

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Fakultät Life Sciences

Validierung von Nährmedien für Plattengussverfahren gemäß DIN EN ISO 11133

Bachelorarbeit
Ökotoxikologie

vorgelegt von

Laura Katharina, Beer



Hamburg

am 21. August 2020

Gutachter: Prof. Dr. med. vet. Katharina Riehn (HAW Hamburg)

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Michael Häusler (HAW Hamburg)

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor der Firma:
Eurofins Bio Testing Services Nord GmbH

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	IV
Danksagung	IV
Zusammenfassung.....	V
Abstract	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
Abbildungsverzeichnis.....	X
Tabellenverzeichnis.....	XI
1. Einleitung.....	1
1.1 Relevanz von mikrobiologischen Routinelaboren.....	1
1.2 Die Eurofins Bio Testing Services Nord GmbH	2
1.3 Hypothese	3
1.4 Erläuterung der Methode	3
2. Literaturübersicht.....	5
2.1 Definition Validierung	5
2.2 Der Nutzen von Validierungen	6
2.3 Der Validierungsprozess.....	6
2.4 Der Stellenwert von Validierungen im Kontext des internen Qualitätsmanagements.....	7
2.5 Allgemeingültige Leitlinien für die Durchführung von Validierungen.....	8
2.6 Die Bedeutung von Nährmedien bei der lebensmittelmikrobiologischen Arbeit.....	8
2.6.1 Definition Nährmedien.....	8
2.6.2 Historische Einordnung von Nährmedien	9
2.7 Anreicherungsverfahren	10
2.7.1 Flüssige Nährmedien	10
2.7.2 Feste Nährmedien	10
2.7.3 Feste Selektivnährmedien.....	11
3. Material und Methodik	11
3.1 Definition die für die Leistungsprüfung der Nährmedien gewählte Methode des Plattengussverfahren	11
3.2 Flussdiagramm zur Übersicht des durchgeführten Validierungsprozesses gemäß DIN EN ISO 11133:2015-02.....	12
3.3 Verwendete Mikroorganismen	13
3.3.1 Familie der Enterobacteriaceae	13

3.3.2	Familie der Enterococcaceae	13
3.3.3	Familie der Pseudomonadaceae	13
3.3.4	Familie der Lactobacillaceae	14
3.3.5	Familie der Streptococcaceae	15
3.3.6	Familie der Saccharomycetaceae.....	15
3.3.7	Familie der Trichocomaceae	15
3.3.8	Familie der Wallemiaceae	16
3.4	Verwendete Nährmedien.....	17
3.4.1	Beschreibung der verwendeten Nährböden.....	17
3.4.2	Leistungskontrolle für alle untersuchten Nährmedien	19
3.4.3	Zusammensetzung und Herstellung für alle untersuchten Nährmedien.....	19
3.4.4	Beschreibung der verwendeten Referenznährböden.....	19
3.4.5	Beschreibung der verwendeten Boullions	20
3.5	Probenvorbereitung und Herstellen der Zellkulturen für Coliforme und Enterobacteriaceae	21
3.5.1	Beimpfen und Inkubieren.....	21
3.5.2	Einstellen des Zelltiters	22
3.5.3	Das Arbeiten mit Zählkammern	22
3.5.4	Berechnung des Zelltiters für 50-150 Kolonien auf der Platte.....	24
3.5.5	Überführen der 200 ml Zellsuspension in Cryoröhrchen.....	25
3.5.6	Ermitteln der Lebendzellzahl.....	25
3.6	Probenvorbereitung und Herstellen der Zellkulturen für Milchsäurebakterien.....	26
3.7	Probenvorbereitung und Herstellen der Zellkulturen für Hefen und Schimmelpilze	26
3.8	Messmethodik/Analytik	27
3.8.1	Durchführung des Plattengussverfahrens im Rahmen eines Produktivitätsnachweises für Nährmedien:.....	27
3.8.2	Beschriebene Vorgehensweise angewendet auf die durchgeführten Untersuchungen des Aufschmelzprozesses und der Untersuchung der Routineprüfung.....	31
3.9	Auswertung und Datenanalyse sowie Erstellung der Regelkarten	35
3.9.1	Auszählen und Bestimmen der Koloniezahl jeder Platte	35
3.9.2	Erstellung einer Regelkarte	36
3.9.3	Beispielberechnung zur Erstellung einer Regelkarte unter der Verwendung von 20 aufeinanderfolgenden Ergebnissen	37
4.	Ergebnisse	39
4.1	Routinebegleitende Leistungsprüfung von 500 ml TBX Agar-Flaschen über einen Zeitraum von maximal 34 Stunden	40

4.2	Routinebegleitende Leistungsprüfung von 500 ml Oxoid VRBD Agar-Flaschen über einen Zeitraum von maximal 34 Stunden	43
4.3	Routinebegleitende Leistungsprüfung von 250 ml YGC Agar-Flaschen über einen Zeitraum von maximal 34 Stunden	52
4.4	Routinebegleitende Leistungsprüfung von 250 ml MRS Agar-Flaschen über einen Zeitraum von maximal 34 Stunden	61
5.	Diskussion.....	68
5.1.	Stabilitätsunterschiede- und Gemeinsamkeiten der Prüfnährmedien während der Variation der Aufschmelzprozesse.....	68
5.2.	TBX-Leistungsnachweis Interpretation der Ergebnisse.....	69
5.3.	VRBD-Leistungsnachweis Interpretation der Ergebnisse.....	71
5.4.	VRBL-Leistungsnachweis Interpretation der Ergebnisse.....	74
5.5.	YGC-Leistungsnachweis Interpretation der Ergebnisse	75
5.6.	MRS-Leistungsnachweis Interpretation der Ergebnisse	77
5.7.	Allgemeine Feststellungen	79
5.8.	Erwartungen.....	80
5.9.	Beschränkung der Forschung	80
5.10.	Kritik an der Methode	81
5.11.	Validität der Ergebnisse.....	81
5.12.	Empfehlung für weiterführende Forschung und Zukunftsausblick.....	81
6.	Fazit	82
	Literaturverzeichnis.....	83
	Anhang A- Ergebnisse.....	89
	Inhaltsverzeichnis.....	89
	Abbildungsverzeichnis.....	90
	Tabellenverzeichnis.....	94
	Ergebnisse zu den Aufschmelzprozessen TBX.....	98
	Anhang I: Tabellen zur Leistungsprüfung verwendeter Nährmedien	177
	Anhang II: Der Validierungsprozess	183
	Anhang III: Verwendete Zielkeime	184
	Anhang IV: Zusammensetzung und Herstellung der validierten Nährmedien	189
	Anhang V: Probenvorbereitung und Herstellen der Zellkulturen- Beispielrechnung	196
	Anhang VI	198
	Anhang VII	201
	Anhang VIII Verwendetes Labormaterial	205

Vorwort

Die Datenerhebung zur Validierung der Nährmedien wurde im Mai 2018 mit der zu diesem Zeitpunkt gültigen DIN EN ISO 11133:2015-02 durchgeführt.

Nach Abschluss der Datenerfassung im Laboratorium wurde die DIN EN ISO 11133:2015-02 durch die DIN EN ISO 11133: 2018-07 ersetzt.

Die Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit der Eurofins Bio Testing Services Nord GmbH verfasst. Die in 2015 neu eingeführten Regelungen der überarbeiteten Fassung der DIN EN ISO 11133 stellen für die Routine Laboratorien eine zusätzliche Herausforderung dar. So müssen zum Beispiel Nährmedien, die für quantitative Untersuchungen bestimmt sind immer auch einer quantitativen Überprüfung unterzogen werden. Es ist erforderlich detailliertere Angaben zur Art der Überprüfung und den verwendeten Teststämmen sowie der Methodik zu machen. Dies führt neben der täglichen Routinearbeit zu einer zusätzlichen Belastung für die Laboratorien. Um die Mindestanforderungen in mikrobiologischen Laboratorien zu dem Thema der Nährmedienüberprüfung bestmöglich einzuhalten, spricht der Arbeitskreis der auf dem Gebiet der Lebensmittelhygiene und der Lebensmittel tierischer Herkunft tätigen Sachverständigen (ALTS) zur DIN EN ISO 11133-2015-02 zusätzliche Empfehlungen aus.

Für die vorliegende Bachelor Arbeit hat die Durchführung der Leistungsprüfung für Nährmedien gemäß DIN EN ISO 11133-2015-02 die höchste Priorität.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei der gesamten Eurofins Bio Testing Services Nord GmbH bedanken, die dazu beigetragen hat, diese Bachelorarbeit zu ermöglichen. Mein äußerster Dank gebührt Dr. Gabriele Daum, der Laborleitung und Nicole Illas aus der Abteilung Qualitätssicherung. Beide übernahmen während meiner Eurofins-Zeit die Betreuung der Bachelorarbeit und brachten in meiner Einarbeitung neben ihrem eigenen Tagesgeschäft zusätzlich viel Zeit und Energie für mich auf. Felix Walter, Business Unit Manager danke ich für die vielen Anregungen, Vorschläge und Ideen, die mir fachlich und persönlich weiterhalfen. Ein besonderer Dank gilt Dr. Tanja Janschik, Marketing Leitung bei der Eurofins NDSC Food Testing Germany GmbH. Sie ermöglichte nach Beendigung meines 6-monatigen Pflichtpraktiums im Zentralen Marketing die Bacheloranden Stelle bei den Kollegen der Eurofins Bio Testing Services Nord GmbH.

Zusammenfassung

Die Produktivitätsausprägung der untersuchten Kulturmedien TBX und VRBL steht in keiner Abhängigkeit zu der Art des Aufschmelzprozesses.

VRBD, YGC und MRS deuten bei einem Agar-Volumen von 250 ml auf produktivitätssteigernde Merkmale hin sofern bei einer Anfangstemperatur von 95°C aufgeschmolzen wird.

Drei der fünf validierten Nährmedien (TBX, VRBL, VRBD (Oxoid)) dokumentierten nach dem Aufschmelzprozess (DIN EN ISO 11133) und der darauffolgenden Lagerung im Trockenschrank bei 47°C einen exzellenten Leistungsnachweis bis zu maximal 34 Stunden. Die gemäß DIN EN ISO 11133 vorgegeben Maximalagerdauer (4 Stunden) im Trockenschrank konnte durch die laborinterne Datenerhebung ohne Unterschreitung der Produktivität ($P_R > 0,5$) der drei Medien deutlich überschritten werden.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Untersuchungen kann bei Verwendung der folgenden Agar, getestet mit einem Volumen von 500 ml:

- TBX, $\bar{P}_R = 0,87$ des Zielkeims *E.Coli*
- VRBD (Oxoid), $\bar{P}_R = 1$ des Zielkeims *E.Coli*, $\bar{P}_R = 0,91$ des Zielkeims *E.aerogenes*, $\bar{P}_R = 0,81$ des Zielkeims *S.enterica*, $\bar{P}_R = 0,93$ des Zielkeims *C.freundii*

sowie

- VRBL, $\bar{P}_R = 0,83$ des Zielkeims *E.Coli*, einem $\bar{P}_R = 0,76$ des Zielkeims *E.aerogenes* und einem $\bar{P}_R = 0,81$ des Zielkeims *C.freundii*, getestet mit einem Volumen von 250 ml

die DIN EN ISO 11133 bezüglich der Lagerdauer dieser Nährmedien angepasst werden.

Für die Eurofins Bio Testing Services Nord GmbH bedeutet dies im Einzelnen, dass die Laboranten TBX, VRBD und VRBL über zwei Routinetage, beginnend nach dem Aufschmelzprozess der Agar-Flaschen an Versuchstag eins nach Feierabend im Trockenschrank lagern- und am nächsten Tag weiterhin gießen dürfen.

YGC verhält sich ähnlich wie TBX, VRBD und VRBL wobei aufgrund seiner Produktivität der Agar bereits nach neun Stunden Lagerung im Trockenschrank verbraucht sein muss. Die \bar{P}_R -Werte für den ersten Versuchstag belaufen sich für *S.cerevisiae* auf $\bar{P}_R = 0,73$, für *A.braziliensis* auf $\bar{P}_R = 0,81$, für *C.albicans* auf $\bar{P}_R = 0,57$ und für *W.sebi* auf $\bar{P}_R = 0,99$. Dies stellt dennoch ein hervorragendes Ergebnis dar, welches den in DIN EN ISO 11133 angegebenen Wert für die Lagerungsdauer um 5 Stunden überschreitet.

Für MRS gilt im Gegensatz zu den anderen Nährmedien eine deutlich höher einzuhaltende Produktivitätsvorgabe für *P.pentosaceus* von $P_R > 0,8$ und für *L.sakei* sowie *L.lactis* von $P_R > 0,7$. Nach den daraus ungenügend resultierenden Produktivitätsverhältnissen muss die Vorgabe für die Lagerdauer gemäß DIN EN ISO 11133 eingehalten und streng genommen sogar verkürzt werden.

Abstract

There is no correlation between productivity and melting process of the tested culture mediums TBX and VBRL.

VRBD, YGC and MRS show an increased productivity at an initial melting temperature of 95 °C, when 250 ml Agar bottles are used.

Three (TBX, VRBL, VRBD (Oxoid)) out of five validated nutrient media displayed an excellent performance up to 30 hours after the melting process (DIN EN ISO 11133) and the subsequent storage in a drying cabinet at 47 °C. The maximum retention time of 4 hours in the oven according to DIN EN ISO 11133 was significantly exceeded for the determination of the productivity values ($P_R > 0,5$).

Based on the test results and when using the following agars, tested with a volume of 500 ml,

- TBX, $\bar{P}_R = 0,87$ of target organism *E.Coli*
- VRBD, $\bar{P}_R = 1$ of target organism *E.Coli*, $\bar{P}_R = 0,91$ of target organism *E.aerogenes*, $\bar{P}_R = 0,81$ of target organism *S.enterica*, $\bar{P}_R = 0,93$ of target organism *C.freundii*

and

- VRBL, $\bar{P}_R = 0,83$ of target organism *E.Coli*, $\bar{P}_R = 0,76$ of target organism *E.aerogenes* and $\bar{P}_R = 0,81$ of target organism *C.freundii*, tested with a Volume of 250 ml

DIN EN ISO 11133 can be adapted with regards to retention time of these nutrient media.

This means for Eurofins Bio Testing Services Nord GmbH that TBX, VRBD und VRBL can be used for two days by the laboratory technicians starting on day 1 with the melting process and pouring of the nutrient media. On day 2 the pouring of the nutrient media can continue.

YGC reacts pretty much like TBX, VRBD and VRBL however, based on its productivity it needs to be used up already after nine hours retention time in the drying cabinet. The \bar{P}_R -value for testing day one for *S.cerevisiae* is $\bar{P}_R = 0,73$, for *A.braziliensis* it is $\bar{P}_R = 0,81$, for *C.albicans* it is $\bar{P}_R = 0,57$ and for *W.sebi* it is $\bar{P}_R = 0,99$. Nevertheless this is an excellent result as the retention time according to DIN EN ISO 11133 can be exceeded by 5 hours.

In contrast to TBX, VRBD and VRBL the nutrient medium YGC requires a significantly higher productivity for *P.pentosaceus* ($P_R > 0,8$) and *L.sakei* as well as *L.lactis* ($P_R > 0,7$). The test results in this study confirm the maximum retention time according to DIN EN ISO 11133 must not be exceeded. Strictly speaking the test results suggest a reduction of the maximum retention time.

Abkürzungsverzeichnis

ALTS	Arbeitskreis der auf dem Gebiet der Lebensmittelhygiene und der Lebensmittel tierischer Herkunft tätigen Sachverständigen
ASM	Society of Microbiology
ASTM	American Society for Testing and Materials
BAM	Bacteriological Analytical Manual
CASO	Casein-Soja-Pepton-Agar
CE	Communauté Européenne
DG18	Dichloran-Glycerin-Agar
DIN	Deutsches Institut für Normung
EG	Europäische Gemeinschaft
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
FDA	Food and Drug Administration
FSIS	Food Safety and Inspection Service
GKZ	Gesamtkeimzahl
GMP	Good Manufacturing Practise
ISO	Internationale Organisation für Normung
IVD	In-vitro Diagnostika
KBE	Koloniebildende Einheit
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittel Gesetzbuch
ml	Mililiter
MRS	deMan, Rogosa und Sharp
NaCl	Natrium Chlorid
P _R	Produktivitätsverhältnis
QM	Qualitätsmanagement
QMS	Qualitätsmanagementsystem
QS	Qualitätssicherung
SDA	Sabouraud-Dextrose Agar
TBX	Trypton-Galle-X-Glucuronid-Agar
TCBS	Thiosulfat-Citrat-Galle-Saccharose-Agar
TSA	Trypton-Soja-Agar
TSB	Tryptonsojabrühe
USDA	U.S. Department of Agriculture

VRBD	Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar
VRBL	Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Lactose-Agar
WB	Wasserbad
YGC	Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Agar
μl	Mikroliter

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema zur Gesamtübersicht der Methode für relevante Bakteriengruppen und durchgeführte Teiluntersuchungen	12
Abbildung 2: Schematisch selbst konstruierte Zählkammer.....	22
Abbildung 3: schematisch selbst konstruiertes Zählnetz mit verschiedenen Ebenen.....	23
Abbildung 4: Schematisch selbst konstruiertes mittleres Großquadrat mit diagonal liegenden Gruppenquadraten.....	24
Abbildung 5: Stapelsystem vor dem Ansetzen der Petrischalen	29
Abbildung 6: Stapelsystem der angesetzten Petrischalen vor dem Gießen	30
Abbildung 7: Regelkarte Produktivitätsverhältnis E.Coli auf TBX 500 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h	42
Abbildung 8: Regelkarte Produktivitätsverhältnis E.Coli auf VRBD 500 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h	45
Abbildung 9: Regelkarte Produktivitätsverhältnis E.aerogenes auf VRBD 500 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h	47
Abbildung 10: Regelkarte Produktivitätsverhältnis S.enterica auf VRBD 500 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h	49
Abbildung 11: Regelkarte Produktivitätsverhältnis C.freundii VRBD 500 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h	51
Abbildung 12: Regelkarte Produktivitätsverhältnis S.cerevisiae auf YGC 250 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h	54
Abbildung 13: Regelkarte Produktivitätsverhältnis A.braziliensis auf YGC 250 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h	56
Abbildung 14: Regelkarte Produktivitätsverhältnis C.albicans auf YGC 250 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h	58
Abbildung 15: Regelkarte Produktivitätsverhältnis W.sebi auf YGC 250 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h	60
Abbildung 16: Regelkarte Produktivitätsverhältnis P.pentosaceus auf MRS 250 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h	62
Abbildung 17: Regelkarte Produktivitätsverhältnis L.sakei auf MRS 250 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h	64
Abbildung 18: Regelkarte Produktivitätsverhältnis L.lactis auf MRS 250 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Matrix der Nährmedien mit zugehörigen Zielkeimen	17
Tabelle 2: Beispieltabelle für die Erstellung einer Regelkarte	37
Tabelle 3: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von E.Coli für TBX 500 ml beschreiben.	41
Tabelle 4: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von E.Coli für VRBD 500 ml beschreiben.	44
Tabelle 5: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von E.aerogenes für VRBD 500 ml beschreiben.....	46
Tabelle 6:18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von S.enterica für VRBD 500 ml beschreiben.	48
Tabelle 7: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von C.freundii für VRBD 500 ml beschreiben.....	50
Tabelle 8: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von S.cerevisiae für YGC 250 ml beschreiben	53
Tabelle 9: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von A.braziliensis für YGC 250 ml beschreiben.....	55
Tabelle 10: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von C.albicans für YGC 250 ml beschreiben.....	57
Tabelle 11: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von W.sebi für YGC 250 ml beschreiben.....	59
Tabelle 12: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von P.pentosaceus für MRS 250 ml beschreiben.....	61
Tabelle 13: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von L.sakei für MRS 250 ml beschreiben.	63
Tabelle 14: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von L.lactis für MRS 250 ml beschreiben.	65
Tabelle 15:Leistungsbewertung nach DIN EN ISO 11133.....	67
Tabelle 16: Zusammenhang Redoxpotential und Produktivität in Bezug auf Milchsäurebakterien	79

1. Einleitung

Nach den aktuellen vorliegenden Daten von Statista, 2019 <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/256389/umfrage/beschaefigte-in-der-deutschen-ernaehrungsindustrie/> arbeiten täglich 618.721 Beschäftigte in der Ernährungsindustrie und tragen zum Wohl von rund 80 Millionen Verbrauchern in Deutschland bei. Sie ermöglichen das Inverkehrbringen beanstandungsloser Lebensmittel, die frei von jeglicher Kontamination sein sollen (Nitsche, 2016, pp. 5-6). Dafür müssen alle Bereiche, wie Beschaffung, Verarbeitung, Veredelung und Vertrieb von Lebensmitteln einwandfrei überwacht, hygienisch kontrolliert und für alle Produktionsstätten hinreichend zertifiziert sein (Greiß, 1991, pp. 7-8). Die hohen Verbraucheransprüche an Lebensmittel und die damit verstärkt erforderliche Überprüfung der Lebensmittelsicherheit und Kontrolle, sorgen für eine immer stärker werdende Wende in allen Bereichen der Lebensmittelproduktion vom Rohstoff, bis hin zum einwandfreien Lebensmittel im Supermarktregal (Lange & Daxenberger, 2007, p. 2-6). Es können unter anderem in Produktions- oder Lieferschritten Engpässe entstehen, die Fehler verursachen und in extremen Fällen, bis hin zu Lebensmittelrückrufen vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) führen können (Hamatschek, 2016, pp. 37-39). Um dieses Risiko zu minimieren, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit einem bedeutenden Teilschritt der Lebensmittelkette. Die durchgeführten Untersuchungen unterliegen der lebensmittel-mikrobiologischen Arbeit in einem zertifizierten Prüflaboratorium. Es überprüft lebensmittelproduzierende Betriebe nach mikrobiologischen Gesichtspunkten, um festzustellen, ob die Betriebe ihre Produkte vertreiben können, ohne ein gesundheitliches Risiko für den Verbraucher darzustellen.

1.1 Relevanz von mikrobiologischen Routinelaboren

Der Verderb von Lebensmitteln ist ein grundlegend natürlicher Vorgang, der auf verschiedenen Wegen eintritt. Die häufigste Ursache ist der Verderb durch Mikroorganismen. Lebensmittel werden primär von Bakterien, Hefen oder Schimmelpilzen kontaminiert, indem sie durch Menschen, Tiere, verunreinigte Arbeitsflächen oder durch die Luft auf das Lebensmittel treffen und dort durch geeignete Umgebungsbedingungen ein enorm schnelles Wachstum erfahren. Dies führt dazu, dass Lebensmittel faulen, gären, verschimmeln oder sauer werden (Wagner, 2012, pp. 273-275).

Die mikrobiologischen Prozesse, die dabei im Lebensmittel stattfinden, bewirken das Abbauen von Lebensmittelinhaltsstoffen und die Ausscheidung von Stoffwechselprodukten. Nicht selten geht dies mit der Produktion von höchst giftigen und krankheitsverursachenden Stoffen einher

(Lück, 1995, p. 3). Neben dem mikrobiologischen Verderb von Lebensmitteln spielen zudem physikalische und biochemische Faktoren sowie der Verderb durch Schädlingsbefall eine zentrale Rolle (Menn, 2020).

Damit Verbraucher vor pathogenen Bakterien geschützt sind, werden Lebensmittel bevor sie in den freien Handel gelangen durch Prüflaboratorien auf die Anwesenheit unerwünschter Mikroorganismen getestet (Binz, 2018, p. 19).

Grundsätzlich dienen die verschiedenen Untersuchungsverfahren dem qualitativen und quantitativen Nachweis von Keimen in unterschiedlichen Matrices (Leuchtenberger, 1998, p. 99).

1.2 Die Eurofins Bio Testing Services Nord GmbH

Im mikrobiologischen Routine Prüflaboratorium der Eurofins Bio Testing Services Nord GmbH am Standort Hamburg-Harburg werden ausschließlich Lebensmittel -und Futtermittelproben sowie Heimtiernahrungsproben mithilfe der Agar Nährmedien getestet. Das Labor selbst ist zusätzlich gemäß DIN EN ISO 17025 akkreditiert.

Dem Prüflaboratorium war es bisher nicht möglich neben der Routinearbeit weitere Kapazitäten für interne Validierungen aufzubringen, weshalb das schon lang gewünschte Thema: „Validierung von Nährmedien für Plattengussverfahren gemäß DIN EN ISO 11133“ durch einen Produktivitätsnachweis, im Rahmen einer Bachelor- oder Masterarbeit durchgeführt werden sollte.

Im speziellen sollten Validierungen zu Gussnährmedien durchgeführt werden.

Die DIN EN ISO 11133 gibt für Gussnährmedien nach dem Aufschmelzprozess eine maximale Lagerdauer im Trockenschrank bei 47 ° C von 4 Stunden vor. Um herauszufinden, ob die in der DIN angegebenen Zeiten bezüglich der Lagerung der aufgeschmolzenen Agar-Flaschen im Trockenschrank überschritten werden können, ohne die Produktivität negativ zu beeinflussen, ist ein Leistungsnachweis erforderlich.

Nach Erfahrungsberichten von Mitarbeitern aus dem Bereich des Routineteams und aus dem Bereich des mikrobiologischen Labors, indem mit pathogenen Keimen gearbeitet wird sowie der Beurteilung der Laborleitung, gab es bisher keine Beeinträchtigungen bei versehentlicher Überschreitung der maximalen Lagerung der Agar-Flaschen im Trockenschrank. Sofern die DIN durch hinreichende Validierungen bezüglich der Lagerdauer im Trockenschrank widerlegt wird, kann das Prüflabor den Prozessschritt des Plattengussverfahrens nach den Ergebnissen der internen Validierung angleichen. Aus dem auszuführenden Untersuchungsauftrag lässt sich folgende Hypothese ableiten, die es zu verifizieren oder falsifizieren gilt.

1.3 Hypothese

Die Regelung der DIN EN ISO 11133:2015-02, Gussnährmedien nach dem Aufschmelzprozess maximal 4 Stunden im Trockenschrank bei 47 °C lagern zu dürfen beeinflusst keinesfalls die Produktivität der Zielkeimmikroorganismen der untersuchten Gussnährmedien.

Sofern die Hypothese verifiziert werden kann, würden sich folgende Vorteile für das Prüflabor ergeben:

Die verwendeten Agar-Flaschen müssten nach Ablauf der 4 Stunden im Trockenschrank nicht umgehend entsorgt werden. Dies wäre ein positiver Beitrag zu den Themen Nachhaltigkeit (Ressourcenschonung) und Wirtschaftlichkeit (Kostenreduzierung).

Für die bereits erläuterte Hauptfragestellung wurde ein weiterer Einflussfaktor in die Gesamtuntersuchung mitaufgenommen. Neben dem Fokus auf den Produktivitätsnachweis der Zielkeimmikroorganismen über maximal 34 Stunden sollte für jedes Nährmedium der Aufschmelzprozess näher betrachtet werden.

Um eine eventuelle produktivitätsbeeinflussende Einwirkung des Aufschmelzprozesses zu berücksichtigen wurden zusätzlich zwei Varianten des Aufschmelzprozesses durchgeführt:

Aufschmelzmethode 1 (gemäß DIN EN ISO 11133)

Aufschmelzmethode 2 und 3 (abweichend von DIN EN ISO 11133) (Siehe Kapitel: 3.9.2.2f.)

1.4 Erläuterung der Methode

In folgender Untersuchung werden fünf Nährmedien:

- Tryptone Bile X-Glucuronide Agar (TBX)
- Violet Red Bile Dextrose Agar (VRBD)
- Violet Red Bile Lactose Agar (VRBL)
- Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar (YGC)
- deMan, Rogosa and Sharpe Agar (MRS)

auf Belastbarkeit und Stabilität in Bezug auf die Produktivität der jeweiligen Zielkeimmikroorganismen in einem Zeitraum von maximal 34 Stunden näher betrachtet (DIN EN ISO 11133:2015-02, pp. 51-67). Üblicherweise sind mehrere Prüfungen an unterschiedlichen Chargen desselben Prüf-Agars durchzuführen. Aufgrund von Materialverfügbarkeit wurden die Untersuchungen in dieser Arbeit nur an jeweils einer Charge durchgeführt.

Der Prüfumfang richtet sich nach der Herstellungsart des Nährmediums. Hierbei unterscheiden sich Fertignährmedien, die von einem externen, kommerziellen und zertifizierten Hersteller

bezogen wurden, von der Eigenherstellung in einer firmeninternen Nährmedienküche. VRBD, VRBL und YGC sind Medien, die extern bezogen werden und TBX und MRS werden bei der Eurofins Bio Testing Services Nord GmbH im Labor selbst hergestellt.

Im Vorfeld müssen die zu den Nährmedien zugehörigen Ziel- und Nichtzielmikroorganismen gewählt werden, die zuverlässige Merkmale der eigenen Art aufweisen. Um für ein Nährmedium eine bestimmte und optimale Leistung nachzuweisen sind diese Merkmalsausprägungen entscheidend für die Auszählung (DIN EN ISO 11133: 2015-02, p. 21). Für die Leistungsprüfung der Nährmedien liegen Tabellen zur physikalischen und mikrobiellen Qualitätskontrolle des Agars vor, aus denen benötigte Kontrollstämme und Referenzmedien ablesbar sind (siehe Anhang I).

Die Stämme werden entweder direkt aus der Referenzkultursammlung oder aus sauberen Gebrauchskulturen, die einmal pro Monat neu hergestellt werden, selbst isoliert (DIN EN ISO 11133: 2015-02, p. 22). Die hierfür anzulegenden Prüfsuspensionen werden als Milch-Gefriersuspension hergestellt und umgehend eingefroren, um weiteres Zellwachstum zu vermeiden.

Die Messungen beginnen stündlich nach dem Aufschmelzen und der Abkühlung der Agar-Flaschen auf 47°C. Sofern die Produktivität der Zielkeimmikroorganismen des Nährmediums während des gesamten Untersuchungszeitraums bei TBX, VRBD, VRBL und YGC >50% liegt und bei MRS >70% bzw. >80% liegt, kann der Agar für die geprüfte Stundenanzahl (über den festgelegten Stundenrichtwert von 4 Stunden) weiterverwendet werden. Um reproduzierbare und eindeutige Ergebnisse bezüglich der Qualität des Nährbodens zu liefern und so nicht zuletzt den Verbraucher vor nicht hinreichend geprüften Lebensmitteln, die durch pathogene Keime lebensmittelbedingte Erkrankungen auslösen können zu schützen, wird jedes Nährmedium einer Produktivitätsprüfung unterzogen (DIN EN ISO 11133:2015-02, p. 6)

2. Literaturübersicht

2.1 Definition Validierung

Validierung ist die Grundvoraussetzung für mikrobiologisches Arbeiten in jedem Laboratorium (Welmitz & Gluschke, 2004, p. 3).

Um Lebensmittel unter mikrobiologischen Gesichtspunkten für den Handel und den Vertrieb verkehrsfähig zu machen müssen Validierungen durchgeführt werden (Kromidas & Morkowski, 2011, p. 8).

Mit der Bezeichnung Validierung verbinden Analytiker die Überprüfung einer Methode auf Brauchbarkeit. Dabei soll der Nachweis nach dem EU-GMP (Good Manufacturing Practice) Leitfa- den erbracht werden, dass die Anforderungen an einen lebensmittelanalytischen Prozess, ein Ver- fahren, Materialien und Arbeits-/Ausrüstungsgegenstände oder an gesamte Systeme gewährleis- tet sind und darüber hinaus zum erwarteten Ergebnis führen. Methoden-, Prozess-, Computer- und Reinigungsvalidierungen sind die groben Felder in die Validierungen gegliedert werden (Rieht, 2017, p. 213).

Validierungen sollen in der Analytik für eine angemessene Einhaltung von Qualitätsanforderungen sorgen. Sie dienen der Referenzierung und zeigen inwieweit ein Verfahren praktikabel ist (Baum- gartner et al., 2017, p. 5).

Offiziell wird der Begriff erstmals in den 1970er Jahren in der Richtlinie des Rates 75/318 der Eu- ropäischen Wirtschaftsgemeinschaft (EWG) in Europa, im Jahre 1975 und 1978 in den USA von der Food and Drug Administration (FDA) im Rahmen der Arzneimittelproduktion erwähnt (Kromidas & Morkowski, 2011, p. 10).

Die FDA: (1989) bezeichnete Validierungen wie folgt: „*Validierung ist die Prozedur, die sicherstellt, dass eine Testmethode so zuverlässig ist wie möglich. Dieser Prozess besteht aus einem (Test) Pro- gramm, das zur Beantwortung folgender Frage führt: „Wie richtig ist es?“ und „Wie präzise ist die Methode in den Händen des Routineanwenders?*“

2.2 Der Nutzen von Validierungen

Gemäß DIN EN ISO 13485:2003–Validierung von Prozessen der Produktion und der Dienstleistungserbringung, antwortet eine Validierung auf die Frage, inwieweit ein Prüfverfahren, eine analytische Methode, ein Produkt oder eine Mess-/Prüfeinrichtung für die Erfüllung einer definierten Aufgabe geeignet ist. Es ergeben sich drei Voraussetzungen für das Lösen der Prüffragestellung:

1. Detaillierte Spezifikation der Aufgabe, die beantwortet werden soll.
2. Charakteristische/s Leistungsmerkmal/e durch die das zu testende Verfahren/Methode/Produkt auf Eignung geprüft werden kann.
3. Vorliegen der experimentell ermittelten Werte des Leistungsmerkmals.

Die geforderten Eigenschaften des Prüfobjekts, bzw. die Eignung der Methode (häufig werden Literaturwerte als Referenzdatenbank genutzt) können mit den experimentell ermittelten Daten verglichen werden und den Validierungsauftrag, der auf Eignung zu testen ist, erfüllen. Ist das Verfahren imstande den Produktanforderungen zu entsprechen oder womöglich zu übertreffen, sind alle Schritte des normgerechten Validierungsprozesses erfüllt (Albers et al., 2016, p. 541).

2.3 Der Validierungsprozess

Validierungen werden von zwei unterschiedlichen Perspektiven - der des Auftraggebers und der des Auftragnehmers durchgeführt. Der in Auftrag gegebene Sachverhalt kann aus öffentlichem Interesse resultieren oder aber aus Forderungen, Gesetzen und Verordnungen hervorgehen. Das Labor selbst sowie externe und interne Kunden können Forderungen an interne Methoden und Geräte stellen, um diese zu kontrollieren und gegebenenfalls zu optimieren (Kromidas & Morkowski , 2011, p. 8).

Das Labor sorgt für einen reibungslosen Validierungsablauf, um auftragsbezogene Ergebnisse und Lösungen liefern zu können. Hierfür muss die Aufgabenstellung erfasst und für alle Mitwirkenden nachvollziehbar sein. Darüber hinaus ist sicherzustellen, dass notwendige Kapazitäten vorhanden sind. Der komplette Validierungsprozess lässt sich in einem Ablaufschema darstellen (siehe Anhang II).

Stellt sich heraus, dass das Labor eine Methode gewählt hat, die sich als unzureichend für die jeweilige Fragestellung erweist, muss die Methode modifiziert oder sogar eine Alternativmethode in Betracht gezogen werden. Die Aufgabenstellung zu ändern wäre ein weiterer Ansatz (Kromidas & Morkowski , 2011, p. 9).

Validierungsexperimente gehen immer mit einem finanziellen und technischen Aufwand einher, denn für jedes Labor besteht die Notwendigkeit Methoden und verwendete Produkte nachweislich auf deren Funktionalität zu testen (Hörnlimann et al. 2001, pp. 408-409).

2.4 Der Stellenwert von Validierungen im Kontext des internen Qualitätsmanagements

In lebensmittelanalytischen Laboratorien spielen Validierungen in jeglicher Form im internen Qualitätsmanagement (QM) eine bedeutende Rolle. Die zentralen Funktionen eines Qualitätsmanagementsystems (QMS) werden primär durch Transparenz von Abläufen und Verantwortlichkeiten im Laboratorium geschaffen. Die Nutzung von Methoden und Routineprozessen sollen gefördert werden, indem diese durch Leitlinien für alle Mitarbeiter gleichermaßen beherrschbar gemacht werden. In einem Prüflabor sind klar definierte Arbeitsweisen unerlässlich, da nur durch sie einwandfreie und sichere Resultate gewährleistet sind. Eine unmissverständliche Spezifikation von Arbeitsweisen, die national und international anerkannten Kriterien entsprechen, sichern das Vertrauen und die Glaubwürdigkeit der Prüfergebnisse (Steffen, 2006, p. 8).

Ein wichtiger Aspekt, den das interne QMS zusätzlich miteinbeziehen muss, ist neben den gleichbleibenden Arbeitsabläufen die unveränderliche Untersuchungssituation innerhalb der Räumlichkeiten. Die Qualitätssicherung (QS) ist dafür verantwortlich gezielte, routinemäßige mikrobiologische Untersuchungen anzuleiten, um nicht nur eine Methode bezüglich des Ablaufes zu standardisieren, sondern das Verfahren ebenso immer unter denselben Bedingungen durchzuführen. Die Vorgehensweise von Hygienekontrollen ist der Norm der International Organisation for Standardization (ISO) für das jeweilige mikrobiologische Verfahren zu entnehmen (Wendt & Hof, 2017, p. 706).

Die verbreitetste Technik zur Hygienekontrolle ist das Abklatschverfahren mittels einer Rodac-Platte und die Verwendung eines Membranfilters, der auf die zu untersuchende Fläche mittels Pinzette und sterilen Handschuhen gelegt wird und anschließend auf einer Agarplatte bebrütet wird (Goverde et al. 2017, pp. 33-42).

Die Durchführung und darauffolgende Auswertung dieser Hygienekontrollen liegt im Zuständigkeitsbereich der QS. Für die Interpretation mikrobieller Befunde von Oberflächen kann beispielsweise die Checkliste der Vereinigung der Hygienefachkräfte der Bundesrepublik Deutschland e.V. als Hilfestellung dienen (VHD 2005) (Weißgerber, 2017, p. 189).

2.5 Allgemeingültige Leitlinien für die Durchführung von Validierungen

In Deutschland und europaweit bestehen standardisierte Nachweisverfahren zur Erleichterung und Vereinheitlichung mikrobiologischer Untersuchungen von Lebensmitteln auf pathogene Mikroorganismen, die auf nationaler und internationaler Ebene ihre Anwendung finden. Die Amtliche Sammlung nach § 64 Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) sowie die Normen des Deutschen Instituts für Normung (DIN), bieten deutschen lebensmittelmikrobiologischen Untersuchungseinrichtungen eine Orientierung, um die Vorgaben einhalten zu können (Messelhäuser, 2010, p. 6)

2.6 Die Bedeutung von Nährmedien bei der lebensmittelmikrobiologischen Arbeit

Neben der Überprüfung und Optimierung von Methoden und Verfahrensweisen ist es sinnvoll den Fokus auf die zu verwendenden Hilfsmittel, zum Beispiel Nährmedien und Arbeitsgegenstände zu werfen.

Um die Arbeit in einem mikrobiologischen Labor zu ermöglichen sind Nährmedien unabdingbar, da sie das Hauptmedium für die Kultivierung von Bakterien, Hefen und Schimmelpilzen darstellen. Neben der Anwendung im Bereich der Lebensmittelmikrobiologie werden sie außerdem im diagnostischen, pharmazeutischen und im Bedarfsgegenstandsbereich, wie zum Beispiel Kosmetika angewendet (Steinbüchel et al., 2013, p. 317).

Nährmedien sind somit ein Hauptbestandteil der vorliegenden Arbeit, wodurch eine kurze Zusammenfassung über deren Bedeutung und historische Entwicklung in der Mikrobiologie vorgestellt werden sollen.

2.6.1 Definition Nährmedien

Nährmedien sind bakteriologische Nährböden, die bei der Vermehrung also Kultivierung von Mikroorganismen in mikrobiologischen Laboratorien ihre Anwendung finden. Alle Nährmedien haben das Ziel durch eine geeignete Rezeptur, optimales Wachstum für Keime zu schaffen. Die einzelnen Komponenten der Nährböden müssen präzise auf die Stoffwechselcharakteristika der auf den Nährböden wachsenden Keime ausgelegt sein. Die Rezeptur der Nährböden besteht aus organischen und anorganischen Substanzen. Beispiele hierfür sind: Eiweißhydrolysate, Kohlenhydrate, Mineralstoffe, Spurenelemente sowie Vitamine (Rolle, 2006, p. 382).

Das Wachstum von Mikroorganismen hängt nicht allein von der Zusammensetzung des Nährmediums ab. Faktoren wie der pH-Wert, Osmolarität, Bebrütungstemperatur und Lichtverhältnisse haben ebenfalls einen Einfluss auf das Wachstum (Hirsch-Kaufmann & Schweiger, 2004, p. 292). Die Gemeinsamkeit aller Mikroorganismen liegt in ihrer Ernährung und die damit einhergehende

Vermehrung. Sie sind nur in der Lage wasserlösliche Nährstoffe aufzunehmen. Der pH-Wert und das Redoxpotential sind neben den Nährstoffen und dem Wasser von großer Bedeutung. Nährmedien können durch Geliermittel gefestigt werden. Dies erfolgt je nach Notwendigkeit mit Agar-Agar, ein aus Algen entnommenes Polysaccharid oder Gelatine, ein aus Bindegewebe und Knochen erworbenes Protein. Die Konzentration der Geliermittelzugabe entscheidet über die Art des Nährmediums (Fest, halbfest, flüssig) (Attz & Hetche, 1935, p. 99).

2.6.2 Historische Einordnung von Nährmedien

Louis Pasteur gehörte zu den ersten Mikrobiologen, die es in Erwägung zogen, Krankheitserreger außerhalb des menschlichen Körpers zu kultivieren. Aus diesen Überlegungen entstand 1861 die erste flüssige Anreicherungsbouillon (Georgi, Bierbach, 2007, zitiert nach Messelhäuser, 2010 p.5). Dadurch war einer der fundamentalen Meilensteine der heutigen mikrobiologischen Diagnostik gesetzt. Aus dieser ersten Anreicherungsbouillon entstanden, nach jahrelang durchgeführter Modifikation und Forschung, die bis heute genutzten nichtselektiven Nährbouillons mit einem optimalen Wachstum von Bakterien (Madigan et al., 2015, p. 16).

Im Bereich der Entwicklung von Festnährböden gilt der deutsche Botaniker Oscar Brefeld als bedeutender Wegbereiter. 1872 gelang es ihm, auf einem Flüssigmedium (zugemischt mit Gelatine) Schimmelpilzkolonien zu kultivieren (Drews, 2015, p. 48).

Robert Koch war es der die Bedeutung der Entwicklung von Oscar Brefeld aufgriff und die damit einhergehenden neuen Möglichkeiten im Labor verstand. Diese Entwicklung eröffnete die Isolation von Mikroorganismen aus Umweltproben und die darauffolgende Differenzierung der Mikroorganismen, was im Gegensatz zu Flüssigmedium nicht möglich war. Es wurde allerdings auch deutlich, dass Gelatine nur eine geringe Eignung für die Stabilität der Nährmedien aufzeigte. Sie geht erst bei einer Temperatur $<25\text{ °C}$ in den festen Zustand über, was für viele Bakterien, deren Bebrütungstemperatur bei 37 °C liegt, nicht geeignet ist (Madigan et al., 2015, p. 17).

Ein Flüssigmedium, das Friedrich Loeffler (Assistenz von Robert Koch) entwickelte, ebnete den Erfolg für die Entwicklung der Festnährmedien (Pandey et al., 2008, p. 75). Diesem Flüssigmedium wurde Agar-Agar zugesetzt, welcher starke physikalische Eigenschaften aufweist und bis zu Temperaturen $>100\text{ °C}$ im festen Zustand bleibt. Robert Koch legte mit seinen Kollegen einen bedeutenden Meilenstein in der Entdeckung der aktuell erforschten bakteriellen Infektions- und Intoxikationserreger und erschuf so die Basis modernen mikrobiologischen Arbeitens (Laudert, 2015, pp. 647-648).

2.7 Anreicherungsverfahren

Die Anzucht von Bakterien ist grundlegend mit flüssigen, halbfesten sowie festen Nährmedien möglich.

2.7.1 Flüssige Nährmedien

Flüssige Nährmedien sind für die Aktivierung von Keimen notwendig. Mikroorganismen haben in flüssigen Nährmedien grundsätzlich günstigere Entwicklungsmöglichkeiten. Dies zeigt sich zum einen durch die einheitliche Nährstoffaufnahme, die über die ganze Oberfläche der Zelle verläuft und zum anderen durch die gleichbleibend eingestellte Temperatur sowie eine bessere Sauerstoffverteilung. Es existieren einige Mikroorganismen, die erst in flüssigen Nährmedien charakteristische Wuchsformen annehmen und anschließend unter dem Mikroskop ausgewertet werden können (Pichhardt, 1993, p. 23).

Im ersten Schritt einer Kultivierung kommen die flüssigen Anreicherungsbouillons zum Einsatz, in denen für den weiteren Versuchsablauf eine ausreichend hohe Keimzahl heranwachsen muss. Nach der Beimpfung der Nährbouillon kommen in den meisten Fälle feste Nährmedien zum Einsatz. Dies dient dazu, die gesuchten Bakterien zu isolieren und detaillierter zu charakterisieren. Bei Mikroorganismen mit hohen Erfordernissen an die Umwelt oder bei Mikroorganismen, die negativ auf auftretende Begleitflora reagieren (z. B. *Campylobacter* spp), werden lediglich Selektivnährmedien verwendet (Messelhäußer, 2010, p. 7).

2.7.2 Feste Nährmedien

Feste Nährböden haben grundsätzlich immer einen mindestens 1%igen Agar-Agar Anteil. Bei einem 1%igen Zusatz von Agar-Agar kann das Nährmedium Temperaturen bis zu 121 °C standhalten, wobei die Gelierfähigkeit nicht abnimmt. Agar-Agar wird von Mikroorganismen im Allgemeinen nicht angegriffen (Pichhardt, 1993, p. 23) und geliert bei einer Temperatur von 45 °C (Drews, 2013, p. 8).

