3E+01	0,0E+00	<1
			3/1	5,7E+01	3,00E+01	10		6,3E+01	3,0E+01	<1
			3/2	5,5E+01	0,00E+00	15		4,2E+01	0,0E+00	<1
		10 ⁻⁶	1/1	5,0E+01	0,00E+00	4				
			1/2	4,7E+01	0,00E+00	2				
			2/1	5,0E+01	0,00E+00	<1				
			2/2	4,5E+01	0,00E+00	1				
			3/1	5,9E+01	0,00E+00	3				
			3/2	3,4E+01	0,00E+00	1				
		10 ⁻⁷	1/1	5,2E+01	0,00E+00	<1				
			1/2	3,8E+01	3,00E+01	<1				
			2/1	5,5E+01	0,00E+00	<1				
			2/2	3,9E+01	0,00E+00	<1				
			3/1	6,5E+01	0,00E+00	<1				
			3/2	5,8E+01	3,00E+01	<1				
		10 ⁻⁸	1/1	3,8E+01	0,00E+00	<1				
			1/2	5,3E+01	0,00E+00	<1				
			2/1	5,8E+01	0,00E+00	<1				
			2/2	3,8E+01	0,00E+00	<1				
			3/1	3,8E+01	0,00E+00	<1				
			3/2	5,2E+01	0,00E+00	<1				

Anlage 17

Tabelle 33: Zusammenfassung der Ergebnisse des Promilite III, des D-Count und des Kulturellen Nachweismethode von TG-BA-N beimpft mit *Lactobacillus rhamnosus*

Produkt	Keim	Verd.	Probennr.	RLU	Counts/ml	KbE/ml	Verd.	RLU	Counts/ml	KbE/ml
TG-BA-N-1.01	LB	10 ⁻⁴	1/1	1,4E+05	1,75E+06	n.a.	10 ⁻⁹	5,0E+01	2,4E+02	n.a.
			1/2	1,6E+05	4,30E+04	n.a.		4,2E+01	2,4E+02	n.a.
			2/1	1,2E+05	1,80E+06	n.a.		5,0E+01	3,0E+02	n.a.
			2/2	1,4E+05	3,38E+06	n.a.		5,7E+01	3,3E+02	n.a.
			3/1	1,3E+05	7,51E+04	n.a.		4,6E+01	5,9E+01	n.a.
			3/2	1,4E+05	1,76E+06	n.a.		5,8E+01	5,9E+01	n.a.
		10 ⁻⁵	1/1	1,5E+04	8,42E+04	n.a.	10 ⁻¹⁰	3,2E+01	3,0E+01	<1
			1/2	1,6E+04	1,56E+05	n.a.		3,5E+01	1,2E+02	<1
			2/1	1,1E+04	9,43E+04	n.a.		4,6E+01	1,2E+02	<1
			2/2	1,4E+04	1,84E+05	n.a.		4,3E+01	8,9E+01	<1
			3/1	1,2E+04	8,63E+04	n.a.		3,2E+01	3,0E+01	<1
			3/2	1,5E+04	1,09E+05	n.a.		4,4E+01	2,7E+02	<1
		10 ⁻⁶	1/1	1,5E+03	1,43E+04	n.a.				
			1/2	1,4E+03	4,29E+04	n.a.				
			2/1	1,8E+03	1,61E+04	n.a.				
			2/2	1,5E+03	3,16E+04	n.a.				
			3/1	5,8E+02	1,81E+04	n.a.				
			3/2	1,2E+03	4,15E+04	n.a.				
		10 ⁻⁷	1/1	1,8E+02	7,14E+02	n.a.				
			1/2	2,1E+02	7,29E+03	n.a.				
			2/1	1,3E+02	5,48E+03	n.a.				
			2/2	2,1E+02	8,75E+03	n.a.				
			3/1	1,5E+02	5,18E+03	n.a.				
			3/2	1,5E+02	2,26E+03	n.a.				
		10 ⁻⁸	1/1	6,9E+01	4,16E+02	n.a.				
			1/2	5,4E+01	3,73E+03	n.a.				
			2/1	2,4E+03	3,48E+06	n.a.				
			2/2	3,5E+03	3,63E+06	n.a.				
			3/1	6,1E+01	5,95E+02	n.a.				
			3/2	5,6E+01	7,43E+02	n.a.				

