

Vergleich zweier Nährmedien für die Keimzahlbestimmung von Bifidobakterien in Sauermilchprodukten

Autor(en): **Grand, Marius / Schilliger, Crescentia / Fuchs, Georges-Henri**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchungen und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **97 (2006)**

Heft 2-3

PDF erstellt am: **13.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982024>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Vergleich zweier Nährmedien für die Keimzahlbestimmung von Bifidobakterien in Sauermilchprodukten

Marius Grand¹, Crescentia Schilliger², Georges-Henri Fuchs³, Peter Kradolfer⁴

¹Bundesamt für Gesundheit (BAG), 3003 Bern

²Kantonales Laboratorium, 6002 Luzern

³Estavayer Lait SA (ELSA), 1470 Estavayer-le-Lac

⁴Swiss Quality Testing Services (SQTS), 1784 Courtepin

Eingegangen am 30. August 2005, akzeptiert am 23. Februar 2005

Einleitung

Das Ziel dieser Arbeit war die Evaluation von zwei Nährmedien für die Keimzahlbestimmung von Bifidobakterien in probiotischen Sauermilchprodukten einer grossen Molkerei. Der Zusatz von probiotischen Keimen in Sauermilchprodukten hat sich schon seit langem etabliert. Die Keimzahlbestimmung bei solchen Keimen ist aber problematisch, weil von Stamm zu Stamm unterschiedliche physiologische Bedürfnisse bestehen und darum keine geeigneten horizontalen Nachweismethoden zur Verfügung stehen (1, 2). In der Schweiz sind *Bifidobacterium lactis* und *Bifidobacterium animalis* die am häufigsten eingestezt Stämme in Sauermilchprodukten (3). Da die schweizerische Verordnung des EDI über Lebensmittel tierischer Herkunft (817.022.108, Art. 35) einen Mindestgehalt an Bifidobakterien von 1 Million kolonienbildenden Einheiten pro Gramm Produkt vorschreibt, besteht schon lange das Bedürfnis nach einer entsprechenden Nachweismethode für die amtliche Lebensmittelkontrolle (4).

Zur Evaluation einer geeigneten Methode, haben vier Laboratorien, die Lebensmittelmikrobiologische Untersuchungen betreiben, eine Vergleichsstudie durchgeführt, wobei in bestimmten Sauermilchprodukten der Gehalt an Bifidobakterien mittels zweier Selektivnährmedien bestimmt wurde. Die Analysen wurden im frischen Produkt und im Produkt nach einer Lagerung von einem Monat bei 6°C durchgeführt. Die Auswertung der Resultate erfolgte mittels Varianzanalyse.

Material und Methode

Probenplan

Von einer Produktecharge, wurden je 40 Proben probiotischer Sauermilch «Classic» und 40 Proben probiotischer Sauermilch «Mango» entnommen. Jedes Labor erhielt zuerst 5 frische Proben «Classic» und 5 frische Proben «Mango». Jede Probe wurde einmal untersucht. Das selbe Vorgehen wurde am Ende der Lagerungszeit (Proben 4 Wochen bei 6 °C beim Hersteller) wiederholt.

Analyse

Die quantitative Bestimmung erfolgte auf:

- a) Wilkins-Chalgren Agar (WCA OXOID CM 619) supplementiert mit 100 mg/l Mupirocin (GlaxoSmithKline BRL 4910) (5).
- b) Bifidus Selective Medium Agar (BSM Agar Fluka 88517) supplementiert mit 116 mg/l BSM-Supplement (Fluka 83055).

Jede Probe (10 g) wurde in 90 ml physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Davon ausgehend wurden in dekadischen Stufen weitere Verdünnungen erstellt. Anschliessend wurden je 0,1 ml der 10^{-5} bis 10^{-7} Verdünnung auf dem Nährmedium ausgespatelt.

Die Bebrütung erfolgte anaerob bei 37 °C während 4 Tagen. Als präsumtiv wurden Kolonien mit folgenden Eigenschaften bewertet: a) trüb-milchig mit einem Durchmesser von 1 bis 1,5 mm auf dem Wilkins-Chalgren Agar und b) violett-braun von derselben Grösse auf dem BSM Agar.