Festmedien eignen sich für quantitative und qualitative Nachweisverfahren von Keimzahlen und Keimarten. In der Lebensmittelmikrobiologie finden Festnährmedien ihre Anwendung zur Isolation der Mikroorganismen nach der Anreicherung in Flüssigkulturen. Bei semiquantitativen oder quantitativen Verfahren kommen sie ebenfalls zum Einsatz. Kombiniert man verschiedene Verfahren, kann eine exakte Identifizierung und Bestimmung von gegebenenfalls existierenden Pathogenitätsfaktoren ermittelt werden (Schink, 2007, p. 163).

2.7.3 Feste Selektivnährmedien

Für die Herstellung von Selektivnährböden wird nichtselektiver Nähragar als Grundlage verwendet. Um ein selektives Wachstum und eine erste Identifizierung der Mikroorganismen zu begünstigen wird dieser Nähragar zusätzlich um chemische Agenzien, wie Farbstoffe und antimikrobiell wirksame Substanzen ergänzt. Ein Farbumschlag des Nährbodens oder die Färbung einer Bakterienkolonie gibt häufig Hinweise auf die vorhandene Bakterienspezies. Die Ursache dafür ist meistens die Verstoffwechslung unterschiedlicher Zuckerarten, die im Nährboden hervorgerufen werden (Groß, 2013, pp. 88-89).

3. Material und Methodik

3.1 Definition die für die Leistungsprüfung der Nährmedien gewählte Methode des Plattengussverfahrens

Für die Leistungsprüfung der Nährmedien wurde die Methode des Plattengussverfahrens gewählt. Beim Plattengussverfahren wird in jede leere Petrischale 1ml = 1000 µl Probe oder in diesem Fall für die Produktivitätsprüfung 1 ml = 1000 µl Zellen aus den selbst kultivierten Stämmen auf Milchbasis geimpft. Anschließend wird der zu untersuchende aufgeschmolzene Agar zugegeben. Die Petrischale wird geschlossen und die Zellen durch achten förmige Bewegungen auf der Platte bestmöglich verteilt. Die Platten werden zur Trocknung pyramidenartig gestapelt, nach Festwerden des Agars in Racks gestellt und inkubiert (DIN EN ISO 4833-1:2013, pp. 4-6).

3.2 Flussdiagramm zur Übersicht des durchgeführten Validierungsprozesses gemäß
DIN EN ISO 11133:2015-02

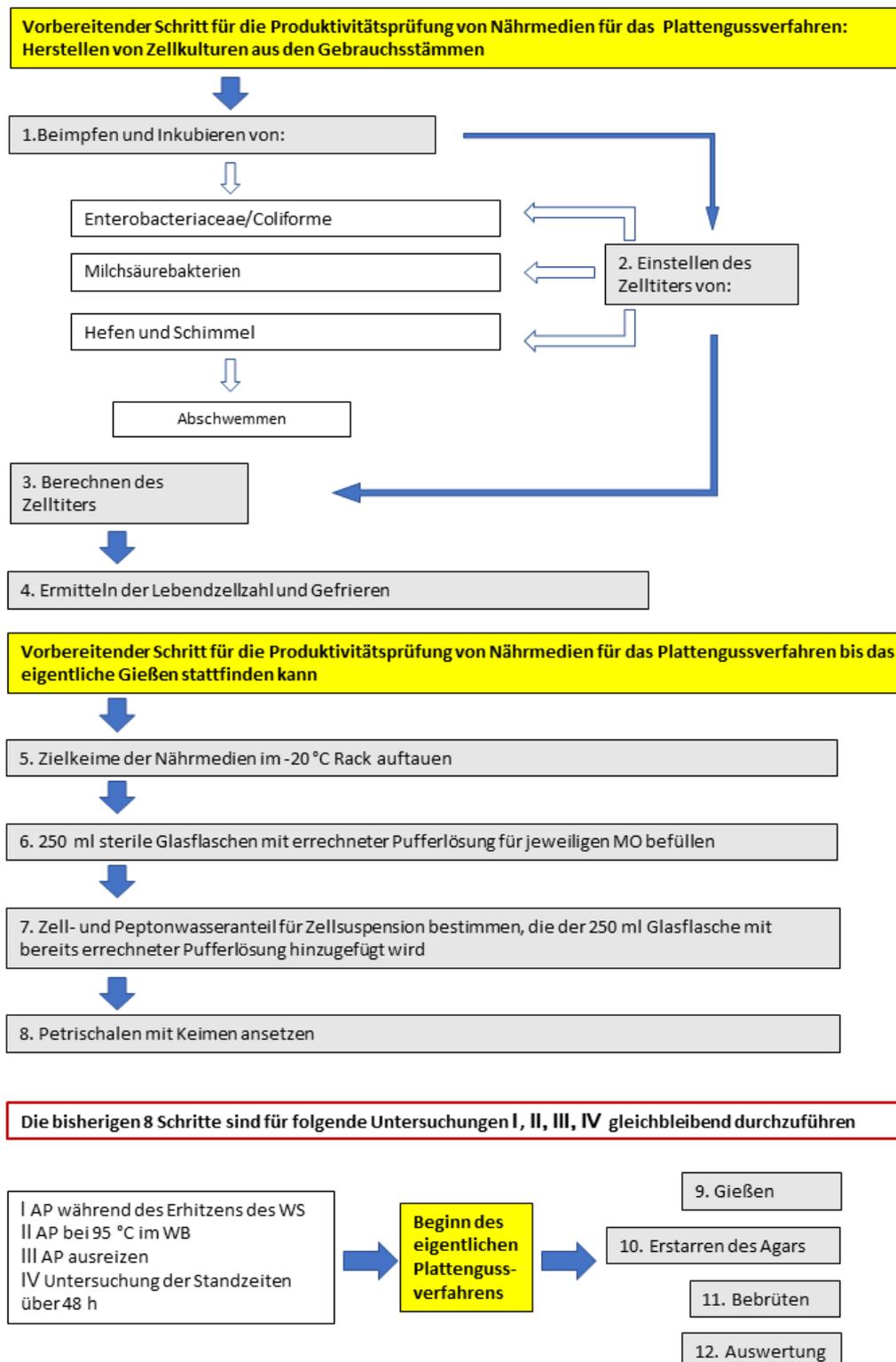


Abbildung 1: Schema zur Gesamtübersicht der Methode für relevante Bakteriengruppen und durchgeführte Teiluntersuchungen

3.3 Verwendete Mikroorganismen

3.3.1 Familie der Enterobacteriaceae

Enterobacteriaceae bestehen aus bedeutenden Gattungen wie *Echerichia*, *Klebsia*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Shigella* und *Yersinia*. Entdeckt wurde diese Erregerform erstmals im Darm, wodurch sich die Bezeichnung Enterobakterien auf das Wort *griechisch Enteron=Darm* zurück zu führen lässt (Octavia & Lan, 2014, pp. 225-226).

Es handelt sich um verwandte gramnegative, gerade Stäbchen, die sich auf Kulturmedien unter aeroben und anaeroben Bedingungen einfach und gut vermehren. Unter den oben genannten Gattungen existieren fakultativ pathogene Enterobakterien. Sie sind Teil der physiologischen Bakterienflora des Darms und entwickeln sich erst dann zu Krankheitserregern, sobald sie aus dem Magen-Darm-Trakt in andere Regionen des Organismus gelangen. Diese opportunistischen Gattungen sind von den obligat pathogenen Mikroorganismengattungen *Salmonella*, *Shigella* und *Yersinia* zu differenzieren. Sie sind nicht für die Aufrechterhaltung der natürlichen Darmflora vorgesehen, sondern führen entweder zu Enteritiden im Darm oder lösen allgemeine Infektionen aus, sofern sie in die Blutbahn zu anderen Organen gelangen (Hahn, 1991, p. 299).

3.3.2 Familie der Enterococcaceae

Die Familie der *Enterococcaceae* zeichnen sich durch grampositive Bakterien aus. *Atopobacter*, *Catelliococcus*, *Enterococcus*, *Melissococcus*, *Pilibacter*, *Tetragenococcus* und *Vagococcus* sind Gattungen dieser Familiengruppe. Sie haben einen aneroben Stoffwechsel und sind demnach nicht auf Sauerstoff angewiesen. Die Bakterien sind größtenteils kokkenförmig, besitzen keine Geißeln und sind non-motil, demnach nicht befähigt sich aktiv vorzubewegen. Speziell Enterokokken sind als opportunistische Krankheitserreger bekannt und können nosokomiale Infektionen verursachen. *E. faecali* und *E. faecium* sind für die Erkrankung des menschlichen Organismus am relevantesten (Raza et al., 2018, pp. 768-772).

3.3.3 Familie der Pseudomonadaceae

Pseudomonadaceae, aus dem *griechischen Pseudo (= falsch)*, *Monas (= eine einzelne Einheit)*, sind eine äußerst umfangreiche und höchst wichtige Familie von gramnegativen Bakterien. Sie besitzen eine stäbchenförmige oder leicht gebogene Bakterienform, gehören zu den polaren Flagellenbakterien und sind keine Sporenbildner. Zudem verlangen sie nach einem aeroben Wachstumsmilieu (Jurat-Fuentes & A. Jackson, 2012, p. 312).

Bakteriengattungen wie *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Gluconobacter*, *Zoogloea*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Thiobacillus*, *Sphaerotilus*, *Leptothrix*, *Caulobacter*, *Asticcacaulis*, *Methanomonas*,

Comamonas, *Alginomonas*, *Cellulomonas* und *Cellvibrio* teilen voranstehende morphologische Merkmale. Die ersten vier genannten Gattungen haben hervorstechende Merkmale, die für eine Trennung der Gattungen sprechen würden. Die Oxidase-Reaktion, die bei der Gattung *Pseudomonas* positiv und bei der Gattung *Xanthomonas* negativ ausfällt, ist ein Beispiel dafür. Umstritten ist des Weiteren die Beweglichkeit der Bakteriengattungen. Pseudomonaden sind beweglich, einige Arten der *Gluconobacter*-Gattung sind beweglich oder auch unbeweglich und Zoogloea sind ausschließlich in jungen Jahren aktiv (Palleroni, 1981, pp. 655-656).

Die Gattung *Pseudomonas*, insbesondere die Art *P. aeruginosa* wird als opportunistischer Erreger mit einer zunehmenden klinischen Relevanz in Bezug auf eine mögliche Antibiotikaresistenz eingestuft (Bauerfeind, 2015, p. 156).

3.3.4 Familie der Lactobacillaceae

Lactobacillaceae, im gewöhnlichen Sprachgebrauch auch als Milchsäurebakterien oder *Lactobacillen* bekannt, weisen wichtige physiologische Merkmale, wie die Fähigkeit der Bildung von Milchsäure aus Kohlenhydraten auf (Alvarez-Sieiro, 2006, pp. 2939-2951). Sie sind den fakultativ anaeroben Bakterien zugehörig, nicht sporenbildend und bilden unterschiedlich lange Stäbchen. Sie sind grampositiv (nur ältere entwickeln sich zu gramnegativen Zellen) und größtenteils unbeweglich. Sie erfahren ein Wachstum, sofern sie von Luftsauerstoff umgeben sind, können diesen jedoch nicht verwerten, da sie ihre Energie ausschließlich über die Milchsäuregärung erlangen. Deshalb zählen sie zu den aerotoleranten Keimen. *Lactobacillen* haben äußerst hohe Nährstoffansprüche, weshalb sie meistens auf komplexen und kohlenhydrathaltigen Nährmedien, die reich an Spurenelementen, Vitaminen und Aminosäuren sind, kultiviert werden. Hierzu zählende Nährmedien sind Milch, Molke und Pflanzensäfte. Ihr Wachstum ist als sehr langsam einzustufen. Zu der Familie der Lactobacillaceae zählen (nach Stand 2008) Gattungen wie *Lactobacillus*, *Pediococcus* und *Paralactobacillus*. Die Gattung *Lactobacillus* wird wegen der verschiedenen Stoffwechsellistung der *Lactobacillus*-Arten näher in zwei Gruppen unterteilt. Es handelt sich einerseits um die hauptsächlich Milchsäure produzierenden Stämme, die den homofermentativen Arten zugeschrieben werden und andererseits, um die heterofermentativen Arten, die neben der Milchsäureherstellung einen deutlich hohen Anteil an Essigsäure, Ethylalkohol und Kohlendioxid bilden (Müller, 1983, pp. 59-60).

3.3.5 Familie der Streptococcaceae

Streptococcaceae gehören aktuell drei Gattungen an. *Lactococcus*, *Lactovum* und *Streptococcus*. Es handelt sich um grampositive, katalsenegative, nicht sporenbildende und unbewegliche Bakterien (Hagen Meyer, 2006, p. 340).

Aus dem *Griechischen*: *Streptos*=Kette leitet sich der Name, der im Gram-Präparat in paariger Anordnung oder unterschiedlich langer Ketten liegenden Zellen ab. Früher gehörten die Enterokokken ebenfalls zu dieser Familie. Die bedeutendste Gattung unter den *Streptococcaceae* ist *Streptococcus*. Sie gehört zu den wichtigsten Infektionserregern beim Menschen und verursachen Krankheitsbilder wie Meningitis, Scharlach oder Endokarditis. *Laktokokken* differenzieren sich hauptsächlich durch ein positives Wachstum bei einer Temperatur von 10 °C im Gegensatz zu Streptokokken (Reinert, 2009, pp. 310,330).

3.3.6 Familie der Saccharomycetaceae

Sporenbildende hefeartige Pilze finden sich in der Familie der *Saccharomycetaceae* wieder. Arten dieser Familie werden nicht selten als ascosporogene Hefen, was so viel wie „echte Hefen“ bedeutend, bezeichnet. Sie besitzen die Fähigkeit unter speziellen Bedingungen Asci zu bilden, was sie von anderen sprossenden und oidienbildenden Pilzen unterscheidet. Anascosporogene Hefen sind hefeähnliche Pilze, die äußerlich den Hefen gleichen, jedoch keine Asci produzieren können (Gäumann, 1964, pp. 117-118).

Es existiert eine prägnante Anzahl von Arten, die dieser Familie untergeordnet sind, denen bisher jedoch noch keine Sporenbildung zugeschrieben wurde. Bei der Familie der *Saccharomycetaceae* ist das Gärverhalten teilweise nicht vorhanden. Einige Gattungen wie *Saccharomyces* haben jedoch ein ausgeprägtes Gärverhalten (Rehm, 1967, pp. 24-25).

Gattungen wie *Schizosaccharomyces*, *Endomycopsis*, *Saccharomyces* und *Candida* zählen ebenfalls zu den *Saccharomycetaceae*. Insgesamt existieren ca. 20 dazugehörige Gattungen. (Müller, 1977, pp. 74-75).

3.3.7 Familie der Trichocomaceae

Die Trichocomaceae sind in drei zu differenzierende Familien gegliedert. Aspergillaceae, Thermoascaceae und Trichocomaceae. Die Aspergillaceae bilden kolbenförmige oder zylindrische Phialiden. Sie kennzeichnen sich durch Asci, die in Kleistothezien produziert werden. Sie können zudem von Hülle-Zellen und Ascosporen umgeben sein (Houbraken, 2011, p. 50).

Zu den Aspergillaceae sind die bekanntesten Gattungen *Penicillium* und *Aspergillus*. Bei *Aspergillus* handelt es sich um saprotrophe Pilze, die eine hohe pH-Werttoleranz aufweisen, weshalb sie auf einem breiten Spektrum von Substraten wachsen (Malcom et al., 2009, p.271).

Die Gattung *Aspergillus* umschließt mehrere hundert Arten. Von diesen Arten tragen eine große Anzahl dazu bei, die Gesundheit vieler Pflanzen, Tiere und Menschen zu beeinträchtigen. Dies geschieht primär durch eine direkte Infektion. Ein mögliches in Kontakt treten wäre zudem durch die Produktion toxischer Sekundärmetaboliten (Mykotoxine) möglich (Schubert et al., 2018, pp. 1167-1184).

Grundlegend existieren unter ihnen Arten, die opportunistische Krankheitserreger darstellen und andere, die in biotechnologischen Prozessen für die Herstellung von Enzymen, Antibiotika und anderen Produkten angewendet werden (Pérez Rodríguez et al., 2016, pp. 173-190).

3.3.8 Familie der Wallemiaceae

Die Familie der Wallemiaceae umschließt ausschließlich eine Gattung. Die Gattung *Wallemia*. Die Gattung *Wallemia* gehört der Ordnung Wallemiales an und impliziert die weltweit xerotolerantesten, xerophilsten und auch halophilsten Arten (Padamsee & Kumar, 2012, pp. 217-226). Von allen *Wallemia* Arten, werden vier häufig mit Lebensmitteln in Verbindung gebracht und Laborberichten zu urteilen können sie mit einem gesundheitlichen Risiko für den Menschen in Verbindung stehen. Es handelt sich um: *W. sebi*, *W. mellicola*, *W. muriae* und *W. ichthyophaga* (Zajc, 2018, p. 46).

Für eine tabellarische Übersicht der verwendeten Zielkeime siehe Anhang III.

3.4 Verwendete Nährmedien

Tabelle 1 präsentiert einen allgemeinen Überblick über die verwendeten Nährmedien und die darauf wachsenden Zielkeime.

	TBX	VRBD	VRBL	YGC	MRS	TSA	MRSref	DG18	SDA/SABC
<i>E. Coli</i>	x	x	x			x			
<i>E. aerogenes</i>		x	x			x			
<i>C. freundii</i>	Δ	x	x			x			
<i>S. enterica</i>		x				x			
<i>E. faecalis</i>	O	O	O			x			
<i>P. aeruginosa</i>	Δ					x			
<i>L. sakei</i>					x		x		
<i>P. pentosaceus</i>					x		x		
<i>L. lactis</i>					x		x		
<i>C. albicans</i>				x				x	x
<i>S. cerevisiae</i>				x				x	x
<i>A. braziliensis</i>				x				x	x
<i>W. sebi</i>				x				x	x

Legende					
Zielkeime	x	Vollständig gehemmt	O	Reagierende nicht Zielkeime	Δ

Tabelle 1: Matrix der Nährmedien mit zugehörigen Zielkeimen

3.4.1 Beschreibung der verwendeten Nährböden

3.4.1.1 Trypton-Galle-X-Glucuronid- Agar

Gemäß ISO 16649 beruht *Tryptone-Bile X Agar* (TBX) auf dem Grundsatz eines horizontalen Verfahrens zum quantitativen Nachweis und zur Identifizierung von β -Glucuronidase-positiven *Escherichia Coli*. Hierbei handelt es sich um Bakterien, die unter dieser ISO zugrunde gelegten Bedingungen, ein Wachstum bei 44 °C aufweisen und für den Nährboden typisch blau gefärbte Kolonien bilden. Das Verfahren ist für Lebensmittel- und Futtermittel bestimmt.

Zum Nachweis des Enzyms β -Glucuronidase ist für das Koloniezählverfahren immer ein chromogener Bestandteil auf dem festen Nährmedium erforderlich (DIN ISO 16649-2:2019-12, pp. 4-6).

3.4.1.2 Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar

VRBD-Agar (violet red bile dextrose agar), auch als VRBG-Agar bekannt (violet red bile glucose agar), ist Hauptbestandteil des Verfahrens für den quantitativen Nachweis und die Identifizierung von Enterobacteriaceae. Hierbei stehen Produkte für den menschlichen Verzehr sowie Futtermittel im Vordergrund. Umgebungsproben im Zusammenhang mit Herstellungsprozessen und der Behandlung von Lebensmitteln sind ebenfalls mitinbegriffen. Pasteurisierte Milch, Milch- und Molkereiprodukte sowie Eiprodukte gehören zu den Lebensmittelproben, die für VRBD Nährboden verwendet werden. Neben Milchprodukten finden sich Enterobacteriaceae typischerweise in der Lebensmittelgruppe Fleischerzeugnisse, darunter Wurst- und Fleischwaren wieder. Auf VRBD wachsen Bakterien, die entsprechender Vorgabe der ISO oder der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 des LFGB bei 37 °C kultiviert werden (DIN ISO 21528-2:2009-12, pp. 6-10).

3.4.1.3 Kristallviolett-Galle-Lactose-Agar

Die Norm ISO 4832 erläutert für den selektiven Nährboden Kristallviolett-Galle-Lactose-Agar (VRBL), ein grundlegendes Verfahren für die Zählung von coliformen Keimen speziell für Lebensmittel, Futtermittel und Umgebungsproben im Rahmen der Lebensmittelproduktion. Typisch empfohlene Lebensmittelproben für diesen Agar sind Milch- und Molkereiprodukte sowie Speiseeis. Die Temperaturspanne coliformer Keime befindet sich zwischen 30 °C und 37 °C. Darüber hinaus ist diese Form von Mikroorganismen in der Lage, Lactose unter Gasbildung zu fermentieren. Auf VRBL weisen sie ein entscheidendes Wachstum in Form von rötlichen bis violetten Kolonien mit gleich aussehenden Höfen auf. Nicht coliforme Keime, dementsprechend nicht Lactose verwertende Bakterien oder später Lactose verwertende Bakterien, erkennt man in Form von blass erscheinenden Kolonien, die einen grünlichen Hof aufweisen. Einige verwandte Mikroorganismen können auf VRBD ebenfalls ein Wachstum erfahren, sofern sie bei einer Temperatur > 42 °C bebrütet werden. Ist das Wachstum anderen verwandter Keime unerwünscht, kann es durch eine anaerobe Bebrütung gehemmt werden (ISO 4832:2006-02, pp. 2-5).

3.4.1.4 Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Agar

Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Agar oder Yeast-Glucose-Chloramphenicol-Agar (YGC), ist ein Selektivnährmedium, das gemäß DIN 10186:2005 mikrobiologische Mischuntersuchung, *der ISO 6611:2004 Milk and milk* oder dem Lebensmittel und Futtermittelgesetzbuch LFGB nach § 64 für die Keimzahlbestimmung von Hefen und Schimmelpilzen empfohlen wird. Sowohl im

internationalen als auch im nationalen Kontext beziehen sich die Empfehlungen speziell auf Milchprodukte. Für die Herstellung des YGC Agars bei der Eurofins Biotesting Services Nord GmbH, existiert eine interne Methode (PV 0053,2013, pp. 2-4) die insbesondere für zuckerhaltige Lebensmittel angewendet werden kann, obwohl der Agar wie eingangs erwähnt, von Oxoid bezogen wird.

3.4.1.5 de Man, Rogosa und Sharp Agar

Die für den Nährboden angewandten Techniken, sowie deren Zusammensetzung und Herstellung beziehen sich alle auf die internationale Norm ISO 15214.

MRS (de Man, Rogosa und Sharp) ist der Nährboden, der für die Zählung von mesophilen Milchsäurebakterien zur Anwendung kommt. Lebensmittel- und Futtermittelproben werden mit MRS Agar bei der Plattengussmethode bedeckt und bei 30 °C inkubiert. Auf einigen Lebensmitteln wachsen zusätzlich psychrotrophe oder auch thermophile Milchsäurebakterien, die ihr Temperaturoptimum > 30 °C haben. Je nach Lebensmittelprobe ist das miteinzubeziehen (ISO 15214:1998-08, pp. 3-5).

3.4.2 Leistungskontrolle für alle untersuchten Nährmedien

Für die Leistungsüberprüfung sind wichtig einzuhaltenden Parameter jedes vorgestellten Nährmediums erforderlich (siehe Anhang I)

3.4.3 Zusammensetzung und Herstellung für alle untersuchten Nährmedien

Die jeweiligen Rezepturen sowie die Herstellung nach zugrundeliegender Norm der untersuchten Nährmedien, Referenznährböden und Bouillons (siehe Anhang IV).

3.4.4 Beschreibung der verwendeten Referenznährböden

3.4.4.1 Trypton-Soja-Agar

Trypton-Soja-Agar ist ein Allzwecknährmedium, auf dem zahlreiche coliforme Bakterien und Enterobacteriaceae wachsen. Es ist für die Kultivierung von aeroben und anaeroben Bakterien geeignet, weshalb es für die Verwendung als Referenzagar für selektive Medien ausschlaggebend ist. Demnach können eine Vielzahl von Selektivnährmedien mit Hilfe von TSA einer Produktivitätsprüfung unterzogen werden. In der DIN EN ISO 11133 gilt es als Standardreferenzmedium. In weiteren Normen, wie der Europäischen ISO Norm 9308-1:2000 zur Untersuchung von Wasserproben oder dem FDA-Bacteriological Analytical Manual (FDA-BAM)/U.S. Department of Agriculture-Food Safety Inspection Service (USDA-FSIS) „methods for testing of food and water samples“, wird TSA verwendet.

In der Literatur wird das Nährmedium häufig auch als Casein-Soja-Pepton-Agar (CASO) bezeichnet. Der Name geht auf dessen Zusammensetzung zurück. TSA bzw. CASO besteht mengenmäßig zum größten Teil aus Casein- und Sojapepton (Abbott & Graham, 1961, pp. 5-58).

3.4.4.2 *de Man, Rogosa und Sharp Agar MRS (MRS Fertigmedium OXOID)*

Für das selbstgekochte Nährmedium MRS, wurde ein MRS-Fertigmedium (bereits gegossene und überprüfte Platten von Oxoid) als Referenzagar verwendet. Anhand dieser Platten konnte der MRS-Agar aus Eigenproduktion auf seine Produktivität überprüft werden.

Für die Verwendung von selbst hergestelltem MRS-Agar als Referenzmedium ist es wichtig, bereits validierte Chargen zu verwenden (de Man & Sharp, 1960, pp. 130-135).

3.4.4.3 *Dichloran-Glycerin-Agar (DG18)*

Nach der DIN EN ISO 21527-2 ist der Dichloran-Glycerin-Agar ein Selektivmedium zur Kultivierung von Hefen und Schimmelpilzen in Lebensmitteln. Speziell sind Lebensmittelproben, die aus trockenen und halbtrockenen Lebensmitteln entnommen wurden, für diesen Agar anwendbar (PV 0053, 2013, pp. 2-4).

Eine akute Ausbreitung von hyphenbildenden Pilzen wird durch das in der Rezeptur vorkommende Dichloran gehemmt. Es beschränkt im Allgemeinen das Wachstum und somit die Größe der Pilzkolonien. Dies hat den Vorteil, die bei der Auswertung anstehende Kolonieauszählung zu vereinfachen. Das bakterielle Wachstum und die Ausbreitung von Hefen, wird durch die Komponenten des Chloramphenicols, des geringen pH-Wert und die Reduktion des Wassers durch die Ergänzung von Glycerin gehemmt (Hocking & Pitt, 1980, pp. 488-492).

3.4.4.4 *Sabouraud-Dextrose-Agar (SDA)*

Sabouraud-Dextrose-Agar (SDA) ist ein festes Nährmedium, welches größtenteils zur selektiven Isolierung und Anzucht von pathogenen und nicht pathogenen Schimmelpilzen, Dermatophyten und unterschiedlichen Hefespezies verwendet wird. Wie die vorher beschriebenen Referenzmedien wird auch SDA von der DIN EN ISO 11133 als Referenzmedium empfohlen, besonders für die Leistungsprüfung von YGC. Grundsätzlich kommt es vor, dass auf SDA einige Stämme weniger gut wachsen als andere Stämme. Die Rezepturbestandteile, die eine hemmende Wirkung auf Bakterien aufweisen, können gleichzeitig auch pathogene Pilze hemmen, sodass eine Beeinträchtigung des Wachstums einiger Hefen und Schimmelpilze begründet ist (Kane & Summerbell, 1999, pp. 1275-1294).

3.4.5 Beschreibung der verwendeten Boullions

3.4.5.1 *Tryptic Soy Broth (TSB)*

Tryptic-Soy-Broth, im Deutschen als Tryptische-Soja-Bouillon oder Tryptonsojabrühe bezeichnet, ist ein breites, flüssiges, dehydriertes Kulturnährmedium und kann als Gegenstück zur festen Variante des Trypton-Soja-Agars (TSA) angesehen werden. Durch die vielseitigen und nahrhaften Eigenschaften ermöglicht es ein Wachstum von aeroben und fakultativ anaeroben Organismen

sowie von einzelnen Pilzen. Besonders in der Lebensmittelbakteriologie kommt TSB als BasalmEDIUM vor. Für die Herstellung von Referenzstämmen aus Gebrauchskulturen spielt es als erster Anreicherungsschritt eine bedeutende Rolle und ist für die Entwicklung von Inokula in Verfahrensweisen und Methoden zur Qualitätskontrolle vorgesehen (Abbott & Graham, 1961, pp. 5-58).

3.4.5.2 *deMan, Rogosa und Sharpe Bouillon*

Die MRS Bouillon ist das Korrelat zum bereits beschriebenen MRS Agar. Dadurch ist es grundlegend für die Kultivierung von Milchsäurebakterien sowie *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* und *Pediococcus* bestimmt. Bei der Animpfung von MRS Röhren, die Wachstum nach ausreichender Inkubation im Brutschrank aufweisen sollen, werden Subkulturen auf MRS Agar angelegt, damit die Anwesenheit von Lactobacillen bestätigt werden kann (ISO 15214:1998-08, pp. 3-5).

3.4.5.3 *Malzextrakt Bouillon*

Die Malzextrakt-Bouillon wird vor allem in der Zuckerindustrie speziell für die Herstellung von Softdrinks, Sirup sowie weiteren Süßgetränken verwendet und kann zur Überprüfung von Brauereikulturen angewendet werden. Sie dient der Anzucht von Pilz- und Hefekulturen in Lebensmitteln. Die mit Glucose angereicherte Malzextrakt-Bouillon kommt in mykologischen Laboren als Substrat für Schimmelpilzkulturen zum Einsatz.

Malzextrakt weist durch vorhandene Protein- und Nukleinsäurebausteine sowie Spurenelemente und Vitamine wertvolle Zusätze auf. Die Gewinnung von Malzextrakt erfolgt über Gerstenmalz, das bei der Keimung von Gerste durch wirkende Amylasen produziert wird. Die Amylasen bauen die Reservestärke des Gerstenkorns gewöhnlich zu Maltose ab. Dies geschieht in der Regel unter einem sauren pH-Wert für Hefen und Schimmelpilze. Malzextrakt hat einen hohen Kohlenhydratanteil und ist reich an Kalium (Kane & Summerbell, 1999, pp. 1275-1294).

3.5 Probenvorbereitung und Herstellen der Zellkulturen für Coliforme und Enterobacteriaceae

3.5.1 Beimpfen und Inkubieren

Für jedes Medium werden die benötigten Zielkeime selbst hergestellt. Dazu wird ein steriles Röhren mit 5 ml des Flüssigmediums TSB mittels einer 10 ml Pipette befüllt und in ein Rack gestellt. Die benötigte Gebrauchskultur, aus der die eigene Stammhaltung hergestellt wird, muss einige Sekunden gevortext werden, bis das Medium milchig wird. Mit einer Impföse werden die 5 ml TSB mit 10 µl Zellen aus der Gebrauchskultur beimpft und für 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Die Arbeit findet unter der Sterilbank statt, die vor Nutzung sorgfältig mit Bacillol und ggf. mit

Khorsolintüchern gereinigt wird. Sowie vor als auch nach dem Gebrauch muss die Bank ca. 20 Minuten in Betrieb sein, um Luftreinheit zu gewährleisten, bevor sie erneut benutzt werden kann.

3.5.2 Einstellen des Zelltiters

Durch leichtes Schwenken der Bouillon im Anschluss an die Inkubationszeit, wird überprüft, ob ein Zellwachstum stattfand. Sind trübe Schlieren zu erkennen war das Zellwachstum erfolgreich. Aus der Keimsuspension wird eine Verdünnungsreihe angelegt. Mit einem 10^{-2} Röhrchen wird nach ausreichendem Vortexen, durch schräges Pipettieren am Deckglas einer Thoma-Kammer, eines der zwei Zählnetze befüllt.

3.5.3 Das Arbeiten mit Zählkammern

Für die Arbeit mit Zählkammern ist das Erstellen von Verdünnungsreihen hilfreich. Es erleichtert das Auszählen der Zellen und dient der Bestimmung von Zellen pro Volumeneinheit von Flüssigkeiten. Die für die Untersuchungen verwendeten Zählkammern und Hämacytometer-Deckgläser sind grundsätzlich gemäß in-vitro-Diagnostika-Richtlinie 98/79 der Europäischen Gemeinschaft Communauté Européenne (IVD-Richtlinie 98/79 EG CE) -gekennzeichnet.

Funktionsmerkmale der Zählkammer

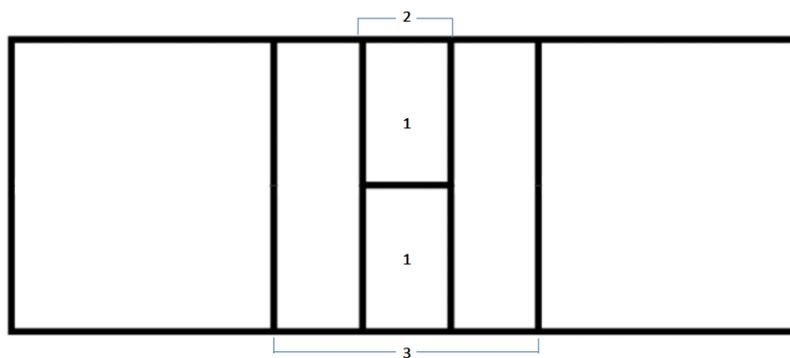


Abbildung 2: Schematisch selbst konstruierte Zählkammer

1: Zwei eingravierte Zählnetze 2: Mittelsteg 3: Plangeschliffener/polierter Bereich

Ein Zählnetz hat unterschiedliche Ebenen, deren Verwendung von den zu bearbeitenden Organismen abhängt. Jede Ebene wird mit einem Buchstaben bezeichnet und hat eine andere Quadratstruktur. Das Zählnetz besteht aus insgesamt:

- 9 Großquadraten= 1 mm^2
- davon vier Eckquadrate= L-Quadrate (Leukozytenzählung) unterteilt in 16 Quadrate mit Seitenlänge= $0,25 \text{ mm}$

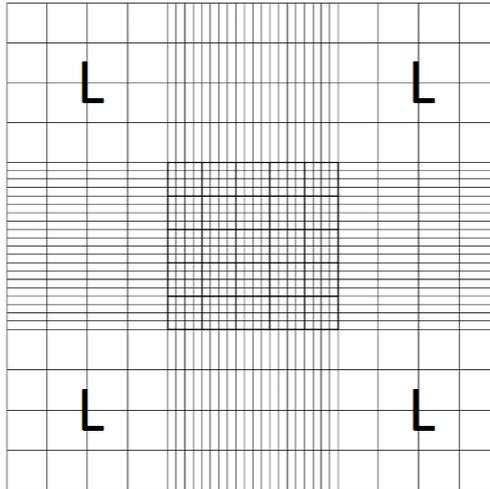


Abbildung 3:schematisch selbst konstruiertes Zählnetz mit verschiedenen Ebenen

Das in Abbildung 4 dargestellte mittlere Großquadrat gliedert sich in:

- 25 Gruppenquadrate mit Seitenlänge = $0,2 \text{ mm}$.
- Unterteilung der Gruppenquadrate in:
 - 16 Kleinquadrate mit Seitelänge = $0,05 \text{ mm}$ und einer Fläche von $0,0025 \text{ mm}^2$.
- 5 diagonal liegende Gruppenquadrate des mittleren Großquadrates werden für die Thrombozyten- und Erythrozytenzählung (daher als E-Quadrate bezeichnet) verwendet.

In dieser Untersuchung werden die E-Quadrate für die Auszählung von Bakterien, Hefen und Schimmelpilzen genutzt. Alle Gruppenquadrate des Mittelquadrates haben dreifache Grenzlinien, wovon die mittlere Linie darüber Auskunft gibt, ob bestimmte Zellen mitzuzählen sind oder nicht. In der Lebensmittelmikrobiologie und in der vorliegenden Untersuchung für die Einstellung des Zelltiters werden die 5 diagonal, hintereinander liegenden Gruppenquadrate ausgezählt und aufsummiert.

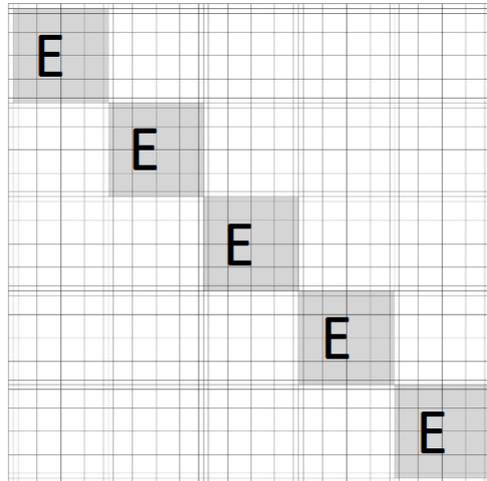


Abbildung 4: Schematisch selbst konstruiertes mittleres Großquadrat mit diagonal liegenden Gruppenquadraten

Vor der Nutzung der Kammer wird ein Deckglas auf den Trägerstegen befestigt.

Die mit der 10^{-2} Verdünnung befüllte Zählkammer wird auf dem Objektträger des Mikroskops befestigt und der Phasenkontrast PH₂ eingestellt. Das 40er Objektiv wird gewählt und mittels Grob- und Feintrieb die richtige Ebene der auszuzählenden Gruppenquadrate des mittleren Großquadrats gesucht. Von oben links nach unten rechts werden die fünf Quadrate visuell ausgezählt und die Gesamtkeimzahl (GKZ) für die 10^{-2} Verdünnung ermittelt.

3.5.4 Berechnung des Zelltiters für 50-150 Kolonien auf der Platte

Folgende allgemeingültige Gleichung gilt für die Ermittlung von Keimen pro μl Volumen und für die Einstellung des Zelltiters für diese Untersuchung:

$$\text{Teilchen pro Volumen} = \frac{\text{ausgezählte Teilchen}}{\text{ausgezählte Fläche (mm}^2\text{)} \cdot \text{Kammertiefe (mm)} \cdot \text{Verdünnung}}$$

Ausgezählte Fläche: 5 Gruppenquadrate entsprechen $0,2 \text{ mm}^2$

Kammertiefe: $0,1 \text{ mm}$

Verdünnung: 10:200

Das Ziel für die Produktivitätsprüfung jedes untersuchten Nährmediums für das Plattengussverfahren ist es, für jeden Zielkeim, der auf dem zu untersuchenden Nährmedium wächst, bei der Auswertung zwischen 50 und 150 Kolonien auszählen zu können. Dafür muss das Zellvolumen von $1 \text{ ml} = 1000 \mu\text{l}$, wie für das Plattengussverfahren vorgegeben, beim Beimpfen der Petrischale immer zwischen 50 und 150 Zellen liegen. Im Vorfeld muss daher mit Sorgfalt der Zelltiter für 50 bis 150 Zellen pro $1 \text{ ml} = 1000 \mu\text{l}$ berechnet werden.

Es werden 200 ml Zellsuspension aus Milch hergestellt, da diese im weiteren Verlauf auf 82 Cryoröhrchen (entspricht einem für Cryoröhrchen vorgesehenem Rack) pipettiert werden, die ein Fassungsvermögen von 2 ml aufweisen. Damit die Milchsuspension inklusiver Zellen definitiv für 82 Röhrchen ausreicht wurde das Milchvolumen von 200 ml gewählt.

Die Gleichung wird für ein Volumen von 200 ml Milch für jeden Keim angeglichen, um beim späteren Pipettieren von 1 ml aus den Cryoröhrchen 50 bis 150 Kolonien auf der Platte auszählen zu können (siehe Anhang V).

3.5.5 Überführen der 200 ml Zellsuspension in Cryoröhrchen

Der errechnete Zelltitel für 200 ml entrahmte Milch (3% Fett) wird unter der Sterilbank in die Milch pipettiert (Milch und Zellen werden in einer sterilen 1L Flasche suspendiert). Die Suspension wird für zwei Minuten unter ständigem Schwenken homogenisiert und im Anschluss mittels einer 10 ml Glaspipette und zugehörigem Accu-jet auf 82 Cryoröhrchen verteilt, die vorher in einem dafür vorgesehenem Rack platziert werden. Es ist darauf zu achten, bei jedem erneuten Pipettieren aus der Zellsuspension, die Flasche hinreichend zu schwenken, damit von einer möglichst gleichbleibenden Zellzahl in jedem einzelnen Röhrchen ausgegangen werden kann. Nach vollständigem Pipettieren wird das Rack umgehend bis auf -85°C tiefgefroren. Vorher wurde das Rack mit der vollständigen Stammbezeichnung und der DSM Nummer beschriftet. Die Lebendzellzahl wird nach Ermittlung ebenfalls hinzugefügt (siehe Anhang V).

3.5.6 Ermitteln der Lebendzellzahl

Es reicht nicht aus, sich ausschließlich auf die Berechnung des Zelltiters zu verlassen. Um die tatsächliche Lebendzellzahl zu ermitteln, werden von drei Röhrchen des Racks Verdünnungsreihen hergestellt. Die Röhrchen werden aus dem Rack diagonal von oben links nach unten rechts gewählt und mit den Buchstaben A (Anfang), M (Mitte) und E (Ende) beschriftet. Für jeden Buchstaben werden zwei Verdünnungsstufen ($10^{-1}/10^{-2}$) angelegt und anschließend auf TSA-Platten ausgespatelt. Drei Cryoröhrchen (Anfang, Mitte, Ende) entsprechen sechs Natrium Chlorid (NaCl)-Verdünnungsröhrchen (für 10^{-1} und 10^{-2} Verdünnungen) sowie sechs TSA-Platten, auf denen die 10^{-1} und 10^{-2} Verdünnung jedes Cryoröhrchens pipettiert und für 24 Stunden bei 37°C bebrütet werden.

Auswertbar sind alle Platten die eine GKZ >50 KbE/ml und <150 KbE/ml aufweisen. In der Regel fallen die 10^{-2} Verdünnungen in die vorgegebene Spanne. Die Kolonien werden ausgezählt und notiert. Je nach verwendeter Verdünnungsstufe werden die Kolonien auf den Zelltiter hochgerechnet (ausgehend von der jeweiligen Verdünnungsstufe). Der mittlere Zelltiter ergibt sich aus dem Mittelwert der einzelnen Zelltiter der drei Röhrchen A, M und E und gilt für alle Röhrchen des

Stammes eines hergestellten Racks. Mit Hilfe des Zelltiters lassen sich die benötigten Verdünnungen der unterschiedlichen Zielkeime der Nährmedien für das Plattengussverfahren bestimmen. Je nach Keim entstehen unterschiedliche Mischverhältnisse, die bei den folgenden Validierungen der Nährmedien für die Zielkeime unverzichtbar sind, um eine GKZ $>50\text{KbE/ml}$ $<150\text{KbE/ml}$ auf einer Platte zu sichern. Pro Zielkeim werden die Mischverhältnisse für 50 ml Zellen berechnet.

Das Unterkapitel 3.5 wurde in Anlehnung an die DIN EN ISO 11133:2015-02: Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser–Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien–Anhang B: Herstellung einer Referenz-Stammkultur und einer Gebrauchskultur, pp. 42-43–Anhang C: Ablaufschemata der Verfahren zur Leistungsprüfung, pp. 44-48 verfasst und auf Unterkapitel 3.6 sowie 3.7 angewendet.

3.6 Probenvorbereitung und Herstellen der Zellkulturen für Milchsäurebakterien

Für das optimale Wachstum der Milchsäurebakterien ist das Schaffen einer mikroaerophilen Umgebung erforderlich, welche mit Hilfe von Anaerobtopfen und dazugehörigen Anaerobbeuteln aufgebaut wird. Der Vorgang des Animpfens gleicht dem der Coliformen und Enterobacteriaceae. Die angeimpften Milchsäurebakterien werden in ein Becherglas gestellt und mit diesem in einem Anaerobtopf platziert. Ein Anaerobbeutel wird geöffnet und zu den Mikroorganismen in den Anaerobtopf gestellt. Der Anaerobtopf muss innerhalb von 30 Sekunden geschlossen werden, um die geeignete Gasatmosphäre für ein mikroaerophiles Wachstum gewährleisten zu können. Der Anaerobtopf wird bei 30°C für 72 Stunden inkubiert (siehe Anhang VI).

Für die weiterführende Vorgehensweise nach der Inkubationszeit siehe 3.5.2ff.

3.7 Probenvorbereitung und Herstellen der Zellkulturen für Hefen und Schimmelpilze

Aus den Gebrauchskulturen werden Ausstriche auf DG18 und SDA gemacht und bei 20°C für fünf Tage inkubiert. Schimmelpilze müssen grundlegend von bewachsenen Platten abgeschwemmt werden, um Verdünnungen herstellen zu können.

Der Vorgang des Abschwemmens findet unter der sterilen Werkbank statt. Eine stark bewachsene Platte wird geöffnet und ein Röhrchen mit 0,9% NaCl Lösung hinzugefügt. Mit einem Einwegspatel wird der Schimmelpilz mit der NaCl Lösung mehrere Minuten homogenisiert, bis eine einheitlich schwarze Schimmelsuspension entsteht. Die Suspension wird zurück in das Reagenzglas pipettiert. Für den weiteren Verlauf, der sich mit der Vorgehensweise ab dem Zeitpunkt nach der Inkubationszeit mit Enterobakterien und Milchsäurebakterien deckt, siehe 3.5.2ff.

3.8 Messmethodik/Analytik

Die präzise Herstellung der Zellkulturen, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben wurde, ist die Grundvoraussetzung und somit der erste Schritt für einen erfolgreichen Produktivitätsnachweis der Nährmedien. Die Reihenfolge der Versuchsschritte im Labor, setzt sich wie folgt zusammen:

1. Welches Nährmedium soll überprüft werden?
2. Welche Ziel- und Nichtzielkeime sind dafür erforderlich?
3. Herstellung der Ziel- und Nichtzielkeime.