Anlage 18

Tabelle 34: Zusammenfassung der Ergebnisse des Promilite III, des D-Count und des Kulturellen Nachweismethode von hc-AFAC-S beimpft mit *Aspergillus niger*

Produkt	Keim	Verd.	Probennr.	RLU	Counts/ml	KbE/ml	Verd.	RLU	Counts/ml	KbE/ml
hc-AF- AC-S-1.0l	AS	10 ⁻⁴	1/1	1,1E+02	3,0E+01	21	10 ⁻⁹	2,0E+01	0,0E+00	15
			1/2	3,7E+01	0,0E+00	22		3,8E+01	0,0E+00	5
			2/1	3,8E+01	0,0E+00	19		5,1E+01	0,0E+00	5
			2/2	3,2E+01	0,0E+00	20		3,7E+01	0,0E+00	2
			3/1	3,7E+01	0,0E+00	15		3,2E+01	0,0E+00	8
			3/2	2,7E+01	0,0E+00	18		2,4E+01	0,0E+00	21
		10 ⁻⁵	1/1	2,8E+01	0,0E+00	20	10 ⁻¹⁰	4,4E+01	3,0E+01	<1
			1/2	2,9E+01	0,0E+00	4		3,4E+01	0,0E+00	<1
			2/1	3,0E+01	0,0E+00	8		2,6E+01	0,0E+00	<1
			2/2	3,0E+01	0,0E+00	7		3,3E+01	0,0E+00	<1
			3/1	3,0E+01	0,0E+00	4		2,6E+01	0,0E+00	<1
			3/2	3,2E+01	0,0E+00	3		2,7E+01	0,0E+00	<1
		10 ⁻⁶	1/1	2,8E+01	0,0E+00	1				
			1/2	2,7E+01	3,0E+01	<1				
			2/1	2,9E+01	0,0E+00	<1				
			2/2	3,0E+01	0,0E+00	<1				
			3/1	3,0E+01	0,0E+00	<1				
			3/2	3,8E+01	0,0E+00	<1				
		10 ⁻⁷	1/1	4,2E+01	0,0E+00	8				
			1/2	3,4E+01	0,0E+00	3				
			2/1	3,6E+01	0,0E+00	3				
			2/2	4,3E+01	3,0E+01	2				
			3/1	4,3E+01	0,0E+00	2				
			3/2	3,0E+01	0,0E+00	2				
		10 ⁻⁸	1/1	3,3E+01	3,0E+01	<1				
			1/2	3,3E+01	3,0E+01	<1				
			2/1	2,9E+01	0,0E+00	<1				
			2/2	2,9E+01	0,0E+00	<1				
			3/1	3,2E+01	0,0E+00	<1				
			3/2	4,7E+01	0,0E+00	<1				

Anlage 19

Tabelle 35: Zusammenfassung der Ergebnisse des Promilite III, des D-Count und des Kulturellen Nachweismethode von hc-ORC-S beimpft mit *Aspergillus niger*

Produkt	Keim	Verd.	Probennr.	RLU	Counts/ml	KbE/ml	Verd.	RLU	Counts/ml	KbE/ml
hc-OR-S-1.01	AS	10 ⁻⁴	1/1	1,5E+02	0,0E+00	18	10 ⁻⁹	9,4E+01	0,0E+00	<1
			1/2	1,4E+02	0,0E+00	20		1,2E+02	0,0E+00	<1
			2/1	1,4E+02	6,0E+01	23		1,3E+02	0,0E+00	<1
			2/2	1,2E+02	6,0E+01	25		9,9E+01	1,8E+02	<1
			3/1	1,3E+02	3,0E+01	25		9,9E+01	0,0E+00	<1
			3/2	1,3E+02	6,0E+01	21		1,2E+02	0,0E+00	<1
		10 ⁻⁵	1/1	1,0E+02	3,0E+01	4	10 ⁻¹⁰	9,0E+01	9,0E+01	<1
			1/2	1,4E+02	0,0E+00	2		1,3E+02	0,0E+00	<1
			2/1	9,8E+01	1,2E+02	7		9,8E+01	0,0E+00	<1
			2/2	1,4E+02	9,0E+01	5		1,2E+02	3,0E+01	<1
			3/1	1,2E+02	0,0E+00	6		1,1E+02	0,0E+00	<1
			3/2	1,5E+02	0,0E+00	4		1,1E+02	3,0E+01	<1
		10 ⁻⁶	1/1	1,3E+02	3,0E+01	23				
			1/2	1,3E+02	3,0E+01	21				
			2/1	8,8E+01	0,0E+00	18				
			2/2	1,2E+02	6,0E+01	19				
			3/1	9,0E+01	0,0E+00	20				
			3/2	9,8E+01	0,0E+00	11				
		10 ⁻⁷	1/1	8,5E+01	0,0E+00	1				
			1/2	9,3E+01	0,0E+00	<1				
			2/1	7,9E+01	0,0E+00	<1				
			2/2	1,3E+02	0,0E+00	<1				
			3/1	9,3E+01	8,9E+01	<1				
			3/2	1,1E+02	0,0E+00	<1				
		10 ⁻⁸	1/1	1,1E+02	3,0E+01	<1				
			1/2	1,1E+02	0,0E+00	<1				
			2/1	1,0E+02	0,0E+00	<1				
			2/2	1,3E+02	0,0E+00	<1				
			3/1	1,2E+02	0,0E+00	<1				
			3/2	1,1E+02	0,0E+00	<1				