Zur Bestätigung wurde Zellmaterial präsumtiver Kolonien im Phasenkontrast Verfahren mikroskopiert. Bifidobakterien sind polymorphe Stäbchen und unbeweglich. Des weiteren wurde 10 prozentige, rekonstituierte Magermilch beimpft. Die so beimpfte Milch wurde während 48 Std bei 37 °C bebrütet. Bifidobakterien wachsen unter diesen Bedingungen nicht und es entsteht keine Gerinnung der Milch. Als Kontrolle wurde der Stamm *Bifidobacterium lactis* Bb 12-CHR-Hansen verwendet.

Auswertung

Die Ermittlung und Angabe der Resultate erfolgte nach Vorgaben im Kapitel 56 «Mikrobiologie» des Schweizerischen Lebensmittelbuches. Zur Auswertung wurden Platten mit einer Belegungsdichte zwischen 10 und 300 Kolonien berücksichtigt (6).

Für die statistische Bewertung wurden die logarithmierten (\log_{10}) Keimzahl-Ergebnisse mit der vierfach Varianzanalyse mit sämtlichen Mehrfachinteraktionen (ANOVA-SYSTAT) verglichen sowie der Mittelwert (\bar{x}) und die Standardabweichung (s) berechnet.

Tabelle 1

Log Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen (s) der quantitativen Bestimmungen von Bifidobakterien in zwei Sauermilchprodukten («Classic» und «Mango») frisch und nach 4 Wochen Lagerung bei 6 °C

Produkt	Labor 1		Labor 2		Labor 3		Labor 4	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
Classic frisch WCA	7,84	0,050	7,63	0,137	7,68	0,079	7,65	0,152
Classic frisch BSM	7,81	0,059	7,46	0,112	7,69	0,052	7,67	0,025
Classic gelagert WCA	7,63	0,233	7,42	0,093	7,67	0,039	6,93	0,196
Classic gelagert BSM	7,69	0,109	7,30	0,134	7,53	0,090	7,31	0,122
Mango frisch WCA	7,67	0,115	7,55	0,093	7,65	0,115	7,47	0,039
Mango frisch BSM	7,66	0,108	7,48	0,079	7,59	0,097	7,47	0,135
Mango gelagert WCA	7,55	0,076	7,14	0,142	7,60	0,085	6,65	0,152
Mango gelagert BSM	7,46	0,057	7,00	0,206	7,46	0,130	7,19	0,051

Resultate und Diskussion

Mit einer Ausnahme lagen die Mittelwerte für die frischen und gelagerten Produkte in jedem Labor über 10^7 KBE/g (Labor 4 ermittelte für «Mango» gelagert, einen Wert von 10^6 KBE/g). Nach der Lagerung war eine Abnahme an Bifidobakterien erkennbar. Die Werte lagen jedoch immer noch weit über der gesetzlich erforderlichen Keimzahl von 10^6 KBE/g.

Der Variationskoeffizient (R^2 : 0,860) zeigte einen hohen Adaptationsgrad zwischen dem ANOVA-Test und den erzielten Resultaten. Ein p-value $\geq 0,05$ bedeutet, dass die betreffende Variable keinen Einfluss auf die Keimzahlergebnisse hat.

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, fanden wir einen signifikanten Unterschied in der Bifidobakterienkonzentration zwischen den Proben «Classic» und «Mango». Zudem wichen auch die Resultate der Laboratorien deutlich voneinander ab. Schliesslich waren auch zwischen den frisch und gelagerten Proben signifikante Unterschiede sichtbar.

Hingegen, und das ist bemerkenswert, lieferten beide Nährmedien vergleichbare Resultate.