Es ist zeitlich miteinzuplanen, wie lange die angeimpften Gebrauchskulturen erstmals im Brutschrank verweilen müssen, bis Wachstum festzustellen ist. Anschließend kann wie beschrieben die Einstellung des endgültigen Zelltiters für die einzufrierenden Stämme in Milchsuspension erfolgen.

Allgemeingültige Vorgehensweise für ein Nährmedium:

1. Durchführung der Untersuchung des Aufschmelzprozesses der Methode I für das ausgewählte Nährmedium (Methode II und III werden an den Folgetagen durchgeführt).
2. Durchführung der für die Standzeiten der Routineprüfung (über neun Stunden) vorgesehenen Untersuchung für dasselbe Nährmedium, welches an den Vortagen bezüglich des Aufschmelzprozesses überprüft wurde.
3. Fortsetzung der Durchführung der Routineprüfung (erneute neun Stunden).
4. Die Auswertung erfolgt je nach Inkubationszeit zwischen den einzelnen Messungen.

3.8.1 Durchführung des Plattengussverfahrens im Rahmen eines Produktivitätsnachweises für Nährmedien:

Der Ablauf der Versuchstage gilt für alle fünf untersuchten Nährmedien gleichermaßen. Für jedes Nährmedium werden die Zielkeime aus dem Gefrierschrank in ein -20 °C Rack zum Auftauen gestellt. Der Anzahl der Zielkeime entsprechend werden 250 ml Flaschen mit dem errechneten Peptonwasser-Anteil mittels einer Glaspipette befüllt. Für jeden Stamm des zu überprüfenden Nährmediums werden insgesamt 50 ml Zellsuspension hergestellt, die aus Peptonwasser und Zellen besteht. Ein Volumen von 50 ml gewährleistet ein hinreichendes Zellsuspensionsvolumen für einen gesamten Versuchstag. (siehe Anhang VI).

3.8.1.1 Zell- und PW-Anteil für 50 ml Zellsuspension bestimmen

Der Mittelwert des Zelltiters eines Stammes gibt Auskunft über das erforderliche Mischverhältnis. Jedes Mischverhältnis hat einen Zellanteil und einen Pufferlösungsanteil.

Beispiel Mischverhältnis 1:5 auf 50 ml

Wurde beispielsweise ein mittlerer Zelltitert von $5,27 \times 10^4$ KbE/ml für den hergestellten Stamm *E.Coli* ermittelt, ist nach Auftauen des Cryoröhrchens *E.Coli* ein Mischverhältnis von 1:5 (Zellen:Peptonwasser) auf 50 ml herzustellen, um das Wachstum von 50 – 150 Kolonien auf einer Platte zu sichern. Die 40 ml Peptonwasser können bereits am Vortag der Untersuchung in eine sterile 250 ml Glasflasche pipettiert werden und in einem Kühlschrank gelagert werden. Der Zellanteil wird ebenfalls auf die ermittelte Verdünnungsstufe angeglichen. Hierbei ist der Exponent des Zelltiters zu berücksichtigen. Die Zelltitert der selbst hergestellten Gefrierkulturen liegen zwischen 10^4 KbE/ml und 10^5 KbE/ml. Aus dem Inhalt eines aufgetauten Röhrchens werden die Verdünnungen des Zellanteils bestimmt. Bei 10 ml erforderlichem Zellanteil mit einer Keimdichte von 10^4 KbE/ml, die in einem gefrorenem Röhrchen eingestellt ist, wird zweimal verdünnt, sodass man bei der vorgeschriebenen Menge des Inokulums von 1,0 ml, auf die 100er Verdünnung und eine geeignete Kolonieanzahl erreicht. Je nachdem, wie das Mischverhältnis der jeweiligen Keimsuspensionen ausfällt, kann es durchaus vorkommen, dass man aus einem Cryoröhrchen mehrere Verdünnungen gleicher Verdünnungsstufen anlegen muss, um das gewünschte Zellanteil-Volumen zu erhalten.

Der Zellanteil wird je nach erforderlichem Zellvolumen mit einer Eppendorf Pipette (100-1000µl) oder einer 10 ml Glaspipette zu dem Peptonwasser-Anteil pipettiert und bis zum Verwendungzeitpunkt kühlgestellt. Im Vorfeld wird jede erforderliche leere Petrischale für die stündliche Messung mit Art des Nährmediums, Zielkeim, Standzeit (t_0 bis t_{18}), Flaschennummer (1, 2, 3 aufgrund der Dreifachbestimmung) und Volumen (250 ml/500 ml) beschriftet, woraus je nach Vorgabe der Zielkeimanzahl unterschiedlich viele beschriftete Plattenstapel entstehen, die pro Messung beimpft werden müssen.

3.8.1.2 Ansetzen der leeren Petrischalen

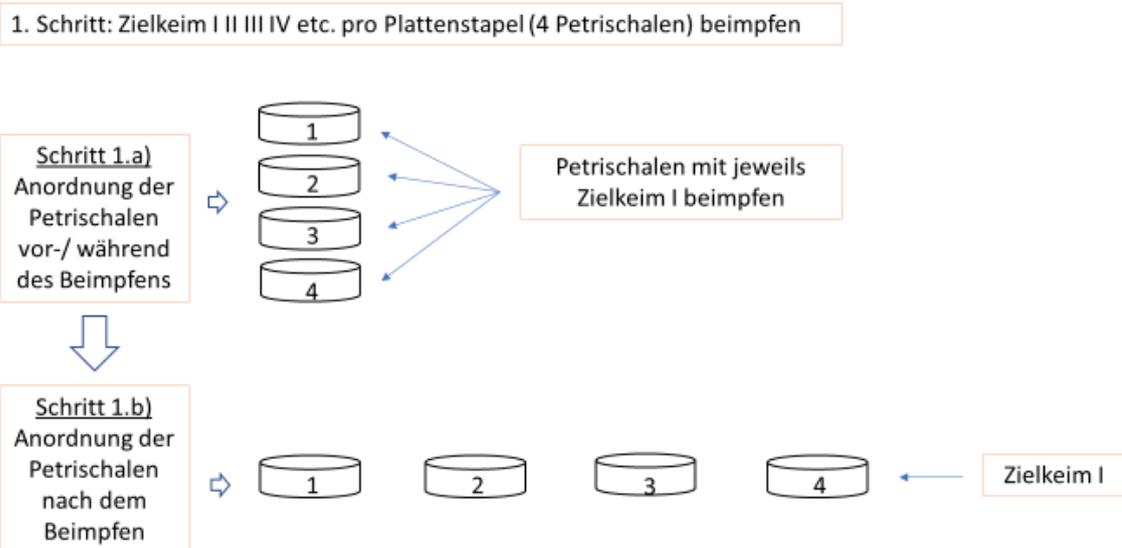


Abbildung 5: Stapelsystem vor dem Ansetzen der Petrischalen

Jeder Stapel der beschrifteten Petrischalen, die für die erste Messung (immer t_0) eingesetzt werden, sind, von links nach rechts, in einer Linie unter die Sterilbank zu stellen. Die vorerst in die Kühlung gestellten sterilen 250 ml Flaschen mit 50 ml Zellsuspension eines Zielkeims, die ebenso mit Zielkeim, Mischverhältnis und Volumen zu beschriften sind, werden hinter den zugehörigen beschrifteten Zielkeim-Stapel, der bereits unter der Werkbank platziert ist, gestellt. Die erste 250 ml Flasche, die den ersten Zielkeim enthält, wird ausgiebig geschwenkt, bevor in alle vier Petrischalen des zugehörigen ersten Stapels mit gleichem beschriftetem Zielkeim, jeweils 1 ml Zellsuspension pipettiert wird. Ist der erste Stapel angesetzt wird er aufgelöst, indem der Reihe nach von oben nach unten, die Platten von links nach rechts nebeneinander angeordnet werden.

2. Schritt: Beimpfte und neu angeordnete Petrischalen-Stapel mit Agar XY gießen

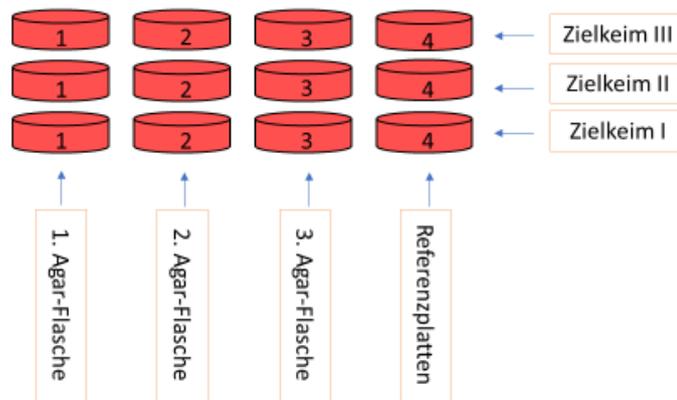


Abbildung 6: Stapelsystem der angesetzten Petrischalen vor dem Gießen

Petrischale 1-3 sind Anfang dreier neuer Plattenstapel, die sich nun nicht mehr, nach dem Zielkeim, sondern nach der Flaschenanzahl für die Dreifachbestimmung richten. Für eine Untersuchung mit Dreifachbestimmung sind drei Versuchsreihen pro Durchlauf erforderlich. Angewandt auf die Validierung eines Nährmediums sind drei zu testende Agar-Flaschen desselben Nährmediums und dergleichen Charge für ein glaubwürdiges statistisches Ergebnis nötig. Die Platten mit den unterschiedlichen Zielkeimen des Nährmediums werden vor dem Gießen pro Flasche gestapelt. Alle weiteren Zielkeimstapel, die noch unter der Werkbank stehen, werden wie für den ersten Zielkeim mit zugehörigem Plattenstapel beschrieben angesetzt und nach der Reihe auf die neuen Agar-Flaschen Stapel (1. bis 3. Flasche) verteilt. Die Referenzplatten aus den Zielkeimstapeln bilden nach dem Ansetzen einen vierten Stapel, der nicht mit dem zu testenden Nährmedium gegossen wird, sondern mit dem jeweiligen Referenzmedium. Alle vier Stapel (für die 1. Flasche, 2. Flasche, 3. Flasche und Referenz-Agar-Flasche) werden aus der Sterilbank auf den QS-Arbeitsplatz gestellt. Vor jeder Flasche befinden sich nun die angesetzten Petrischalen mit den unterschiedlichen Zielkeimen für das zu testende Nährmedium. Die Zeitpanne zwischen Ansetzen und Gießen muss so gering wie möglich gehalten werden, um die Teilung der Zellen auf den Petrischalen möglichst klein zu halten (siehe Anhang VI).

3.8.2 Beschriebene Vorgehensweise angewendet auf die durchgeführten Untersuchungen des Aufschmelzprozesses und der Untersuchung der Routineprüfung

Im Folgenden werden die einzelnen Untersuchungen zum Aufschmelzprozess und zur Routineüberprüfung, die alle immer für ein Nährmedium durchzuführen sind soweit beschrieben, bis es nach zuvor beschriebenem Schema (Zell- und Peptonwasser-Anteil für 50 ml Zellsuspension bestimmen, Ansetzen der leeren Petrischalen) zum Gießen und Inkubieren der angeimpften Platten und der darauffolgenden Auswertung kommen kann.

3.8.2.1 *Aufschmelzmethode 1 (gemäß DIN EN ISO 11133):*

Untersuchung des Aufschmelzprozesses des Agars während sich das WB auf 95°C erhitzt

Für die Untersuchung des Aufschmelzprozesses wird ein Untersuchungszeitraum von vier Stunden angesetzt (t_0 - t_2). Das Zeitintervall zwischen den Messungen beträgt zwei Stunden, sodass ausgehend vom Nullpunkt, der ersten Messung t_0 , nach 2 Stunden Verweilzeit im Trockenschrank t_1 und erneut nach zwei Stunden Verweilzeit im Trockenschrank t_2 gemessen wird. Bevor das Wasserbad eingeschaltet wird, werden die Agar-Flaschen aus der Kühlzelle entnommen und in das Wasserbad gestellt. Die Anzahl der Agar-Flaschen hängt von den Volumina der zu prüfenden Agar-Flaschen (500 ml oder 250 ml) und der Anzahl der Zielkeime ab. Je mehr Zielkeime auf die Platten geimpft werden, desto mehr Platten und Agar-Flaschen werden benötigt. Im Vorfeld ist abzuschätzen, wie viel Liter Agar für einen Versuchstag benötigt werden, sodass für alle zeitlich festgelegten Versuchsslots, in denen gegossen wird, ausreichend Agar zur Verfügung steht. Erfahrungsgemäß werden für eine Dreifachbestimmung drei bis sechs 500 ml Agar-Flaschen bzw. sechs bis neun 250 ml Agar-Flaschen benötigt. Die Flaschen werden mit den Zahlen 1-3 nummeriert, damit sie beim Gießen den mit Zellen befüllten Plattenstapeln zugeordnet werden können. Wie bereits erwähnt befindet sich auf jeder Petrischale auch immer die korrespondierende Flaschennummer. Nachdem das Wasserbad eingeschaltet wurde, wird die genaue Uhrzeit notiert. Sobald die Temperatur des Wasserbades die Temperatur von 95°C erreicht hat, wird erneut die Uhrzeit notiert und in Abständen von 10 Minuten der Aufschmelzstatus überprüft. Die Flaschen gelten als aufgeschmolzen sobald der Agar bei manuellem Rotieren und gegen das Licht halten, keinen Widerstand durch noch nicht aufgeschmolzene Agar-Klumpen oder starke Bläschenbildung am inneren Rand der Flasche aufweist. Die Agar-Flaschen werden bei Raumtemperatur abgekühlt. Sobald die herausgenommenen Agar-Flaschen eine Temperatur von 47°C erreicht haben, wird die erste Messung t_0 durchgeführt. Die Uhrzeit beim Erreichen der Temperatur von 47 °C ist zu notieren. Nach der ersten Messung t_0 , werden die Flaschen in den Trockenschrank überführt, der die Flaschen

auf einer konstanten Temperatur von 47°C hält. Messung t_1 und t_2 erfolgen nach derselben Vorgehensweise.

Zu beachten beim Gießen des Agars in die Petrischalen:

1. Agar-Flaschen 1,2,3 werden in korrespondierende Petrischalenstapel Nr.1,2,3 gegossen.
2. Petrischalen werden mit ca. 15 ml-20 ml Agar befüllt.
3. Achtförmiges Kreisen des gegossenen Petrischalenstapels erforderlich, um Mikroorganismen gleichmäßig zu verteilen.
4. Für eine geringere Trocknungszeit ist eine pyramidenartige Anordnung der Platten hilfreich.
5. Getrocknete Platten werden kopfüber in ein Rack gestellt.

(siehe Anhang VI)

3.8.2.2 Aufschmelzmethode 2 (abweichend von der DIN EN ISO 11133)

Untersuchung des Aufschmelzprozesses der Agar-Flaschen bei der Temperatur von 95°C (WB ist bereits auf t_{max} erhitzt)

Das Wasserbad wird eingeschaltet. Die zu testenden Agar-Flaschen werden erst beim Erreichen von 95 °C dem Wasserbad zugesetzt. Die Agar-Flaschen werden aufgeschmolzen und aus dem Wasserbad entnommen, sobald sie die gewünschte Konsistenz haben. Erreichen die Agar-Flaschen die Temperatur von 47 °C folgen die Schritte gemäß des oben genannten Aufschmelzprozesses.

3.8.2.3 Aufschmelzmethode 3 (abweichend von der DIN EN ISO 11133)

Untersuchung die Agar-Flaschen über den Aufschmelzprozess hinaus im WB stehen lassen

Die Agar Flaschen über einen längeren Zeitraum bei 95°C im Wasserbad stehen zu lassen, obwohl sie bereits aufgeschmolzen sind, soll die Widerstandsfähigkeit und gleichermaßen die Qualitätsmerkmale des Agars durch die Bestimmung der P_R -Werte pro Messdurchlauf testen. Darüber hinaus soll, wie bei den beiden vorigen Methoden die Möglichkeit bestehen, bereits beim Aufschmelzen der Nährmedien prozessoptimierende Maßnahmen einzuführen, die die Produktivität des Agars so lang wie möglich über 50% hält. Diese Untersuchung wird als Pilotprojekt angesehen, wodurch aus materialeinsparenden Gründen keine Dreifachbestimmung durchgeführt wird und ausschließlich drei Agar-Flaschen für drei Messdurchläufe verwendet werden. Die Agar-Flaschen werden vor Inbetriebsetzung des Wasserbades im Wasserbad platziert. Das Wasserbad wird eingeschaltet und auf 95°C erhitzt (siehe dazu Anhang VII).

Sobald der Agar aufgeschmolzen ist wird er für weitere 30 Minuten im Wasserbad belassen. Anschließend wird die erste Agar-Flasche aus dem Wasserbad herausgenommen und wie gehabt bis

auf 47 °C abgekühlt. Für die Agar-Flaschen 2 und 3 wird analog verfahren. Betrachtet wird insgesamt also ein Zeitraum von 1,5 Stunden, indem die Agar-Flaschen über den Aufschmelzprozess hinaus Temperaturen von 95°C ausgesetzt sind. Sobald die erste Agar-Flasche abgekühlt ist, findet Messung t_0 statt. Der Agar der Flasche 1 wird in die beschrifteten und bereits angesetzten Petrischalen gegossen. Flaschen 2 und 3 folgen entsprechend für t_1 und t_2 , sobald sie die Temperatur 47 °C erreicht haben.

3.8.2.4 Routinebegleitende Untersuchung der Standzeiten von Nährmedien über einen Zeitraum von maximal 34 Stunden

Vor den zwei aufeinanderfolgenden Versuchstagen wird sichergestellt, dass das Wasserbad so programmiert ist, dass es sich automatisch um 4:00 Uhr morgens einschaltet. Zwischen 5:00 Uhr und 6:00 Uhr morgens hat das Wasserbad seine gewünschte Temperatur von 95°C erreicht und zwischen 7:00 Uhr und 7:30 Uhr sind die Flaschen aufgeschmolzen und werden parallel mit den Agar-Flaschen, die die Routinelabormitarbeiter verwenden aus dem Wasserbad genommen und abgekühlt. Alle Agar-Flaschen des zu untersuchenden Mediums sowie die benötigten Referenz Agar-Flaschen werden für beide Versuchstage am Vorabend in das Wasserbad gestellt. Für die stündliche Messung für die Überprüfung der Standzeiten des Agars im Trockenschrank (maximal 34 Stunden), werden 12 Agar-Flaschen mit einem Volumen von 500 ml benötigt. Die ersten sechs Agar-Flaschen, die für den ersten Versuchstag bestimmt sind, werden mit einem kleinen „a“ hinter der Flaschennummer gekennzeichnet, die restlichen sechs Agar-Flaschen mit einem kleinen „b“. Durch die Indizierung werden die Agar-Flaschen des ersten Versuchstages von den Agar-Flaschen des zweiten Versuchstages unterschieden. Bei einem Agar Volumen von 250 ml sind 24 Agar-Flaschen erforderlich, die analog nummeriert werden.

Die mikrobiologische Routinearbeit beginnt um ca. 9:30 Uhr mit dem Gießen der ersten Platten. Zu diesem Zeitpunkt müssen die Cryoröhrchen, die aus dem – 80 °C Schrank in die -20 °C Kühlblöcke gestellt werden (7:00 Uhr), aufgetaut (abgeschlossen um 8:30 Uhr) werden, daraus die Verdünnungen mit den jeweiligen Mischverhältnissen unter der Sterilbank für ein Volumen von 50 ml hergestellt (abgeschlossen um 9:20 Uhr) und die gesamten Petrischalen für die vollständigen zwei Versuchstage beschriftet sein. Der erste Versuchstag besteht aus neun Messungen in stündlichem Abstand beginnend von 9:30 Uhr bis 17:30 Uhr. Die Versuchsdurchläufe sind auf den jeweiligen Petrischalen beginnend mit t_0 und abschließend mit t_8 gekennzeichnet. Wie bei den Aufschmelzprozessen werden die ersten drei Flaschen (1a, 2a, 3a) direkt für die erste Messung um 9:30 Uhr (t_0) verwendet. Die übrig gebliebenen Flaschen des restlichen Versuchstags und des zweiten Versuchstags werden in den Trockenschrank gestellt. Nach t_0 bleibt eine knappe Stunde Zeit, um t_1 , die zweite Messung vorzubereiten. Nach dem Gießen werden die Agar-Flasche 1a-3a

zu den anderen Agar-Flaschen in den Trockenschrank gestellt und die Sterilbank mit Bacillol und ggf. mit Khorsolintüchern gereinigt. Anschließend werden die für die zweite Messung beschrifteten unterschiedlichen Zielkeimmikroorganismen-Stapel nebeneinander unter der Sterilbank platziert. Zehn Minuten nach jeder vollen Stunde werden nacheinander die sterilen Glasflaschen samt der 50 ml hergestellten Zellsuspension der verschiedenen Zielkeimmikroorganismen zu den Stapeln aus Petrischalen gestellt, wobei immer nur eine mit Mikroorganismen gefüllte Flasche unter der Sterilbank steht. Auch hier soll die Zellteilung, die möglicherweise durch das zeitgleiche Herausstellen der Glasflaschen mit der Zellsuspension aus der Kühlung entstehen könnte, vermieden werden.

Das stündliche Ansetzen der jeweiligen Zielkeime und das darauffolgende Gießen des zu prüfenden Agars, erfolgt nach demselben Schema (siehe Abbildungen 5 und 6).

Bis zur letzten Messung um 17:30 Uhr (t_8) sind zwei große Racks und ein kleines Rack gefüllt. Je nach Nährmedium werden die Racks für die vorgegebene Inkubationszeit und Temperatur in den richtigen Brutschrank gestellt und bebrütet. Die für den zweiten Versuchstag vorgesehenen, aufgeschmolzenen Agar-Flaschen bleiben über Nacht im Brutschrank. In dem Zeitraum zwischen 17:30 Uhr-9:30 Uhr des Folgetages, finden innerhalb der 34 Stunden keine Messungen statt. Versuchstag zwei läuft exakt, wie Versuchstag eins ab, wobei ausschließlich neue Referenz Agar-Flaschen aufgeschmolzen werden müssen und frische 50 ml Zellsuspensionen für jeden Zielkeim herzustellen sind, um die übrig gebliebenen Messungen t_9 - t_{17} durchzuführen. Der zu testende Agar befindet sich noch vom Vortag im Trockenschrank (Beschriftete Flaschen gekennzeichnet mit „b“ entsprechen dem 2. Versuchstag).

Das Unterkapitel 3.8 wurde in Anlehnung an den Leitfaden der ALTS-Arbeitsgruppe „Hygiene und Mikrobiologie“ zur Leistungsprüfung von Nährmedien nach DIN EN ISO 11133-2015-02 in amtlichen Untersuchungseinrichtungen (Herstellung/Zukauf für den Eigenbedarf), pp. 3-11 verfasst.

3.9 Auswertung und Datenanalyse sowie Erstellung der Regelkarten

Sobald die Bebrütungszeit der Gussplatten (unabhängig von der jeweiligen Untersuchung) vorüber ist, werden die Racks auf einen Auswertungswagen gestellt. Die Auswertung der gegossenen Platten erfolgt durch händisches Auszählen mit Hilfe eines Zähltesches und Zählscheiben. Je nach Morphologie der Kolonien wird das Hilfsmedium gewählt (Anhang VII).

3.9.1 Auszählen und Bestimmen der Koloniezahl jeder Platte

Die Kolonien sind mit einem Edding auf dem Boden der Petrischale zu markieren und durch einen Klicker, der das Zählen erleichtert, auszuzählen. Die ausgezählte Kolonienanzahl wird auf dem Boden der Petrischale notiert.

Die ersten drei Plattenstapel von der ersten Messung t_0 sowie die dazugehörigen Platten des Referenzmediums, die für jeden Zielkeim für die Bestimmung des Produktivitätsverhältnisses erforderlich sind, müssen aus dem Rack genommen werden. Auf allen Plattenebenen der drei Petrischalen-Stapel befindet sich derselbe Zielkeim, sodass die ersten vier Platten, die oben aufliegen von links nach rechts gesehen ausgezählt werden können (1., 2., 3. Flasche eines Zielkeims + Referenzmedium für alle drei Flaschen aufgrund der Dreifachbestimmung). Anschließend wird erneut die nächste oben aufliegende Platte von jedem der drei Stapel zum Auszählen nebeneinandergelegt. Nun handelt es sich im Gegensatz zu den drei vorher ausgezählten Platten um einen anderen Zielkeim. Die drei auszählenden Platten beinhalten jedoch unter sich denselben Zielkeim (siehe Anhang VII). Die zu den aktuellen drei Platten passende Referenzplatte wird ebenfalls ausgezählt und mit den Kolonienanzahlen der zu testenden Platten ins Verhältnis gestellt.

Aus diesem Produktivitätsverhältnis zwischen ausgezählten Kolonien des zu testenden Mediums und ausgezählten Kolonien des Referenzmediums ergibt sich der P_R -Wert für die Messung t_0 . Sind alle drei Plattenstapel mit zugehörigen Referenzplatten ausgezählt, wird dieses Vorgehen für Messungen t_1 - t_8 und am Folgetag ab Messung t_9 bis t_{17} für die Routineprüfung oder für t_1 und t_2 für die Aufschmelzprozesse fortgeführt. Die ausgezählte Koloniezahlen pro Messung lassen sich direkt in eine bereits selbst vorbereitete digitale Tabelle eintragen, sodass sich schnell der P_R -Wert pro Zeitintervall ermitteln lässt und eine erste Einschätzung der Produktivität vorgenommen werden kann (siehe Tabelle: 2ff.).

3.9.2 Erstellung einer Regelkarte

Für jeden Zielkeim pro getesteter Agar-Flasche wird eine Tabelle mit der Anzahl ausgezählter Kolonien des getesteten Nährmediums, dem Produktivitätsverhältnis des getesteten Mediums und der Kolonienzahl des Referenzmediums (in Form des P_R -Wertes) sowie den Bereichswerten, die sich aus dem Produktivitätsverhältnis ergeben, pro Testdurchlauf (i) erstellt. Aus dieser Tabelle ergibt sich die Regelkarte, aus der graphisch das Ergebnis des Produktivitätsnachweises pro Zielkeim eines Nährmediums zu entnehmen ist. Alle Daten aus den drei Tabellen eines Zielkeims und den dazugehörigen Regelkarten werden in einer vierten Tabelle sowie einer vierten Regelkarte als Mittelwert der Dreifachbestimmung zusammengefasst, die in dieser Form im Ergebnisteil vorgestellt sind. Der Umfang einer Tabelle bzw. der dazugehörigen Regelkarte richtet sich nach dem Untersuchungsumfang. Je nach Untersuchung, ob Aufschmelzprozess oder Standzeitenkontrolle, werden 3 (t_0, t_1, t_2) bis 18 (t_0-t_8 erster Versuchstag und t_9-t_{17} zweiter Versuchstag) Messungen in verschiedenen Zeitintervallen, innerhalb einer Regelkarte durchgeführt.

Die Anwendung von Regelkarten setzt ein standardisiertes Inokulum voraus. Zur Berechnung des Mittelwerts eines Prüfereignisses i ist x_i KbE/1,0 ml für das Prüfmedium und y_i KbE/1,0 ml für das Referenzmedium zu bestimmen.

Berechnung des P_R -Wertes:

Der P_R -Wert ergibt sich aus dem Produktivitätsverhältnis des Ereignisses i .

$$r_i = \frac{x_i}{y_i}$$

Berechnung des mittleren Bereichs:

Für die Bestimmung des mittleren Bereichs (\bar{R}) der P_R -Werte ist folgende Gleichung anzuwenden:

$$\bar{R} = \left(\frac{1}{n-1} \right) \sum_{i=1}^n |r_i - r_{i-1}|$$

Hierbei ist

x_i = Koloniezahl Prüfmedium

y_i = Koloniezahl Referenzmedium

i = die Nummer der Prüfung;

n = die Gesamtanzahl der Prüfungen;

r_i = der i -te P_R -Wert

Berechnung der Standardabweichung:

Die Standardabweichung (s) aus dem mittleren Bereich wird mit einer Konstanten (0,8865) oder deren reziproker Wert 1,128 bestimmt. Dies ist der von der American Society for Testing and Materials (ASTM) vorgegebene Wert für die resultierenden Prüfergebnisse.

$$(s) = 0,8865 \times \bar{R} = \frac{\bar{R}}{1,128}$$

Berechnung der Vertrauensgrenzen:

Mit der Standardabweichung werden die Vertrauensbereiche berechnet, in denen sich die einzelnen P_R -Werte bewegen dürfen. Das 95% Konfidenzintervall entspricht ($\pm 2s$) und das 99% Konfidenzintervall ($\pm 3s$).

3.9.3 Beispielberechnung zur Erstellung einer Regelkarte unter der Verwendung von 20 aufeinanderfolgenden Ergebnissen

In folgender Tabelle sind Werte von 20 hintereinander durchgeführten Überprüfungen aufgeführt. Es werden die Produktivitätsverhältnisse an einem nicht selektiven Agar dargestellt. Die Ergebnisse dienen der Erstellung der Regelkarte.

Unter der Tabelle sind exemplarische Rechenschritte für das Zustandekommen der Tabellenwerte aufgeführt. Für jeden Zielmikroorganismus eines Nährmediums wird eine zusammenfassende Tabelle mit darauffolgender Regelkarte erstellt. Mit den Werten der Tabelle werden weiterführende Berechnungen durchgeführt, deren Ergebnisse sich in der Regelkarte abzeichnen.

Ergebnisse von Prüfung Nummer (i)										
$i =$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
KBE (Prüfagar- x_i)	95	102	94	97	105	68	98	105	103	116
r_i	0,86	0,93	0,85	0,88	0,95	0,62	0,89	0,95	0,94	1,05
$ r_i - r_{i-1} $	-	0,07	0,08	0,03	0,07	0,33	0,06	0,06	0,01	0,01
$i =$	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
KBE (Prüfagar- x_i)	95	90	89	116	114	110	114	98	88	102
r_i	0,86	0,82	0,81	1,05	1,04	1,00	1,04	0,89	0,80	0,93
$ r_i - r_{i-1} $	0,19	0,04	0,01	0,24	0,01	0,04	0,04	0,15	0,09	0,13

Tabelle 2: Beispieltabelle für die Erstellung einer Regelkarte

Berechnung des mittleren PR-Wertes mit den Zahlenwerten der Beispieltabelle:

$$r = \sum \frac{r_i}{n} = \frac{0,86 + 0,93 + 0,85 + \dots + 0,80 + 0,93}{20} = \frac{18,16}{20} = 0,91$$

Berechnung der Bereichswerte:

Die Tabellenzeile ($R = |r_i - r_{i-1}|$) beschreibt Bereichswerte und stellt die absoluten Differenzen der sequenziellen Werte dar:

$$0,93 - 0,86 = 0,07, 0,85 - 0,93 = 0,08, 0,88 - 0,85 = 0,03 \text{ usw.}$$

Berechnung des mittleren Bereichs:

Der mittlere Bereich wird als erster Schritt für die Berechnung der Standardabweichung benötigt:

$$\bar{R} = \sum \frac{R_i}{n-1} = \frac{0,07 + 0,08 + 0,03 + \dots + 0,09 + 0,13}{19} = \frac{1,76}{19} = 0,09$$

Berechnung der Standardabweichung:

In die bereits aufgeführte allgemeingültige Gleichung für die Standardabweichung wird der errechnete Wert des mittleren Bereiches mitaufgenommen:

$$\text{Standardabweichung } (s) = 0,8865 * 0,09 = 0,082$$

Berechnung der Vertrauensgrenzen:

Mit dem errechneten Wert der Standardabweichung wird die 95%-Vertrauensgrenze und die 99%-Vertrauensgrenze ermittelt:

$$95\% - \text{Vertrauensgrenze} = 0,91 \pm 2 * 0,082 = 0,91 \pm 0,16 = 0,75 \text{ bis } 1,07$$

$$99\% - \text{Vertrauensgrenze} = 0,91 \pm 3 * 0,082 = 0,91 \pm 0,25 = 0,66 \text{ bis } 1,16$$

Das Unterkapitel 3.10 wurde in Anlehnung an die (DIN EN ISO 11133:2015-02, pp. 86-94) verfasst.

4. Ergebnisse

Die wichtigsten Ergebnisse der Validierung der untersuchten Nährmedien werden im folgendem Ergebnisteil tabellarisch und graphisch abgebildet. Die stündliche Untersuchung der Produktivität des Agars über maximal 34 Stunden (in den Abbildungen gekennzeichnet durch: Standzeiten) steht für die Beantwortung der Forschungsfrage im Vordergrund.

Die Ergebnisse der Aufschmelzprozesse erscheinen aufgrund des Umfanges für alle Nährmedien im Anhang A.

Es ist erwähnenswert, dass für TBX und VRBD ein Volumen von 500 ml und 250 ml für alle drei Aufschmelzprozesse durchgeführt wurde. Im Ergebnisteil werden ausschließlich die Volumina von 500 ml priorisiert, da diese während der Routinearbeit primär verwendet werden.

VRBL, YGC und MRS werden ausschließlich im Labor mit 250 ml Volumen gegossen, wodurch sich die Ergebnisse der Arbeit für diese Nährmedien auf ein Volumen von 250 ml beziehen.

Die Ergebnisse der restlichen Volumina mit 250 ml sind für alle Untersuchungen im Anhang A hinterlegt.

Mit Hilfe der Methode der pro Stunde durchgeführten Standzeitenkontrollen von VRBD wurden zwei unterschiedliche Hersteller von VRBD Agar miteinander verglichen. Der bisher im Labor der Eurofins Bio Testing Services Nord GmbH noch nicht verwendete VRBD Agar von Xebios, soll ggf. durch Oxoid ersetzt werden.

Die Oxoid VRBD Agar-Flaschen werden in der mikrobiologischen Routinearbeit täglich verwendet. Sie werden im Ergebnisteil vorgestellt. Die Ergebnisse der Xebios VRBD Agar-Flaschen hingegen nicht (siehe Anhang A).

Die Ergebnisse des Nährmediums VRBL sind aus Kapazitätsgründen im Anhang A aufgeführt.

Die Selektivität und Spezifität, die für einige Nährmedien (TBX, VRBD, VRBL) überprüft werden musste, fiel bei allen 5 Prüfnährmedien gleichermaßen unkritisch aus, wodurch sie im Ergebnisteil nicht dargestellt sind.

Alle Daten gehen aus einer Dreifachbestimmung hervor, sodass jede im Ergebnisteil aufgeführte Tabelle, Resultat dreier zusammengefasster Tabellen eines Zielkeims darstellt.

4.1 Routinebegleitende Leistungsprüfung von 500 ml TBX Agar-Flaschen über einen Zeitraum von maximal 34 Stunden

Die nachstehende Tabelle zeigt, dass innerhalb von zwei Untersuchungstagen ($i=1-9$ sowie $i=10-18$) alle P_R -Werte, pro Stunde, über 50 % lagen. Lediglich zwei Werte, der eine nach einer Lagerung des aufgeschmolzenen TBX-Agars im Trockenschrank von 7 Stunden, der andere nach einer Lagerung im Trockenschrank von 25 Stunden (entspricht aufgrund der 16 stündigen Pause zwischen Versuchstag I und Versuchstag II der Messung ($i = 13$)), bewegten sich näherungsweise mit einem P_R -Wert von 0,62 und einem P_R -Wert von 0,69 in Richtung des minimal zulässigen P_R -Werts von 0,50.

	Ergebnis von Prüfung Nummer (i) TBX 500 ml Flasche I bis Flasche III <i>E.Coli</i>								
i=	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Referenz	84	96	81	93	98	111	148	121	84
KBE (Prüfagar-xi)	83	90	82	82	87	84	92	104	74
r_i	0,99	0,94	1,01	0,89	0,89	0,76	0,62	0,86	0,88
$ r_i - r_{i-1} $		0,05	0,07	0,13	0,00	0,13	0,14	0,24	0,03
i=	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Referenz	100	83	93	113	97				
KBE (Prüfagar-xi)	82	83	82	78	81				
r_i	0,82	1,00	0,89	0,69	0,83				
$ r_i - r_{i-1} $	0,07	0,18	0,11	0,20	0,14				

Tabelle 3: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von *E.Coli* für TBX 500 ml beschreiben.

In der Regelkarte für die Standzeiten von TBX 500 ml *E.Coli* wird deutlich, dass sich alle P_R -Werte nach jeder stündlichen Überprüfung des Agars von TBX innerhalb von 80 % bis teilweise >100% befanden. Bis auf die zwei Werte auf die bereit aufmerksam gemacht wurde und die dennoch in keiner Weise die Leistung des Agars beeinträchtigen, kann ein Produktivitätsnachweis bis zu maximal 20 Stunden nach dem Aufschmelzprozess von TBX und der darauffolgenden Überführung der Agar-Flaschen in den Trockenschrank mit vorliegenden Ergebnissen bestätigt werden. Bei den Untersuchungen der Standzeiten konnte der 2. Untersuchungstag aufgrund firmeninterner Termine nur bis 13:30 Uhr durchgeführt werden, wobei nach vorliegenden Ergebnissen zu erwarten ist, dass der Agar seine Produktivität nach weiteren vier Messungen nicht verlieren wird. Die für 250 ml aufgeführten Ergebnisse können das bestätigen (siehe Anhang A). Es ist davon auszugehen, dass sich Volumina von 500 ml Agar-Flaschen und 250 ml Agar-Flaschen während der routinebegleitenden Standzeitenüberprüfung ähnlich verhalten. Die einzelnen Untersuchungsergebnisse der 250 ml TBX-Agar-Flaschen weisen zwar einige wenige, mehr im 60% Bereich liegende P_R -Werte, als bei einem Volumen von 500 ml auf, die jedoch nie unter 50% fallen, sodass TBX im Gesamtkontext als stabiles Nährmedium, dessen Produktivität laut vorliegender Ergebnisse bis maximal 34 Stunden gewährleistet ist.

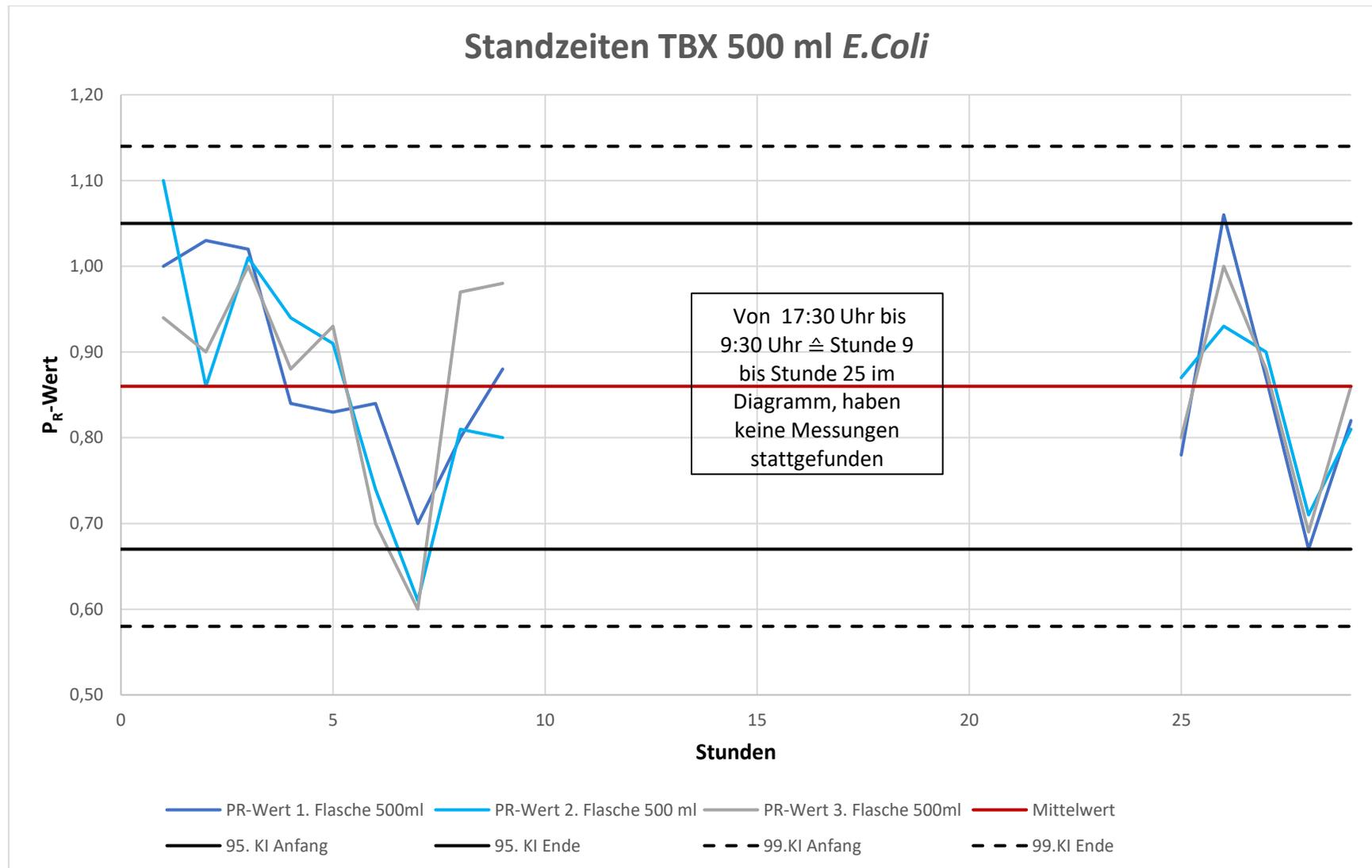


Abbildung 7: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *E.Coli* auf TBX 500 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h

4.2 Routinebegleitende Leistungsprüfung von 500 ml Oxoid VRBD Agar-Flaschen über einen Zeitraum von maximal 34 Stunden

Aus der Tabelle AI-2: Übersicht der für VRBD relevante morphologische Merkmale, Faktoren der Qualitätskontrolle in Bezug auf die jeweiligen Zielkeime, geht hervor, dass für die Verwendung des VRBD Agars von Oxoid ein P_R -Wert von mindestens 0,50 nachweisbar sein muss.

Die folgende Tabelle mit den Ergebnissen der Standzeitenkontrolle über maximal 34 Stunden für den Zielkeim *E.Coli* zeigt einen einwandfreien Produktivitätsverlauf innerhalb des ersten Versuchstages (9 Stunden). Die P_R -Werte liegen ausnahmslos zwischen 90% und 100%, was ein bedeutendes Ergebnis für die Leistungsfähigkeit des Agars in Bezug auf den Zielkeim *E.Coli* darstellt.

Der zweite Versuchstag beginnt mit einer auf den gesamten Untersuchungszeitraum betrachteten, tendenziell abweichenden Beobachtung, die mit einem P_R -Wert von 0,75 fast auf die unterste Vertrauensgrenze des 99% Konfidenzintervalles trifft. Der P_R -Wert ist dennoch deutlich höher als der von der DIN EN ISO 11133 vorgegebene Mindest- P_R -Wert von 0,50 für VRBD Agar. Alle weiteren Überprüfungen pro Stunde befinden sich in einem außerordentlich überzeugendem Produktivitätsbereich, der nahezu konstant bei 100 % liegt.

	Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBD 500 ml Flasche I bis Flasche III <i>E.Coli</i>								
<i>i</i> =	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Referenz	63	65	88	85	84	85	98	113	97
KBE (Prüfagar-xi)	68	74	81	92	80	89	109	118	107
r_i	1,08	1,14	0,92	1,08	0,95	1,05	1,11	1,04	1,11
$ r_i - r_{i-1} $		0,06	0,21	0,15	0,13	0,10	0,06	0,07	0,07
<i>i</i> =	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Referenz	82	70	67	93	74	86	86	76	79
KBE (Prüfagar-xi)	62	75	69	90	77	91	87	82	81
r_i	0,75	1,07	1,03	0,97	1,04	1,06	1,02	1,07	1,02
$ r_i - r_{i-1} $	0,35	0,32	0,04	0,06	0,06	0,02	0,04	0,06	0,05

Tabelle 4: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von *E.Coli* für VRBD 500 ml beschreiben.

In der Regelkarte für die Standzeitenkontrollen der aufgeschmolzenen Agar-Flaschen für den Zielkeim *E.Coli* wird graphisch verdeutlicht, dass ein hinreichender Produktivitätsnachweis über den gesamten Untersuchungszeitraum von zwei Versuchstagen gegeben ist. Die Produktivität von *E.Coli* wird über die 18 Messungen \cong 34 Stunden durch die lange Standzeit im Trockenschrank nicht beeinträchtigt, weshalb die Verwendung des aufgeschmolzenen VRBD Agars von den Routinemitarbeitern nach den Ergebnissen des Zielkeims *E.Coli*, bedenkenlos für zwei Routine-Arbeitstage verwendet werden kann.