Anlage 20

Tabelle 36: Zusammenfassung der Ergebnisse des Promilite III, des D-Count und des Kulturellen Nachweismethode von TG-PG-N beimpft mit *Aspergillus niger*

Produkt	Keim	Verd.	Probennr.	RLU	Counts/ml	KbE/ml	Verd.	RLU	Counts/ml	KbE/ml
TG-PG-N-1.01	AS	10 ⁻⁴	1/1	5,3E+01	0,0E+00	33	10 ⁻⁹	4,6E+01	0,0E+00	3
			1/2	7,0E+01	0,0E+00	28		4,2E+01	0,0E+00	<1
			2/1	5,7E+01	0,0E+00	27		4,1E+01	0,0E+00	2
			2/2	2,7E+02	0,0E+00	17		8,9E+01	0,0E+00	<1
			3/1	6,4E+01	0,0E+00	18		4,9E+01	0,0E+00	<1
			3/2	1,3E+02	0,0E+00	23		5,3E+01	0,0E+00	<1
		10 ⁻⁵	1/1	2,8E+02	0,0E+00	23	10 ⁻¹⁰	2,3E+02	0,0E+00	1
			1/2	1,1E+02	0,0E+00	21		6,3E+03	0,0E+00	<1
			2/1	3,9E+01	0,0E+00	25		4,8E+01	0,0E+00	<1
			2/2	4,0E+01	3,0E+01	21		7,8E+01	0,0E+00	<1
			3/1	7,7E+01	0,0E+00	21		3,7E+01	3,0E+01	1
			3/2	4,9E+01	0,0E+00	23		5,7E+01	0,0E+00	<1
		10 ⁻⁶	1/1	7,0E+01	0,0E+00	8				
			1/2	5,3E+01	0,0E+00	16				
			2/1	3,6E+01	0,0E+00	10				
			2/2	5,1E+01	0,0E+00	11				
			3/1	4,8E+01	0,0E+00	12				
			3/2	4,8E+01	0,0E+00	13				
		10 ⁻⁷	1/1	5,3E+01	0,0E+00	41				
			1/2	5,6E+01	0,0E+00	28				
			2/1	5,3E+01	0,0E+00	7				
			2/2	3,8E+01	3,0E+01	8				
			3/1	4,5E+01	0,0E+00	13				
			3/2	3,9E+01	0,0E+00	8				
		10 ⁻⁸	1/1	3,7E+01	0,0E+00	39				
			1/2	6,5E+01	0,0E+00	31				
			2/1	4,9E+01	0,0E+00	15				
			2/2	5,8E+01	0,0E+00	12				
			3/1	3,6E+01	0,0E+00	9				
			3/2	4,0E+01	0,0E+00	7				

Anlage 21

Tabelle 37: Zusammenfassung der Ergebnisse des Promilite III, des D-Count und des Kulturellen Nachweismethode von TG-BA-N beimpft mit *Aspergillus niger*