Tabelle 2

Auswertung des Versuches mittels vierfach Varianzanalyse (ANOVA)

Source	Sum of Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
Nährmedium (WCA/BSM)	0,000	1	0,000	0,001	0,976
Probe (Classic/Mango)	0,848	1	0,848	62,229	0,000
Zeit (Produkt frisch/gelagert)	3,079	1	3,079	225,991	0,000
Labor (n=4)	3,877	3	1,292	94,860	0,000

R^2 : 0,860

Die Selektivität war für beide Nährmedien gut. Eine Begleitflora, insbesondere Streptokokken, war nicht zu finden und das Ablesen der Kolonien unproblema-

tisch. Auf dem BSM Agar bildeten die Bifidobakterien violett-braune Kolonien, was das Auszählen sehr bequem machte. Diese beiden verglichenen Nährmedien können darum für die Keimzahlbestimmung von Bifidobakterien in den entsprechenden Sauermilchprodukten empfohlen werden.

Zur Ermittlung von Parametern wie Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit wäre eine grössere Anzahl Labors (≥ 8) notwendig gewesen (7).

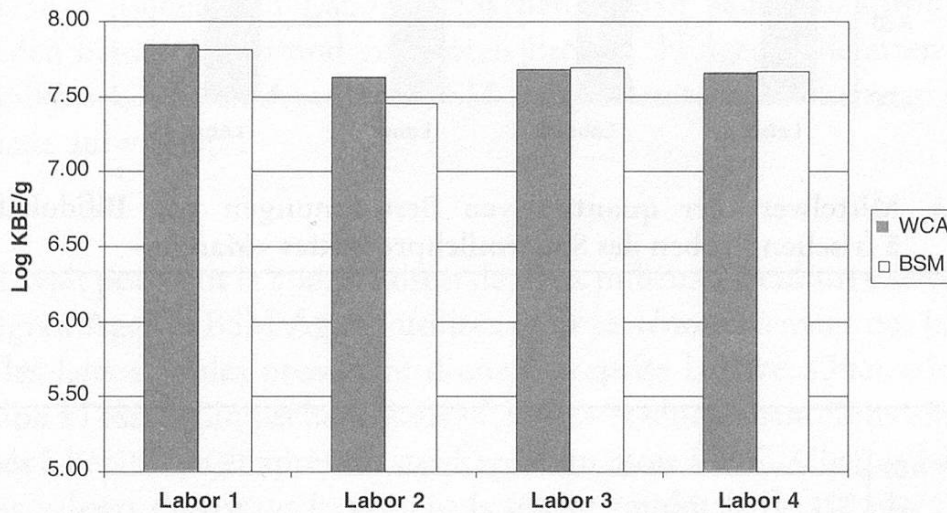


Abbildung 1 Mittelwert der quantitativen Bestimmungen von Bifidobakterien in 5 frischen Proben des Sauermilchproduktes «Classic»

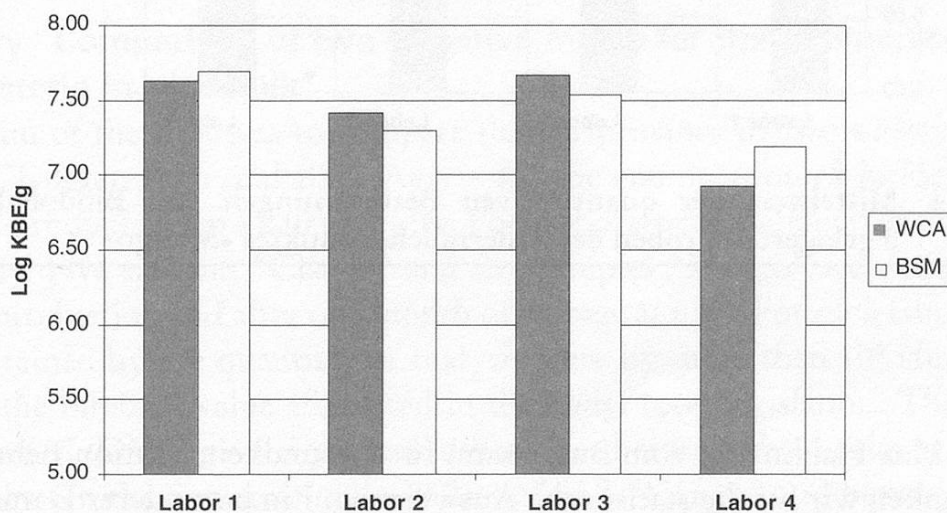


Abbildung 2 Mittelwert der quantitativen Bestimmungen von Bifidobakterien in 5 gelagerten Proben des Sauermilchproduktes «Classic»