Standzeiten VRBD (Oxoid) 500 ml *E.Coli*

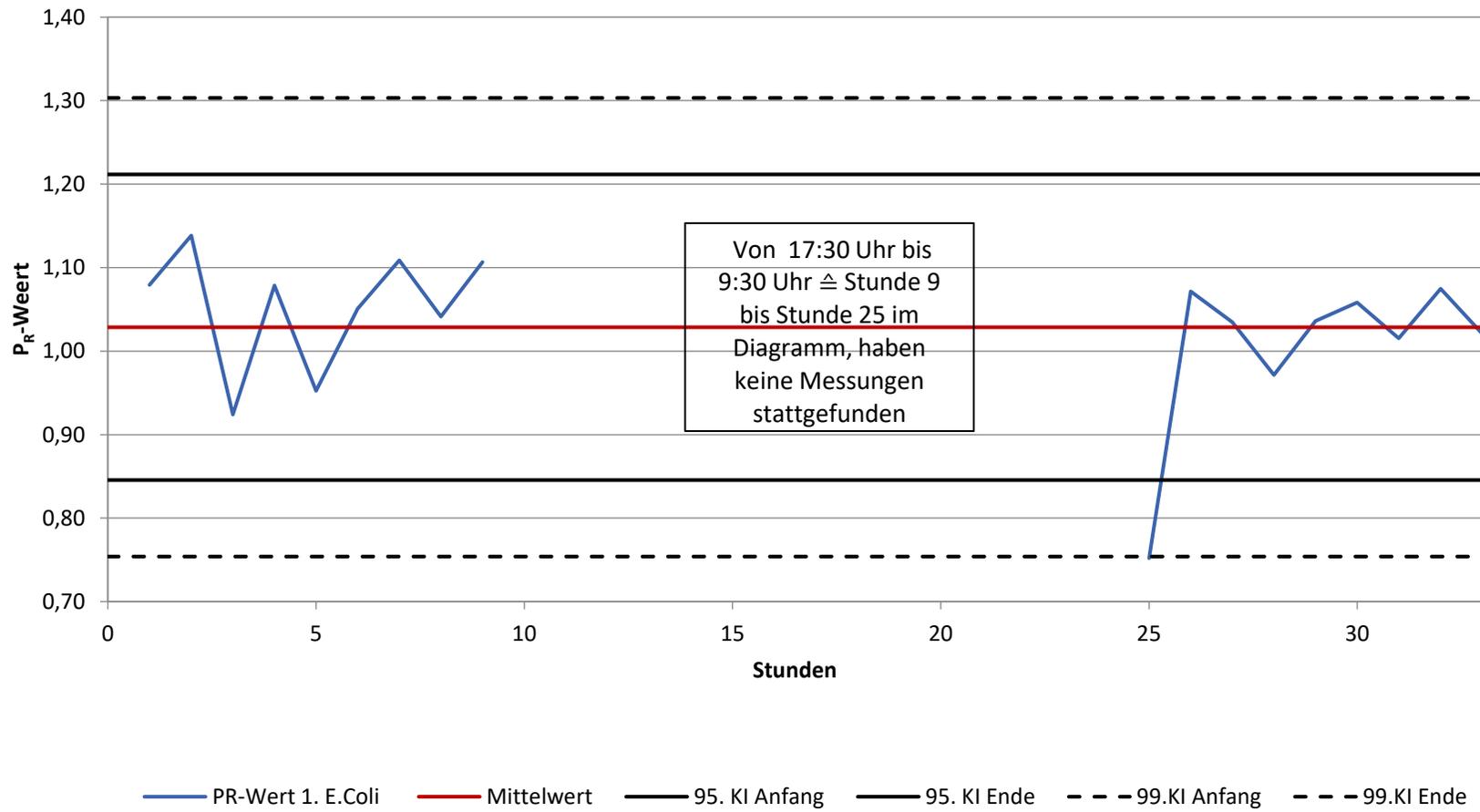


Abbildung 8: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *E.Coli* auf VRBD 500 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h

	Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBD 500 ml Flasche I bis Flasche III <i>E. aerogenes</i>								
<i>i</i> =	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Referenz	62	58	70	64	63	66	90	83	112
KBE (Prüfagar-xi)	51	54	44	63	62	78	85	83	96
r_i	0,83	0,94	0,62	0,99	0,98	1,18	0,94	1,00	0,85
$ r_i - r_{i-1} $		0,11	0,31	0,37	0,01	0,19	0,24	0,06	0,14
<i>i</i> =	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Referenz	66	56	65	71	105	88	91	108	97
KBE (Prüfagar-xi)	57	57	54	63	78	77	88	93	92,33
r_i	0,87	1,01	0,84	0,88	0,74	0,87	0,97	0,86	0,95
$ r_i - r_{i-1} $	0,01	0,14	0,18	0,05	0,14	0,13	0,10	0,11	0,09

Tabelle 5: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von *E.aerogenes* für VRBD 500 ml beschreiben.

Aus Tabelle 5 geht hervor, dass der Zielkeim *E.aerogenes* auf VRBD Agar, wie der Zielkeim *E.Coli*, über beide Versuchstage eine nahezu identische Leistungsfähigkeit bietet. Der nach drei Stunden im Trockenschrank stehende Agar weist als einzige Messung mit einem P_R -Wert von 0,62 keine Produktivität zwischen 80% und 100% am ersten Versuchstag auf. Die schwächste Messung des zweiten Versuchstag ist nach 20 Stunden Lagerung im Trockenschrank mit einem P_R -Wert von 0,74 zu erwähnen. Die Verwendung des aufgeschmolzenen Agars über zwei vollständige Versuchstage ist nach diesen Untersuchungen für den Zielkeim *E.aerogenes* gewährleistet.

Standzeiten VRBD (Oxoid) 500 ml *E.aerogenes*

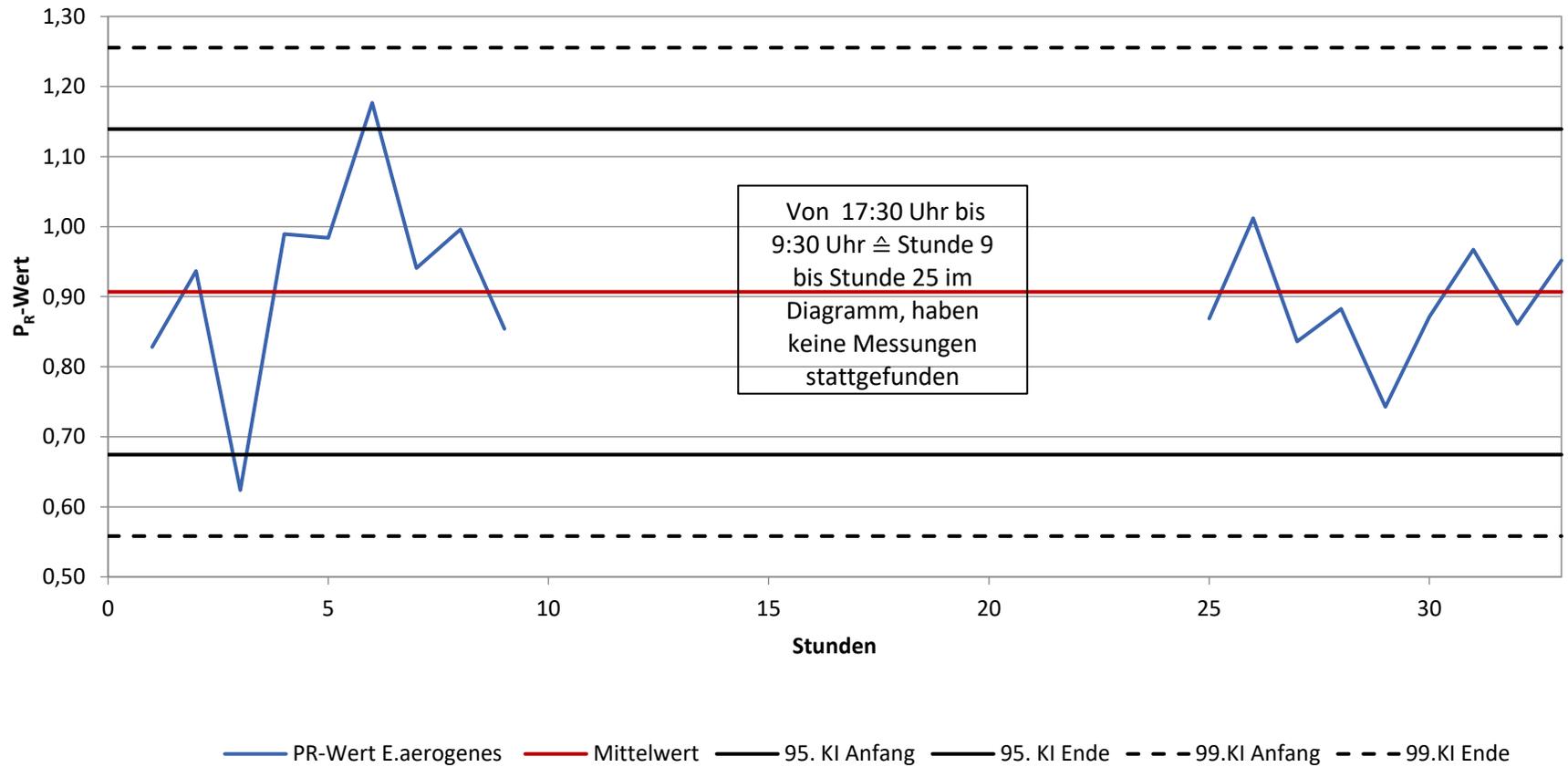


Abbildung 9: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *E.aerogenes* auf VRBD 500 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h

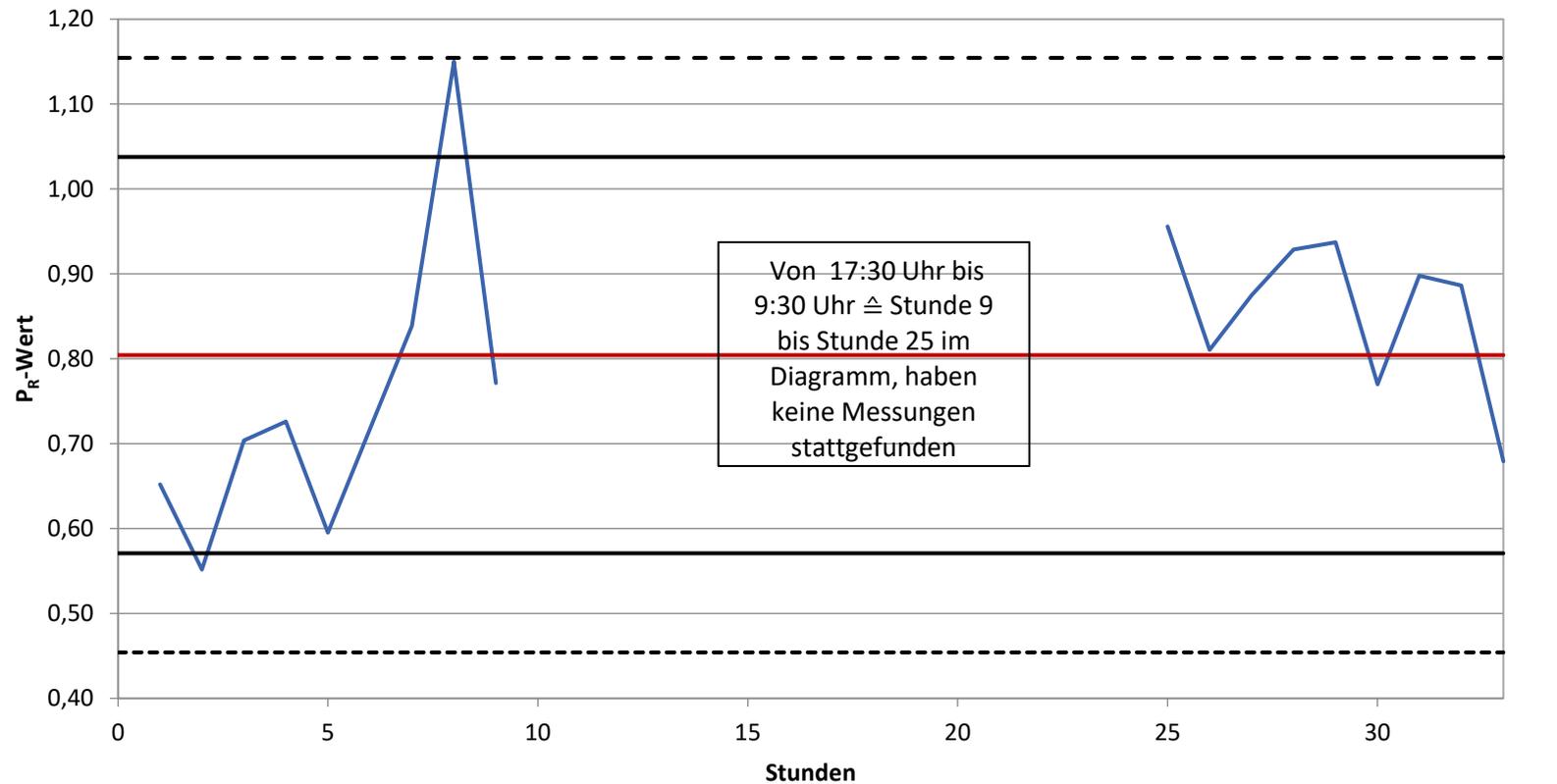
	Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBD 500 ml Flasche I bis Flasche III <i>S.enterica</i>								
<i>i</i> =	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Referenz	23	29	27	28	28	33	31	24	35
KBE (Prüfagar-xi)	15	16	19	20	17	24	26	27	27
r_i	0,65	0,55	0,70	0,73	0,60	0,72	0,84	1,13	0,77
$ r_i - r_{i-1} $		0,10	0,15	0,02	0,13	0,12	0,12	0,29	0,36
<i>i</i> =	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Referenz	203	264	269	271	265	310	303	311	343
KBE (Prüfagar-xi)	194	214	235	252	248	239	272	276	233
r_i	0,96	0,81	0,87	0,93	0,94	0,77	0,90	0,89	0,68
$ r_i - r_{i-1} $	0,18	0,15	0,06	0,05	0,01	0,17	0,13	0,01	0,21

Tabelle 6:18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von *S.enterica* für VRBD 500 ml beschreiben.

Tabelle 6 präsentiert die unterschiedlichen P_R -Werte der Standzeitenüberprüfungen für den Zielkeim *S.enterica*. Alle Werte pro Messung liegen über dem erforderlichen Produktivitätsverhältnis von 50%, sodass *S.enterica* der dritte Zielkeim ist, der für eine Weiterverwendung des aufgeschmolzenen Agars und der damit verbundenen Lagerung im Trockenschrank spricht. Es ist zu erkennen, dass die P_R -Werte von *S.enterica* während der Gesamtuntersuchung weniger homogen angeordnet sind, als die P_R -Werte von *E.Coli* und *E.aerogenes*. Dieses Auftreten charakterisierte die Salmonella bereits während der Aufschmelzprozesse.

Auf der Abbildung 10 ist die Regelkarte für *S.enterica* auf VRBD bei einem getesteten Agar Volumen mit 500 ml zu finden. Bis auf den Wert nach Messung $i=8$ lässt sich die Produktivität zwischen ca. 60% und 90% festlegen. Wie erwähnt unterliegt die *S.enterica* größeren Produktivitätsschwankungen, als bei den vorherigen zwei Zielkeimen.

Standzeiten VRBD (Oxoid) 500 ml *S.enterica*



— PR-Wert S.*enterica* — Mittelwert — 95. KI Anfang — 95. KI Ende - - - 99. KI Anfang - - - 99. KI Ende

Abbildung 10: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *S.enterica* auf VRBD 500 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBD 500 ml Flasche I bis Flasche III <i>C.freundii</i>									
<i>i</i> =	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Referenz	148	200	239	273	286	342	378	431	468
KBE (Prüfagar-xi)	150	212	161	260	274	314	380	436	443
r_i	1,01	1,06	0,67	0,95	0,96	0,92	1,01	1,01	0,95
$ r_i - r_{i-1} $		0,04	0,39	0,28	0,01	0,04	0,09	0,01	0,06
<i>i</i> =	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Referenz	137	143	148	171	216	256	264	323	377
KBE (Prüfagar-xi)	115	125	149	171	177	235	267	296	299
r_i	0,84	0,88	1,01	1,00	0,82	0,92	1,01	0,92	0,79
$ r_i - r_{i-1} $	0,11	0,04	0,13	0,01	0,18	0,10	0,09	0,09	0,13

Tabelle 7: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von *C.freundii* für VRBD 500 ml beschreiben.

In Tabelle 7 werden die Ergebnisse der P_R -Werte für den Zielkeim *C. freundii* vorgestellt. Die Produktivität des ersten Versuchstages liegt bis auf Messung $i=3$, zwischen 90% und 100%. Der zweite Versuchstag weist eine Produktivitätsspanne zwischen 80% und 100% auf. Die Produktivität ist an einigen Messungen des zweiten Versuchstages demnach unwesentlich schlechter als am ersten Versuchstag. VRBD kann gemäß dieser Untersuchungen nach allen untersuchten Zielkeimen länger gegossen werden als gemäß DIN EN ISO 11133 vorgegeben.

Abbildung 11 bildet die Ergebnisse der Leistung des Zielkeims *C.freundii* graphisch ab. Bis auf Messung $i=3$ liegen alle P_R -Werte des ersten Untersuchungstages vermehrt über dem mittleren P_R -Wert. Die P_R -Werte des zweiten Versuchstages finden sich hingegen unter der Grenze des mittleren P_R -Wertes wieder.

Standzeiten VRBD (Oxoid) 500 ml *C.freundii*

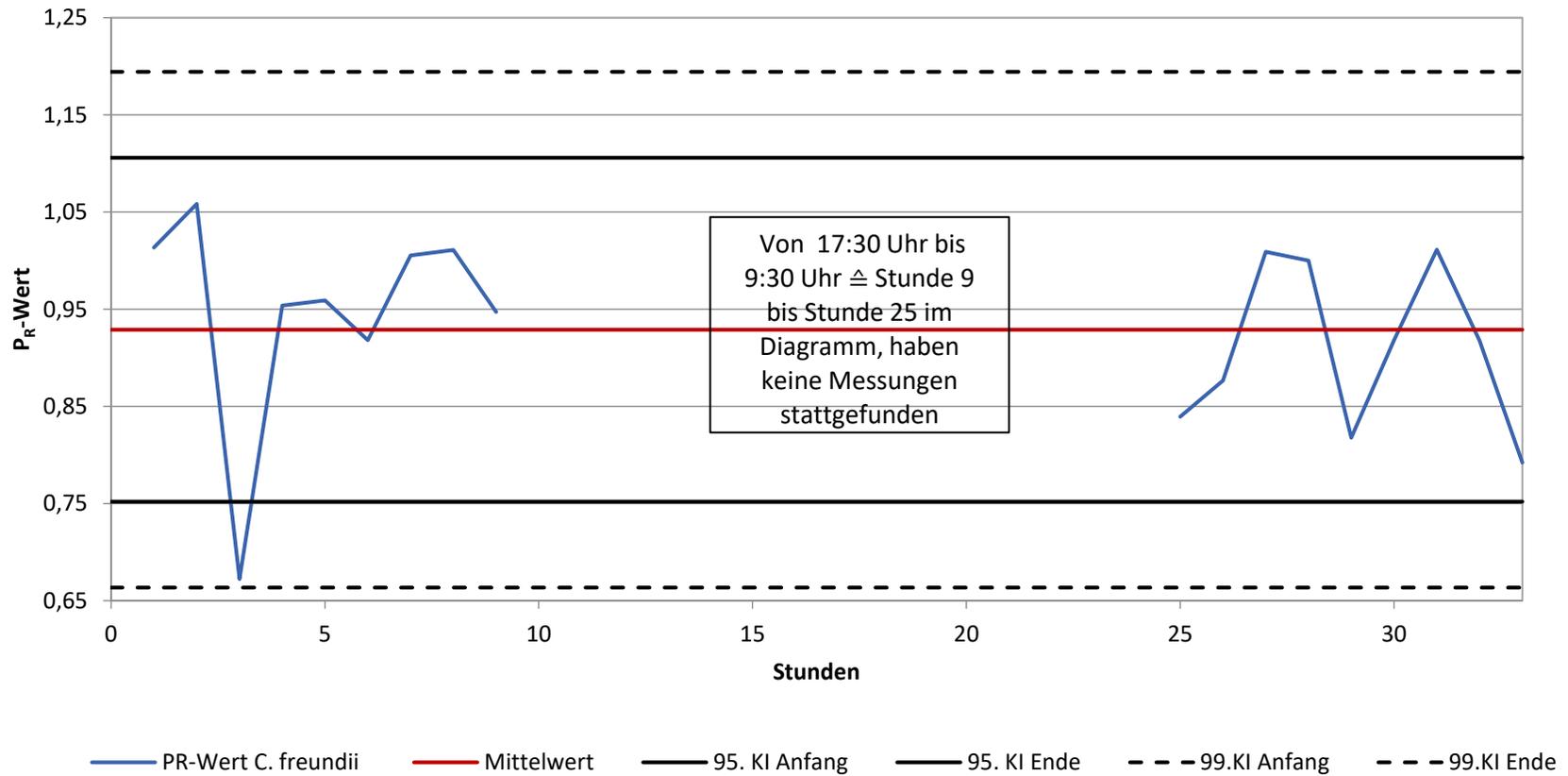


Abbildung 11: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *C.freundii* VRBD 500 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h

4.3 Routinebegleitende Leistungsprüfung von 250 ml YGC Agar-Flaschen über einen Zeitraum von maximal 34 Stunden

Für das Nährmedium YGC wurden drei Untersuchungen zum Aufschmelzprozess und die Hauptuntersuchung der Standzeitenkontrolle der aufgeschmolzenen Agar-Flaschen im Trockenschrank für maximal 34 Stunden durchgeführt. YGC Agar-Flaschen sind ausschließlich für ein Volumen von 250 ml im Labor verwendet worden. Ein für YGC annehmbarer Produktivitätsnachweis ist dann erfolgreich sofern der von der DIN EN ISO 11133 eingehaltene P_R -Wert $0,5 >$ beträgt. Dieser Wert lässt sich aus Tabelle AI-4 ablesen.

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) YGC 250 ml Flasche I bis Flasche III <i>S.cerevisiae</i>									
<i>i</i> =	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Referenz	93	106	92	100	75	86	92	98	97
KBE (Prüfagar-xi)	73	80	75	76	64	60	60	60	64
r_i	0,79	0,75	0,81	0,76	0,85	0,69	0,66	0,61	0,66
$ r_i - r_{i-1} $		0,03	0,06	0,05	0,09	0,16	0,04	0,04	0,05
<i>i</i> =	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Referenz	88	111	98	125	107	97	91	82	69
KBE (Prüfagar-xi)	61	89	80	64	76	60	64	57	53
r_i	0,69	0,80	0,81	0,51	0,71	0,62	0,71	0,70	0,77
$ r_i - r_{i-1} $	0,03	0,11	0,01	0,30	0,20	0,09	0,09	0,01	0,08

Tabelle 8: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von *S.cerevisiae* für YGC 250 ml beschreiben

In Tabelle 8 sind alle P_R -Werte der stündlichen Standzeitenüberprüfung von 250 ml YGC Agar des Zielkeims *S.cerevisiae* aufgeführt. Der Bereich der Produktivität des ersten Versuchstages zeigt P_R -Werte zwischen 0,60 und 0,85 des Zielkeims. Der Produktivitätsbereich des zweiten Versuchstages weist hingegen eine Spanne zwischen $P_R = 0,50$ und $P_R = 0,80$ auf. Die Produktivität von YGC-Agar nimmt im Laufe des zweiten Versuchstages im Vergleich des Vortages ab. Keine der Messungen unterschreitet $P_R < 0,50$.

Nachfolgende Abbildung 12 zeigt die Regelkarte der Standzeiten von *S.cerevisiae* für den YGC Agar. Alle Werte befinden sich innerhalb der Vertrauensgrenzen des 95% Konfidenzintervalls und ordnen sich, abgesehen von Messung $i=13$, um den mittleren P_R -Wert an. Folglich ist die Verwendung des aufgeschmolzenen Agars auf Grundlage des aktuell untersuchten Zielkeims noch legitimiert.

Standzeiten YGC 250 ml *S.cerevisiae*

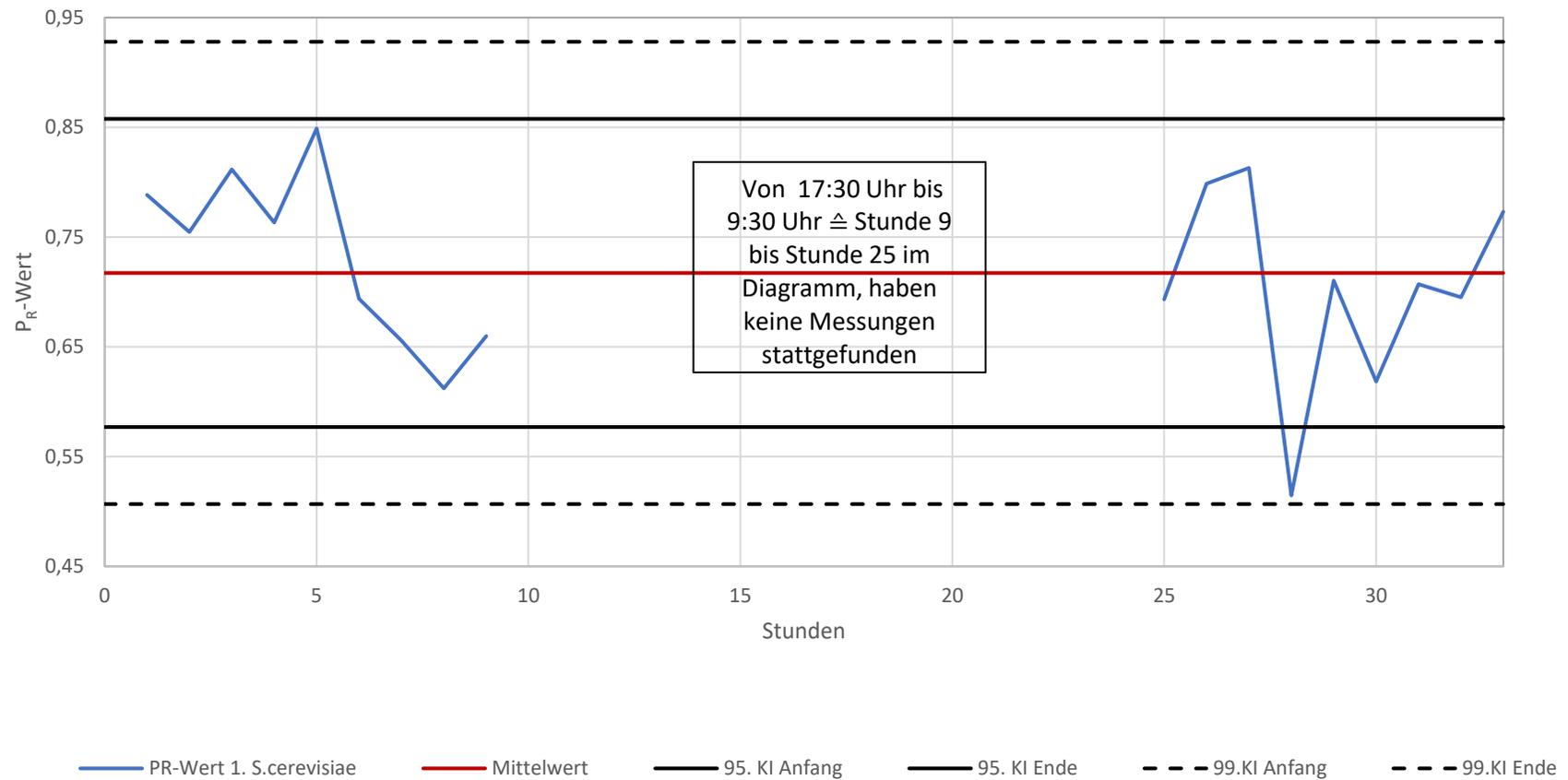


Abbildung 12: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *S.cerevisiae* auf YGC 250 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h

	Ergebnis von Prüfung Nummer (i) YGC 250 ml Flasche I bis Flasche III <i>A.braziliensis</i>								
<i>i</i> =	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Referenz	83	79	83	88	70	73	74	80	81
KBE (Prüfagar-xi)	74	68	71	63	61	61	51	54	70
r_i	0,90	0,86	0,86	0,72	0,87	0,83	0,69	0,68	0,86
$ r_i - r_{i-1} $		0,04	0,00	0,14	0,16	0,04	0,14	0,01	0,18
<i>i</i> =	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Referenz	131	114	105	128	135	110	140	117	105
KBE (Prüfagar-xi)	74	94	75	69	90	67	92	75	91
r_i	0,56	0,82	0,71	0,54	0,66	0,61	0,65	0,64	0,87
$ r_i - r_{i-1} $	0,30	0,26	0,11	0,18	0,13	0,05	0,04	0,01	0,23

Tabelle 9: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von *A.braziliensis* für YGC 250 ml beschreiben

Tabelle 9 beschreibt die Produktivitätswerte des zweiten Zielkeims, der auf 250 ml YGC Agar-Flaschen getestet wurde. *A.braziliensis* hat für den ersten Versuchstag P_R -Werte zwischen ca. 0,70 und 0,90. Diese P_R -Werte Spanne erweitert sich für den zweiten Versuchstag. Es sind P_R -Werte zwischen ca. 0,55 und 0,90 zu finden, sodass einige Messungen des zweiten Versuchstages eine tendenziell niedrige Produktivität aufweisen (siehe $i=10$, $i=13$ und $i=15$). Dennoch besteht noch keine Unterschreitung des von der DIN EN ISO 11133 festgesetzten Mindest- P_R -Wert. Auf der Abbildung 13 lassen sich die Ergebnisse des ersten und zweiten Versuchstags miteinander vergleichen. Es wird deutlich, dass die Werte der ersten neun Stunden in denen gemessen wird, zum größten Teil über dem mittleren P_R -Wert liegen. Die einzelnen Messungen ab Stunde 25 flachen ab und befinden sich vermehrt unter dem mittleren P_R -Wert wieder.

Standzeiten YGC 250 ml *A.braziliensis*

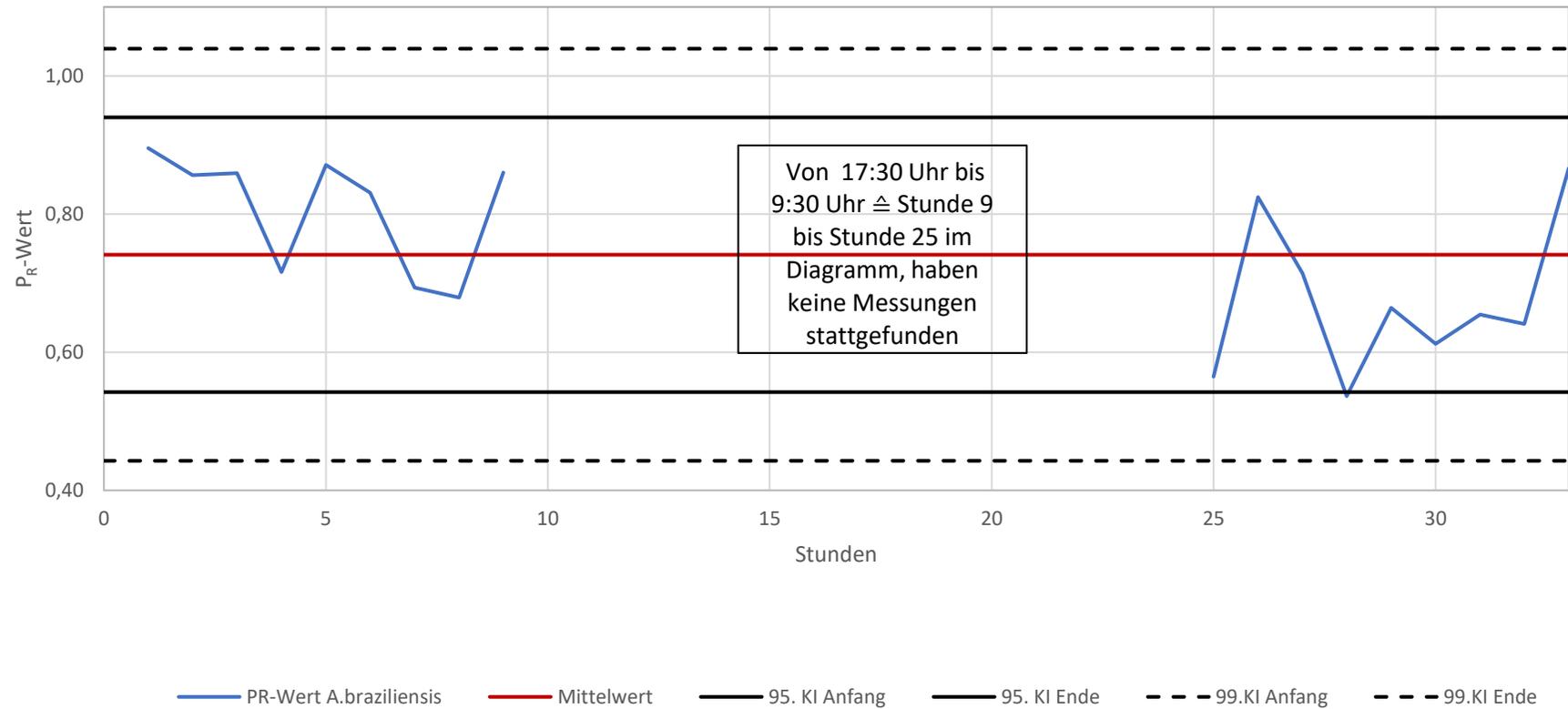


Abbildung 13: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *A.braziliensis* auf YGC 250 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) YGC 250ml Flasche I bis Flasche III <i>C.albicans</i>									
<i>i</i> =	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Referenz	84	101	93	132	65	130	118	106	80
KBE (Prüfagar-xi)	66	56	47	50	52	56	54	54	55
r_i	0,78	0,55	0,51	0,38	0,79	0,43	0,46	0,51	0,69
$ r_i - r_{i-1} $		0,23	0,05	0,13	0,42	0,37	0,03	0,05	0,19
<i>i</i> =	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Referenz	135	85	76	95	183	63	72	73	58
KBE (Prüfagar-xi)	60	62	56	68	67	50	60	65	39
r_i	0,45	0,73	0,74	0,72	0,37	0,79	0,83	0,89	0,67
$ r_i - r_{i-1} $	0,24	0,29	0,01	0,02	0,35	0,42	0,04	0,07	0,22

Tabelle 10: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von *C.albicans* für YGC 250 ml beschreiben.

Tabelle 10 beschreibt den Verlauf der P_R -Werte pro Stunde für den Zielkeim *C.albicans*. Die Messungen zeigen bereits nach exakt vier Stunden eine deutliche Unterschreitung des vorgegebenen P_R -Wertes, was erstmals die von der DIN EN ISO 11133 vorgeschriebene Lagerzeit von vier Stunden im Trockenschrank nach dem Aufschmelzprozess für Flüssignährmedien, durch vorliegende Ergebnisse begründet. Die nachfolgenden Messungen des ersten Versuchstages liegen wiederum im annehmbaren Bereich, sodass der erste Versuchstag im Durchschnitt $P_R > 0,5$ liegt und der Agar für den ersten Versuchstag über neun Stunden leistungsfähig ist.

Der zweite Versuchstag wird direkt durch eine Unterschreitung des erforderlichen P_R -Wertes geprägt, worauf nach weiteren vier Messungen erneut eine Unterschreitung erfolgt. Aufgrund der nicht Einhaltung des erforderlichen P_R -Wertes sollte YGC am zweiten Versuchstag nicht mehr verwendet werden.

Standzeiten YGC 250 ml *C.albicans*

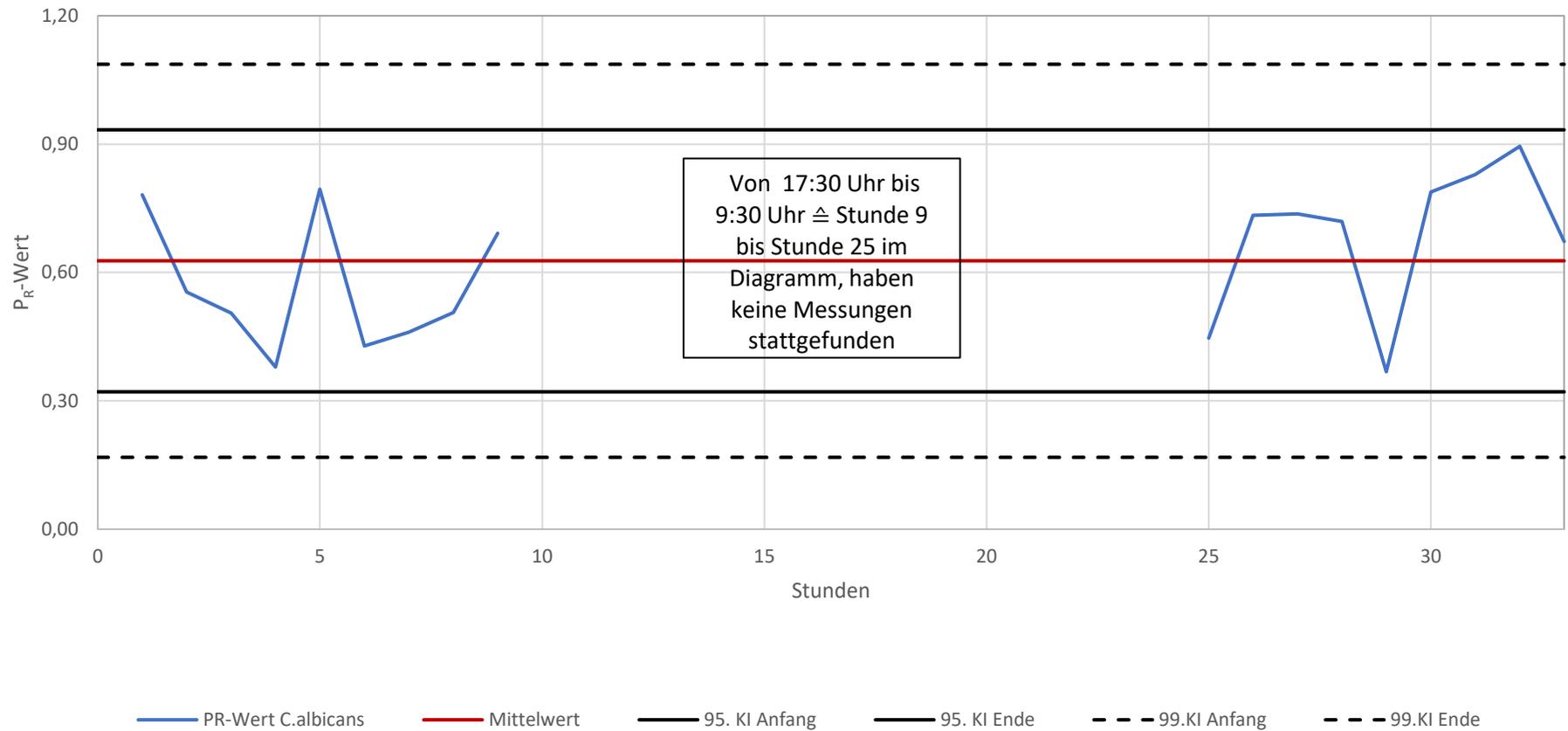


Abbildung 14: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *C.albicans* auf YGC 250 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h

	Ergebnis von Prüfung Nummer (i) YGC 250 ml Flasche I bis Flasche III <i>W.sebi</i>								
<i>i</i> =	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Referenz	67	58	65	73	78	58	63	69	66
KBE (Prüfagar-xi)	68	68	72	67	75	54	52	62	74
r_i	1,01	1,17	1,11	0,91	0,96	0,93	0,83	0,89	1,13
$ r_i - r_{i-1} $		0,15	0,06	0,19	0,04	0,03	0,09	0,06	0,23
<i>i</i> =	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Referenz	74	87	69	82	83	79	97	85	72
KBE (Prüfagar-xi)	71	78	65	78	75	70	69	66	66
r_i	0,95	0,90	0,94	0,95	0,90	0,89	0,71	0,77	0,92
$ r_i - r_{i-1} $	0,17	0,06	0,05	0,01	0,04	0,01	0,18	0,06	0,15

Tabelle 11: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von *W.sebi* für YGC 250 ml beschreiben.

Die Tabelle 11 zeigt für YGC durch den Zielkeim *W.sebi* einwandfreie P_R -Werte auf. Während des ersten Versuchstages liegen die P_R -Werte zwischen 0,90 und 1,0, was erstklassige Ergebnisse darstellt. Die P_R -Werte des zweiten Versuchstages haben eine weitere Spanne (P_R -Werte zwischen 0,70 und 0,95) und liegen vergleichsweise zum ersten Versuchstag etwas niedriger.

In der Regelkarte auf Abbildung 15 ist die Produktivitätsabnahme graphisch abgebildet. Die meisten P_R -Werte des ersten Versuchstages liegen weit oberhalb des mittleren P_R -wertes, wohingegen die letzten Messungen am zweiten Versuchstag deutlich leistungsfähiger sind.

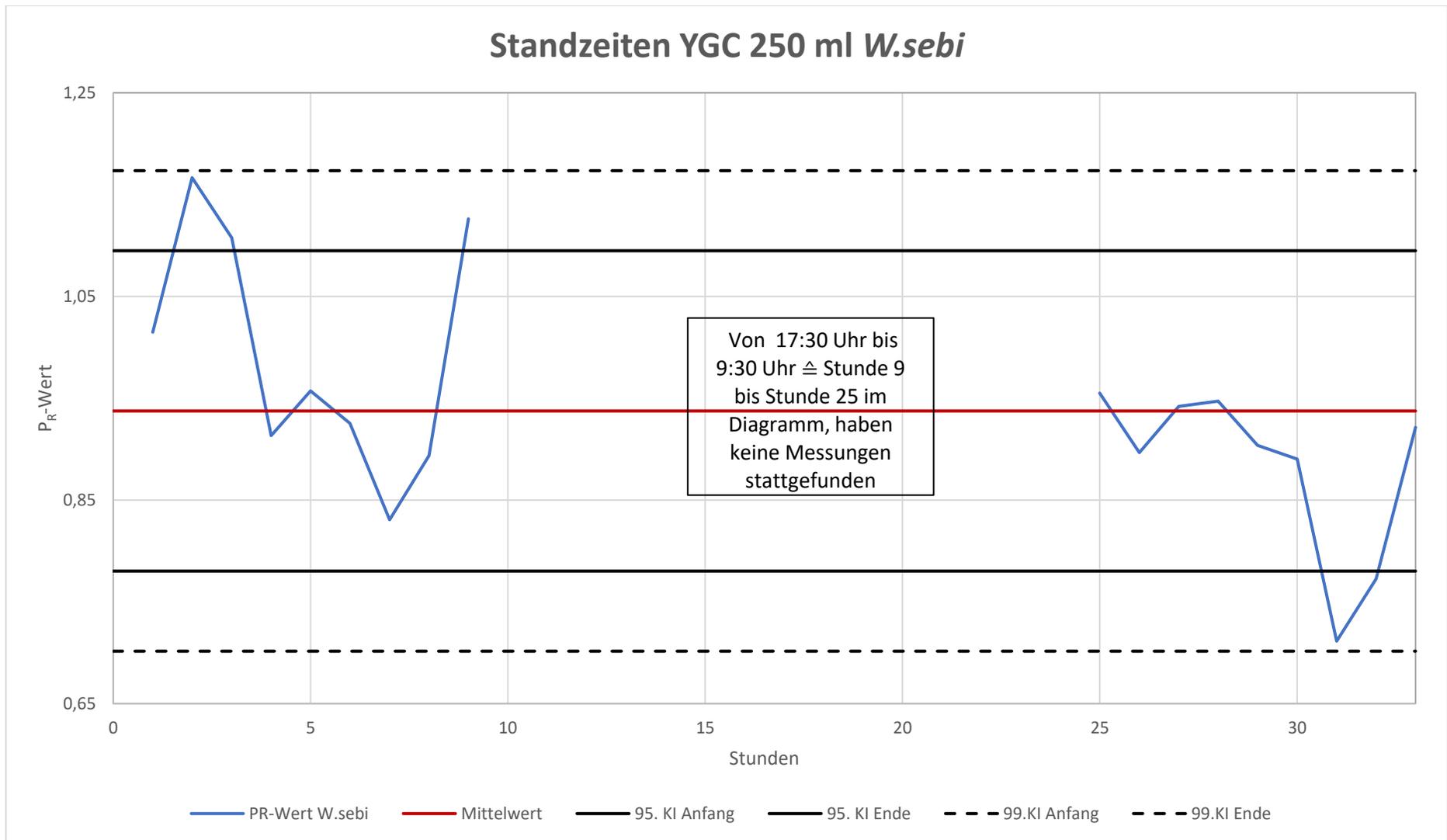


Abbildung 15: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *W.sebi* auf YGC 250 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h

4.4 Routinebegleitende Leistungsprüfung von 250 ml MRS Agar-Flaschen über einen Zeitraum von maximal 34 Stunden

	Ergebnis von Prüfung Nummer (i) MRS 250 ml Flasche I bis Flasche III <i>P.pentosaceus</i>								
<i>i</i> =	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Referenz	82	80	72	89	109	81	85	70	99
KBE (Prüfagar-xi)	62	56	58	57	64	58	55	58	64
r_i	0,76	0,70	0,81	0,64	0,58	0,72	0,64	0,82	0,65
$ r_i - r_{i-1} $		0,06	0,11	0,75	0,05	0,14	0,08	0,18	0,18
<i>i</i> =	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Referenz	106	109	76	89	79	90	72	113	97
KBE (Prüfagar-xi)	63	53	52	59	62	60	56	54	49
r_i	0,60	0,49	0,69	0,66	0,79	0,67	0,78	0,47	0,51
$ r_i - r_{i-1} $	0,05	0,11	0,20	0,03	0,13	0,12	0,11	0,30	0,03

Tabelle 12: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von *P.pentosaceus* für MRS 250 ml beschreiben.

Die in Tabelle 12 aufgeführten Ergebnisse der Standzeitenüberprüfung fallen für den Zielkeim *P.pentosaceus* bezüglich seiner Produktivitätswerte negativ aus. Lediglich zwei P_R -Werte erreichen die Mindestanforderung von $P_R > 0,8$, während des ersten Versuchstages (Messung $i=1$ bis Messung $i=9$). Die P_R -Werte des zweiten Versuchstages liegen alle unter $P_R < 0,8$. Die aufgestellte Hypothese muss für diesen Zielkeim eindeutig abgelehnt werden. Die nachfolgende Abbildung 16, in der die Regelkarte für den Zielkeim *P.pentosaceus* für MRS Agar abgebildet ist, verdeutlicht die konstante Unterschreitung der ausgewerteten P_R -Werte. Der mittlere P_R -Wert liegt zudem mit $P_R < 0,7$ weit unter dem erforderlichen Grenzwert. Die Daten des ersten Versuchstages liegen vermehrt über dem mittleren P_R -Wert und die Daten des zweiten Versuchstages finden sich verstärkt dichter bis unterhalb der Grenze des mittleren P_R -Werts wieder.