Produkt	Keim	Verd.	Probennr.	RLU	Counts/ml	KbE/ml	Verd.	RLU	Counts/ml	KbE/ml
TG-PG-N-1.01	AS	10 ⁻⁴	1/1	9,9E+01	1,5E+02	26	10 ⁻⁹	5,1E+01	9,0E+01	109
			1/2	2,1E+02	0,0E+00	25		3,5E+01	9,0E+01	81
			2/1	5,8E+01	3,0E+01	43		4,8E+01	1,8E+02	96
			2/2	1,2E+02	9,0E+01	41		4,5E+01	9,0E+01	83
			3/1	1,4E+02	6,0E+01	36		4,3E+01	1,8E+02	62
			3/2	5,1E+02	9,0E+01	34		5,5E+01	1,8E+02	68
		10 ⁻⁵	1/1	4,9E+01	6,0E+01	31	10 ⁻¹⁰	4,7E+01	3,0E+01	1
			1/2	5,4E+01	6,0E+01	36		2,5E+01	3,0E+01	<1
			2/1	3,8E+01	3,0E+01	30		4,0E+01	9,0E+01	<1
			2/2	6,1E+01	3,0E+01	33		3,7E+01	3,0E+01	<1
			3/1	3,3E+01	6,0E+01	44		4,1E+01	6,0E+01	1
			3/2	5,1E+01	3,0E+01	47		4,0E+01	3,0E+01	<1
		10 ⁻⁶	1/1	3,5E+01	6,0E+01	50				
			1/2	4,2E+01	3,0E+01	49				
			2/1	4,4E+01	1,5E+02	37				
			2/2	5,2E+01	1,2E+02	33				
			3/1	6,6E+01	1,5E+02	80				
			3/2	5,1E+01	9,0E+01	58				
		10 ⁻⁷	1/1	5,3E+01	1,5E+02	87				
			1/2	4,3E+01	3,0E+01	73				
			2/1	3,5E+01	1,5E+02	72				
			2/2	4,7E+01	9,0E+01	59				
			3/1	4,4E+01	2,7E+02	80				
			3/2	4,4E+01	1,8E+02	81				
		10 ⁻⁸	1/1	5,0E+01	1,8E+02	n.a.				
			1/2	4,6E+01	1,5E+02	n.a.				
			2/1	4,9E+01	3,0E+02	n.a.				
			2/2	6,1E+01	1,2E+02	n.a.				
			3/1	5,6E+01	9,0E+01	n.a.				
			3/2	4,4E+01	6,0E+01	n.a.				

Anlage 22

Tabelle 38: Messwerte der Füllerrunde TG-AFKI-N-1.0l vom 15.05.2009

TG-AFKI-N-1.0l vom 15.05.2009

Promilite III	D-Count	Promilite III	D-Count	Promilite III	D-Count
[RLU]	[Counts/ml]	[RLU]	[Counts/ml]	[RLU]	[Counts/ml]
34	0	37	0	35	0
32	0	35	0	38	0
32	30	31	0	75	0
30	30	46	0	34	0
27	0	32	0	37	0
38	0	39	0	39	0
24	0	37	0	24	0
29	0	32	0	18	0
31	30	36	0	20	0
24	30	28	0	43	0
25	0	34	0	30	0
32	0	37	0	20	0
29	0	43	0	36	0
24	0	32	0	28	0
41	0	35	0	33	0
46	0	42	0	29	0
29	0	33	0	33	0
33	0	31	0	35	0
29	0	43	0	24	0
35	0	51	0	32	0
27	30	34	0	28	0
26	30	41	30	25	0
25	0	31	30		
21	0	38	0		
35	0	34	0		
26	0	33	0		
38	0	37	0		
29	0	30	0		
31	0	32	0		
33	0	29	30		
42	0	30	30		
39	0	54	0		
40	0	26	0		
30	0	29	0		
36	0	34	0		
23	0	33	0		
39	0	40	0		

Anlage 23

Tabelle 39: Messwerte der Füllerrunde TG-PG-N-1.0l vom 08.05.2009

TG-PG-N-1.0l vom 08.05.2009

Promilite III	D-Count	Promilite III	D-Count	Promilite III	D-Count
[RLU]	[Counts/ml]	[RLU]	[Counts/ml]	[RLU]	[Counts/ml]
48	0	65	30	38	0
75	0	43	0	32	0
42	30	47	0	35	30
33	30	55	0	42	30
34	0	40	0	44	30
33	0	58	0	38	30
56	0	47	0	49	30
35	0	48	0	37	30
33	0	55	0	33	30
58	0	39	30	47	30
29	30	33	30	31	30
49	30	42	59	42	30
39	59	50	59	46	0
45	59	40	0	34	0
43	0	38	0	42	0
56	0	38	0	40	0
45	0	27	0	48	30
40	0	29	30	35	30
43	0	37	30	57	30
45	0	32	59	38	30
42	0	56	59	42	30
51	0	48	0	49	30
48	0	39	0	44	0
57	0	10166	50860	45	0
54	30	56	50860	34	0
39	30	34	30		
31	0	51	30		
129	0	31	30		
42	0	84	30		
37	0	45	0		
32	30	47	0		
49	30	52	0		
52	30	32	0		
44	30	1628	0		
52	30	42	0		