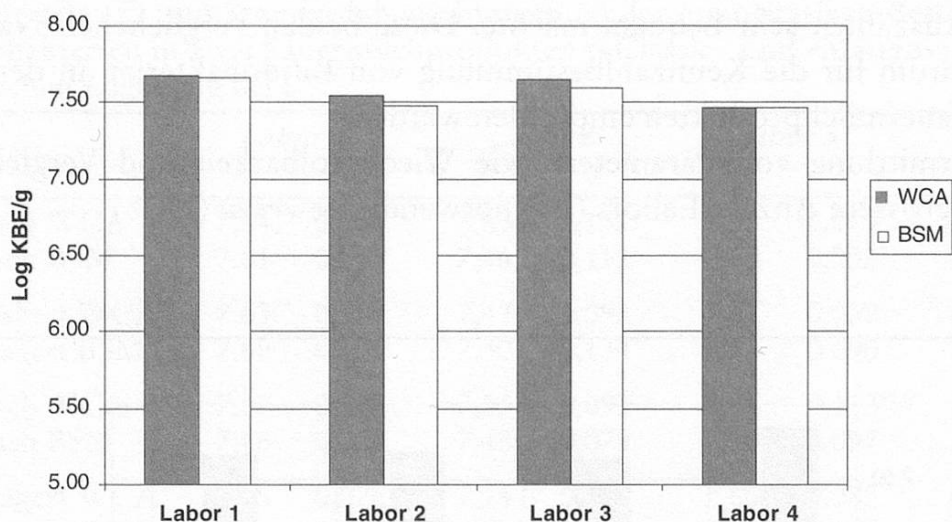


Abbildung 3 Mittelwert der quantitativen Bestimmungen von Bifidobakterien in 5 frischen Proben des Sauermilchproduktes «Mango»

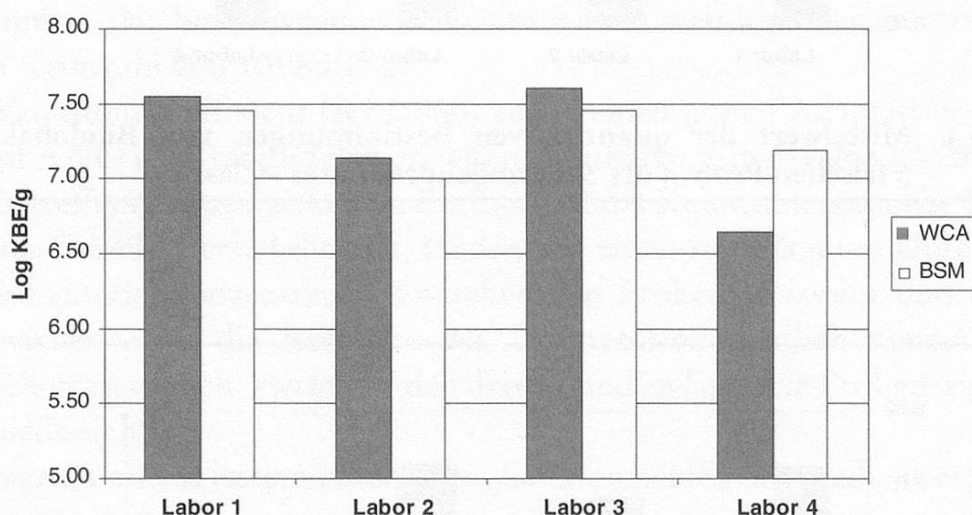


Abbildung 4 Mittelwert der quantitativen Bestimmungen von Bifidobakterien in 5 gelagerten Proben des Sauermilchproduktes «Mango»

Dank

Herrn Max Haldimann vom Bundesamt für Gesundheit, Sektion Lebensmittelchemie, danken wir für die statistische Auswertung. Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Andreas Baumgartner für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Zusammenfassung