Standzeiten MRS 250 ml *P.pentosaceus*

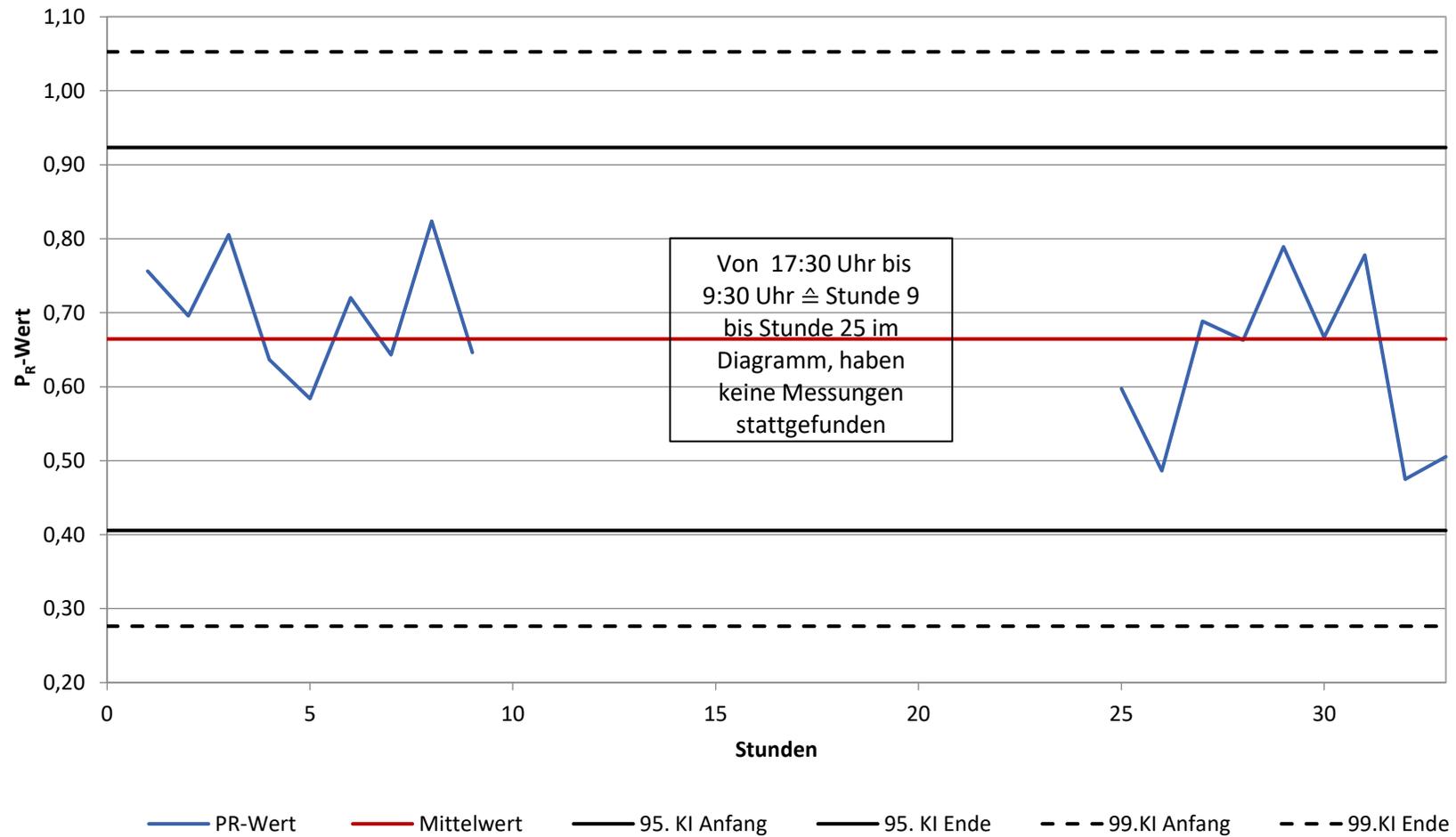


Abbildung 16: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *P.pentosaceus* auf MRS 250 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h

Ergebnis von Prüfung Nummer (<i>i</i>) MRS 250 ml Flasche I bis Flasche III <i>L.sakei</i>									
<i>i</i> =	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Referenz	92	100	101	94	73	87	95	89	75
KBE (Prüfagar-xi)	79	75	73	74	73	68	70	64	63
r_i	0,86	0,75	0,73	0,79	1,00	0,79	0,73	0,72	0,84
$ r_i - r_{i-1} $		0,11	0,02	0,06	0,20	0,21	0,05	0,01	0,11
<i>i</i> =	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Referenz	130	84	80	87	90	101	114	95	84
KBE (Prüfagar-xi)	64	67	65	64	59	66	67	58	56
r_i	0,49	0,79	0,81	0,73	0,65	0,65	0,59	0,61	0,66
$ r_i - r_{i-1} $	0,35	0,30	0,01	0,08	0,08	0,00	0,06	0,02	0,05

Tabelle 13: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von *L.sakei* für MRS 250 ml beschreiben.

Aus Tabelle 13 geht hervor, dass *L.sakei* die Standzeitenkontrolle mit einem $P_R > 0,7$ über 9 Stunden standhält und so den gesamten Zeitraum des ersten Versuchstags mit einer ausreichenden Produktivität abdeckt.

Abgesehen von der ersten Messung des zweiten Versuchstages ($i=10$) wäre die Produktivität über fast 1,5 Versuchstage bestätigt gewesen. Die Daten ab $i=10$ bis $i=18$ verlieren jedoch an Produktivität, sodass ausschließlich drei Messungen $i=11$ bis $i=13$ über $P_R > 0,7$ liegen.

Abbildung 17 verweist auf die in Tabelle 13 aufgeführten Daten und stellt graphisch den abnehmenden Produktivitätsverlauf des Zielkeims *S.sakei* dar. Die konstante Produktivitätsabnahmen ab $i=12$ (entspricht in der Regelkarte einer Lagerzeit im Trockenschrank von 28 Stunden) ist besonders auffällig.

Standzeiten MRS 250 ml *L.sakei*

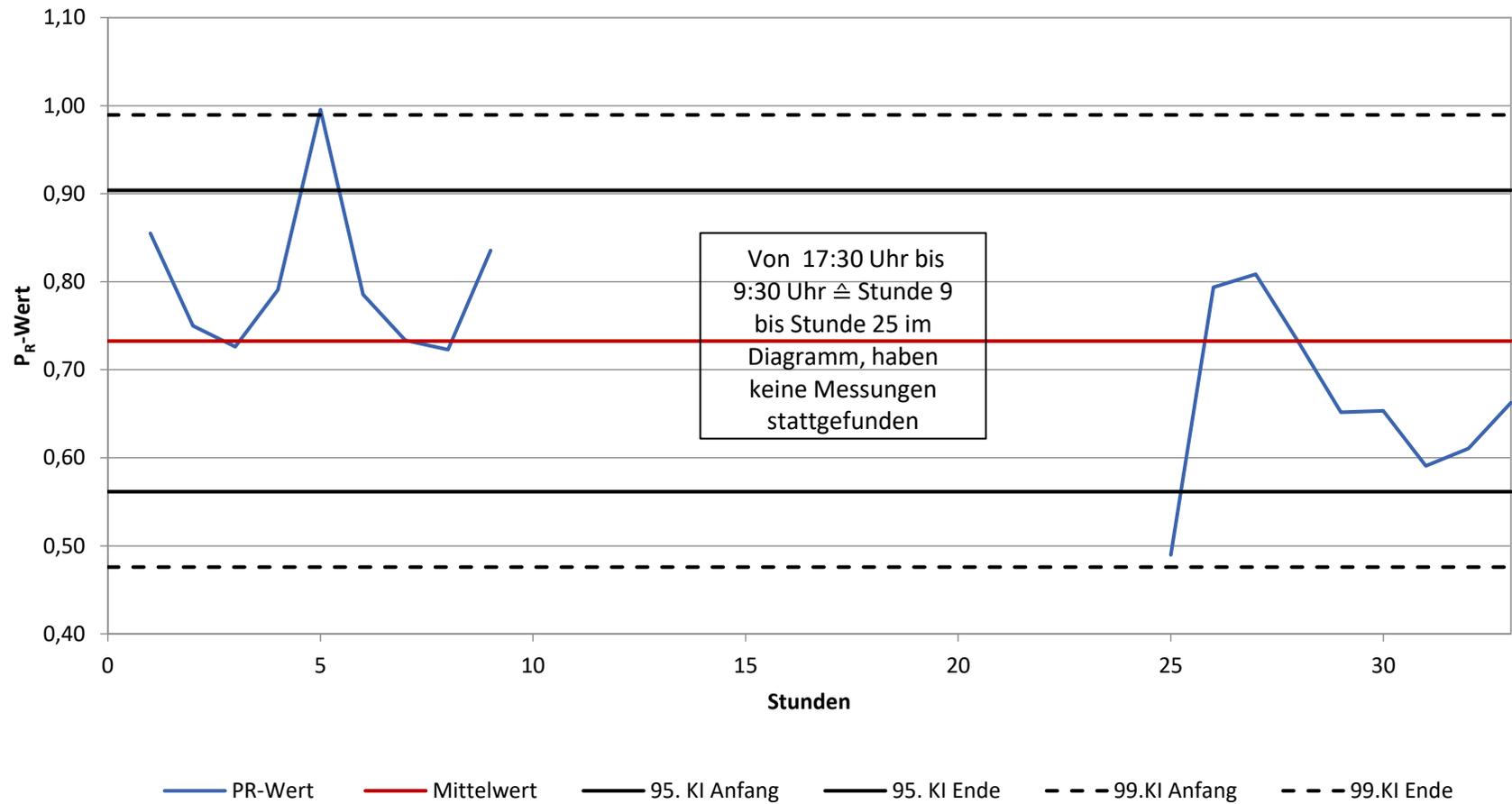


Abbildung 17: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *L.sakei* auf MRS 250 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h

	Ergebnis von Prüfung Nummer (i) MRS 250 ml Flasche I bis Flasche III <i>L.lactis</i>								
<i>i</i> =	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Referenz	86	85	115	135	126	105	158	93	118
KBE (Prüfagar-xi)	79	76	88	100	93	95	112	88	91
r_i	0,91	0,89	0,77	0,74	0,74	0,90	0,71	0,95	0,77
$ r_i - r_{i-1} $		0,02	0,12	0,02	0,01	0,16	0,19	0,24	0,18
<i>i</i> =	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Referenz	112	108	97	116	130	59	68	124	101
KBE (Prüfagar-xi)	61	72	70	71	66	60	67	74	79
r_i	0,54	0,66	0,72	0,61	0,51	1,02	0,99	0,59	0,79
$ r_i - r_{i-1} $	0,23	0,12	0,06	0,11	0,11	0,51	0,03	0,40	0,19

Tabelle 14: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von *L.lactis* für MRS 250 ml beschreiben.

Tabelle 14 zeigt die Ergebnisse der stündlichen Standzeitenkontrolle für MRS am Zielkeim *L.lactis*. Genau wie Zielkeim *S.sakei*, erbringt *L.lactis* ein Produktivitätsnachweis von neun Stunden. Dabei liegen die Produktivitätswerte von *L.lactis* grundsätzlich immer höher als die von *S.sakei*. Das stellt ein wiederkehrendes Merkmal für alle zu MRS durchgeführte Untersuchungen (siehe Anhang A, Aufschmelzprozesse MRS) dar, wobei *L.lactis* immer der der höchsten Produktivitätsausprägung entspricht. Die Hälfte der P_R -Werte des zweiten Versuchstages erfüllen die Bedingung $P_R > 0,7$. Die andere Hälfte der dargestellten P_R -Werte liegen unterhalb dieser festgelegten Grenze, weshalb eine länger als neunstündige Lagerzeit im Trockenschrank nicht genehmigt werden kann. Wiederholte Versuche an ggf. weiteren Chargen würde an dieser Stelle mehr Klarheit schaffen. Aus der Regelkarte auf Abbildung 18 ist der gesamte Produktivitätsverlauf graphisch zu betrachten. Der mittlere P_R -Wert liegt wie erforderlich $P_R > 0,7$. Die deutlich größere Spanne der P_R -Werte sowie die von der Anzahl her gleichermaßen angeordneten P_R -Werte über und unterhalb des mittleren P_R -Wertes am zweiten Versuchstages werden ersichtlich.

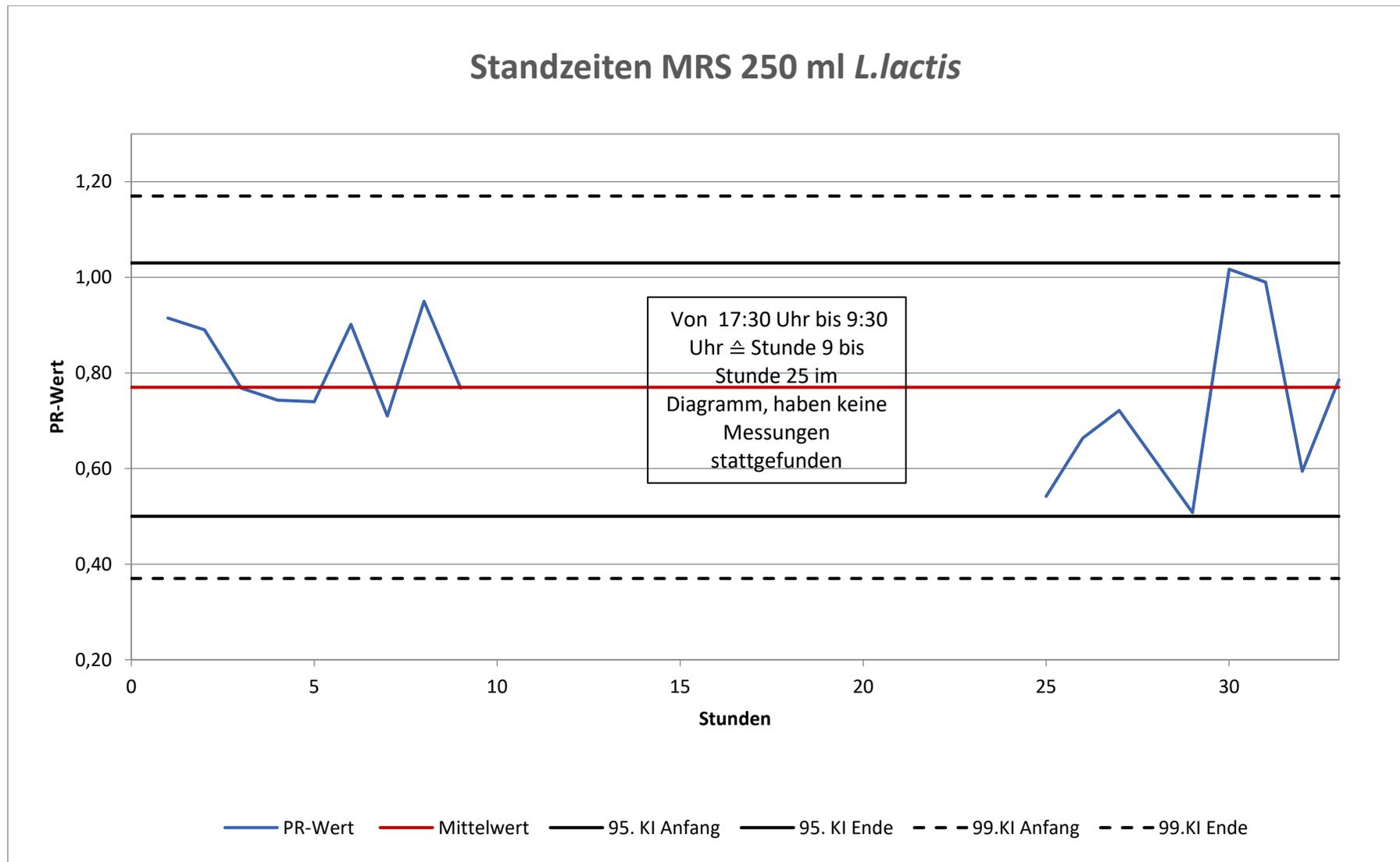


Abbildung 18: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *L.lactis* auf MRS 250 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h

<u>Bewertungskriterien</u>	TBX	VRBD	VRBL	YGC	MRS
1. Produktivitätsnachweis gesichert	✓	✓	✓	-	-
2. Einhaltung der Vertrauensgrenze von ±3s	✓	Oxoid ✓	Xebios -	✓	✓
3. Zwei von drei Beobachtungen überschreiten nicht die Vertrauensgrenzen von ± 2s	✓	✓	✓	✓	✓
4. Sechs Beobachtungen nacheinander erhöhen /verringern sich nicht stetig	✓	✓	✓	✓	✓
5. Nicht mehr als neun Beobachtungen liegen auch derselben Seite des mittleren PR-Wertes	✓	Oxoid ✓	Xebios -	✓	✓
Gesamtranking der überprüften Nährmedien	1	2	1	3	4

Tabelle 15:Leistungsbewertung nach DIN EN ISO 11133

Die DIN EN ISO 11133 hat neben der Hauptanforderung der Produktivität für den Leistungsnachweis von Nährmedien vier weitere Kriterien aufgestellt, die in Tabelle 15 tabellarisch aufgeführt sind und deren Einhaltung unterbreitet wird. Die Darstellung der Gesamtplatzierung der validierten Nährmedien soll als Orientierung für die nachfolgende Diskussion dienen.

5. Diskussion

Die Studienlage bezüglich der Leistungsprüfung von Nährmedien ist nicht besonders umfangreich. Aus diesem Grund können die Ergebnisse dieser Arbeit nur in einzelnen Fällen mit anderen Forschungsarbeiten und bereits vorhandenen Daten verglichen werden. Insbesondere für die Untersuchungen, die den Aufschmelzprozess von Nährmedien beleuchten, scheinen keine bestehenden Vergleichsdaten zu existieren.

5.1. Stabilitätsunterschiede- und Gemeinsamkeiten der Prüfnährmedien während der Variation der Aufschmelzprozesse

Aus allen Ergebnissen der Aufschmelzprozesse geht hervor, dass die Art des Aufschmelzens der Agar-Flaschen für die meisten Nährmedien nicht ausschlaggebend ist. Dies gilt vor allem für TBX und VRBL. Die Ergebnisse der Leistungsprüfung fallen überdurchschnittlich gut aus, sodass die beiden Aufschmelzmethoden (1 und 2), produktivitätsbedingt, nicht sonderlich voneinander zu unterscheiden sind und für die mikrobiologische Routinearbeit nicht verändert werden müssen.

Die Ergebnisse von VRBD liegen ebenfalls deutlich über der P_R -Wertgrenze ($P_R > 0,5$) und es müssten auch hier, keine P_R -Wert steigernden Maßnahmen ergriffen werden. Durch die Differenzierung von 500 ml Agar-Flaschen und 250 ml Agar-Flaschen von TBX und VRBD haben sich dennoch folgende Beobachtungen ergeben:

TBX und VRBD wurden mit einem Volumen von 500 ml und 250 ml Agar-Flaschen durchgeführt.

Die Ergebnisse mit TBX zeigten keine Abhängigkeit der verwendeten Volumina.

Bei VRBD hingegen weisen die 250 ml Agar-Flaschen eine höhere Produktivität auf, wenn sie dem Wasserbad erst bei einer Temperatur von 95 °C zugesetzt werden. Die Produktivität von *E.aerogenes* (15%), *Salmonella enterica* (15%) und *C.freundii* (20%) steigern sich um den in Klammern angegebenen Prozentwert.

Wird der Zielkeim *S.enterica* als explizites Beispiel herangezogen zeigen beide Aufschmelzmethoden in Bezug auf 500 ml und 250 ml VRBD Agar-Flaschen, dass die Salmonelle die schlechteste Produktivität im Gegensatz zu den weiteren Zielkeimen anzeigt. Die Salmonelle weist während des Aufschmelzprozesses im Durchschnitt für die 250 ml Agar-Flaschen einen $P_R > 0,7$ auf. Die gemäß DIN bestimmte Produktivität für *S.enterica* wurde immer mit $P_R < 0,7$ bestimmt. Diese Beobachtung weist daraufhin, dass *S.enterica* den kürzeren Aufschmelzprozesses bevorzugt anstatt mit dem anfangs kalten Wasser des Wasserbad über einen längeren Zeitraum kontinuierlich auf 95 °C erwärmt zu werden.

Es kann ausgeschlossen werden, dass die Anfälligkeit der Salmonelle ausschließlich aufgrund des geringeren Agar-Volumens zurückzuführen ist, da wie eingangs erwähnt alle VRBD Agar-Volumina von einer geringen Salmonellenaktivität betroffen sind.

Für YGC und MRS ergeben sich ähnliche Tendenzen bei der Umstellung des Aufschmelzprozesses. Für ein Volumen von 250 ml Agar verbessert sich die Produktivität von YGC für zwei der vier Zielkeime. *A. braziliensis* um 10% und *C. albicans* um 20%. *W.sebi* bleibt unverändert wogegen *S.cerevisiae* sogar um 15% an Produktivität verliert.

MRS verbessert sich ausschließlich beim Zielkeim *L.sakei*.

So ergab sich die Überlegung, dass Agar Flaschen mit einem Volumen <500 ml erst bei der Temperatur $t_{\max}=95^{\circ}\text{C}$ dem Wasserbad zugesetzt werden könnten, um die ohnehin nur geringen Produktivitätsunterschiede zwischen 500 ml und 250 ml Agar-Flaschen für VRBD auszugleichen. Ausschließlich auf den Vergleich der Produktivitätswerte, bezogen auf alle Nährmedien, die ein Volumen von 250 ml umfassen, würde die Umstellung des Aufschmelzprozesses zumindest VRBD-Agar leistungsfähiger machen.

Für YGC und MRS sind die positiven Auswirkungen noch zu schwach und nicht eindeutig genug, um eine zuverlässige Aussage bezüglich einer Anpassung des Aufschmelzprozesses vornehmen zu können. Es wäre in Erwägung zu ziehen für beide Medien weitere Chargen zu kontrollieren, um eine sicherere Aussage bezüglich des Verhaltens der Zielkeime bei dem routinefremden Aufschmelzprozess treffen zu können.

Ein weiterer Punkt ist, dass für YGC und MRS keine 500 ml Agar Flaschen als Vergleichsgrundlage vorliegen, wodurch nicht mit Sicherheit gesagt werden kann, ob sich die Zielkeime ebenso wie bei VRBD verhalten und auf die Instabilität der Zielkeime zurückgehen oder einzig und allein aufgrund des geringeren Flaschenvolumens bei Aufschmelzprozess 2, eine höhere Produktivität aufweisen. Die Nährmedien im Wasserbad weiter kochen zu lassen, obwohl sie bereits aufgeschmolzen sind, spielt eine unbedeutendere Rolle als im Vorfeld angenommen. Die Ergebnisse für die Untersuchung der Standzeitenkontrolle zeigen, dass der Zeitpunkt des Herausnehmens der Agar-Flaschen nicht ursächlich für den auftretenden Produktivitätsverlust einiger Nährmedien ist.

Es ist anzumerken, dass diese Untersuchung im Rahmen eines Pilotprojektes durchgeführt wurde. Die Bedingungen einer Dreifachbestimmung konnten hier nicht berücksichtigt werden. Die Validität der vorliegenden Ergebnisse sowie die dazu überprüfende Reliabilität durch wiederholtes Prüfen mittels einer Dreifachbestimmung, müssten daher durch weitere Untersuchungen gefestigt werden.

5.2. TBX-Leistungsnachweis Interpretation der Ergebnisse

Einige Studien beschreiben, eine sichere Zählweise von *E.Coli* als Zielmikroorganismus auf TBX. Überwiegend belaufen sich diese auf die Qualität von Wasserproben, deren dafür bestehenden Methoden gegenübergestellt werden und je nach den Ergebnissen der Produktivitätsausprägung als geeigneter, gleich oder weniger geeignet eingestuft werden. Für eine zuverlässige

Überwachung des Nährmediums, werden zum Teil Parameter vorgestellt, die unter anderem die Leistungsmerkmale von Trypton-Galle-X-Glucuronid-Agar beschreiben.

Darunter fällt ein Forschungsartikel (Jozić et al., 2019, p. 558), der für die Methode der Membranfiltration, überprüfte Leistungseigenschaften für TBX im akzeptablen Bereich nachweist. Dabei wird der Zielkeim *E. Coli* für die Kolonieauszählung auf TBX Agar als überaus geeignet dokumentiert. Die Selektivität von TBX ging matrixabhängig bei ca. 60% als annehmbar hervor.

Wie in der Einleitung des Ergebnisteils erwähnt, wurden den qualitätsbezogenen Kontrollen der vorliegende Arbeit bezüglich der Selektivität und der Spezifität für TBX sowie für VRBD und VRBL keine große Bedeutung zugeschrieben, da der für die Selektivität erforderliche Zielkeim *E. faecalis* für alle drei Nährmedien ausnahmslos einer vollständigen Hemmung unterlegen war. Die ausgestrichenen Mikroorganismen (*P. aeruginosa* und *C. freundii*) für den Nachweis der Spezifität auf TBX offenbarten keine morphologisch ungewöhnlichen Merkmale auf den Prüfmedien. Die aus dem Artikel zu entnehmender Selektivität für TBX erscheint im Vergleich zu den Ergebnissen dieser Arbeit niedrig zu sein.

In welchem Umfang und mit welcher Vorgehensweise die Leistungsprüfung der oben aufgeführten Quelle durchgeführt wurde und in welchem Bereich die einzelnen Produktivitätswerte lagen, ist nicht ersichtlich. In dieser Arbeit fallen die Parameter der Produktivität, Selektivität und Spezifität insgesamt positiver aus, als vorgestellte Forschung (Jozić et al., 2019, p. 191) verdeutlicht.

Das Nährmediums TBX zeigte eine überaus starke Produktivität sowohl während der Untersuchungen zum Aufschmelzprozess als auch während der Untersuchung der Standzeitenkontrolle in vorliegender Bachelorarbeit auf. Die hohe Leistungsfähigkeit kann näherungsweise durch folgende Untersuchung begründet werden:

Die Studie (Torlak, 2008, pp. 566-570) basierte auf dem Vergleich von TBX Medium und TEMPO® EC (*Escherichia coli*), der für eine automatisierte 24 stündige Zählung von *E. Coli* in Lebensmitteln verwendet wird. Beide Verfahren basieren auf der Glucuronidase-Aktivität. Prinzipiell wurde der Logarithmus zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden nicht überschritten. Dies lässt auf eine hohe Übereinstimmung der beiden Auszählungsmethoden schließen. Der statistischen Analyse ist zu entnehmen, dass beide Auszählungsmethoden zu einer nahezu identischen Koloniebildung führten. Dabei stellte der Nachweis des Enzyms β Glucuronidase, welches Bestandteil des TBX Agars ist und für das Standardplattenverfahren die Identifizierung von positiven *E. Coli* verursacht, für beide Methoden den ausschlaggebenden Produktivitätsparameter dar. TBX Agar kann eine hohe Leistungsfähigkeit zugesagt werden, wenn daraus entnommene Bestandteile für aktuellere Verfahrenstechniken übernommen werden.

5.3. VRBD-Leistungsnachweis Interpretation der Ergebnisse

Wie aus der Literatur zu entnehmen ist, lassen sich einige Werke finden, in denen VRBD als Vergleichsmedium mit anderen Medien beschrieben wird. Hierbei wird VRBD für die Überprüfung von Methoden herangezogen, deren Potential für die Auszählung von Enterobacteriaceae ermittelt werden sollen. Auf dieser Tatsache basierend, lässt sich VRBD nicht nur in Bezug auf die vorliegenden Daten, sondern ebenso auf literaturgestützte Forschungen, als ein stabiles und zuverlässiges Nährmedium deklarieren.

Im Journal of Food Protection zur Forschung von Paulsen (2008) richtet sich der Fokus auf die Involvierung zweier Methoden, um die Fähigkeit, der Zählung von Enterobacteriaceae für ein automatisiertes MPN-System (Most Probable Number) zu testen. Bei den Methoden handelt es sich um die Zählung der Enterobacteriaceae mit VRBD Medium und Petrifilmsplatten. Es wurden insgesamt 411 kontaminierte Lebensmittel getestet, von denen sich 119 Proben für alle Methoden im Nachweisbereich befanden. Es stellte sich heraus, dass aus diesem Nachweisbereich VRBD deutlich stärker als das zu überprüfende MPN-System hervorging.

VRBD geht aus der literaturentnommenen Forschung (Paulsen, 2008, pp. 376-379) erfolgreicher als die zu überprüfende Technik hervor, was sich hinsichtlich der Leistung von VRBD mit den erhobenen Daten der vorliegenden Bachelorarbeit deckt. Ungeachtet dessen, ist es schwer eine eindeutige Kausalität herzustellen, die eine Begründung vorlegt, aus welchem Grund VRBD ein deutlich besseres Ergebnis erreichte als die anderen zwei Methoden. Es scheint, dass das VRBD Medium hinsichtlich der Plattenzählmethode funktionstüchtig ist und als Maß für fortschrittlichere Methoden hinreichende Gültigkeit besitzt.

Einen möglichen Zusammenhang für die vorliegenden Ergebnisse von VRBD hinsichtlich des Leistungsnachweises liefert Mercuri et al. (1979) in seinen Untersuchungen wurden fünf Lebensmittelproben verglichen, die zur Coliformen Zählung und zur Enterobacteriaceae Zählung mittels VRBD und VRBL Agar durchgeführt wurden. Bis zu 40 typische Kolonien wurden zufällig ausgewählt und mit unterschiedlichen Methoden identifiziert. Es stellte sich heraus, dass 80% der VRBL Isolate aus Geflügelfleisch alle Kriterien für fäkale Coliforme erfüllte. VRBD erfüllte hingegen nur 62,5% der Kriterien.

Die vorgestellte Forschung zeigt auf, dass VRBD und VRBL ähnliche Eigenschaften besitzen. Auch in den zusammengestellten Ergebnissen dieser Bachelorarbeit zeigen VRBD und VRBL ähnliche Produktivitätsverhältnisse, wobei in der Gesamtwertung VRBL geringfügig bessere Ergebnisse erzielte als VRBD. Wie aus Tabelle 15 hervorgeht entspricht zum Beispiel VRBL Agar allen Anforderungskriterien einer Leistungsprüfung gemäß DIN EN ISO 11133. Xebios VRBD Agar jedoch nicht. Diese Tatsache spiegelt sich in den Ergebnissen der letzteren Untersuchung (Mercuri, 1979, pp. 712-714) wider. Es wirft die Frage auf, ob das schwächere Abschneiden des VRBD Agars bei der

Untersuchung der Coliformen Zählmethode in der Forschung von Mercuri geringer ausfiel, weil gegebenenfalls ein weniger produktives VRBD Medium gewählt wurde. Das Ergebnis der Bachelorarbeit verdeutlicht, dass die Ergebnisse der Produktivität von VRBD Agar herstellerbezogen minimalen Unterschiede unterliegen können.

Die Ergebnisse zur Produktivität von VRBD lassen sich mit einer Untersuchung der Forscherin (Kim et al., 2001, pp. 1556-1564) weiter vergleichen. Es wurde ein Monitoring für das Bakterienwachstum und für die Histaminbildung in pazifischen Makrelen während der Lagerung von 0 bis 25 °C unter anderem an VRBD Agar durchgeführt.

Der produktivste und weitverbreitetste Histaminbildner befand sich auf VRBD Agar bei einer Lagertemperatur von 25 °C. Die Produktivität der Histaminbildner sank mit verringerter Temperatur. Dieselben durchgeführten Untersuchungen mit TCBS-Agar zeigten einen deutlich geringeren Histaminspiegel als bei VRBD Agar, was daraufhin deutet, dass VRBD auch mit anderen Untersuchungsmethoden produktiver ist als andere Nährmedien. Die Untersuchung bringt allerdings keine der Nährmedien aus vorliegender Arbeit miteinander in Verbindung.

Eine weitere Arbeit (Oblinger, 1982, pp. 948-952) befasst sich mit dem Vergleich von VRBD und VRBL Agar, indem deren Anzahl und taxonomische Verteilung von typischen Kolonien aus 23 Lebensmittelproben im Einzelhandel bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen beurteilt wurden. Unter den Proben waren Fleisch, gefrorene bzw. verarbeitete Lebensmittel sowie frisches Gemüse. Die mittleren VRBD-Zahlen ergaben während jeder der Bebrütungstemperaturen minimal höhere Werte als bei VRBL Agar an. Die höchsten Zählungen traten für beide Medien bei der Inkubation von 20 °C auf. Bei den restlichen Temperaturen sowie bei der typischen taxonomischen Verteilung der Kolonien der Probenotypen, ergaben sich keine erheblichen Unterschiede. Die aus beiden Medien am häufigsten gewonnenen Organismen waren *E.Coli* und *Enterobacter* Arten. Auch diese Erkenntnisse spiegeln die in dieser Arbeit vorliegenden Produktivitäts-Ergebnisse für VRBD wider. Die hohe Leistungsfähigkeit ist bestätigt und zudem lassen sich Parallelen der herausragenden Organismen der Untersuchung (Oblinger, 1982, pp. 948-952) ziehen, die sich mit den Ergebnissen aus vorliegender Arbeit für 500 ml VRBD produktivsten Zielkeime *E.Coli* und *E.aerogenes* decken. In dieser Untersuchung schneidet VRBD geringfügig besser ab als VRBL, wie in voriger Studie angesprochen kann, dies daraufhin deuten, dass je nach verwendetem Hersteller die Ergebnisse zumindest für VRBD leicht variieren. Je nach Untersuchungsmethode zeigt entweder VRBD oder VRBL stückweit höhere Leistungswerte auf.

Dies bestätigt sich auch durch das in Tabelle 15 dargestellte Ranking der gesamten validierten Nährmedien. VRBL und VRBD liegen mit Platz 1 und Platz 2 von ihren Ergebnissen her dicht beieinander. Die Platzierung von VRBL auf Platz 1 ergab sich durch die Miteinbeziehung der Ergebnisse des Herstellers Xebios bei VRBD in die Gesamtwertung. Betrachtet man ausschließlich die

Ergebnisse der Oxoid-500 ml VRBD Agar-Flaschen und die VRBL Agar Flaschen während der Standzeitenkontrolle, ist die Leistung nahezu identisch, wobei hier VRBD, genau wie in der Untersuchung (Oblinger,1982, pp. 948-952) minimal höhere Produktivitätswerte verzeichnet.

Vergleich der Agar der Hersteller Oxoid und Xebios:

Auf die bereits aufmerksam gemachte Untersuchung der zwei Hersteller für VRBD Agar, ging Oxoid als eindeutiger Favorit hervor (siehe Tabelle 15). Die Nichteinhaltung der in der DIN EN ISO 11133 festgelegten Kriterien wurden bei Xebios von dem normalerweise produktivitätsstarkem Zielkeim *E.Coli* sowie dem produktivitätsschwachem Zielkeim *S.enterica* verursacht. So verließ *E.Coli* während des zweiten Versuchstages den Vertrauensbereich des 99% Konfidenzintervalles gemäß DIN EN ISO 11133 ein eindeutiges Ausschlusskriterium. Die Salmonelle weist neun aufeinander folgende Beobachtungen auf derselben Seite des mittleren P_R -Wertes der Regelkarte auf, was ebenso als nicht annehmbar gilt. Für beide Hersteller gilt, dass die Salmonelle am schlechtesten abschneidet. Sie weisen sogar eine identische Produktivitätsspanne auf, mit dem Unterschied, dass der Oxoid Agar die Produktivität über zwei volle Versuchstage erhalten kann. Xebios hingegen überdauert nur die Zeitspanne des ersten Versuchstags woraufhin anschließend die Produktivität zu sinken beginnt.

Die Salmonelle zeigte sich als schwierig zu kultivieren. Entweder befanden sich zu wenig Kolonien auf der auszählenden Platte oder die Platte galt als überwachsen. So waren mehrere Anläufe erforderlich, um einen auszählbaren Zelltitel einzustellen.

In einem solchen Fall ist es gemäß DIN EN ISO 11133 möglich einen Zielkeim, der nicht besonders leicht zu handhaben ist, durch einen anderen Prozessvalidierungsindikator zu ersetzen. Dies gilt unter folgenden Voraussetzungen:

1. Der Zielstamm ist genetisch instabil.
2. Der Zielstamm ist für die Qualitätslenkung unzureichend reproduzierbar.

Die Laborleitung bestimmt über die Änderung des geforderten Zielkeims wobei folgende Anweisungen bezüglich der Beurteilung der Eignung eines neuen Kontrollstammes eingehalten werden müssen:

- Die Eignung muss in der Leistungsprüfung überprüft und dokumentiert werden.
- Der Nachweis für die Reproduzierbarkeit der Leistungskontrolle muss erbracht werden, indem zwei, optimalerweise drei unabhängige Labore, an zwei bis drei verschiedenen Chargen der jeweiligen standardisierten Rezeptur des Nährmediums, den Kontrollstamm überprüfen.

- Die Kontrollstämme sollten vorzugsweise aus der DIN EN ISO 11133 empfohlenen Stammsammlung ausgewählt werden.
- Bei einer Neueinführung abseits der angeratenen Sammlung sollten die Kontrollstämme:
 - a. aus Lebensmitteln oder Wasserproben gewonnen werden.
 - b. in mindestens zwei internationalen Stammsammlungen zu einem angemessenen Preis angeboten werden (DIN EN ISO 11133:2015-02, p.101).

Es stellte sich die Frage inwieweit ein Austausch der *S. enterica* realisierbar wäre und vor allem welcher Keim durch die Salmonelle ersetzt werden würde. Nach letzteren Kriterien müssten zusätzliche Untersuchungen angeordnet werden. Es müssten beispielsweise Laboratorien involviert werden, die an Ringversuchen zur Beurteilung der Eignung der Kontrollstämme teilnehmen. An dieser Stelle eröffnen sich mehrere neue Forschungsansätze, die nicht mehr Teil vorliegender Arbeit sind.

5.4. VRBL-Leistungsnachweis Interpretation der Ergebnisse

Durch die bereits vorgestellten Studien der für VRBD erforderlichen Bestätigung des Leistungsnachweises wurde VRBL bereits mehrfach positiv erwähnt. In Anlehnung an die Forschungsergebnisse der Literatur und den zugrundeliegenden Ergebnissen vorliegender Arbeit, kann die Forschungsfrage für VRBL Agar nachweislich bestätigt werden. Die mit dem Plattengussverfahren einhergehenden Prozesse des Aufschmelzens der Agar Flaschen sowie die anschließende Lagerung im Trockenschrank, deren Verweildauer gemäß DIN EN ISO 11133 vier Zeitstunden nicht überschreiten darf, haben auf VRBL Agar über zwei Routine Laborarbeitstage keine Auswirkung gezeigt.

Die American Society of Microbiology (ASM) veröffentlichte jedoch einen Forschungsartikel (Ray, 1973, pp. 494-498), der feste Selektivnährmedien wie VRBD, VRBL und TSYA, die mittels des Plattengussverfahrens verwendet wurden mit flüssigen Selektivnährmedien verglich, um die Methode mit der größten Anzahl an Enterobacteriaceae zu ermitteln. Im Vorfeld wurde angenommen, dass TSYA die maximale Anzahl an Enterobacteriaceae aufweisen würde. Es stellte sich allerdings heraus, dass grundsätzlich die nachgewiesenen Zahlen auf selektiven, festen Medien niedrigere Keimzahlen aufwiesen, als diejenigen der selektiven flüssigen Medien.

Es könnte angenommen werden, dass aus diesem Grund die DIN EN ISO 11133 eine maximale Verweildauer der Gussnährmedien im Trockenschrank vorgesehen hat, weil vergleichende Methoden mit einer deutlich höher ausgeprägten Kolonienanzahl leistungsfähiger als beim Plattengussverfahren ausfielen. Andererseits ist die Anzucht von Organismen in Flüssignährmedien meistens mit einer höheren Keimzahl verbunden, wodurch die zuvor genannte Annahme vermindert wird.

Der Grund für eine geringere Koloniezahl, beim Plattengussverfahren waren nach (Ray, 1973) teilweise Spannungen, die in den Zellen durch die beim Plattengussverfahren erforderliche Temperatur beim Schmelzen der Medien induziert wurden. Es ist davon auszugehen, dass diese Zellen offenbar nicht in der Lage gewesen sind Kolonien, in den selektiven Gussmedien zu reparieren und neu zu bilden.

Die nach dieser Erkenntnis hervorgebrachten Ergebnisse zu einer geringeren Leistung der Platten-gussnährmedien, verglichen mit Flüssigmedien, wurde ein besserer Nachweis für das Plattengussverfahren erbracht, indem 1% fettfreie Milchfeststoffe, 1% Pepton oder 1% MgSO₄·7H₂O (Magnesiumsulfat Heptahydrat) den Verdünnungsrohlingen hinzugefügt wurde.

Es lässt sich die Überlegung anstellen, ob diese Modifizierung, angewendet auf die Nährmedien dieser Arbeit, nicht auch positive Auswirkung auf vorliegende Ergebnisse haben könnte. VRBL liegt zwar auf Platz 1 der untersuchten 5 Nährmedien, allerdings wurde der Rahmen der Untersuchungen ausschließlich auf das Plattengussverfahren beschränkt. Aus den Ergebnissen geht nicht hervor, wie die Nährmedien im Vergleich zu weiteren Methoden oder vergleichenden Nährmedien innerhalb derselben Bakteriengruppe reagiert hätte.

Auch hier ist der Ansatz für aufbauende Forschungen auf vorliegenden Untersuchungsergebnissen wünschenswert.

5.5. YGC-Leistungsnachweis Interpretation der Ergebnisse

Der Nachweis der Leistung von YGC brachte erstmalig eine problematische Beobachtung mit sich. Die Hefe *C. albicans* schaffte es nicht einer kontinuierlichen Produktivität während der stündlichen Überprüfung der Standzeitenkontrolle beizubehalten. Während der zweitägigen Untersuchung wurden bei drei Beobachtungen unzureichende Produktivität für YGC ($P_R < 0,5$) festgestellt. Wie im Ergebnisteil bereits angekündigt kann die Forschungsfrage für YGC nicht bestätigt werden. Dazu zeigt eine komparative Studie (Brun, 2001, pp. 718-723) aus dem europäischen Journal zu verschiedenen Candida-Arten ähnliche Beobachtungen, wie in vorliegendem Ergebnisteil erhoben wurden.

Die Studie beruht auf der Vergleichsleistung von fünf verschiedenen im Handel erhältlichen Sabouraud-Glucose-Agar Medien.

Es wurden 124 Stämme kultiviert. Darunter befanden sich 45 Hefen und 79 Fadenpilze. 28 Dermatophyten und 6 der keratinophilen Pilze, die vom Aussehen und von der Größe her für alle fünf Sabouraud-Glucose-Agar Medien ein ähnliches Ergebnis anzeigten. Alle *Aspergillus* Stämme (n=17), wie vereinzelte Hyphomyceten Stämme zeigten wichtige Farbunterschiede der gewachsenen Kolonien auf.

Der für die vorliegende Bachelorarbeit ausschlaggebende Zusammenhang, der in der Studie beobachtet wurde, ergab sich bei der quantitativen Kultivierung der Hefen. Auf den fünf Nährmedien ergaben sich prägnante Unterschiede bezüglich der Anzahl der Hefe-Kolonien, von denen bei zwei *Candida*-Arten kein Wachstum auftrat.

Die Erkenntnisse, die durch die Studie (Brun, 2001, pp. 718-723) unterbreitet werden, lassen sich mit dem negativen Ergebnis der Hefe *C. albicans*, welche als Zielkeim für den Produktivitätsnachweis von YGC für vorliegende Arbeit verwendet wurde vergleichen. Sowohl in der Studie als auch in der Bachelorarbeit ist das Wachstum und somit die Leistungsfähigkeit von *Candida*-Arten im Vergleich zu anderen Organismen in hohen Maßen als schwach zu bezeichnen.

Das schlechte Wachstum bis kein Wachstum der *Candida*-Arten wurde in der Studie lediglich auf SDA bestätigt. In der zugrundeliegenden Bachelorarbeit wächst *C. albicans* unzureichend auf YGC. SDA Agar wurde ausschließlich als Referenzmedium zur Herstellung des Stammes *C. albicans* auf Milchbasis verwendet. SDA und YGC sind nicht identische Nährmedien. Dennoch sind beide speziell für die Kultivierung von Hefen und Schimmelpilzen zugeschnitten, wodurch die Parallelen, die sich auf die negative Produktivität der *Candida* Arten und speziell auf *C. albicans* belaufen, begründet sind. So ist festzuhalten, dass der Zusammenhang nicht für genau dasselbe Nährmedium zu verzeichnen ist. Vielmehr soll das Ergebnis der schlecht abschneidenden *C. albicans* durch bestehende Literatur und Studien aufzeigen, dass *die Hefe* nicht nur in vorliegender Untersuchung wenig produktiv ist sondern dazu bereits ähnliche Forschungen vorliegen, die mit *C. albicans* oder allgemeiner gefasst, mit *Candida* Arten, ähnliche Erfahrungen gemacht haben.