Anlage 24**Tabelle 40:** Messwerte der Füllerrunde TG-AFKI-N-1,0l vom 15.05.2009**TG-AFKI-N-1,0l vom 15.05.2009**

Promilite III	D-Count
[RLU]	[Counts/ml]
46	0
59	30
45	0
29	0
46	0
24	0
33	30
27	0
34	0
35	0
22	0
43	0
30	0
42	0
35	0
26	0
39	0
24	30
27	0
35	0
25	0
21	0
28	0
51	0
56	0
60	0
57	0
50	0
78	0
47	0
50	0
33	0
55	0
50	0
50	0

Anlage 25

Tabelle 41: Messwerte des Batches 13 aus KW 17

Batch 13 aus KW 17

	Promilite III [RLU]	D-Count [Counts/ml]		Promilite III [RLU]	D-Count [Counts/ml]
hc-ORFF-S-1.0l	148	0	FT-RF-G-1.5l	26	30
	182	0	hc-ORFF-S-1.0l	103	30
	361	0		127	238
	186	0		146	238
	157	0		95	60
	110	0		83	60
	129	0		95	59
	125	0		238	59
	264	30		99	59
	118	30		104	59
	100	0			
	114	0			
	126	30			
	111	30			
	103	0			
	109	0			
	136	59			
	104	59			
	155	30			
	124	30			
	107	30			
	94	30			
	86	0			
	103	0			
	121	4810			
	119	4810			
	158	30			
	140	30			
	129	30			
	106	30			
	136	1636			
	118	1636			
	89	89			
113	89				
132	60				
124	60				
FT-RF-G-1.5l	28	59			
	24	59			

Anlage 26

Tabelle 42: Messwerte des Batches 14 aus KW 17

Batch 14 aus KW 17

	Promilite III [RLU]	D-Count [Counts/ml]		Promilite III [RLU]	D-Count [Counts/ml]
hc-ORFF-S-1.0l	126	89	hc-ORFF-S-1.0l	131	0
	133	89		108	0
	105	208		100	149
	101	208		107	149
	107	357		105	59
	120	357		118	59
	124	59		121	149
	208	59		115	149
	122	89		94	238
	106	89		115	238
	105	0			
	98	0			
	107	30			
	104	30			
	82	59			
	101	59			
	114	119			
	86	119			
	124	30			
	117	30			
	111	30			
	69	30			
	137	59			
	504	59			
	118	59			
	106	59			
	65	0			
	96	0			
	98	30			
	146	30			
	85	30			
	113	30			
	96	59			
	102	59			
	79	30			
	93	30			
	89	30			
	124	30			

Anlage 27

Tabelle 43: Messwerte des Batches 16 aus KW 17

Batch 16 aus KW 17

	Promilite III [RLU]	D-Count [Counts/ml]		Promilite III [RLU]	D-Count [Counts/ml]
hc-FS-S-1.01	47	0	hc-FS-S-1.01	61	0
	52	0		46	0
	60	0		46	0
	41	0		38	0
	48	0		44	0
	57	0		59	0
	63	30		56	0
	57	30		44	0
	54	0		57	0
	67	0		56	0
	45	0			
	62	0			
	53	0			
	46	0			
	51	0			
	62	0			
	65	0			
	40	0			
	50	30			
	47	30			
	53	0			
	55	0			
	60	0			
	46	0			
	57	89			
	53	89			
	50	30			
	52	30			
	68	0			
	59	0			
	55	30			
	48	30			
	56	0			
	54	0			
	64	30			
	58	30			
	62	30			
	62	30			