In dem vorliegenden Versuch wurden zwei selektive Nährmedien – Wilkins-Chalgren Agar und BSM Agar – für die Keimzahlbestimmung von Bifidobakterien in Sauermilchprodukten einer Molkerei verglichen. Vier Laboratorien waren an dem Versuch beteiligt. Fünf Proben «Classic» Sauermilch und fünf Proben «Mango» Sauermilch wurden unmittelbar nach der Produktion und nach einem Monat Lagerung bei 6 °C untersucht. Für jedes Labor lag der Bifidobakteriengehalt weit über dem in der Schweizerischen Lebensmittelgesetzgebung festgelegten Mindestgehalt von 10^6 KBE/g. Die statistische Evaluation (ANOVA) ergab signifikante Unterschiede zwischen den Labors, zwischen beiden Sauermilchprodukten und zwischen den beiden frisch und gelagerten Proben. Hingegen lieferten die Nährmedien Wilkins-Chalgren Agar und BSM Agar Resultate, die keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.

Résumé

L'essai avait pour but la comparaison de deux milieux de cultures sélectifs – Wilkins-Chalgren Agar et BSM Agar – utilisés pour le dénombrement des bifidobactéries dans les laits acidulés provenant d'une entreprise laitière. Quatre laboratoires ont participé à l'essai. Cinq échantillons «Classic» et cinq échantillons «Mango» ont été analysés à l'état frais et après un stockage d'un mois à 6 °C. Chaque laboratoire a obtenu des valeurs dépassant largement la teneur minimale de 10^6 ufc/g de bifidobactéries fixée par la législation alimentaire suisse. L'évaluation statistique (ANOVA) des résultats a permis de démontrer que les résultats obtenus diffèrent significativement entre chaque laboratoire, de même il y a une différence significative entre les produits Classic et Mango et entre les échantillons frais et stockés. Par contre, les milieux Wilkins-Chalgren Agar et BSM Agar livrent des résultats semblables, dont les différences ne sont pas significatives.

Summary "Comparison of two selective media for the enumeration of bifidobacteria in sour milk"

The aim of the trial was to compare the performance of two selective media – Wilkins-Chalgren Agar and BSM Agar – for the enumeration of bifidobacteria in sour milk products from a dairy factory. Four laboratories took part at this comparative study. Five samples "Classic" and five samples "Mango" were analysed first after the production and after one month of storage at 6 °C. For each laboratory, the values obtained by the quantitative analysis were by more than 10^6 cfu/g product which is the minimal value stipulated in the Swiss food legislation. The statistical evaluation (ANOVA) gave significant differences between the results of each laboratory, between the two sour milks "Classic" and "Mango" and between the samples which were fresh analysed and after a storage of one month at 6 °C. Whereas, the two media Wilkins-Chalgren Agar and BSM Agar gave similar results without any significant difference.

Key words

Bifidobacteria, quantification, sour milk, media, comparison

Literatur

- 1 Mikkelsen L.L., Bendixen C., Jakobsen M. and Jensen B.B.: Enumeration of bifidobacteria in gastrointestinal samples from piglets. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 654–658 (2003)
- 2 Rada V. and Petr J.: A new selective medium for the isolation of glucose non-fermenting bifidobacteria from the caeca. *J. Microbiol. Methods* **43** (2000)
- 3 Grand M., Küffer M. and Baumgartner A.: Quantitative analysis and molecular identification of bifidobacteria strains in probiotic milk products. *Eur. Food Res. Technol.* **217**, 90–92 (2003)
- 4 Eidgenössisches Departement des Innern: Verordnung des EDI über Lebensmittel tierischer Herkunft vom 23. November 2005 (817.022.108)
- 5 Rada V. and Koc J.: The use of mupirocin for selective enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. *Milchwissenschaft.* **55**, 65–67 (2000)
- 6 Bundesamt für Gesundheit: Schweizerisches Lebensmittelbuch (SLMB): Kapitel 56, «Mikrobiologie» Neuauflage 2000, Stand 2004
- 7 IUPAC: Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure & Appl. Chem.* **67**, No. 2, 331–343 (1995)

Korrespondenzadresse: Dr. Marius Grand, Bundesamt für Gesundheit,
Abteilung Lebensmittelrecht, 3003 Bern, E-Mail: marius.grand@bag.admin.ch