Im International Journal of Food Microbiology zeigt eine Untersuchung (Olivier Bernardi, 2019, pp. 72-76) die Effektivität eines Rauchgenerator-Desinfektionsmittels anhand von Zielkeimen wie *A. brasiliensis* und *C. albicans*. Weitere Zielkeimgattungen waren *Cladosporium*, *Lichtheimia* und *Penicillium*. Die Zielkeime waren für insgesamt 7 Stunden dem Rauchgenerator-Desinfektionsmittel ausgesetzt und die Ergebnisse ergaben, dass *C. albicans* durch das Desinfektionsmittel am stärksten reduziert wurde. Die restlichen Gattungen konnten nur erschwert verringert werden. Diese Ergebnisse zeigen die geringe Produktivität von *C. albicans* auf dem Rauchgenerator- Desinfektionsmittel auf, jedoch nicht auf einem Kulturmedium. Aus dieser Untersuchung geht lediglich hervor, dass der Zielkeim *C. albicans* im Rahmen anderer Forschungen eine ähnlich schwache Stabilität aufweist, wie in den Untersuchungen dieser Bachelorarbeit hervorgehoben wird.

Feststellung und Erkenntnisse speziell zu YGC

Ausschließlich für YGC war es notwendig mehr als ein Kulturmedium für eine angemessene Primärisolierung zu verwenden. Diese Erkenntnis ergab sich allerdings erst nach mehreren misslungenen Anlaufversuchen die Zielkeime (Hefen und Schimmelpilze) für YGC zu kultivieren. Sie offenbarten unterschiedlich gut bewachsene Platten sowie anfangs auch kein Wachstum oder nur ein

sehr geringes Wachstum. Wie sich während der späteren Recherche herausstellte empfehlen Studien für die Kultivierung von Hefen und Schimmelpilzen, immer mehrere Kulturmedium zu verwenden (Silva et al., 2004, pp. 29-36).

5.6. MRS-Leistungsnachweis Interpretation der Ergebnisse

MRS geht zusammenfassend als unproduktivstes Nährmedium aus den Ergebnissen dieser Bachelorarbeit hervor. Selbst bei normgerechter Verweildauer im Trockenschrank von maximal 4 Stunden kann *P.pentosaceus* die erforderliche Produktivität von $P_R > 0,8$ nicht vorweisen. Bei *L.sakei* und *L.lactis* werden zumindest 9 Stunden Lagerzeit erreicht ohne die Produktivitätswerte negativ zu beeinflussen. *L.lactis* zeigt im Vergleich zu *L.sakei* noch die stärkeren P_R -Werte innerhalb von $i=1$ bis $i=9$ auf.

In der Literatur findet man MRS im Vergleich zu anderen Methoden, die für die Zählung von Milchsäurebakterien bestimmt sind, als nicht in solchem Maße leistungsunfähig, wie die Ergebnisse dieser Bachelorarbeit unterbreiten.

Eine Untersuchung (Gonçalves, 2009, pp. 229-233), die im Journal of Dairy Research erschien, sollte die Effektivität der Verwendung von 3M Petrifilmplatten anhand der Produktivitätsausprägung von MRS- und M17 Agar im Rahmen der Joghurtproduktion vergleichen. Die ausgewählten Referenzstämmen, darunter *Streptococcus* und *Lactobacillus* Gattungen wurden für das Experiment in fettreiche Milch geimpft und über 4 Stunden bei 42 °C für die Joghurtproduktion inkubiert. Nach der Inkubation wurden Aliquots entnommen und mittels der M17 und MRS Bouillon verdünnt und ausplattiert. Die M17 Platten wurden bei 42 °C und die MRS Platten unter anaeroben Bedingungen bei 35 °C inkubiert. Nach 48 Stunden wurden die Kolonien ausgezählt und angesichts der Varianzanalyse und Korrelation sowie zufällig ausgewählten Kolonien, die nach Gram-Färbung und Morphologie charakterisiert wurden, miteinander verglichen. Das daraus resultierende Ergebnis zeigte, dass alle drei Methoden ähnlich viele Kolonien aufwiesen und somit Petrifilmplatten als Alternative für MRS und M17-Platten verwendet werden können. Die einzige Auffälligkeit ergab sich während der Auszählung von *Lactobacillus* während der Joghurtproduktion. So konnten einige Störungen von *Lactobacillus* aufgrund des Säuregehalts von MRS bereits bei der Inokulation und Störungen aufgrund des Säuregehaltes am Ende des Fermentationsprozesses der Joghurtproduktion aufgedeckt werden. Zudem ergaben Beobachtungen, dass MRS Bouillon bei einem pH-Wert von 5,4 für *Lactobacillus* Arten eine nicht ausreichende Selektivität aufweist. In Bezug auf die Ergebnisse der Bachelorarbeit zeigt sich, dass in anderen Experimenten MRS leistungsbedingt nicht weniger gut abschneidet als andere Medien. Es ist anzumerken, dass auch hier Nährmedien miteinander verglichen wurden, die für dieselbe Bakteriengruppe bestimmt sind, in diesem Fall für Milchsäurebakterien. Es könnte angenommen werden, dass die bestehenden

Störungen von *Lactobacillus* Arten auf MRS Platten sowie die unzureichende Selektivität in der MRS Bouillon, mit den Ergebnissen in vorliegender Bachelorarbeit zu *L.sakei* in Bezug auf seine nur kurz anhaltende Produktivität, mit den Ergebnissen aus Untersuchung (Gonçalves, 2009, pp. 229-233) in Verbindung gebracht werden könnten.

Die Studie (Ortolani, 2007, pp. 387-391) wies sogar ausgezeichnete Korrelationsindizes bezüglich der Auszählung von Milchsäurebakterien unter Verwendung der Petrifilm-Platten und unter Verwendung der herkömmlichen Plattengussmethode mit MRS Agar auf. In dieser Untersuchung wurden statt 3M Petrifilmplatten, AC Petrifilmplatten verwendet. Genau wie in der Untersuchung (Gonçalves, 2009, pp. 229-233) ergaben sich im Zusammenhang mit der Zugabe von Milchsäurebakterien besonders bei Nahrungsergänzungsmitteln, minimale Störungen.

Aus dem Journal Food Protection zeigt eine Studie (Kanagawa, 2018, pp. 1030-1034) ebenfalls Vergleiche der Leistungsfähigkeit von 3M Petrifilm LAB (Lactic Acid Bacteria) Count Plates und die des MRS Agar Mediums zum Nachweis und zur Quantifizierung von Milchsäurebakterien. Wie Milchsäurebakterien bei der Herstellung von fermentierten Lebensmitteln und als Starterkultur verwendet werden, so könne sie ebenso zum Lebensmittelverderb und miteinhergehenden Verfärbungen führen. Im Rahmen der Qualitätskontrolle von Lebensmittelunternehmen wurden aus diesem Grund Untersuchungen in Produktionsbereichen und an verarbeiteten Lebensmitteln anhand von Petrifilmplatten und MRS Agar Medium in Bezug auf die Aktivität der Lactic Acid Bacteria (Milchsäurebakterien) vorgenommen. Die Endergebnisse der beiden Zählmethoden ergaben für die Bakterienanzahl keine signifikanten Unterschiede. Ergänzend dazu konnte bestätigt werden, dass sich alle auf dem Petrifilm LAB Count Plate befindenden Kolonien tatsächlich als Milchsäurebakterien herausstellten, wohingegen sich auf MRS Medium zusätzlich Hefekolonien wiederfanden.

Dieses Ergebnis weist wie aus bisherig entnommener Literatur auf, dass MRS an sich kein schwaches Medium für die Identifizierung von Milchsäurebakterien ist und im Vergleich zu weiteren Methoden nicht viel schlechter abschneidet, wie man aus den Ergebnissen dieser Bachelorarbeit vielleicht annehmen könnte.

Trotzdem fiel die Produktivität durch die identifizierten Hefekolonien auf dem MRS Agars schlechter aus als bei der Methode der Petrifilmplatten. Aus den Ergebnissen der Bachelorarbeit lässt sich ableiten, dass MRS bei einer vergleichenden Methode (Plattengussverfahren) ebenfalls schlecht abschneidet.

Aus dem Journal of Applied Microbiology wurde eine weitere Untersuchung herangezogen (Brasca et al., 2007, pp. 1516-1524), deren Ergebnisse die Bedeutung des Redoxpotentials von Milchsäurebakterien, die aus traditionellen Käsesorten isoliert wurden, in Bezug auf eine mögliche Verwendung als Starterkultur für Milchprodukte vorstellt. Die Reduktionsfähigkeit der

entnommenen Milchsäurebakterien soll darüber entscheiden, ob sie produktiv genug sind, um bei der Produktion von Milch- und Molkereiprodukten mitzuwirken. Unter den getesteten Stämmen befanden sich, ebenso wie in dieser Arbeit, unter anderem *L. lactis* und *P.pentosaceus*. Darüber hinaus wurden weitere *Lactobacillen* Arten überprüft.

Grundlegend wurde beobachtet, dass die Laktokokken ein schnelleres Redoxpotential erreichten als die Laktobazillen. Insbesondere lag die Reduktionsrate von *L.lactis* höher als die der restlichen Laktobazillen. Alle Pediokokken darunter *P.pentosaceus* wiesen im Gegensatz zu den übrigen Organismen eine sehr geringe Reduktionsaktivität auf.

Die Untersuchung (Brasca et al., 2007, pp. 1516-1524) wirft die Frage auf, ob in Erwägung gezogen werden könnte, dass die Produktivitätsausprägung der auf MRS Agar überprüften Zielkeime in dieser Bachelorarbeit, dem jeweiligen Redoxpotential der Organismen zugeschrieben werden kann. Im letzteren Werk ist die Reihenfolge des Redoxpotentials von *L.lactis*, den getesteten Laktobazillen und *P.pentosaceus* in derselben Hierarchie angeordnet, wie die der Produktivitätswerte der Zielkeime von MRS Agar. Daraus resultieren Zusammenhänge in denen die Produktivität der Zielkeime in Abhängigkeit des Redoxpotentials der Organismen dargestellt wird:

	Redoxpotential	Produktivität
Laktokokken insbesondere: <i>Lactococcus lactis</i>	Hoch	
Laktobazillen	Mittel	
Pediokokken insbesondere <i>P.pentosaceus</i>	Gering	

Tabelle 16: Zusammenhang Redoxpotential und Produktivität in Bezug auf Milchsäurebakterien

5.7. Allgemeine Feststellungen

Aus der Studienlage geht hervor, dass eingehend auf alle untersuchten Medien dieser Bachelorarbeit, hauptsächlich vergleichende Studien zu Nährmedien gefunden wurden, die derselben Bakterien-, Hefe- oder Schimmelpilzgruppe zugehörig sind. Im Fokus stand in den meisten Fällen die Identifizierung der geeignetsten und praktikabelsten Methode, für zum Beispiel die Auszählung von Milchsäurebakterien. Dafür wurden verschiedene Medien herangezogen auf denen ausschließlich Milchsäurebakterien ein Wachstum aufwiesen.

In vorliegender Bachelorarbeit hingegen wird die Produktivität von Bakterien, Hefen sowie Schimmelpilzgruppen anhand einer gemeinsamen Methode untersucht und miteinander verglichen. So ist es erwähnenswert, dass für die Nährmedien YGC und MRS keine weiteren Vergleichsmedien für ihre Mikroorganismen-Gruppe vorlagen. Auf TBX, VRBD und VRBL wachsen alle Enterobakterien, sodass es einfacher war diese drei Medien miteinander zu vergleichen. So sollte man die

Überlegung anstellen, dass MRS und gegebenenfalls auch YGC bei Gegenüberstellung mit anderen Medien innerhalb ihrer Organismengruppe, durchaus eine andere Positionierung bezüglich der Produktivität einnehmen könnten, als die im vorliegenden Produktivitätsranking der Bachelorarbeit dargestellt ist.

Die herangezogenen Studien weisen leider nur selten aktuelle Daten auf. Dies könnte einen weiteren Anreiz für zusätzliche Grundlagenforschung geben.

5.8. Erwartungen

Die Erwartungen in Bezug auf die Ergebnisse wurden bis auf wenige Ausnahmen erfüllt.

Die Auffälligkeiten, die sich in den Ergebnissen bezüglich YGC und MRS zeigten, wurden im Vorfeld für MRS nicht erwartet. YGC hingegen wurde bereits vor Beginn der Untersuchung als tendenziell schwierig eingeschätzt. Grundsätzlich wird diesem Nährmedium im Vergleich zu anderen Nährmedien eine geringere Produktivität zugeschrieben. Dies konnte durch die resultierenden Ergebnisse bestätigt werden.

Die deutlich bessere Einschätzung von MRS vor und auch während der Untersuchungen ging damit einher, dass während der Validierungen davon ausgegangen wurde, die Anforderungen an das Nährmedium würde ebenso wie bei den restlichen Nährmedien bei $P_R > 0,5$ liegen. Im Laufe der Untersuchungen wurde jedoch festgestellt, dass die drei Zielkeime eine Produktivität zwischen $P_R > 0,7$ und $P_R > 0,8$ erreichen müssen.

5.9. Beschränkung der Forschung

Aufgrund des bereits sehr großen Arbeitsumfangs von 5 Nährmedien, wurde das sechste Medium (PCA) in der Bachelorarbeit Ergebnisse nicht berücksichtigt. Zudem wurde für die Zielmikroorganismen einmal pro Woche eine Zellzahlüberprüfung durchgeführt, die in vorliegender Arbeit aus Kapazitätsgründen ebenfalls nicht mit eingebunden wurde.

Nährmedien unterschiedlicher Hersteller wurden, mit Ausnahme von VRBD, nicht überprüft. Gleiches gilt für unterschiedliche Chargen desselben Herstellers.

In allen Untersuchungen dieser Arbeit ist davon ausgegangen worden, dass es sich bei jeder Kolonie, die auf der Agar Platte wuchs, tatsächlich um den vorher beimpften Zielkeim handelte. Während der gesamten Validierungen der Nährmedien wurde für keine einzige Kolonie ein Bestätigungstest durchgeführt. Daraus folgt eine Ungewissheit darüber, ob es sich zum Beispiel bei ausgezählten *E. Coli* Kolonien auf VRBD tatsächlich um *E. Coli* Kolonien gehandelt hat. Sofern weitere Untersuchungen zu den durchgeführten Validierungen angestrebt werden, sollte in Erwägung gezogen werden, zumindest auffällige Kolonien einem weiteren Prozessschritt in Form eines Bestätigungstest zu unterziehen.

5.10. Kritik an der Methode

Die Durchführung der Validierungen waren mit sehr viel Input und Zeitmanagement seitens der Qualitätssicherung, der Laborleitung sowie des gesamten Teams der Eurofins Biotesting Services Nord GmbH verbunden. Schwierig war die Einhaltung der immer gleichbleibenden Zeiten für das Gießen der Petrischalen pro Stunde sowie das Erreichen einer ähnlichen Zellzahl in jedem einzelnen Cryoröhrchen während der Herstellung der Stämme. Die Untersuchungen mussten mindestens eine Woche im Voraus geplant und mit der Nährmedienküche abgesprochen werden. Die Methode ist für eine Person als zeitaufwändig zu beschreiben. Sie ist mit langen Versuchstagen im Rahmen einer frühen Probenvorbereitung und eines späten Abbaus am Abend verbunden.

5.11. Validität der Ergebnisse

Die Validität der Ergebnisse wird ausschließlich durch den Mittelwert der Dreifachbestimmung begründet. Den zu den Validierungen ermittelten Ergebnisse lagen keine Vergleichsdaten aus früheren Überprüfungen vor, weshalb das Thema der Validierung der Nährmedien für Plattengussverfahren noch ganz am Anfang des Erfahrungsstandes für das Laboratorium der Eurofins Biotesting Services Nord GmbH steht. Zudem wurden alle Überprüfungen ausschließlich durch eine einzelne Person ermittelt, wodurch mögliche Messfehler nicht aufgedeckt werden konnten. Die Ergebnisse mittels einer weiteren Person zu kontrollieren wäre somit ein weiterer möglicher Ansatz für die Fortführung dieser Untersuchungsreihe.

5.12. Empfehlung für weiterführende Forschung und Zukunftsausblick

In Bezug auf die Validität der Prüfergebnisse sollte die Reliabilität aller Ergebnisse kontrolliert werden. Hierfür müsste in der Zukunft unter selben Laborbedingungen und demselben Versuchsaufbau, die Validierungen für jedes Nährmedium erneut durchgeführt werden. In der Auswertung lässt sich feststellen, ob die Ergebnisse identisch sind oder nicht. Sind diese deckungsgleich, ist das Verfahren praktikabel und reproduzierbar.

Einige aus der Diskussion hervorgehende Schwierigkeiten und benannte Sachverhalte, können ausschließlich durch weitere Versuche näher erörtert werden, die für die betroffenen Nährmedien, gegebenenfalls im Rahmen einer Masterarbeit durchgeführt werden könnten. Ein möglicher Ansatz hierfür wäre die Rezepturveränderung der weniger produktiven Gussnährmedien oder zumindest der Vergleich ähnlicher Nährmedien innerhalb einer Organismengruppe. Des Weiteren ist es erwägenswert, wie in einigen herangezogenen Studien angewandt, die Inkubationstemperatur zu variieren und anhand dessen neue Daten bezüglich des Leistungsnachweises jedes untersuchten Nährmediums zu erhalten.

Eingehend auf weiterführende Forschung ist abschließend ein Gedankengang hervorzuheben, sofern der Versuchsablauf beibehalten werden soll:

Aktuell sind stabile Produktivitätswerte bis maximal 34 Stunden bestätigt. Das Limit der Verweildauer für die Agar TBX, VRBL und VRBD konnte jedoch im Zuge dieser Arbeit nicht ermittelt werden.

Wo liegt das Maximum der Verweildauer im Trockenschrank für die o.a. Agar?

6. Fazit

In Anlehnung an die Einleitung trägt diese Arbeit dazu bei, dass mikrobiologische Routineuntersuchungen von Lebensmitteln mit Hilfe des Plattengussverfahrens und der darauffolgenden Auswertung nach analytischen und genormten Gesichtspunkten abgesichert, überwacht und im besten Fall optimiert werden.

Die Validierung der Nährmedien für Plattengussverfahren gemäß DIN EN ISO 11133 ist dem letzten Ziel zuzuschreiben.

Der Leistungsnachweise jedes untersuchten Mediums trägt zukünftig zu einem spürbar vorteilhafteren Laboralltag bezüglich der Prozessschritte des Plattengussverfahrens bei. TBX, VRBD und VRBL könnten aufgrund des hervorragend nachgewiesenen Produktivitätsverlaufes >34 Stunden in der Eurofins Biotesting Services Nord GmbH nur noch alle zwei Tage aufgeschmolzen werden. YGC kann über einen gesamten Tag (neun Stunden) statt ausschließlich innerhalb von vier Stunden gegossen werden.

Diese Ergebnisse können Arbeitsabläufe verbessern sowie die Arbeitsbelastung verringern.

Je nach zu testenden Proben pro Tag kam es oft zu Engpässen in Bezug auf nur noch knapp vorhandene aufgeschmolzene Agar-Flaschen im Trockenschrank. Aufgrund der durchgeführten Validierungen und der Tatsache, dass aktuell vier von den fünf untersuchten Nährmedien weitaus länger als vier Stunden nach dem Aufschmelzprozess verwendet werden dürfen, stellt dies eine große Entlastung für die Laboranten dar, denn ein zweites oder drittes Mal Aufschmelzen pro Tag fällt selbst bei einem großen Probenumfang weg.

Hierbei entstehen wie in der Einleitung als mögliches Ziel benannt, nicht zuletzt ein nachhaltiger Umgang mit materiellen sowie zeitlichen Freiheitsgraden und aus wirtschaftlichen Aspekten heraus betrachtet eine Möglichkeit der Kosteneinsparung.

Nach der durchgeführten Arbeit sollte an die interne Qualitätskontrolle der Eurofins Biotesting Services Nord GmbH appelliert werden auch zu weiteren Bereichsthemen Validierungen und Prozessoptimierungen durchzuführen, die einerseits dem Endverbraucher im Sinne einer hinreichenden Lebensmittelüberwachung zugutekommen und gleichzeitig den Arbeitsalltag der Laboranten erträglicher und durchaus produktiver gestalten.

Literaturverzeichnis

- Abbott J. D. and Graham J. M. (1961): *Monthly Bulletin of the Ministry of Health and the Public Health Laboratory Services*, Nr. 20.
- Albert Albers, Matthias Behrendt, Simon Klingler (2016): *Verifikation und Validierung im Produktentstehungsprozess*, in: *Handbuch Produktenwicklung*, Udo Lindemann Hrsg., 1.Aufl., München, Carl Hansen Verlag
- Alvarez-Sieiro P., Montalbán-López M., Kuipers, OP. (2016): *Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 100, Nr.7
- ALTS AG (2015): Leitfaden der ALTS-Arbeitsgruppe „Hygiene und Mikrobiologie“ zur Leistungsprüfung von Nährmedien nach DIN EN ISO 11133-2015-02 in amtlichen Untersuchungseinrichtungen (Herstellung/Zukauf für den Eigenbedarf)
- Attz, Martin, Hettche, H Otto (1935): *Feste Nährböden–Agar Nährböden*, in: *Nährböden und Farbe in der Bakteriologie*, Berlin Heidelberg: Springer Verlag
- Bauerfeind, Rolf (2015): *Gramnegative aerobe/mikroaerophile Stäbchen und Kokken*, in: *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, Hans-Joachim Selbitz, Uwe Truyen, Peter Valentin-Weigand (Hrsg.), 10. Aufl., Stuttgart: Thieme Verlagsgruppe
- Baumgartner A., Bischofberger T., Bissig-Choisat B. et al (2017): *Leitfaden zur Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren und zur Abschätzung der Messunsicherheit im Bereich Lebensmittel- und Umweltmikrobiologie*, Eidgenössisches Departement für Wirtschaft, Bildung und Forschung WBF
- Binz, Thomas (2018): *Biologische Sicherheit im Labor*, 1. Aufl., Wiesbaden: Springer Verlag
- Brasca, M., Morandi, S., Lodi, R., Tamburini A. (2007): Redox potential to discriminate among species of lactic acid bacteria, *Journal of Applied Microbiology*, Vol.103, Nr.5.
- Brun, S., Bouchara, J.P., Bocquel, A., Basile A.M., Contet-Audonneau N., Chabasse D. (2001): *Evaluation of five commercial Sabouraud gentamicin-chloramphenicol agar media*, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*., Vol.20, Nr.10
- DIN EN ISO 11133:2015-02: Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser-Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien–Part.1: Anwendungsbereiche*
- DIN EN ISO 11133:2015-02: Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser-Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien–Part.5: Prüforganismen für die Leistungsprüfung–Auswahl der Prüforganismen*
- DIN EN ISO 11133:2015-02: Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser–Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien–Part.5: Prüforganismen für die Leistungsprüfung–Konservierung und Erhaltung von Prüforganismen*

DIN EN ISO 11133:2015-02: Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser–Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien–Part.7: Verfahren zur Leistungsprüfung von festen Nährmedien–**Verfahren für quantitative Prüfungen**

DIN EN ISO 11133:2015-02: Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser–Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien–Anhang B: **Herstellung einer Referenz-Stammkultur und einer Gebrauchskultur**–Anhang C: **Ablaufschemas der Verfahren zur Leistungsprüfung**

DIN EN ISO 11133: 2015-02: Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser–Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien–Anhang E: **Prüfmikroorganismen und Leistungskriterien für allgemein in der Lebensmittelmikrobiologie verwendete Nährmedien**

DIN EN ISO 11133:2015-02: Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser–Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien–Anhang G.: **Anwendung von Regelkarten zur Überwachung der quantitativen Prüfung von festen Nährböden**

DIN EN ISO 11133:2015-02: Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser–Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien–Anhang J.: **Festlegung von mikrobiologischen Leistungsprüfungen für standardisierte Nährmedien**

DIN EN ISO 4833-1:2013-12: Horizontales Verfahren zur Zählung von Mikroorganismen–Teil 1: Koloniezählverfahren bei 30°C mittels Gussplattenverfahren–Anwendungsbereiche

DIN ISO 16649-2:2009-12: Horizontales Verfahren für die Zählung von β -Glucuronidase-positiven *Escherichia Coli*–Teil:2 Koloniezählverfahren bei 44°C mit 5-Brom-4-Chlor-3-Indol- β -D-Glucuronid

DIN ISO 21528-2:2009-12: Horizontales Verfahren zum Nachweis und zur Zählung von *Enterobacteriaceae*–Teil:2 Koloniezähltechnik

DIN ISO 4832: 2006-02: Horizontal method for the enumeration of coliforms–Colony-Count technique–Teil:1 Zweck und Anwendungsbereiche–Teil:4 Nährmedien und Reagenzien

Drews, Gerhart (2015): *Bakterien–Ihre Entdeckung und Bedeutung für Natur und Mensch*, 2. Aufl., Berlin, Heidelberg: Springer

Drews, Gerhart (2013): *Die wichtigsten Voraussetzungen mit dem Arbeiten von Mikroorganismen–in: Mikrobiologisches Praktikum für Naturwissenschaftler*, 1.Aufl., Berlin, Heidelberg: Springer

Gäumann, Ernst (1964): *Die Pilze Grundzüge ihrer Entwicklungsgeschichte und Morphologie*, 2. Aufl., Basel: Springer Verlag

Gonçalves M.M., Freitas R., Nero L.A., Carvalho A.F. (2009): *Enumeration of starter cultures during yogurt production using Petrifilm AC plates associated with acidified MRS and M17 broths*, Journal of Dairy Research, Vol.76, Nr.2

- Goverde M, Willrodt J, Staerk A. 2017: *Evaluation of the Recovery Rate of Different Swabs for Microbial Environmental Monitoring*, PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, 71., Nr.1
- Greiß P. (1991): *Hygienemaßnahmen in der Lebensmittelindustrie*, Dieter Osteroth (Hrsg.), 1. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer
- Groß, Uwe (2013): *Allgemeine Bakteriologie*, in: *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, 3. Aufl., Stuttgart: Thieme Verlag
- Hagen Meyer, Alfred (2006): *RÖMP Lexikon Lebensmittelchemie*, Gerhard Eisenbrand, Peter Schreier (Hrsg.), 2.Aufl., Stuttgart: Thieme Verlag
- Hahn H. (1991): *Enterobakterien: Allgemeines und fakultativ pathogene Arten*, in: *Medizinische Mikrobiologie. Springer-Lehrbuch* Hahn H., Falke D., Klein P. (Hrsg.), Berlin, Heidelberg: Springer Verlag
- Hamatschek, Jochen (2016): *Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz*, in: *Lebensmitteltechnologie-Die industrielle Herstellung von Lebensmitteln aus landwirtschaftlichen Rohstoffen*, Stuttgart: Eugen Ulmer
- Hirsch-Kaufmann, Monica, Schweiger, Manfred (2004): *Mikrobiologie–Prokaryoten sind kernlose Zellen*, in: *Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 6. Aufl., Stuttgart: Thieme Verlag
- Hocking, A.D. und Pitt, J.I. (1980): *Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods*, Journal of Applied and Environmental Microbiology, Nr. 39
- Houbraken J., Samson RA. (2011): *Phylogeny of Penicillium and the segregation of Trichocomaceae into three families*, Studies in Mycology, Vol.70, Nr.1, 50
- Hörnlimann Beat, Riesner Detlev, Kretschmar, Hans A., Seehoffer Horst, Arber, Werner (2001): *Prionen und Prionkrankheiten*. Berlin New York: Walter de Gruyter.
- ISO 15214:1998-08: Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria Colony-count technique at 30 °C–Teil 1: Zweck und Anwendungsbereich–Teil 4: Nährmedien und Reagenzien*
- Jozic S., Vulkić Lušić D., Aljinović A. et al. (2019): *Is TBX agar a suitable medium for monitoring Escherichia Coli in bathing water using the membrane filtration?*, in: *Environmental Monitoring Assess*, Band 191, Nr.9
- Jurat-Fuentes, Juan Luis, A. Jackson, Trevor (2012): *Bacterial Entomopathogens, Family Pseudomonadaceae: Pseudomonas spp.*, in: *Insect Pathology*, Fernando E. Vega and Harry K. Kaya (Hrsg.), 2. Aufl., London, Waltham,: Academic Press
- Kanagawa, S., Ohshima, C., Takahashi, H. (2018): *Evaluation of Petrifilm Lactic Acid Bacteria Plates for Counting Lactic Acid Bacteria*, Journal of Food Protection, Vol.81, Nr.6

Kane, J., Summerbell, R.C. (1999): *Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton, an agents of superficial mycoses in: Manual of clinical microbiology*, P.R. Murray, E. J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, R.H. Tenover, American Society for Microbiology, Aufl. 7

Kim SH, Field K.G., Chang D.S., Wei C.I., An H. (2001): *Identification of bacteria crucial to histamine accumulation in pacific mackerel during storage*, Journal of Food Protection, Vol. 64, Nr.10

Kromidas Stavros, Morkowski, Januz S. (2011): *Validierung in der Analytik*. 2 Hrsg. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH und Co. KGaA.

Lange, Susanne, Daxenberger Andreas (2007): *Praxisleitfaden IFS Logistic Standards–Sicherheit der Lebensmittel auf dem Weg vom Hersteller zum Handel*, 1.Aufl., Hamburg: Behr's Verlag

Laudert, D. (2015): *Lebensmitteltechnologisch relevante Mikroorganismen*, in: *Moderne Lebensmittelchemie*, M. Fischer, M. A. Glomb (Hrsg.), 1. Aufl., Hamburg: Behr's Verlag

Leuchtenberger, Andrea (1998): *Grundwissen zur mikrobiellen Biotechnologie*, 1.Aufl., Wiesbaden: Springer

Lück, Erich, Jager Martin (1995): *Chemische Lebensmittelkonservierung*, 3. Aufl., Berlin: Springer

Madigan, Michael T., Martinko, John M., Stahl, David A., Clark, David P. (2015): *Die Entdeckung der Mikrobiologie*, in: *Brock Mikrobiologie kompakt*, Martina Jahn, Dieter Jahn (Hrsg.), 13. Aufl., München: Pearson Studium

Malcom D., Richardson K.B, Hope William (2009): *Clinical Mycology*, Elias J. Anaissie, Michael R. McGinnis and Michael A. Pfaller (Hrsg.), 2. Aufl., Churchill Livingstone: London

Menn, Carmen, Bundesinstitut für Ernährung (2020): *Lebensmittelverderb erkennen* [online] <https://www.bzfe.de/inhalt/lebensmittelverderb-erkennen-748.html,01.03.2020>

Mercuri, A.J., Cox, N.A. (1979): *Coliforms and Enterobacteriaceae Isolates from Selected Foods*, Journal of Food Protection, Vol.42, Nr.9

Messelhäußer, Ute (2010): *Kultivierungsverfahren von Bakterien*, In: *Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik*, Ulrich Busch (Hrsg.), Berlin, Heidelberg: Springer

Müller, Gunther (1983): *Grampositive, asporogene Stäbchenförmige Bakterien*, in: *Grundlagen der Lebensmittelmikrobiologie*, 5. Aufl. Darmstadt: Dr. Dietrich Steinkopff Verlag

Nitschen, Benjamin, Figiel, Anna (2016): *Zukunftstrends der Lebensmittellogistik Herausforderungen und Lösungsimpulse*, Frank Straube (Hrsg.) Universität Berlin

Oblinger J.L., Kennedy J.E., Langston D.M. (1982): *Microflora Recovered from Foods on Violet Red Bile Agar with and without Glucose and Incubated at Different Temperatures*, Journal of Food Protection, Vol. 45, Nr.10

Octavia, Sophie, Lan Ruiting (2014): The Family of *Enterobacteriaceae*, in: *The Prokaryotes*, Eugen Rosenberg, Edward F. DeLong, Stephen Lory, Erko Stackebrandt, Fabiano Thompson (Hrsg.), Berlin, Heidelberg: Springer Verlag

Olivier Bernardi A., Santos da Silva T., Stefanello A. (2019): *Sensitivity of food spoilage fungi to a smoke generator sanitizer*, International Journal of Food Microbiology, Vol. 289

Ortolani M.B., Viçosa G.N., Beloti V., Nero L.A. (2007): *Screening and enumeration of lactic acid bacteria in milk using three different culture media in Petrifilm Aerobic Count plates and conventional pour plate methodology*, Journal of Dairy Research, Vol.74, Nr.4

Padamsee M., Kumar T.K., Riley R. (2012): *The genome of the xerotolerant mold Wallemia sebi reveals adaptations to osmotic stress and suggests cryptic sexual reproduction*, in: *Fungal Genetics and Biology*, Vol.49, Nr.3, p. 217-226.

Palleroni, Norberto J. (1981): Introduction to the Family Pseudomonadaceae, in: *The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria*, Mortimer P. Star, Heinz Stolp, Hanz G. Trüper, Albert Balows, Hans G. Schlegel (Hrsg.), Berlin, Heidelberg: Springer Verlag

Pandey, B. N., Pandey, P. N., Matho, B., Singh, L. B., Singh, R.K., Januar, M. K. (2008): *Biotechnology*, S. B. Nagia (Hrsg.), New Delhi: Balaji Offset

Paulsen P., Borgetti C., Schopf E., Smulders F.J. (2008): *Enumeration of Enterobacteriaceae in various foods with a new automated most-probable-number method compared with Petrifilm and international organization for standardization procedures*, Journal of Food Protection, Vol. 71, Nr.2

Peréz Rodríguez, Noelia, Torrao-Agrasar, Ana, Domínguez, José M. (2016): *Verwendung von Aspergillus niger-Extrakten, die durch Festkörperfermentation erhalten werden*, in: *Pilzbiotechnologie Entwicklungen und Anwendungen*, Mariane Petre (Hrsg.), 1. Aufl., o.O.i: Elsevier Verlag

Pichhardt, Klaus (1993): *Lebensmittelmikrobiologie*, 3. Aufl., Berlin, Heidelberg: Springer Verlag

PV 0053:2013-05: *Vefahren zur Zählung osmotoleranter Hefen und Schimmelpilzen in zuckerhaltigen Lebensmitteln–Interne Methode–Teil: Zweck und Anwendung*

Ray B., Speck M.L. (1973): *Discrepancies in the enumeration of Escherichia coli*, Applied Microbiology, Vol.25, Nr.4

Raza T, Ullah SR, Mehmood K, Andleeb S. (2018): *Vancomycin resistant Enterococci: A brief review*, Journal of the Pakistan Medical Association, Vol.68, Nr.5

Rehm, Hans-Jürgen (1967): *Technisch wichtige Hefearten*, in: *Industrielle Mikrobiologie*, Berlin, Heidelberg: Springer Verlag

Reinert, Ralf René (2009): *Grampositive und fakultativ anaerobe Kokken*, in: *Mikrobiologische Diagnostik*, Birgid Neumeister, Heinrich K. Geiss, Rüdiger W. Braun et al. (Hrsg.), 2. Aufl., Stuttgart: Thieme Verlag

- Rieht, Michael (2017): *Pharmazeutische Mikrobiologie-Qualität, Monitoring, Betriebshygiene*, 2. Aufl., Weinheim, Wiley-VCH-Verlag
- Rolle, Michael (2006): *Allgemeine Bakteriologie–Kulturverfahren zu Anzüchtung von Bakterien*, in: *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, Anton Mayr (Hrsg.), 8. Aufl., Stuttgart: Enke Verlag
- Schink, B. (2007): *Wachstum und Ernährung der Mikroorganismen*, in: *Allgemeine Mikrobiologie, Georg Fuchs (Hrsg.)*, 8. Aufl., Stuttgart: Thieme Verlag
- Schubert M., Spiegel H., Schillberg S., Nölke G. (2018): *Aspergillus-specific antibodies - Targets and applications*, *Biotechnology Advances*, Vol. 36, Nr. 4, 1167-1184
- Silva J.O., Franceschini S.A., Lavrador M.A., Candido R.C. (2004): *Performance of selective and differential media in the primary isolation of yeasts from different biological samples*, *Mycopathologia*, Vol. 157, Nr.1
- Steinbüchel Alexander, Oppermann-Sanio Fred Bernd, Ewering Christian, Pötter Markus (2013): *Mikrobiologisches Praktikum–Versuche und Theorie*, 2. Aufl., Berlin Heidelberg: Springer Verlag
- Steffen Harald (2006): *Einführung und Validierung einer datenbankgestützten Qualitätsmanagement-Dokumentation in einem mittelständischen Unternehmen der Medizintechnik*, 1. Aufl., Hamburg: Diplomica Verlag
- Torlak E, Akan İ.M , Gökmen M. (2008): *Comparison of TEMPO® EC and TBX medium for the enumeration of Escherichia coli in cheese*, in: *Letters in Applied Microbiology*, Vol.47, Nr. 6
- Wagner, M., (2012): *Lebensmittelsicherheit und Lebensmittelüberwachung*, Hartmunt Dunkelberg, Thomas Gebel, Andrea Hartig (Hrsg.), 1 Aufl., Weinheim: WILEY-VICH, S. 273-275
- Weißgerber P. (2017): *Mikrobiologische Diagnostik und Infektiologie*, in: *Repetitorium Krankenhaushygiene, hygienebeauftragter Arzt und ABS-beauftragter Arzt*, Sebastian Schulz-Stübner (Hrsg.), 2. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer
- Welmitz Jörg, Gluschke Michael (2004): *Leitlinien zu Methodvalidierung*, Berlin: Umweltbundesamt, p.3
- Wendt, Constanze, Hof, Herbert (2017): *Hygiene und Impfungen*, in: *Medizinische Mikrobiologie*, 6. Aufl., Stuttgart: Thieme Verlag.
- Zajc J., Gunde-Cimerman N. (2018): *The Genus Wallemia-From Contamination of Food to Health Threat*, in: *Microorganisms*, Vol. 6, Nr. 2

Anhang A- Ergebnisse

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Ergebnisse zu den Aufschmelzprozessen TBX

TBX Aufschmelzmethode 1 (gemäß DIN EN ISO 11133)

TBX Aufschmelzmethode 2 (abweichend von DIN EN ISO 11133)

TBX Aufschmelzmethode 3 (abweichend von DIN EN ISO 11133)

Routineergänzende Tabellen TBX

Routinebegleitende Leistungsprüfung für 250 ml TBX Agar-Flaschen über einen Zeitraum von maximal 34 Stunden

Ergebnisse zu den Aufschmelzprozessen VRBD

VRBD Aufschmelzmethode 1 gemäß DIN EN ISO 11133

VRBD Aufschmelzmethode 2 (abweichend von DIN EN ISO 11133)

VRBD Aufschmelzmethode 3 (abweichend von DIN EN ISO 11133)

Routinebegleitende Leistungsprüfung von 400 ml VRBD Agar-Flaschen (Xebios) über einen Zeitraum von maximal 34 Stunden

Routinebegleitende Leistungsprüfung von 250 ml VRBD Agar-Flaschen (Xebios) über einen Zeitraum von maximal 34 Stunden

Ergebnisse zu den Aufschmelzprozessen VRBL

VRBL Aufschmelzmethode 1 gemäß DIN EN ISO 11133

VRBL Aufschmelzmethode 2 (abweichend von DIN EN ISO 11133)

VRBL Aufschmelzmethode 3 (abweichend von DIN EN ISO 11133)

Routinebegleitende Leistungsprüfung von VRBL über einen Zeitraum von maximal 34 Stunden, 250 ml Agar-Flaschen

Ergebnisse zu den Aufschmelzprozessen YGC

YGC Aufschmelzmethode 1 gemäß DIN EN ISO 11133

YGC Aufschmelzmethode 2 (abweichend von DIN EN ISO 11133)

YGC Aufschmelzmethode 3 (abweichend von DIN EN ISO 11133)

Ergebnisse zu den Aufschmelzprozessen MRS

MRS Aufschmelzmethode 1 gemäß DIN EN ISO 11133

MRS Aufschmelzmethode 2 (abweichend von DIN EN ISO 11133)

MRS Aufschmelzmethode 3 (abweichend von DIN EN ISO 11133)

Abbildungsverzeichnis

AA- Abbildung 1: Regelkarte Produktivitätsverhältnis E.Coli auf TBX 500 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	99
AA- Abbildung 2: Regelkarte Produktivitätsverhältnis E.Coli auf TBX 250 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	101
AA- Abbildung 3: Regelkarte Produktivitätsverhältnis E.Coli auf TBX 500 ml, Aufschmelzprozess während $t_{\max}=95^{\circ}\text{C}$	102
AA- Abbildung 4: Regelkarte Produktivitätsverhältnis E.Coli auf TBX 250 ml, Aufschmelzprozess während $t_{\max}=95^{\circ}\text{C}$	104
AA- Abbildung 5: Regelkarte Produktivitätsverhältnis E.Coli auf TBX 500 ml, Überschreitung des Aufschmelzprozesses	106
AA- Abbildung 6: Regelkarte Produktivitätsverhältnis E.Coli auf TBX 250 ml, Überschreitung des Aufschmelzprozesses	107
AA- Abbildung 7: Regelkarte Produktivitätsverhältnis E.Coli auf TBX 250 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h	113
AA- Abbildung 8: Regelkarte Produktivitätsverhältnis E.Coli auf VRBD 500 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	115
AA- Abbildung 9: Regelkarte Produktivitätsverhältnis E.aerogenes auf VRBD 500ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	116
AA- Abbildung 10: Regelkarte Produktivitätsverhältnis S.enterica auf VRBD 500ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	117
AA- Abbildung 11: Regelkarte Produktivitätsverhältnis C.freundii auf VRBD 500ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	118
AA- Abbildung 12: Regelkarte Produktivitätsverhältnis E.Coli auf VRBD 250 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	119
AA- Abbildung 13: Regelkarte Produktivitätsverhältnis E.aerogenes auf VRBD 250 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	120
AA- Abbildung 14: Regelkarte Produktivitätsverhältnis S.enterica auf VRBD 250 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	121
AA- Abbildung 15: Regelkarte Produktivitätsverhältnis C.freundii auf VRBD 250 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	122
AA- Abbildung 16: Regelkarte Produktivitätsverhältnis E.Coli auf VRBD 500 ml, Aufschmelzprozess während $t_{\max}=95^{\circ}\text{C}$	123

AA- Abbildung 17: Regelkarte Produktivitätsverhältnis E.aerogenes auf VRBD 500 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95^{\circ}C$	124
AA- Abbildung 18: Regelkarte Produktivitätsverhältnis S.enterica auf VRBD 500 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95^{\circ}C$	125
AA- Abbildung 19: Regelkarte Produktivitätsverhältnis C.freundii auf VRBD 500 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95^{\circ}C$	126
AA- Abbildung 20; Regelkarte Produktivitätsverhältnis E.Coli auf VRBD 250 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95^{\circ}C$	127
AA- Abbildung 21: Regelkarte Produktivitätsverhältnis E.aerogenes auf VRBD 250 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95^{\circ}C$	128
AA- Abbildung 22: Regelkarte Produktivitätsverhältnis S.enterica auf VRBD 250 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95^{\circ}C$	129
AA- Abbildung 23: Regelkarte Produktivitätsverhältnis C.freundii auf VRBD 250 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95^{\circ}C$	130
AA- Abbildung 24: Regelkarte Produktivitätsverhältnis E.Coli auf VRBD 400 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h	133
AA- Abbildung 25: Regelkarte Produktivitätsverhältnis E.aerogenes auf VRBD 400 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max.34 h	135
AA- Abbildung 26: Regelkarte Produktivitätsverhältnis S.enterica auf VRBD 400 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max.34 h	137
AA- Abbildung 27: Regelkarte Produktivitätsverhältnis C.freundii auf VRBD 400 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max.34 h	139
AA- Abbildung 28: Regelkarte Produktivitätsverhältnis E.Coli auf VRBL 250 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf $95^{\circ}C$	141
AA- Abbildung 29: Regelkarte Produktivitätsverhältnis E.aerogenes auf VRBL 250 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf $95^{\circ}C$	142
AA- Abbildung 30: Regelkarte Produktivitätsverhältnis C.freundii auf VRBL 250 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf $95^{\circ}C$	143
AA- Abbildung 31: Regelkarte Produktivitätsverhältnis E.Coli auf VRBL 250 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95^{\circ}C$	144
AA- Abbildung 32: Regelkarte Produktivitätsverhältnis E.aerogenes auf VRBL 250 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95^{\circ}C$	145
AA- Abbildung 33: Regelkarte Produktivitätsverhältnis C.freundii auf VRBL 250 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95^{\circ}C$	146

AA- Abbildung 34: Regelkarte Produktivitätsverhältnis E.Coli auf VRBL 250 ml, Überschreitung des Aufschmelzprozesses	147
AA- Abbildung 35: Regelkarte Produktivitätsverhältnis E.aerogenes auf VRBL 250 ml, Überschreitung des Aufschmelzprozesses.....	148
AA- Abbildung 36: Regelkarte Produktivitätsverhältnis C.freundii auf VRBL 250 ml, Überschreitung des Aufschmelzprozesses.....	149
AA- Abbildung 37: Regelkarte Produktivitätsverhältnis E.Coli auf VRBL 250 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h	151
AA- Abbildung 38: Regelkarte Produktivitätsverhältnis E.aerogenes auf VRBL 250 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h	153
AA- Abbildung 39: Regelkarte Produktivitätsverhältnis S.enterica auf VRBL 250 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h	155
AA- Abbildung 40: Regelkarte Produktivitätsverhältnis S.cerevisiae auf YGC 250 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	156
AA- Abbildung 41: Regelkarte Produktivitätsverhältnis A.braziliensis auf YGC 250 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	157
AA- Abbildung 42: Regelkarte Produktivitätsverhältnis C.albicans auf YGC 250 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	158
AA- Abbildung 43: Regelkarte Produktivitätsverhältnis W.sebi auf YGC 250 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	159
AA- Abbildung 44: Regelkarte Produktivitätsverhältnis S.cerevisiae auf YGC 250 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95^{\circ}C$	160
AA- Abbildung 45: Regelkarte Produktivitätsverhältnis A.braziliensis auf YGC 250 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95^{\circ}C$	161
AA- Abbildung 46: Regelkarte Produktivitätsverhältnis C.albicans auf YGC 250 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95^{\circ}C$	162
AA- Abbildung 47: Regelkarte Produktivitätsverhältnis W.sebi auf YGC 250 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95^{\circ}C$	163
AA- Abbildung 48: Regelkarte Produktivitätsverhältnis S.cerevisiae auf YGC 250 ml, Überschreitung des Aufschmelzprozesses.....	164
AA- Abbildung 49: Regelkarte Produktivitätsverhältnis A.braziliensis auf YGC 250 ml, Überschreitung des Aufschmelzprozesses.....	165
AA- Abbildung 50: Regelkarte Produktivitätsverhältnis C.albicans auf YGC 250 ml, Überschreitung des Aufschmelzprozesses.....	166