Anlage 28

Tabelle 44: Messwerte des Batches 3 aus KW 18

Batch 3 aus KW 18

	Promilite III [RLU]	D-Count [Counts/ml]		Promilite III [RLU]	D-Count [Counts/ml]
hc-MV-S-1.01	76	30	hc-MV-S-1.01	68	91
	87	30		53	91
CB hc-ORM-S- 1,5l	163	31		67	61
	100	31		65	61
hc-MV-S-1.01	78	0		65	30
	71	0		64	30
	80	30		67	207
	66	30		55	207
	61	59		66	0
	56	59		70	0
	67	0			
	69	0			
	60	183			
	55	183			
	68	61			
	84	61			
	46	118			
	74	118			
	74	89			
	59	89			
	70	30			
	61	30			
	67	59			
	91	59			
66	152				
67	152				
56	59				
74	59				
66	207				
64	207				
82	61				
59	61				
78	91				
97	91				
72	30				
65	30				
66	118				

Anlage 29

Tabelle 45: Messergebnisse des Batches 4 aus KW 18

Batch 4 aus KW 18

	Promilite III [RLU]	D-Count [Counts/ml]		Promilite III [RLU]	D-Count [Counts/ml]
hc-MV-S-1.0l	74	89	hc-ORCA-S-1.0l	155	0
	62	89		140	0
	71	30		115	0
	65	30		95	0
	68	29	CB hc-ORM-S-1.5l	75	29
	79	29		62	29
	81	88		73	177
	50	88	CB hc-MV-S-1.5l	56	177
	72	30		55	177
	79	30		73	177
	73	30			
	66	30			
	90	61			
	66	61			
	81	61			
	62	61			
	57	118			
	60	118			
	52	89			
	61	89			
52	91				
76	91				
68	29				
64	29				
68	148				
CB hc-ORM-S-1,5l	62	148			
	72	31			
	67	31			
hc-ORCA-S-1.0l	131	92			
	131	92			
	199	0			
	134	0			
	140	89			
	134	89			
	125	30			
	116	30			
	147	30			
	126	30			

Anlage 30

Tabelle 46: Messergebnisse des Batches 4 aus KW 19

Batch 4 aus KW 19

	Promilite III [RLU]	D-Count [Counts/ml]		Promilite III [RLU]	D-Count [Counts/ml]
FP-AFCA-G- 1,5l	32	0	FP-EX-G- 1,5l	42	0
	37	0		41	0
FP-EX-G-1,5l	48	0	33	0	
	50	0	34	0	
	45	0	44	0	
	36	0	40	0	
	37	0	34	0	
	42	0	42	0	
	32	0	33	0	
	35	0	42	0	
	45	0			
	52	0			
	44	0			
	33	0			
	40	0			
	48	0			
	33	0			
	44	0			
	59	30			
CB hc-MV-S- 1,5l	62	89			
	81	89			
	73	89			
CB hc-FS-S- 1,5l	62	0			
	47	0			
	54	0			
FP-EX-G-1,5l	42	0			
	43	0			
	145	30			
	43	0			
	28	0			
	31	0			
	37	0			
	43	0			
	41	0			
	39	0			
	35	0			
40	30				

Anlage 31**Tabelle 47:** Messergebnisse des Batches 4 aus KW 20

Batch 4 aus KW 20

	Promilite III [RLU]	D-Count [Counts/ml]		Promilite III [RLU]	D-Count [Counts/ml]
TG-ORMN-N- 1,0l	51	0	TG-OR-S-1.0l	94	30
	54	30		102	60
	41	30		122	30
	37	59		119	0
	47	30		108	35
	51	30		122	30
	55	30		134	0
	55	30		104	0
	61	30		91	30
	40	59		101	30
	55	30			
	62	30			
	52	30			
	TG-OR-S-1.0l	104		0	
123		30			
127		30			
128		0			
103		60			
113		30			
119		30			
134		30			
112		0			
132		0			
116		0			
114		0			
117		0			
115		0			
120		30			
130		0			
116		0			
118		60			
93		0			
123		30			
110		0			
129	30				
102	30				
110	30				

Anlage 32

Tabelle 48: Messergebnisse des Zentrifugationstestes von hc-AFAC-S angeimpft mit *Candida parapsilosis*