AA- Abbildung 51: Regelkarte Produktivitätsverhältnis <i>W.sebi</i> auf YGC 250 ml, Überschreitung des Aufschmelzprozesses	167
AA- Abbildung 52: Regelkarte Produktivitätsverhältnis <i>P.pentosaceus</i> auf MRS 250 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C	168
AA- Abbildung 53: Regelkarte Produktivitätsverhältnis <i>L.sakei</i> auf MRS 250 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	169
AA- Abbildung 54: Regelkarte Produktivitätsverhältnis <i>L.lactis</i> auf MRS 250 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	170
AA- Abbildung 55: Regelkarte Produktivitätsverhältnis <i>P.pentosaceus</i> auf MRS 250 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95^{\circ}C$	171
AA- Abbildung 56: Regelkarte Produktivitätsverhältnis <i>L.sakei</i> auf MRS 250 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95^{\circ}C$	172
AA- Abbildung 57: Regelkarte Produktivitätsverhältnis <i>L.lactis</i> auf MRS 250 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95^{\circ}C$	173
AA- Abbildung 58: Regelkarte Produktivitätsverhältnis <i>P.pentosaceus</i> auf MRS 250 ml, Überschreitung des Aufschmelzprozesse	174
AA- Abbildung 59: Regelkarte Produktivitätsverhältnis <i>L.sakei</i> auf MRS 250 ml, Überschreitung des Aufschmelzprozesses	175
AA- Abbildung 60: Regelkarte Produktivitätsverhältnis <i>L.lactis</i> auf MRS 250 ml, Überschreitung des Aufschmelzprozesses	176

Tabellenverzeichnis

AA- Tabelle 1: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses TBX 500 ml während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	98
AA- Tabelle 3: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses TBX 250 ml während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	100
AA- Tabelle 4: Gesammelte Daten der Regelkarte für TBX 250 ml E.Coli, Aufschmelzprozess während sich das WB auf 95 °C erwärmt.....	100
AA- Tabelle 5: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses TBX 500 ml während t_{\max} 95 °C	101
AA- Tabelle 6: Gesammelte Daten der Regelkarte für TBX 500 ml E.Coli, Aufschmelzprozess bei $t_{\max}=95$ °C	102
AA- Tabelle 7: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses TBX 250 ml bei $t_{\max} = 95$ °C	103
AA- Tabelle 8: Gesammelte Daten der Regelkarte für TBX 250 ml E.Coli, Aufschmelzprozess bei $t_{\max}=95$ °C	103
AA- Tabelle 9: Aufeinanderfolgende Überprüfungen bei Überschreitung des Aufschmelzprozesses TBX 500 ml.....	105
AA- Tabelle 10: Gesammelte Daten der Regelkarte für TBX 500 ml E.Coli bei Überschreitung des Aufschmelzprozesses	105
AA- Tabelle 11: Aufeinanderfolgende Überprüfungen bei Überschreitung des Aufschmelzprozesses TBX 250 ml	106
AA- Tabelle 12: Gesammelte Daten der Regelkarte für TBX 250 ml E.Coli bei Überschreitung des Aufschmelzprozesses	107
AA- Tabelle 13: Gesammelte Daten der Regelkarte für TBX 500 ml E.Coli für die Standzeiten-Kontrolle der Routineuntersuchungen	109
AA- Tabelle 14: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von E.Coli für TBX 250 ml beschreiben.	110
AA- Tabelle 15: Gesammelte Daten der Regelkarte für TBX 250 ml E.Coli für die Standzeiten-Kontrolle der Routineuntersuchungen	112
AA- Tabelle 16: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBD 500 ml E.Coli während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	114
AA- Tabelle 17: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBD 500 ml E.aerogenes während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	115

AA- Tabelle 18: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBD 500 ml S.enterica während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	116
AA- Tabelle 19: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBD 500 ml C.freundii während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	117
AA- Tabelle 20: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBD 250 ml E.Coli während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	118
AA- Tabelle 21: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBD 250 ml E.aerogenes während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	119
AA- Tabelle 22: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBD 250 ml S.enterica während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	120
AA- Tabelle 23: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBD 250 ml C.freundii während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	121
AA- Tabelle 24: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBD 500 ml E.Coli während $t_{max}=95$ °C	123
AA- Tabelle 25: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBD 500 ml E.aerogenes während $t_{max}=95$ °C.....	123
AA- Tabelle 26: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBD 500 ml S.enterica während $t_{max}=95$ °C	124
AA- Tabelle 27: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBD 500 ml C.freundii während $t_{max}=95$ °C.....	125
AA- Tabelle 28: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBD 250 ml E.Coli während $t_{max}=95$ °C	126
AA- Tabelle 29: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBD 250 ml E.aerogenes während $t_{max}=95$ °C.....	127
AA- Tabelle 30: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBD 250 ml S.enterica $t_{max}=95$ °C	128
AA- Tabelle 31: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBD 250 ml C.freundii während $t_{max}=95$ °C.....	129
AA- Tabelle 32: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von E.Coli für VRBD 400 ml beschreiben	132
AA- Tabelle 33: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von E.aerogenes für VRBD 400 ml beschreiben.	134
AA- Tabelle 34: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von S.enterica für VRBD 400 ml beschreiben. ...	136

AA- Tabelle 35: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von <i>C.freundii</i> für VRBD 400 ml beschreiben.....	138
AA- Tabelle 36: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBL 250 ml <i>E.Coli</i> während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	140
AA- Tabelle 37: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBL 250 ml <i>E.aerogenes</i> während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	141
AA- Tabelle 38: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBL 250 ml <i>C.freundii</i> während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	142
AA- Tabelle 39: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBL 250 ml <i>E.Coli</i> während $t_{max}=95$ °C.....	143
AA- Tabelle 40: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBL 250 ml <i>E.aerogenes</i> während $t_{max}=95$ °C.....	144
AA- Tabelle 41: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBL 250 ml <i>C.freundii</i> während $t_{max}=95$ °C.....	145
AA- Tabelle 42: Aufeinanderfolgende Überprüfungen bei Überschreitung des Aufschmelzprozesses VRBL 250 ml <i>E.Coli</i>	146
AA- Tabelle 43: Aufeinanderfolgende Überprüfungen bei Überschreitung des Aufschmelzprozesses VRBL 250 ml <i>E.aerogenes</i>	147
AA- Tabelle 44: Aufeinanderfolgende Überprüfungen bei Überschreitung des Aufschmelzprozesses VRBL 250 ml <i>C.freundii</i>	148
AA- Tabelle 45: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von <i>E.Coli</i> für VRBL 250 ml beschreiben.	150
AA- Tabelle 46: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von <i>E.aerogenes</i> für VRBL 250 ml beschreiben.	152
AA- Tabelle 47: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von <i>C.freundii</i> für VRBL 250 ml beschreiben.	154
AA- Tabelle 48: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses YGC 250 ml <i>S.cerevisiae</i> während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	156
AA- Tabelle 49: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses YGC 250 ml <i>A.braziliensis</i> während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	157
AA- Tabelle 50: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses YGC 250 ml <i>C.albicans</i> während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	158
AA- Tabelle 51: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses YGC 250 ml <i>W.sebi</i> während der Erwärmung des WB auf 95 °C.....	159

AA- Tabelle 52: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses YGC 250 ml S.cerevisiae während $t_{\max}=95\text{ °C}$	160
AA- Tabelle 53: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses YGC 250 ml A.braziliensis während $t_{\max}=95\text{ °C}$	161
AA- Tabelle 54: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses YGC 250 ml C.albicans während $t_{\max}=95\text{ °C}$	161
AA- Tabelle 55: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses YGC 250 ml W.sebi während $t_{\max}=95\text{ °C}$	162
AA- Tabelle 56: Aufeinanderfolgende Überprüfungen bei Überschreitung des Aufschmelzprozesses YGC 250 ml S.cerevisiae	163
AA- Tabelle 57: Aufeinanderfolgende Überprüfungen bei Überschreitung des Aufschmelzprozesses YGC 250 ml A.braziliensis.....	164
AA- Tabelle 58: Aufeinanderfolgende Überprüfungen bei Überschreitung des Aufschmelzprozesses YGC 250 ml C.albicans.....	165
AA- Tabelle 59: Aufeinanderfolgende Überprüfungen bei Überschreitung des Aufschmelzprozesses YGC 250 ml W.sebi.....	166
AA- Tabelle 60: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses MRS 250 ml P.pentosaceus während der Erwärmung des WB auf 95 °C	167
AA- Tabelle 61: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses MRS 250 ml L.sakei während der Erwärmung des WB auf 95 °C	168
AA- Tabelle 62: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses MRS 250 ml L.lactis während der Erwärmung des WB auf 95 °C	169
AA- Tabelle 63: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses MRS 250 ml P.pentosaceus während $t_{\max}=95\text{ °C}$	171
AA- Tabelle 64: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses MRS 250 ml L.sakei während $t_{\max}=95\text{ °C}$	172
AA- Tabelle 65: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses MRS 250 ml L.lactis während $t_{\max}=95\text{ °C}$	172
AA- Tabelle 66: Aufeinanderfolgende Überprüfungen bei Überschreitung des Aufschmelzprozesses MRS 250 ml P.pentosaceus.....	174
AA- Tabelle 67: Aufeinanderfolgende Überprüfungen bei Überschreitung des Aufschmelzprozesses MRS 250 ml L.sakei	175
AA- Tabelle 68: Aufeinanderfolgende Überprüfungen bei Überschreitung des Aufschmelzprozesses MRS 250 ml L.lactis	175

Ergebnisse zu den Aufschmelzprozessen TBX

TBX Aufschmelzmethode 1 (gemäß DIN EN ISO 11133)

Untersuchung des Aufschmelzprozesses der Agar-Flaschen während sich das WB auf 95°C erhitzt

In nachfolgender Tabelle sind drei aufeinanderfolgende Überprüfungen des Produktivitätsverhältnisses von TBX zu sehen. Die P_R -Wert liegen in einem Gesamtzeitraum von 4 Stunden zwischen 80% und 90%. Die Leistung von TBX Agar wird während des Aufschmelzens des Agars unter Routinebedingungen in keiner Weise beeinträchtigt.

500 ml TBX Agar-Falschen

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) TBX 500 ml Flasche I-III <i>E.Coli</i>			
$i=$	t_0	t_1	t_2
Referenz	118	126	111
KBE (Prüfagar-xi)	100	101	100
R_i	0,84	0,80	0,90
$ r_i - r_{i-1} $		0,04	0,10

AA- Tabelle 1: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses TBX 500 ml während der Erwärmung des WB auf 95 °C

Nachfolgende Tabelle AA- 2 geht aus Tabelle AA- 1 hervor und beinhaltet zusätzlich die Daten zum mittleren P_R -Wert (hier für *E.Coli*) und den Vertrauensgrenzen, die in der Regelkarte erscheinen. Sie dient als Zwischenschritt für eine erleichterte Erstellung der Regelkarte, da alle benötigten Daten in einer Tabelle aufgeführt sind. Die Regelkarte kann so in Excel direkt aus der Tabelle konstruiert werden, ist für die Ergebnisdarstellung jedoch unwesentlich. Dieser Zwischenschritt ist für jeden Zielkeim des jeweiligen untersuchten Nährmediums durchzuführen und erscheint einmalig exemplarisch für TBX.

Flasche 1.-3. 500ml <i>E.Coli</i>						
Stunden	P_R -Wert <i>E.Coli</i>	Mittelwert <i>E.Coli</i>	95. Kl. Anfang	95. Kl. Ende	99. Kl. Anfang	99. Kl. Ende
0	0,84	0,85	0,94	0,76	0,98	0,72
2	0,80	0,85	0,94	0,76	0,98	0,72
4	0,90	0,85	0,94	0,76	0,98	0,72

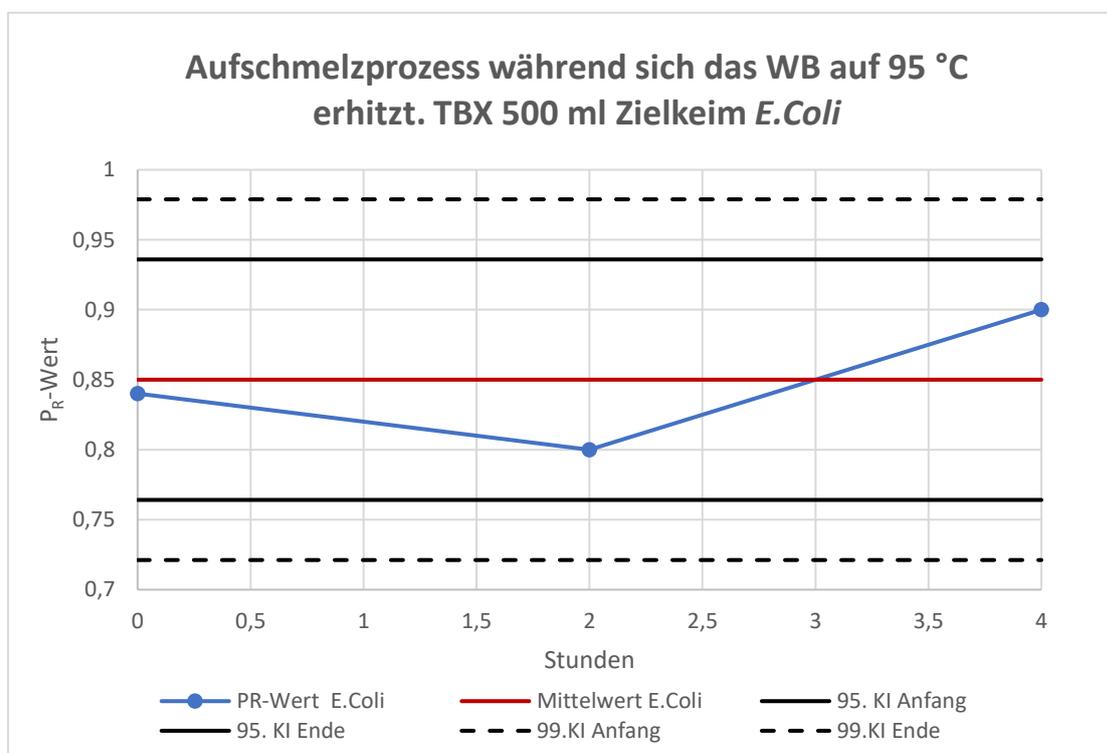
AA- Tabelle 2: Gesammelte Daten der Regelkarte für TBX 500 ml *E.Coli*, Aufschmelzprozess während sich das WB auf 95 °C erwärmt

In der nachfolgenden Regelkarte sind die Ergebnisse des Aufschmelzprozesses der Agar-Flaschen während sich das Wasserbad auf 95°C erhitzt grafisch abgebildet. Neben des

Produktivitätsverhältnisses zwischen ausgezählten *E.Coli*-Kolonien und der Anzahl an *E.Coli* Kolonien auf der Referenzagar-Platte, sind die Konfidenzintervalle für 95% und 99%-Vertrauensgrenzen sowie der mittlere P_R -Wert von *E.Coli* für das Nährmedium TBX über den gesamten Untersuchungszeitraums abgebildet.

Die beschriebenen Elemente der Regelkarte gelten für jeden Zielkeim des untersuchten Nährmediums und müssen immer individuell für die Untersuchungen des Aufschmelzprozesses und die Untersuchungen der Routineüberprüfungen errechnet werden (siehe 3.9.2 Erstellung einer Regelkarte)

Die Produktivität des Zielkeim *E.Coli* bei der Untersuchung dieses Aufschmelzprozesses mit 500 ml TBX Agar nimmt zwischen der ersten und der zweiten Messung ab und befindet sich bis zu der Messung nach 2 Stunden im sinkenden Zustand. Anschließend steigt die Produktivität erneut, so dass sie nach 4 Stunden oberhalb des mittleren P_R -wertes liegt.



AA- Abbildung 1: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *E.Coli* auf TBX 500 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C

Für das Nährmedium TBX geht aus der Tabelle AI 1: *Übersicht der für TBX relevante morphologische Merkmale, Faktoren der Qualitätskontrolle in Bezug auf die jeweiligen Zielkeime* hervor, dass für eine ausreichende Leistung des Nährbodens ein P_R -Wert >0,50 erforderlich ist. Wie aus Abbildung AA-1: *Regelkarte Produktivitätsverhältnis E.Coli auf TBX, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des Wasserbades auf 95 °C* abzulesen ist, beeinträchtigt der Aufschmelzprozess, nach

errechneten P_R -Werten über 4 Stunden, den TBX-Agar nicht. Der mittlere P_R -Wert liegt bei 0,85, was deutlich über dem minimalen geduldeten P_R -Wert liegt.

250 ml TBX Agar-Flaschen

Dieselbe Untersuchung des Aufschmelzprozesses für ein Volumen von 250 ml TBX Agar-Flaschen ergab keinen erheblichen Unterschied im Vergleich zu den 500 ml Agar-Flaschen. Die Spanne des Produktivitätsbereiches des Zielkeims *E.Coli* innerhalb der 4 Stunden der durchgeführten Messungen für 250 ml Agar fällt sogar geringer als bei einem Volumen von 500 ml aus.

Die P_R -Werte von *E.Coli* für ein Agar-Volumen von 250 ml liegen zwischen knapp 80% und ca. 85%, was einen sehr geringen Produktivitätsbereich abdeckt. Die Werte liegen alle weit aus über 50%, was für einen eindeutigen Produktivitätsnachweis spricht.

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) TBX 250 ml Flasche I-III <i>E.Coli</i>			
<i>i</i> =	t_0	t_1	t_2
Referenz	115	108	100
KBE (Prüfagar-xi)	90	93	86
r_i	0,78	0,86	0,86
$ r_i - r_{i-1} $		0,08	0,00

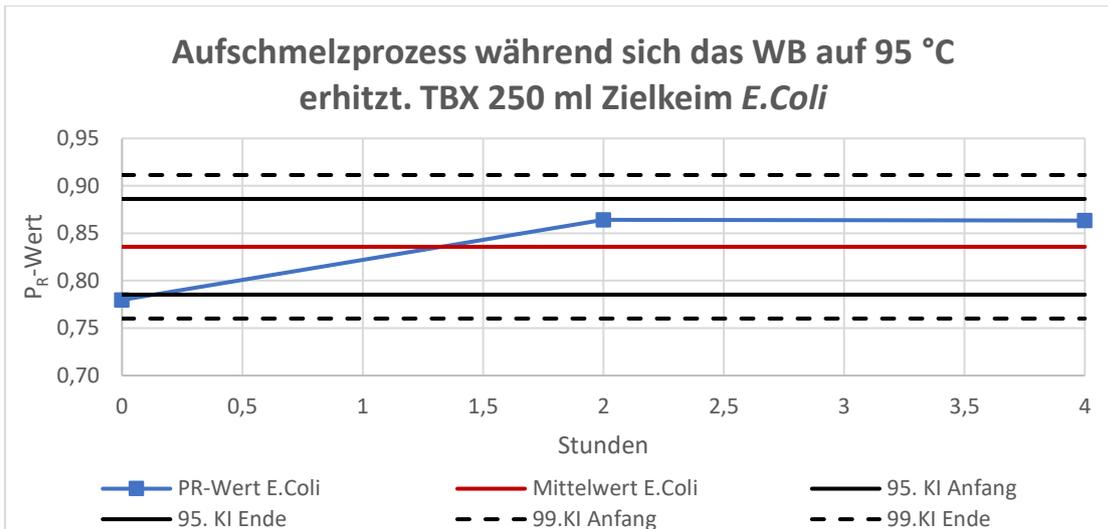
AA- Tabelle 3: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses TBX 250 ml während der Erwärmung des WB auf 95 °C

Tabelle AA-4 stellt die vorbereitende Tabelle für 250 ml Flaschen TBX zur Erstellung der Regelkarte mit allen erforderlichen Daten, die für die Untersuchung des Aufschmelzprozesses der Agar-Flaschen während sich das Wasserbad auf 95°C erhitzt sowie für alle weiteren durchgeführten Untersuchungen, in der Regelkarte erscheinen müssen dar.

Flasche 1.-3. 250 ml <i>E.Coli</i>						
Stunden	P_R -Wert <i>E.Coli</i>	Mittelwert <i>E.Coli</i>	95. Kl. An- fang	95. Kl. Ende	99. Kl. An- fang	99. Kl. Ende
0	0,78	0,84	0,79	0,89	0,76	0,91
2	0,86	0,84	0,79	0,89	0,76	0,91
4	0,86	0,84	0,79	0,89	0,76	0,91

AA- Tabelle 4: Gesammelte Daten der Regelkarte für TBX 250 ml *E.Coli*, Aufschmelzprozess während sich das WB auf 95 °C erwärmt

Zwischen den ersten beiden Messungen steigt der P_R -Wert von *E.Coli* deutlich an, woraufhin er zwischen Messung zwei und drei geradezu parallel über dem mittleren P_R -Wert verläuft.



AA- Abbildung 2: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *E.Coli* auf TBX 250 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C

TBX Aufschmelzmethode 2 (abweichend von DIN EN ISO 11133)

Untersuchung des Aufschmelzprozesses der Agar-Flaschen bei der Temperatur von 95°C (WB ist bereits auf t_{max} erhitzt)

Nach den Ergebnissen dieser Aufschmelzmethode sind 500 ml TBX Agar-Flaschen deutlich leistungsfähiger als die 250 ml Agar-Flaschen. Die 500 ml Agar-Flaschen haben einen Produktivitätsbereich zwischen 75% und 90%. Die 250 ml Agar-Flaschen weisen hingegen nur Werte zwischen 40%-75% auf, die für die von der DIN EN ISO 11133 festgelegten Produktivitätsgrenze von 50% ungenügend sind.

500 ml Agar-Flaschen

Die Produktivität bei dieser Aufschmelzmethode liegt für *E.Coli* mit 500 ml TBX Agar-Flaschen ca. zwischen 75% und 90 % und ist somit ähnlich wie bei der Aufschmelzmethode für *E.Coli* mit 500 ml Agar-Flaschen während sich das Wasserbad auf 95 °C erwärmt von der Produktivität so gut wie im selben Bereich einzuordnen.

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) TBX 500 ml Flasche I-III <i>E.Coli</i>			
$i=$	t_0	t_1	t_2
Referenz	23	20	24
KBE (Prüfagar-xi)	21	18	18
r_i	0,91	0,88	0,76
$ r_i - r_{i-1} $		0,03	0,12

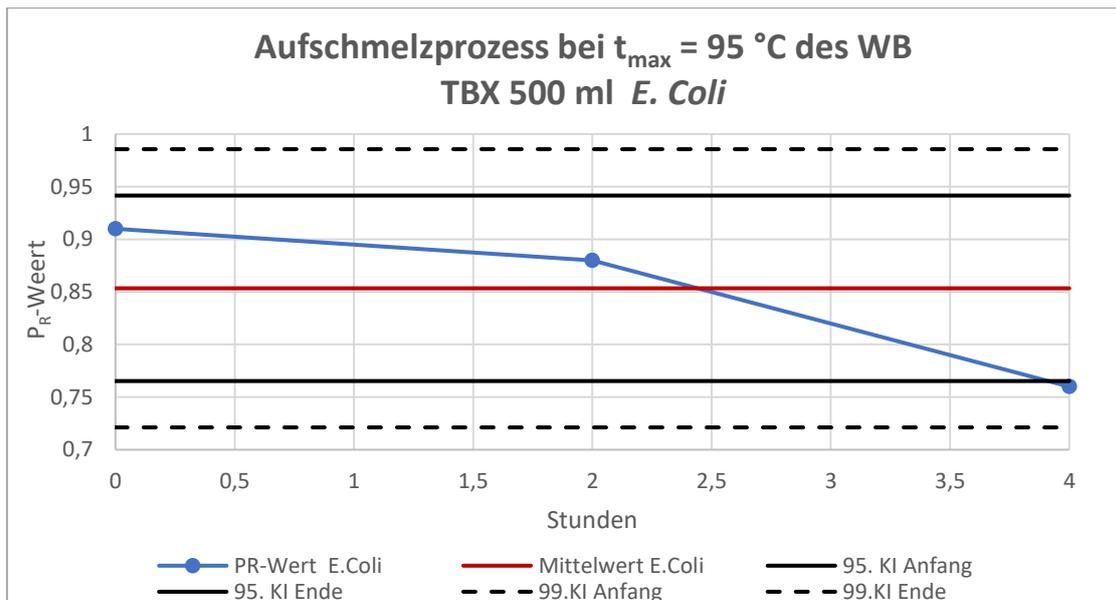
AA- Tabelle 5: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses TBX 500 ml während t_{max} 95 °C

Tabelle AA-6 stellt die vorbereitende Tabelle für 500 ml Flaschen TBX zur Erstellung der Regelkarte mit allen erforderlichen Daten, die für die Untersuchung des Aufschmelzprozesses der Agar-Flaschen bei der Temperatur von 95°C (WB ist bereits auf t_{max} erhitzt) sowie für alle weiteren durchgeführten Untersuchungen, in der Regelkarte erscheinen müssen dar.

Flasche 1.-3. 500 ml <i>E.Coli</i>						
Stunden	P_R -Wert <i>E.Coli</i>	Mittelwert <i>E.Coli</i>	95. Kl. An- fang	95. Kl. Ende	99. Kl. An- fang	99. Kl. Ende
0	0,91	0,85	0,94	0,77	0,99	0,72
2	0,88	0,85	0,94	0,77	0,99	0,72
4	0,76	0,85	0,94	0,77	0,99	0,72

AA- Tabelle 6: Gesammelte Daten der Regelkarte für TBX 500 ml *E.Coli*, Aufschmelzprozess bei $t_{max}=95^\circ\text{C}$

Die Produktivität des Zielkeimes *E.Coli* fällt bis zur zweiten Messung leicht ab. Kurz nach der Messung nach 2 Stunden schneidet er den mittleren P_R -Wert und sinkt bis auf 75 %. Dabei unterschreitet er die untere Vertrauensgrenze des 95 % Konfidenzintervalles.



AA- Abbildung 3: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *E.Coli* auf TBX 500 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95^\circ\text{C}$

250 ml TBX Agar-Flaschen

Die Produktivität von *E.Coli* bei 250 ml TBX Agar-Flaschen liegt zwischen 40% und ca. 75%.

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) TBX 250 ml Flasche I-III <i>E.Coli</i>			
$i=$	t_0	t_1	t_2
Referenz	18	19	25
KBE (Prüfagar-xi)	14	10	10
r_i	0,76	0,52	0,40
$ r_i - r_{i-1} $		0,23	0,12

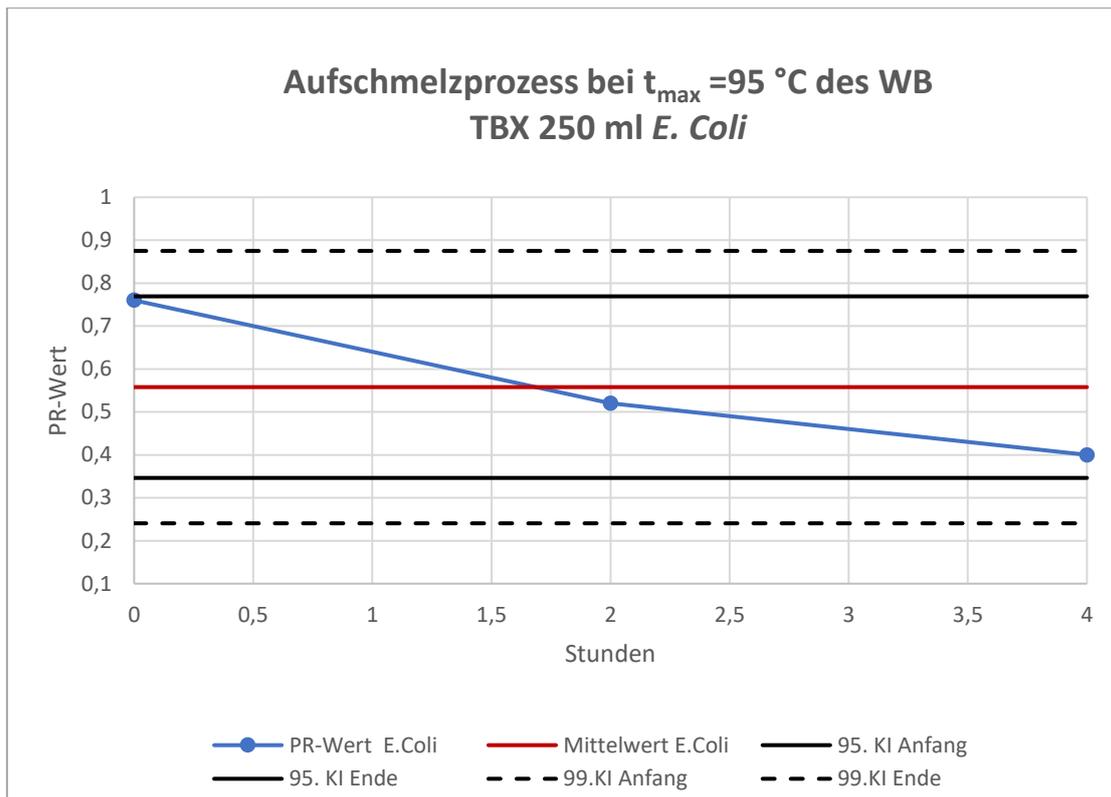
AA- Tabelle 7: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses TBX 250 ml bei $t_{max} = 95\text{ °C}$

Tabelle AA-8 stellt die vorbereitende Tabelle für 250 ml Flaschen TBX zur Erstellung der Regelkarte mit allen erforderlichen Daten, die für die Untersuchung des Aufschmelzprozesses der Agar-Flaschen bei der Temperatur von 95°C (WB ist bereits auf t_{max} erhitzt) sowie für alle weiteren durchgeführten Untersuchungen, in der Regelkarte erscheinen müssen dar.

Flasche 1.-3. 250 ml <i>E.Coli</i>						
Stun- den	P_R -Wert <i>E.Coli</i>	Mittelwert <i>E.Coli</i>	95. Kl. An- fang	95. Kl. Ende	99. Kl. An- fang	99. Kl. Ende
0	0,76	0,56	0,77	0,35	0,87	0,24
2	0,52	0,56	0,77	0,35	0,87	0,24
4	0,40	0,56	0,77	0,35	0,87	0,24

AA- Tabelle 8: Gesammelte Daten der Regelkarte für TBX 250 ml *E.Coli*, Aufschmelzprozess bei $t_{max}=95\text{ °C}$

In der Regelkarte für *E.Coli* bei 250ml TBX-Agar-Flaschen sind die ersten zwei Messungen aus Sicht der Produktivität noch annehmbar.



AA- Abbildung 4: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *E.Coli* auf TBX 250 ml, Aufschmelzprozess während $t_{\max} = 95 \text{ °C}$

TBX Aufschmelzmethode 3 (abweichend von DIN EN ISO 11133)

Untersuchung die Agar-Flaschen über den Aufschmelzprozess hinaus im WB stehen lassen

Grundsätzlich hat sich herausgestellt, dass das gewollte Überschreiten der Zeit des Aufschmelzens der TBX Agar-Flaschen auf die 500 ml Agar-Flaschen keinen wesentlichen Einfluss ausgeübt hat. Die 250 ml Agar-Flaschen hingegen haben weniger gut abgeschnitten. Die gemessenen P_R -Werte lagen nach einstündiger Überschreitung der bereits aufgeschmolzenen Agar-Flaschen bei 50%. Nach 1,5 Stunden Überschreitung lag der P_R -Wert bei 55%. Die geduldete Mindestgrenze von 50% für TBX-Agar wurde demnach nicht unterschritten. Im Vergleich zu den anderen Untersuchungen zum Aufschmelzprozess ist dieses Ergebnis das schwächste.

500 ml TBX Agar-Flaschen

Die Produktivität des Zielkeims *E.Coli* wird bei der Überschreitung des Aufschmelzprozesses nicht erheblich beeinflusst. Die P_R -Werte liegen zwischen ca. 60% und 90 %. Die Produktivitätsspanne ist hoch, was keine Auswirkung auf die Leistung des Nährmediums hat.

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) TBX 500ml <i>E.Coli</i>			
$i=$	t_0	t_1	t_2
Referenz	139	141	145
KBE (Prüfagar-xi)	88	122	127
r_i	0,63	0,87	0,88
$ r_i - r_{i-1} $		0,23	0,01

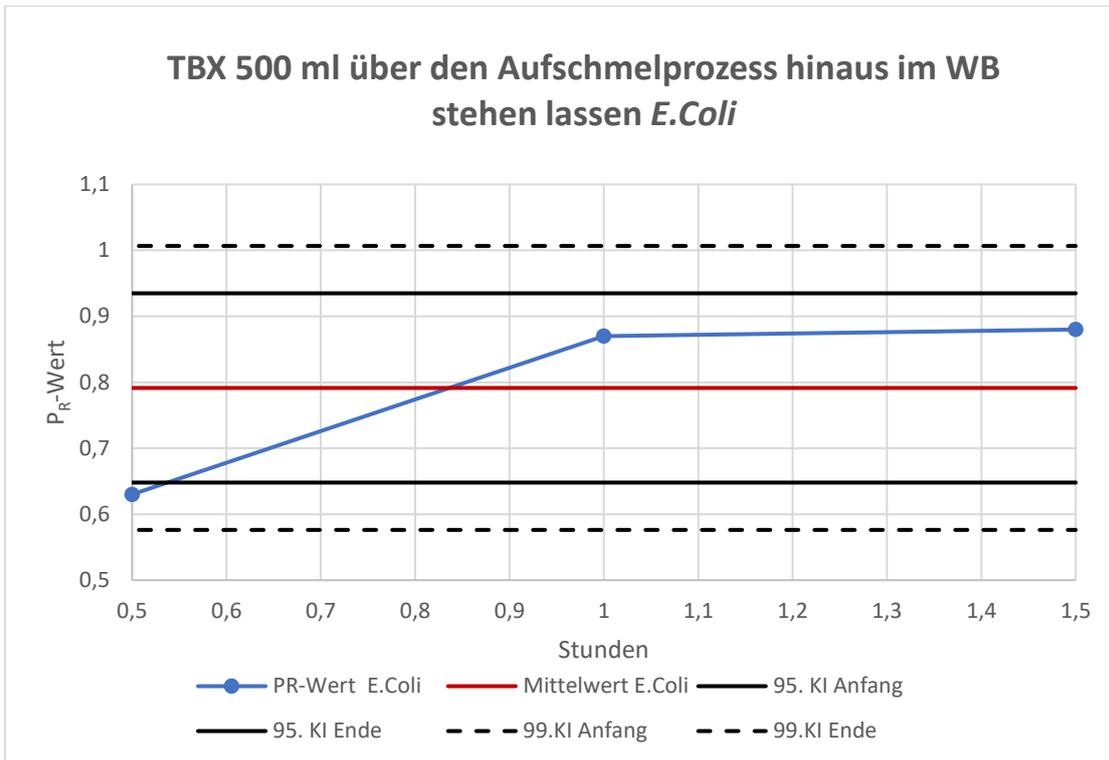
AA- Tabelle 9: Aufeinanderfolgende Überprüfungen bei Überschreitung des Aufschmelzprozesses TBX 500 ml

Tabelle AA-10 zeigt die vorbereitende Tabelle für 500 ml Flaschen TBX zur Erstellung der Regelkarte mit allen erforderlichen Daten, die für die Untersuchung die Agar-Flaschen über den Aufschmelzprozess hinaus im Wasserbad stehen zu lassen sowie für alle weiteren durchgeführten Untersuchungen, die in der Regelkarte erscheinen müssen.

Flasche 1.-3. 500 ml <i>E.Coli</i>						
Stunden	P_R -Wert <i>E.Coli</i>	Mittelwert <i>E.Coli</i>	95. Kl. An- fang	95. Kl. Ende	99. Kl. An- fang	99. Kl. Ende
0,5	0,63	0,79	0,93	0,65	1,01	0,58
1,0	0,87	0,79	0,93	0,65	1,01	0,58
1,5	0,88	0,79	0,93	0,65	1,01	0,58

AA- Tabelle 10: Gesammelte Daten der Regelkarte für TBX 500 ml *E.Coli* bei Überschreitung des Aufschmelzprozesses

Die Produktivität von *E.Coli* nimmt bei 500 ml TBX-Flaschen während der Überschreitung des Aufschmelzens der bereits im Wasserbad flüssig gewordenen Agar-Flaschen nicht ab. Die erste Messung liegt leicht unter der ersten Vertrauensgrenze des 95% Konfidenzintervalls, was durch den weiteren Verlauf der P_R -Werte nicht negativ zu bewerten ist. Der mittlere P_R -Wert liegt bei knapp 80%, was auf einen sehr leistungsfähigen Nährboden schließt, der Temperaturen von 95°C auch mehr als einer Stunde bei bereits aufgeschmolzenem Agar standhalten kann.



AA- Abbildung 5: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *E.Coli* auf TBX 500 ml, Überschreitung des Aufschmelzprozesses

250 ml TBX Agar-Flaschen

E.Coli verhält sich bei derselben Untersuchung bei Überschreitung des Aufschmelzprozesses von TBX deutlich schlechter. Die P_R -Werte liegen in einem deutlich niedrigeren Bereich. Die zwei letzten Messungen sind dem Grenzwert mit 50% und 55% deutlich näher.

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) TBX 250 ml <i>E.Coli</i>			
$i=$	t_0	t_1	t_2
Referenz	134	142	162
KBE (Prüfagar-xi)	103	71	89
r_i	0,77	0,50	0,55
$ r_i - r_{i-1} $		0,27	0,05

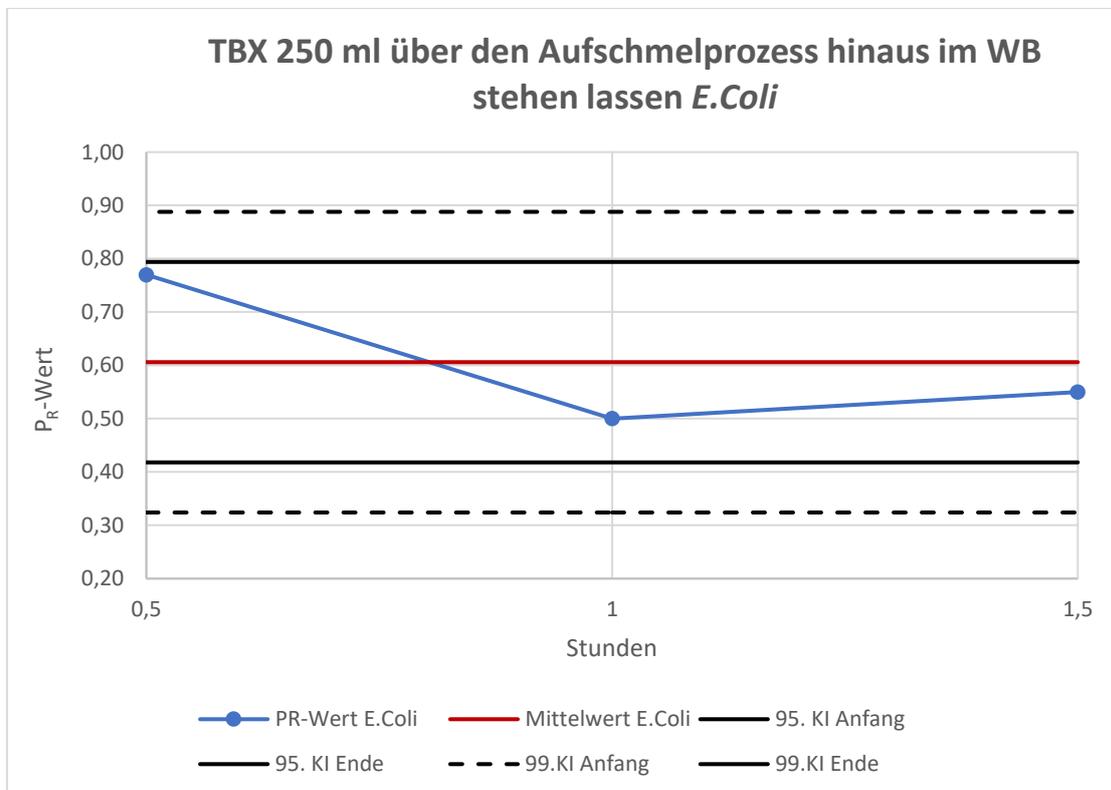
AA- Tabelle 11: Aufeinanderfolgende Überprüfungen bei Überschreitung des Aufschmelzprozesses TBX 250 ml

Vorbereitende Tabelle für 250 ml Flaschen TBX zur Erstellung der Regelkarte mit allen erforderlichen Daten, die für die Untersuchung die Agar-Flaschen über den Aufschmelzprozess hinaus im Wasserbad stehen zu lassen sowie für alle weiteren durchgeführten Untersuchungen, die in der Regelkarte erscheinen müssen.

Flasche 1.-3. 250 ml <i>E.Coli</i>						
Stunden	P _R -Wert <i>E.Coli</i>	Mittelwert <i>E.Coli</i>	95. Kl. An- fang	95. Kl. Ende	99. Kl. An- fang	99. Kl. Ende
0,5	0,77	0,61	0,79	0,42	0,89	0,32
1,0	0,50	0,61	0,79	0,42	0,89	0,32
1,5	0,55	0,61	0,79	0,42	0,89	0,32

AA- Tabelle 12: Gesammelte Daten der Regelkarte für TBX 250 ml *E.Coli* bei Überschreitung des Aufschmelzprozesses

E.Coli verhält sich bei einem Volumen von 250 ml spiegelverkehrt zu den Ergebnissen der 500 ml TBX Agar-Flaschen bei Überschreitung des Aufschmelzprozesses. Die Produktivität sinkt bis zu der zweiten Messung nach 2 Stunden bis zu 50% und steigt anschließend leicht bis zum mittleren P_R-Wert.



AA- Abbildung 6: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *E.Colii* auf TBX 250 ml, Überschreitung des Aufschmelzprozesses

Routineergänzende Tabellen TBX

Routinebegleitende Leistungsprüfung von TBX über einen Zeitraum von maximal 34 Stunden

500 ml TBX Agar-Flaschen

Vorbereitende Tabelle für 500 ml Flaschen TBX zur Erstellung der Regelkarte mit allen erforderlichen Daten, die für die Routinebegleitende Leistungsprüfung von TBX über einen Zeitraum von maximal 34 Stunden erforderlich sind.

Uhrzeit	Stunden	PR-Wert 1. Flasche 500ml	PR-Wert 2. Flasche 500 ml	PR-Wert 3. Flasche 500ml	Mittelwert	PR-Wert Flasche 1-3	95. KI Anfang	95. KI Ende	99.KI Anfang	99.KI Ende
	0				0,86		0,67	1,05	0,58	1,14
09:30	1	1,00	1,10	0,94	0,86	0,99	0,67	1,05	0,58	1,14
10:30	2	1,03	0,86	0,90	0,86	0,94	0,67	1,05	0,58	1,14
11:30	3	1,02	1,01	1,00	0,86	1,01	0,67	1,05	0,58	1,14
12:30	4	0,84	0,94	0,88	0,86	0,89	0,67	1,05	0,58	1,14
13:30	5	0,83	0,91	0,93	0,86	0,89	0,67	1,05	0,58	1,14
14:30	6	0,84	0,74	0,70	0,86	0,76	0,67	1,05	0,58	1,14
15:30	7	0,70	0,61	0,60	0,86	0,62	0,67	1,05	0,58	1,14
16:30	8	0,80	0,81	0,97	0,86	0,86	0,67	1,05	0,58	1,14
17:30	9	0,88	0,80	0,98	0,86	0,88	0,67	1,05	0,58	1,14
18:30	10				0,86		0,67	1,05	0,58	1,14
19:30	11				0,86		0,67	1,05	0,58	1,14
20:30	12				0,86		0,67	1,05	0,58	1,14
21:30	13				0,86		0,67	1,05	0,58	1,14
22:30	14				0,86		0,67	1,05	0,58	1,14
23:30	15				0,86		0,67	1,05	0,58	1,14
00:30	16				0,86		0,67	1,05	0,58	1,14
01:30	17				0,86		0,67	1,05	0,58	1,14
02:30	18				0,86		0,67	1,05	0,58	1,14

Uhrzeit	Stunden	PR-Wert 1. Flasche 500ml	PR-Wert 2. Flasche 500 ml	PR-Wert 3. Flasche 500ml	Mittelwert	PR-Wert Flasche 1-3	95. KI Anfang	95. KI Ende	99.KI Anfang	99.KI Ende
03:30	19				0,86		0,67	1,05	0,58	1,14
04:30	20				0,86		0,67	1,05	0,58	1,14
05:30	21				0,86		0,67	1,05	0,58	1,14
06:30	22				0,86		0,67	1,05	0,58	1,14
07:30	23				0,86		0,67	1,05	0,58	1,14
08:30	24				0,86		0,67	1,05	0,58	1,14
09:30	25	0,78	0,87	0,80	0,86	0,82	0,67	1,05	0,58	1,14
10:30	26	1,06	0,93	1,00	0,86	1,00	0,67	1,05	0,58	1,14
11:30	27	0,87	0,90	0,88	0,86	0,89	0,67	1,05	0,58	1,14
12:30	28	0,67	0,71	0,69	0,86	0,69	0,67	1,05	0,58	1,14
13:30	29	0,82	0,81	0,86	0,86	0,83	0,67	1,05	0,58	1,14

AA- Tabelle 13: Gesammelte Daten der Regelkarte für TBX 500 ml E.Coli für die Standzeiten-Kontrolle der Routineuntersuchungen

Routinebegleitende Leistungsprüfung für 250 ml TBX Agar-Flaschen über einen Zeitraum von maximal 34 Stunden

Die P_R -Werte für jede Messung pro Stunde weisen alle eine Produktivität >50% auf. Lediglich Messung $i = 7$ und $i = 9$ liegen im Bereich zwischen 50% und 60%.