Produkt	Verd.	Keim	RLU	RLU zentr. Probe	RLU zentr. Probe/10	Verd.	RLU	RLU zentr. Probe	RLU zentr. Probe/10
hc-AFAC-S	10 ⁻⁴	CP	62	20559	2056	10 ⁻⁹	38	39	4
			3088	54611	5461		43	39	4
			822	20822	2082		34	39	4
			4648	22392	2239		36	35	4
			3824				26		
			6448				44		
	10 ⁻⁵		38	63	6	10 ⁻¹⁰	50	36	4
			48	47	5		45	32	3
			77	39	4		46	41	4
			46	63	6		24	59	6
			266				36		
			329				43		
	10 ⁻⁶		53	57	6				
			42	51	5				
			32	55	6				
			36	57	6				
			41						
			42						
	10 ⁻⁷		48	36	4				
			28	31	3				
			43	44	4				
			40	40	4				
			42						
			43						
	10 ⁻⁸		38	34	3				
			28	40	4				
			27	41	4				
			49	33	3				
			33						
			48						

Anlage 33

Tabelle 49: Messergebnisse des Zentrifugationstestes von hc-OR-S angeimpft mit *Candida parapsilosis*

Produkt	Verd.	Keim	RLU	RLU zentr. Probe	RLU zentr. Probe/10	Verd.	RLU	RLU zentr. Probe	RLU zentr. Probe/10
hc-OR-S	10 ⁻⁴	CP	801	25156	2516	10 ⁻⁹	78	100	10
			799	24485	2449		88	58	6
			643	25850	2585		66	156	16
			612	23620	2362		55	89	9
			1023				69		
			1024				59		
	10 ⁻⁵		95	88	9	10 ⁻¹⁰	65	103	10
			74	82	8		51	119	12
			61	91	9		57	126	13
			67	89	9		65	121	12
			65				62		
			94				54		
	10 ⁻⁶		65	66	7				
			86	86	9				
			57	58	6				
			74	68	7				
			75						
			85						
	10 ⁻⁷		77	60	6				
			89	69	7				
			72	96	10				
			84	87	9				
			74						
			72						
	10 ⁻⁸		65	114	11				
			80	50	5				
			55	99	10				
			54	60	6				
			81						
			78						

Anlage 34

Tabelle 50: Messergebnisse des Zentrifugationstestes von TG-PG-N angeimpft mit *Candida parapsilosis*

Produkt	Verd.	Keim	RLU	RLU zent. Probe	RLU zentr. Probe/10	Verd.	RLU	RLU zent. Probe	RLU zentr. Probe/10
TG-PG-N	10 ⁻⁴	CP	44499	503646	50365	10 ⁻⁹	77	55	6
			43147	480750	48075		66	56	6
			29680	555718	55572		68	47	5
			33961	472269	47227		66	61	6
			16192				49		
			16130				68		
	10 ⁻⁵		3563	7231	723	10 ⁻¹⁰	67	270	27
			3704	6319	632		82	192	19
			58	5587	559		69	287	29
			82	7705	771		65	242	24
			1971				62		
			2025				83		
	10 ⁻⁶		52	107	11				
			39	114	11				
			63	116	12				
			50	125	13				
			8674						
			9206						
	10 ⁻⁷		44	35	4				
			39	45	5				
			47	33	3				
			51	45	5				
			50						
			50						
	10 ⁻⁸		58	36	4				
			373	42	4				
			64	40	4				
			52	38	4				
			51						
			51						

Anlage 35

Tabelle 51: Messergebnisse des Zentrifugationstestes von TG-BA-N angeimpft mit *Candida parapsilosis*

Produkt	Verd.	Keim	RLU	RLU zent. Probe	RLU zentr. Probe/10	Verd.	RLU	RLU zent. Probe	RLU zentr. Probe/10
TG-BA-N	10 ⁻⁴	CP	130483	548289	54829	10 ⁻⁹	31	41	4
			177624	527950	52795		23	27	3
			63923	556031	55603		35	43	4
			73594	507572	50757		47	45	5
			147667				34		
			171755				33		
	10 ⁻⁵		13314	88121	8812	10 ⁻¹⁰	43	63	6
			13081	45416	4542		44	52	5
			4886	58915	5892		45	44	4
			5687	69505	6951		47	38	4
			3331				45		
			3694				51		
	10 ⁻⁶		136	593	59				
			115	492	49				
			191	582	58				
			231	493	49				
			139						
			196						
	10 ⁻⁷		68	125	13				
			70	164	16				
			499	141	14				
			577	160	16				
			43						
			47						
	10 ⁻⁸		37	39	4				
			31	56	6				
			40	40	4				
			53	35	4				
			33						
			38						

Anlage 36

Tabelle 52: Messergebnisse des Zentrifugationstestes von hc-AFAC-S angeimpft mit *Saccharomyces cerevisiae*

Produkt	Verd.	Keim	RLU	RLU zentr. Probe	RLU zentr. Probe/10	Verd.	RLU	RLU zentr. Probe	RLU zentr. Probe/10
hc-AF-AC-S	10 ⁻⁴	SC	63	231766	23177	10 ⁻⁹	42	50	5
			1056	208153	20815		35	40	4
			167				36		
			399				33		
			420				36		
			736				48		
	10 ⁻⁵		323	5771	577	10 ⁻¹⁰	41	47	5
			445	5965	597		27	41	4
			132				40		
			282				45		
			516				45		
			435				38		
	10 ⁻⁶		87	52	5				
			97	42	4				
			35						
			51						
			48						
63									
	10 ⁻⁷		35	48	5				
			58	48	5				
			51						
			44						
			43						
45									
	10 ⁻⁸		41	44	4				
			39	42	4				
			22						
			28						
			34						
44									

Anlage 37

Tabelle 53: Messergebnisse des Zentrifugationstestes von hc-OR-S angeimpft mit *Saccharomyces cerevisiae*

Produkt	Verd.	Keim	RLU	RLU zentr. Probe	RLU zentr. Probe/10	Verd.	RLU	RLU zentr. Probe	RLU zentr. Probe/10
hc-OR-S	10 ⁻⁴	SC	5201	167947	16795	10 ⁻⁹	113	101	10
			5486	163982	16398		118	93	9
			5672				116		
			8018				113		
			6142				130		
			6780				4197		
	10 ⁻⁵		695	19887	1989	10 ⁻¹⁰	97	99	10
			721	19196	1920		127	85	9
			543				130		
			687				148		
			892				121		
			69172				127		
	10 ⁻⁶		169	1798	180				
			202	1839	184				
			165						
			208						
			169						
			200						
	10 ⁻⁷		155	261	26				
			137	330	33				
			125						
			127						
			121						
			128						
	10 ⁻⁸		107	336	34				
			129	340	34				
			125						
			132						
			116						
			126						

Anlage 38

Tabelle 54: Messergebnisse des Zentrifugationstestes von TG-PG-N angeimpft mit *Saccharomyces cerevisiae*

Produkt	Verd.	Keim	RLU	RLU zentr. Probe	RLU zentr. Probe/10	Verd.	RLU	RLU zentr. Probe	RLU zentr. Probe/10
TG-PG-N	10 ⁻⁴	SC	21230	129465	12947	10 ⁻⁹	67	41	4
			20401	152300	15230		61	48	5
			20616				52		
			23114				60		
			18953				66		
			21259				83		
	10 ⁻⁵		2359	64	6	10 ⁻¹⁰	70	41	4
			2645	1588	159		73	43	4
			2459				2924		
			2550				68		
			2471				488		
			2560				62		
	10 ⁻⁶		482	5474	547				
			526	5244	524				
			282						
			351						
			493						
			528						
	10 ⁻⁷		122	84	8				
			103	72	7				
			158						
			112						
			136						
			96						
	10 ⁻⁸		64	42	4				
			43	40	4				
			66						
			58						
			52						
			49						

Anlage 39

Tabelle 55: Messergebnisse des Zentrifugationstestes von TG-BA-N angeimpft mit *Saccharomyces cerevisiae*

Produkt	Verd.	Keim	RLU	RLU zentr. Probe	RLU zentr. Probe/10	Verd.	RLU	RLU zentr. Probe	RLU zentr. Probe/10
TG-PG-N	10 ⁻⁴	SC	30987	12578	1258	10 ⁻⁹	47	44	4
			47444	26826	2683		59	32	3
			19709				46		
			30592				41		
			17267				59		
			24072				56		
	10 ⁻⁵		4821	11834	1183	10 ⁻¹⁰	49	39	4
			6432	11197	1120		53	44	4
			5008				55		
			4313				53		
			2446				45		
			3852				48		
	10 ⁻⁶		792	1458	146				
			881	1265	127				
			651						
			738						
			958						
			1036						
	10 ⁻⁷		68	51	5				
			87	31	3				
			111						
			176						
			87						
			87						
	10 ⁻⁸		49	75	8				
			62	31	3				
			78						
			66						
			44						
			51						

Erklärung über die selbstständige Anfertigung der Arbeit

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ort, Datum

Unterschrift