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) TBX 250ml Flasche I bis Flasche III <i>E.Coli</i>									
$i=$	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Referenz	58	52	64	65	51	79	74	69	78
KBE (Prüfagar-xi)	58	55	54	52	47	55	42	45	43
r_i	0,99	1,05	0,84	0,81	0,92	0,69	0,57	0,66	0,55
$ r_i - r_{i-1} $		0,14	0,29	0,03	0,11	0,23	0,12	0,09	0,11
$i=$	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Referenz	110	118	111	100	124	115	130	123	101
KBE (Prüfagar-xi)	91	74	79	97	107	104	84	89	82
r_i	0,83	0,63	0,71	0,97	0,86	0,91	0,65	0,72	0,82
$ r_i - r_{i-1} $	0,72	0,2	0,08	0,28	0,13	0,05	0,26	0,07	0,10

AA- Tabelle 14: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von *E.Coli* für TBX 250 ml beschreiben.

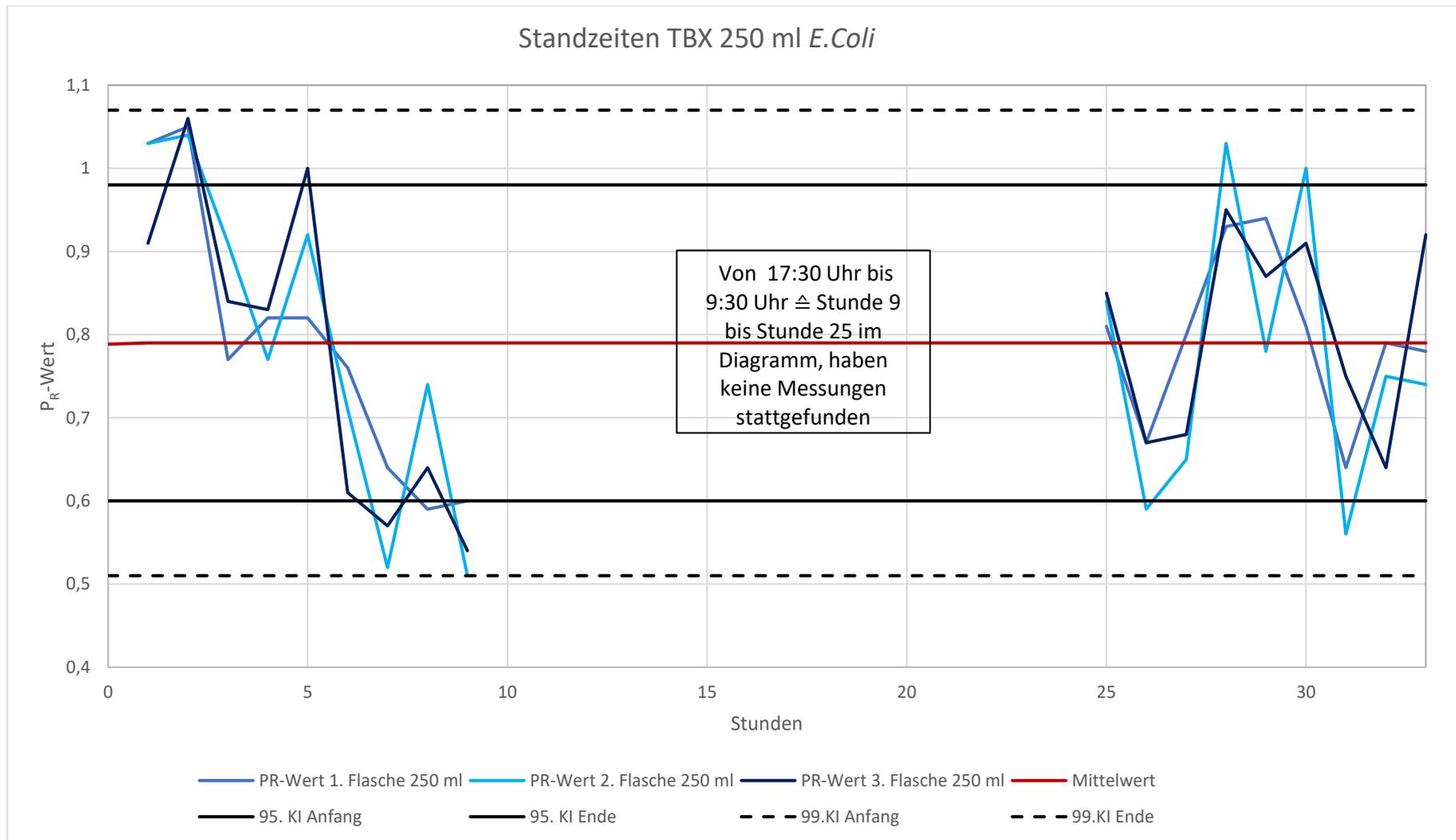
Tabelle AA-15 stellt die vorbereitende Tabelle für 250 ml Flaschen TBX zur Erstellung der Regelkarte mit allen erforderlichen Daten, die für die Routinebegleitende Leistungsprüfung von TBX über einen Zeitraum von maximal 34 Stunden sowie für alle weiteren durchgeführten Untersuchungen, in der Regelkarte erscheinen müssen.

Uhrzeit	Stunden	PR-Wert 1. Flasche 250 ml	PR-Wert 2. Flasche 250 ml	PR-Wert 3. Flasche 250 ml	Mittelwert	PR-Wert Flasche 1-3	95. KI Anfang	95. KI Ende	99. KI Anfang	99. KI Ende
	0				0,79		0,6	0,98	0,51	1,07
09:30	1	1,03	1,03	0,91	0,79	0,99	0,6	0,98	0,51	1,07
10:30	2	1,05	1,04	1,06	0,79	1,05	0,6	0,98	0,51	1,07
11:30	3	0,77	0,91	0,84	0,79	0,84	0,6	0,98	0,51	1,07
12:30	4	0,82	0,77	0,83	0,79	0,81	0,6	0,98	0,51	1,07
13:30	5	0,82	0,92	1	0,79	0,91	0,6	0,98	0,51	1,07
14:30	6	0,76	0,71	0,61	0,79	0,69	0,6	0,98	0,51	1,07
15:30	7	0,64	0,52	0,57	0,79	0,58	0,6	0,98	0,51	1,07
16:30	8	0,59	0,74	0,64	0,79	0,66	0,6	0,98	0,51	1,07
17:30	9	0,6	0,51	0,54	0,79	0,55	0,6	0,98	0,51	1,07
18:30	10				0,79		0,6	0,98	0,51	1,07
19:30	11				0,79		0,6	0,98	0,51	1,07
20:30	12				0,79		0,6	0,98	0,51	1,07
21:30	13				0,79		0,6	0,98	0,51	1,07
22:30	14				0,79		0,6	0,98	0,51	1,07
23:30	15				0,79		0,6	0,98	0,51	1,07
00:30	16				0,79		0,6	0,98	0,51	1,07
01:30	17				0,79		0,6	0,98	0,51	1,07
02:30	18				0,79		0,6	0,98	0,51	1,07

Uhrzeit	Stunden	PR-Wert 1. Flasche 250 ml	PR-Wert 2. Flasche 250 ml	PR-Wert 3. Flasche 250 ml	Mittelwert	PR-Wert Flasche 1-3	95. KI Anfang	95. KI Ende	99. KI Anfang	99. KI Ende
03:30	19				0,79		0,6	0,98	0,51	1,07
04:30	20				0,79		0,6	0,98	0,51	1,07
05:30	21				0,79		0,6	0,98	0,51	1,07
06:30	22				0,79		0,6	0,98	0,51	1,07
07:30	23				0,79		0,6	0,98	0,51	1,07
08:30	24				0,79		0,6	0,98	0,51	1,07
09:30	25	0,81	0,84	0,85	0,79	0,83	0,6	0,98	0,51	1,07
10:30	26	0,67	0,59	0,67	0,79	0,64	0,6	0,98	0,51	1,07
11:30	27	0,8	0,65	0,68	0,79	0,71	0,6	0,98	0,51	1,07
12:30	28	0,93	1,03	0,95	0,79	0,97	0,6	0,98	0,51	1,07
13:30	29	0,94	0,78	0,87	0,79	0,86	0,6	0,98	0,51	1,07
14:30	30	0,81	1	0,91	0,79	0,91	0,6	0,98	0,51	1,07
15:30	31	0,64	0,56	0,75	0,79	0,65	0,6	0,98	0,51	1,07
16:30	32	0,79	0,75	0,64	0,79	0,73	0,6	0,98	0,51	1,07
17:30	33	0,78	0,74	0,92	0,79	0,81	0,6	0,98	0,51	1,07

AA- Tabelle 15: Gesammelte Daten der Regelkarte für TBX 250 ml E.Coli für die Standzeiten-Kontrolle der Routineuntersuchungen

Abbildung AA-7 bildet die Regelkarte für den Zielkeim *E.Coli* für 250 ml TBX Agar ab. Die Produktivität des Zielkeims sinkt am ersten Versuchstag kontinuierlich von $P_R=1,00$ bis auf $P_R=0,50$ ab, wohingegen die Produktivität am zweiten Versuchstag steigt bis sie sich zwischen den Messungen bei $P_R= 0,60$ bis $P_R= 0,95$ positioniert.



AA- Abbildung 7: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *E.Coli* auf TBX 250 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h

Ergebnisse zu den Aufschmelzprozessen VRBD

Alle Zielkeime des VRBD Agars halten eine Produktivität von mindestens 50 % über alle drei Aufschmelzmethoden ein.

VRBD Aufschmelzmethode 1 gemäß DIN EN ISO 11133

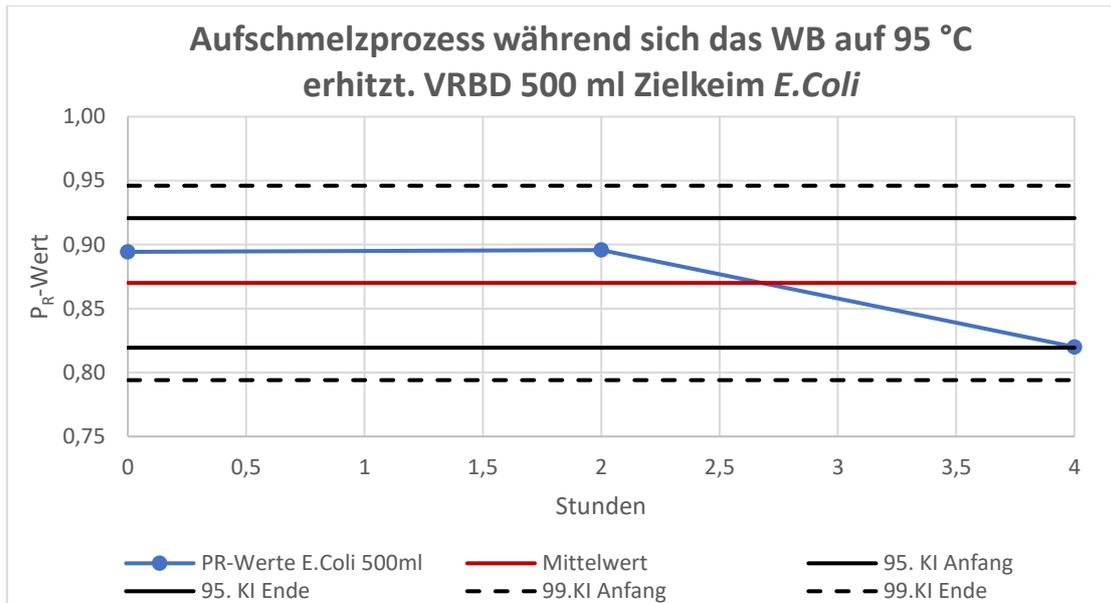
Untersuchung des Aufschmelzprozesses der Agar-Flaschen während sich das WB auf 95°C erhitzt Oxoid 500 ml VRBD Agar-Falschen

Zwischen zwei und vier Stunden Lagerzeit im Trockenschrank verringert sich die Produktivität von *E. Coli* um 8%. In Anlehnung an die stündliche Routineüberprüfung von VRBD, ist davon auszugehen, dass nach weiteren Messungen die Produktivität weniger stark abnehmen wird. Insgesamt ist die Produktivität von *E.Coli* mit einem Bereich zwischen 80% und 90% im Vergleich zu den restlichen Zielkeimen am höchsten.

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBD 500 ml Flasche I-III <i>E.Coli</i>			
<i>i</i> =	<i>t</i> ₀	<i>t</i> ₁	<i>t</i> ₂
Referenz	101	195	150
KBE (Prüfagar-xi)	90	175	123
<i>r_i</i>	0,89	0,90	0,82
<i> r_i-r_{i-1} </i>		0,01	0,08

AA- Tabelle 16: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBD 500 ml *E.Coli* während der Erwärmung des WB auf 95 °C

In der Regelkarte des Zielkeims *E.Coli* für 500 ml VRBD Agar-Flaschen ist zu erkennen, dass der Produktivitätsabfall hauptsächlich zwischen 2 und 4 Stunden stattfindet. Der mittlere P_R -Wert wird erst bei ca. 2,5 Stunden unterschritten.



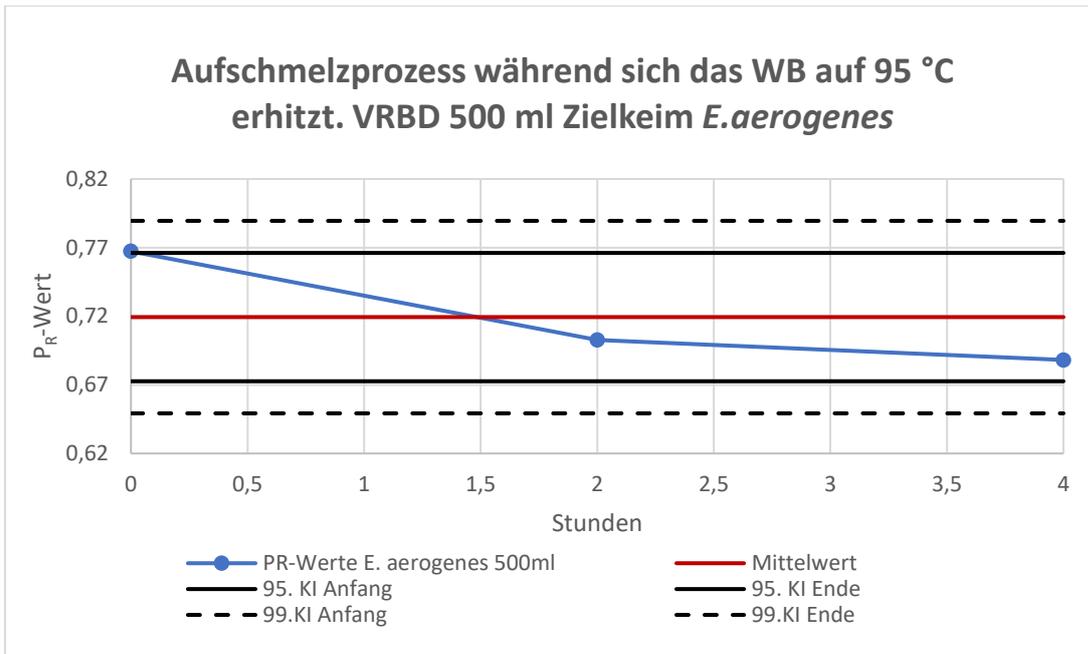
AA- Abbildung 8: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *E.Coli* auf VRBD 500 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C

Der Zielkeim *E.aerogenes* weist wie *E.Coli* innerhalb des vierstündigen Untersuchungszeitraums von Messung t_0 Stunden bis t_2 Stunden für 500 ml VRBD-Agar-Flaschen Schwankungen von 8% auf. Die P_R -Werte liegen ca. zwischen 70% und 80%, was im Gegensatz zu *E.Coli* weniger stark ist.

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBD 500 ml Flasche I-III <i>E. aerogenes</i>			
$i=$	t_0	t_1	t_2
Referenz	53	74	62
KBE (Prüfagar-xi)	41	52	43
r_i	0,77	0,70	0,69
$ r_i - r_{i-1} $		0,06	0,01

AA- Tabelle 17: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBD 500 ml *E.aerogenes* während der Erwärmung des WB auf 95 °C

In der Regelkarte zu *E.aerogenes* zeigt sich, dass der Produktivitätsabfall zwischen t_0 und t_1 steiler abfällt, als zwischen t_1 und t_2 . Kurz vor der Messung t_1 sinkt *E.Coli* unter den mittleren P_R -Wert.



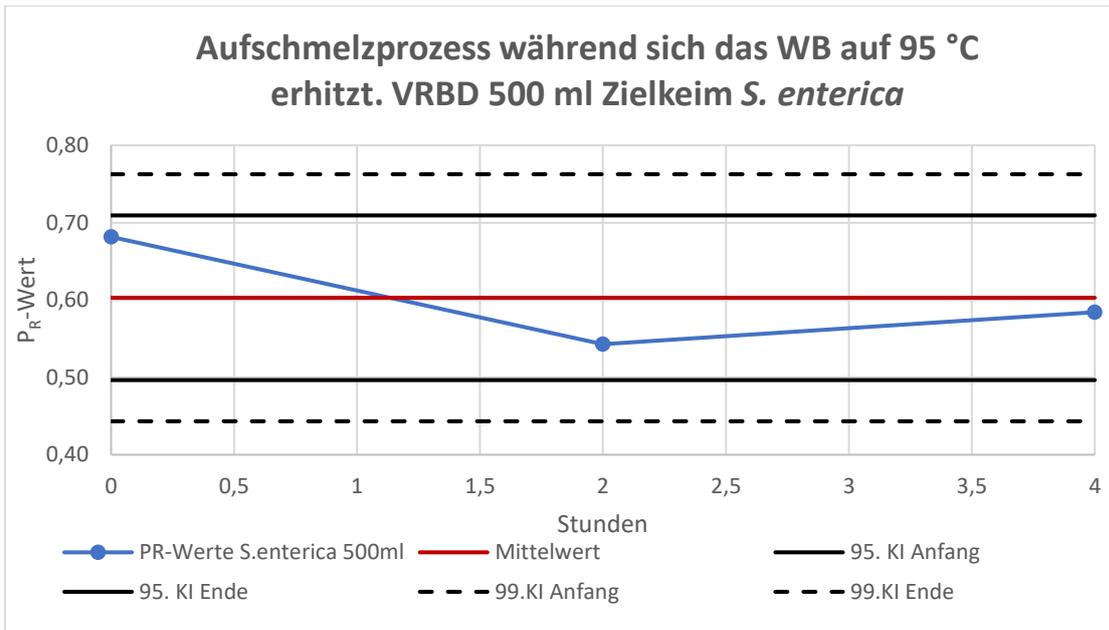
AA- Abbildung 9: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *E.aerogenes* auf VRBD 500ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C

S.enterica ist von allen Zielkeimen der 500 ml VRBD Agar-Flaschen am schwächsten und weist die größten Schwankungen mit einer Produktivität von ca. 50% bis 70% auf.

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBD 500 ml Flasche I-III <i>S. enterica</i>			
<i>i</i> =	t_0	t_1	t_2
Referenz	200	167	178
KBE (Prüfagar-xi)	136	91	104
r_i	0,68	0,54	0,58
$ r_i - r_{i-1} $		0,14	0,04

AA- Tabelle 18: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBD 500 ml *S.enterica* während der Erwärmung des WB auf 95 °C

Die Regelkarte der *S.enterica* für 500 ml VRBD Agar hat einen starken Steigungsabfall zwischen Messung t_0 Stunden und t_1 Stunden und untersteigt den Mittelwert im 2. Drittel nach Messung t_0 . Nach der Messung t_1 nähert sie sich erneut dem mittleren P_R -Wert von 60%. Ein erstmaliger Steigungsabfall und darauffolgende Zunahme der Produktivität ist ebenso bei einem Volumen von 250 ml VRBD-Agar zu beobachten.



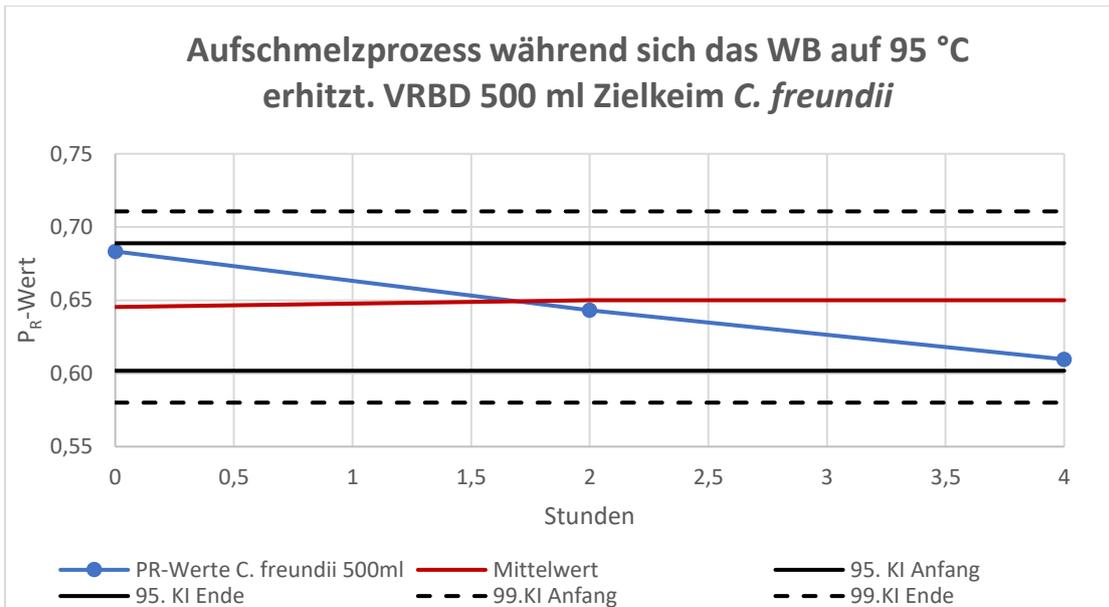
AA- Abbildung 10: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *S. enterica* auf VRBD 500ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C

C. freundii weist die geringsten Schwankungen innerhalb des Untersuchungszeitraumes auf. Die Produktivität liegt zwischen knapp 60% und 70%.

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBD 500 ml Flasche I-III <i>C. freundii</i>			
i=	t ₀	t ₁	t ₂
Referenz	100	85	76
KBE (Prüfagar-xi)	68	55	46
r _i	0,68	0,64	0,61
r _i -r _{i-1}		0,04	0,03

AA- Tabelle 19: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBD 500 ml *C. freundii* während der Erwärmung des WB auf 95 °C

Die Regelkarte des Zielkeims *C. freundii* hat einen geradezu konstanten Produktivitätsabfall innerhalb der Gesamtuntersuchung. Kurz vor der Messung t₁ schneidet er den mittleren P_R-Wert und erreicht bei Messung t₂ fast die unterste Vertrauensgrenze des 95% Konfidenzintervalles.



AA- Abbildung 11: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *C.freundii* auf VRBD 500ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C

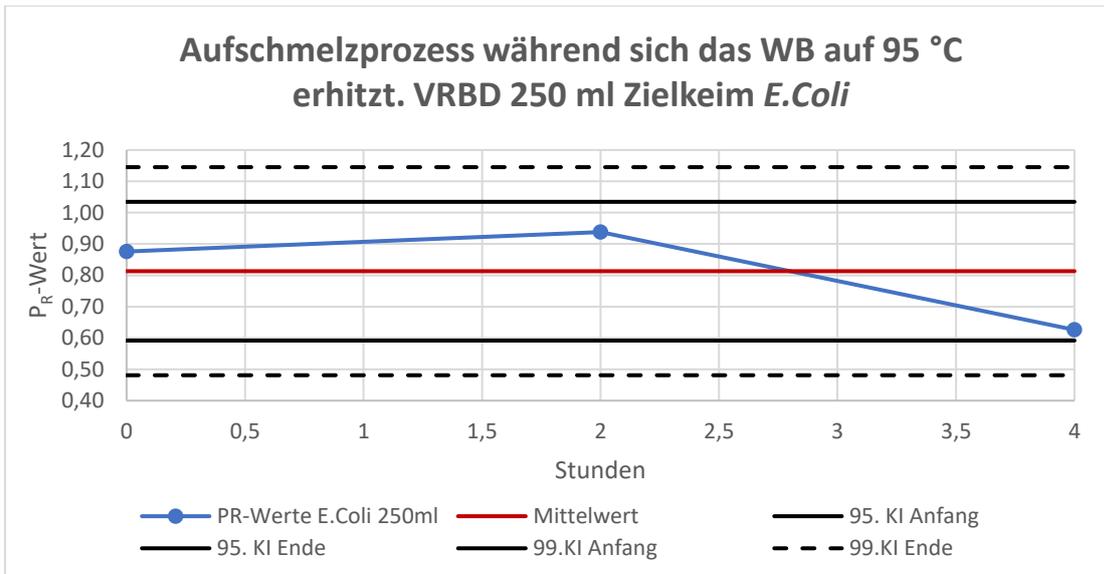
Oxoid 250 ml VRBD Agar-Flaschen

Die Ergebnisse derselben Untersuchung mit 250 ml Agar-Flaschen zeigt, dass die Volumina nahezu gleich stabil sind wie das doppelte Volumen der 500 ml Agar-Flaschen. *E.Coli* und *E.aerogenes* sind auch hier die stärkeren Zielkeime und die Salmonelle stellt den schwächsten Zielkeim dar. Teilweise ist eine größere Produktivitätsspanne und somit ein etwas niedrigerer P_R -Wert zu beobachten.

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBD 250ml Flasche I-III <i>E.Coli</i>			
$i=$	t_0	t_1	t_2
Referenz	67	70	131
KBE (Prüfagar-xi)	59	66	82
r_i	0,88	0,94	0,63
$ r_i - r_{i-1} $		0,06	0,31

AA- Tabelle 20: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBD 250 ml *E.Coli* während der Erwärmung des WB auf 95 °C

Die Produktivität des Zielkeims *E.Coli* steigt leicht bis zu der Messung t_1 an. Der P_R -Wert, liegt zu diesem Zeitpunkt knapp über 90 %, woraufhin dieser bis zur Messung t_2 mit zunehmend negativer Steigung bis 60% abfällt.



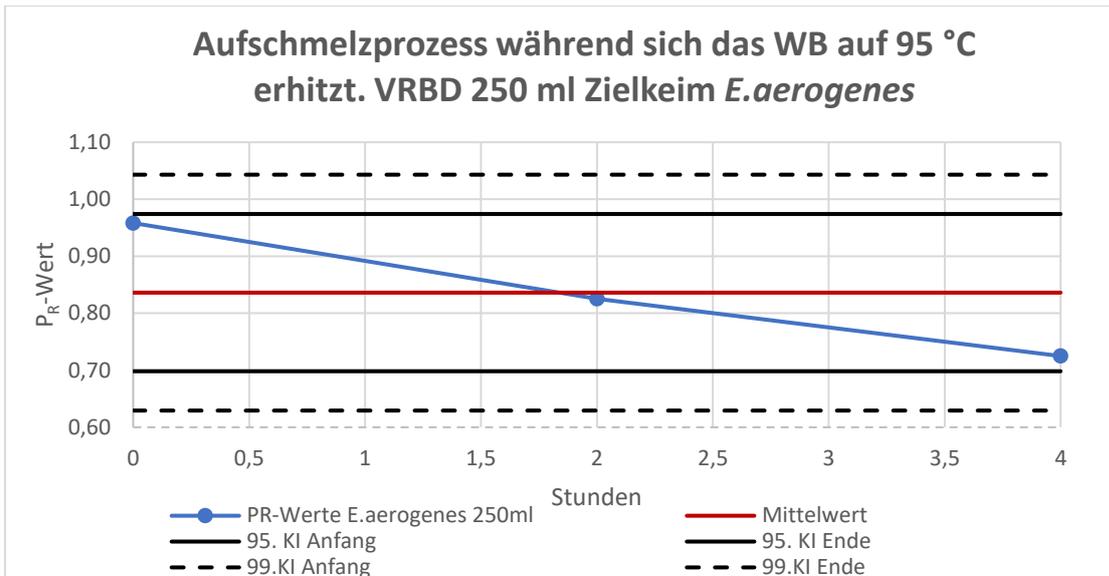
AA- Abbildung 12: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *E.Coli* auf VRBD 250 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C

Der Zielkeim *E.aerogenes* erfährt bei 250 ml VRBD Agar-Flaschen einen größeren Abfall an Produktivität als bei 500 ml. Er liegt dennoch mit P_R-Werten zwischen 70% und 90% deutlich über den erforderlichen 50 % und hat einen geradezu linearen Rückgang der Produktivität.

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBD 250ml Flasche I-III <i>E. aerogenes</i>				
<i>i</i> =	<i>t</i> ₀	<i>t</i> ₁	<i>t</i> ₂	
Referenz	80	84	103	
KBE (Prüfagar-xi)	77	69	75	
<i>r_i</i>	0,96	0,83	0,72	
<i> r_i-r_{i-1} </i>		0,13	0,10	

AA- Tabelle 21: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBD 250 ml *E.aerogenes* während der Erwärmung des WB auf 95 °C

Der Zielkeim *E.aerogenes* nimmt bei einem Agar-Volumen von 250 ml ähnlich, wie *C.freundii* bei einem Volumen von 500 ml konstant ab und erreicht nahezu die untere Vertrauensgrenze des 95% Konfidenzintervalles.



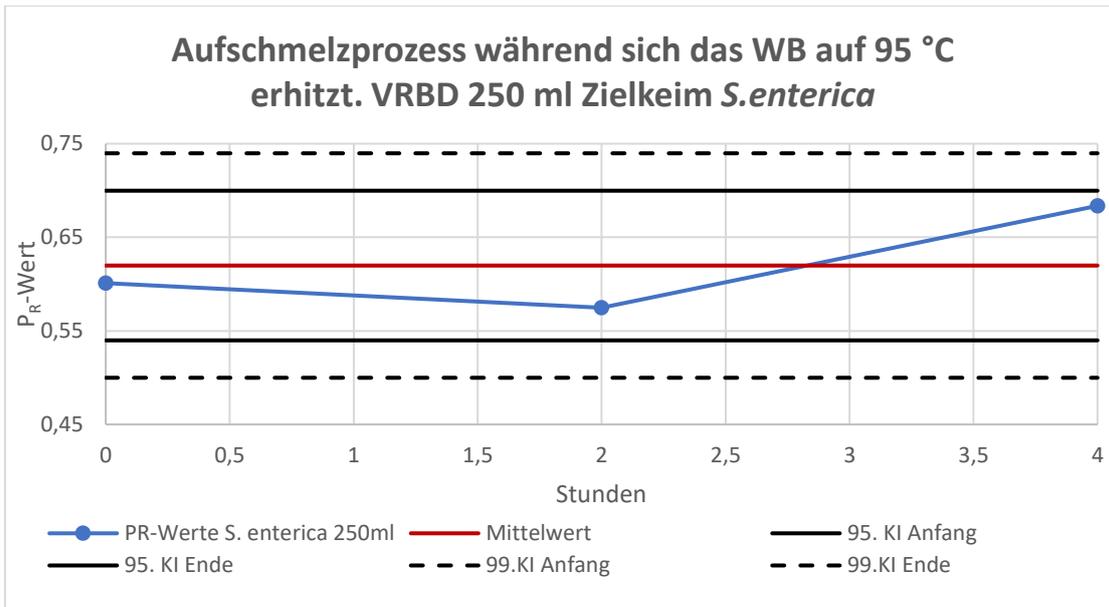
AA- Abbildung 13: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *E.aerogenes* auf VRBD 250 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C

Der Zielkeim *S.enterica* ist auf 250 ml VRBD Agar ebenso schwach, wie bei 500 ml. Mit einem Produktivitätsverhältnis zwischen knapp 60% und knapp 70% liegt die Salmonelle über der Mindestanforderung der Produktivität.

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBD 250ml Flasche I-III <i>S. enterica</i>			
i=	t ₀	t ₁	t ₂
Referenz	122	116	118
KBE (Prüfagar-xi)	73	67	81
r _i	0,60	0,57	0,68
r _i -r _{i-1}		0,03	0,11

AA- Tabelle 22: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBD 250 ml *S.enterica* während der Erwärmung des WB auf 95 °C

S.enterica beginnt bei Messung t₀ unter dem mittleren P_R-Wert bereits den Produktivitätsabfall bis zu Messung t₁. Ab der Messung t₁ steigt der P_R-Wert über den mittleren P_R-Wert hinaus und erreicht näherungsweise die obere Grenze des 95% Konfidenzintervalles.

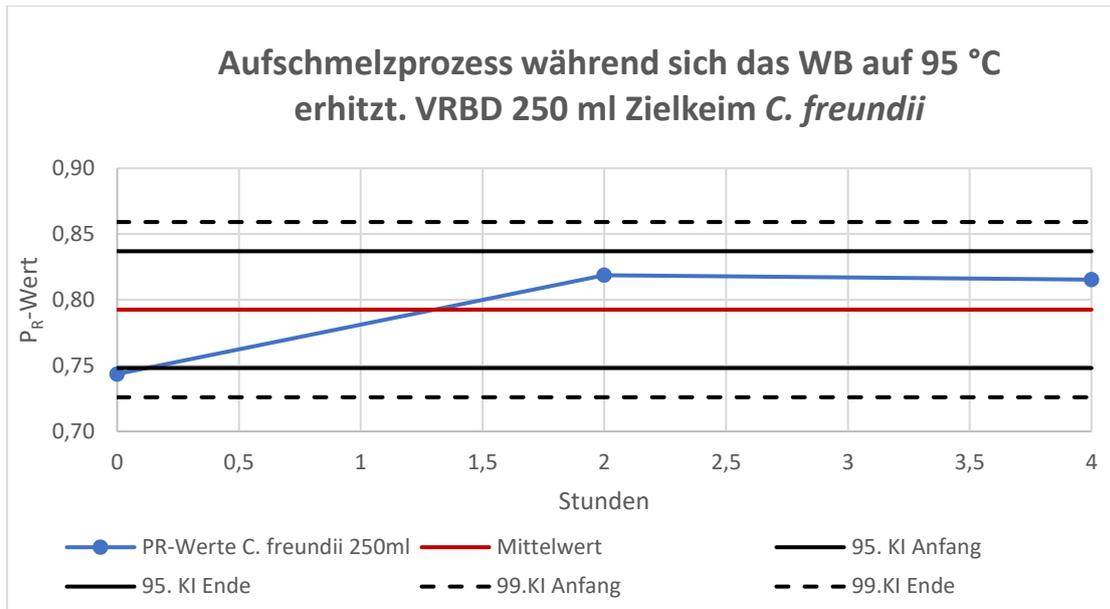


AA- Abbildung 14: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *S.enterica* auf VRBD 250 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C

Der Zielkeim *C.freundii* wird mit einer Produktivität zwischen 70% und 80% für 250 ml VRBD Agar als stabil angesehen.

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBD 250ml Flasche I-III <i>C. freundii</i>			
<i>i</i> =	t_0	t_1	t_2
Referenz	65	57	65
KBE (Prüfagar-xi)	48	47	53
r_i	0,74	0,82	0,82
$ r_i - r_{i-1} $		0,08	0,00

AA- Tabelle 23: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBD 250 ml *C.freundii* während der Erwärmung des WB auf 95 °C



AA- Abbildung 15: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *C.freundii* auf VRBD 250 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C

VRBD Aufschmelzmethode 2 (abweichend von DIN EN ISO 11133)

Untersuchung des Aufschmelzprozesses der Agar-Flaschen bei der Temperatur von 95°C (WB ist bereits auf t_{max} erhitzt)

Die Ergebnisse des Aufschmelzprozesses, die Agar-Flaschen im Wasserbad zu positionieren, sobald die Maximaltemperatur von 95 °C erreicht ist, ergaben für die Zielkeime von VRBD bessere Produktivitätswerte, als bei der Aufschmelzmethode, die Flaschen direkt während der Erwärmung im Wasserbad zu platzieren.

Betrachtet man das Volumen von 500 ml Agar Flaschen fällt auf, dass die Produktivität bei allen Zielkeimen gestiegen ist. Der Zielkeim *C.freundii* durchlief die bedeutendste Verbesserung der Produktivität von zwischen 60% bis 70% auf 94%-95%. Die Leistungsfähigkeit der Salmonelle ist von einer Produktivität von 50% bis 70% auf 0-80% gestiegen. Dennoch sind die Ergebnisse der 500 ml Agar Flaschen der beiden Aufschmelzmethoden weniger starken Schwankungen unterlegen als den 250 ml Agar-Flaschen.

Beim Aufschmelzen der VRBD Agar-Flaschen bei 95 °C haben die 250 ml Agar-Flaschen deutlich besser abgeschnitten als die 500 ml Agar Flaschen, sodass in Erwägung gezogen werden kann den Aufschmelzprozess für VRBD mindestens für ein Volumen von 250 ml anzupassen.

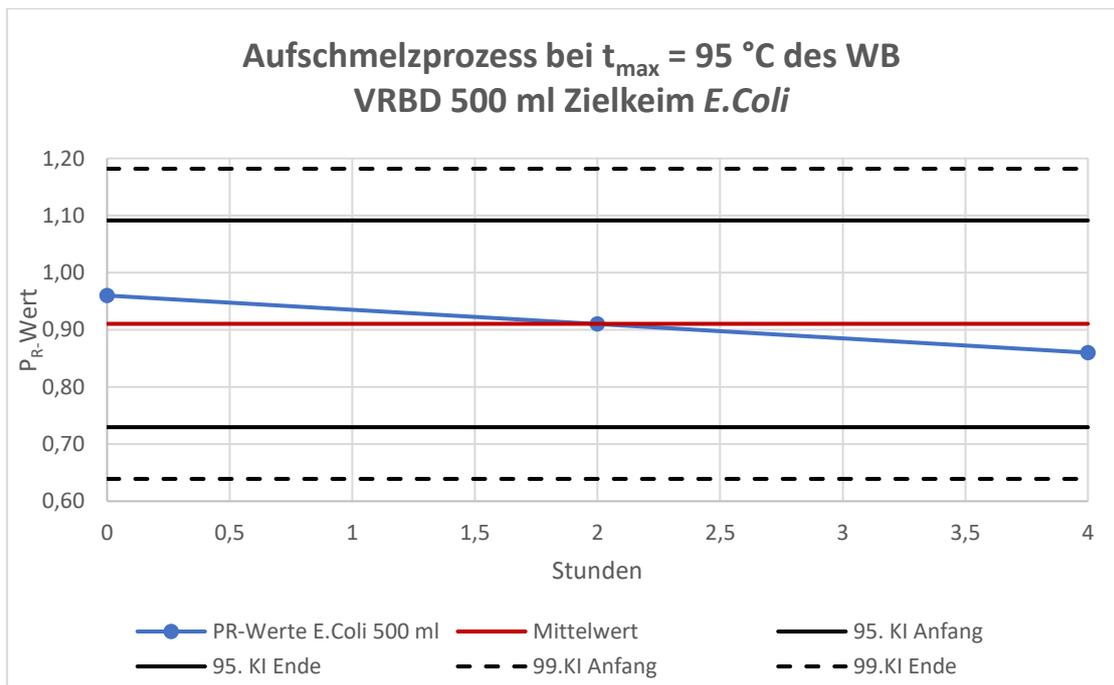
Oxoid 500 ml VRBD Agar-Falschen

Die Produktivität von *E.Coli* lag für den Untersuchungszeitraum zwischen ca. 85% und 95%, was deutlich höher als bei dem, in der Routinearbeit durchgeführten, Aufschmelzprozess ist.

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBD 500 ml Flasche I-III <i>E.Coli</i>			
$j=$	t_0	t_1	t_2
Referenz	53	55	62
KBE (Prüfagar-xi)	51	50	53
r_i	0,96	0,91	0,86
$ r_i - r_{i-1} $		0,05	0,05

AA- Tabelle 24: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBD 500 ml *E.Coli* während $t_{max}=95\text{ }^\circ\text{C}$

Die Regelkarte beschreibt den Produktivitätsverlauf von *E.Coli*, der einen konstanten Produktivitätsabfall erfährt und bei Messung t_1 den mittleren P_R -Wert schneidet.



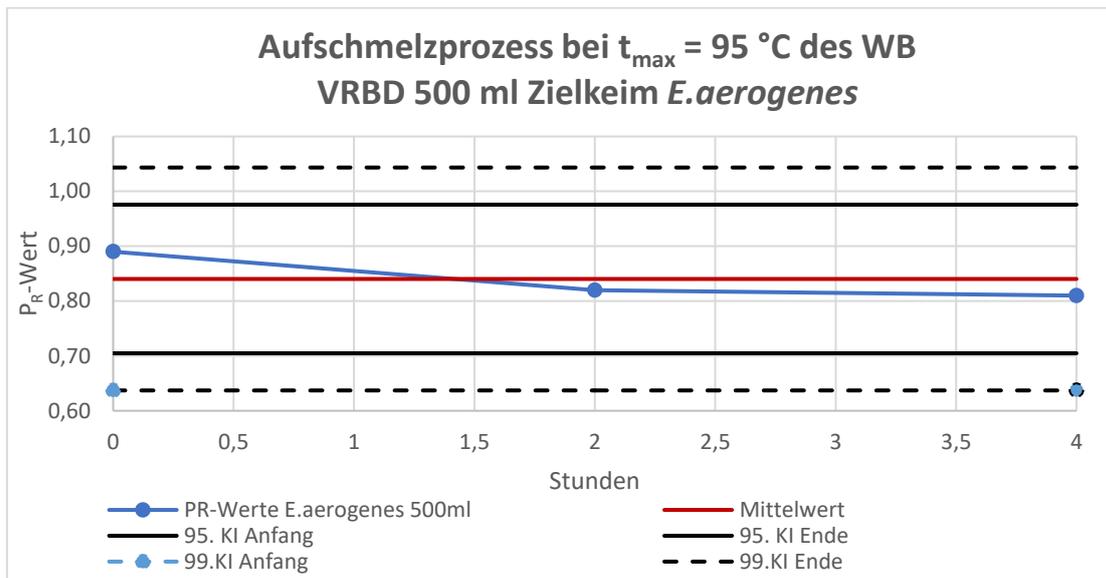
AA- Abbildung 16: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *E.Coli* auf VRBD 500 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95\text{ }^\circ\text{C}$

Die Produktivität von *E.aerogenes* liegt zwischen 80% und 90% für 500 ml VRBD Agar und ist demnach als einwandfrei anzusehen.

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBD 500 ml Flasche I-III <i>E.aerogenes</i>			
$j=$	t_0	t_1	t_2
Referenz	69	72	64
KBE (Prüfagar-xi)	61	59	52
r_i	0,89	0,82	0,81
$ r_i - r_{i-1} $		0,07	0,01

AA- Tabelle 25: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBD 500 ml *E.aerogenes* während $t_{max}=95\text{ }^\circ\text{C}$

Die abnehmende Steigung von *E.aerogenes* ist in der Regelkarte als gering einzuordnen. Die Produktivitätsabnahme verläuft langsam, was für das durchgeführte Aufschmelzverfahren spricht.



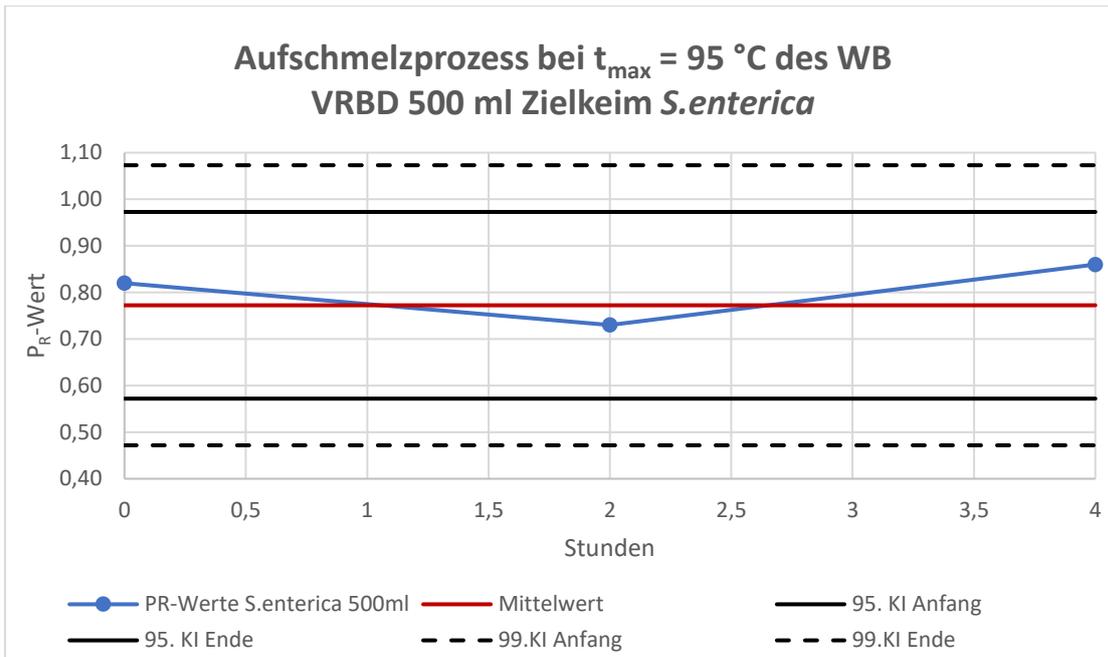
AA- Abbildung 17: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *E.aerogenes* auf VRBD 500 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95^{\circ}C$

S.enterica weist bei dieser Aufschmelzmethode mit einem P_R -Werten zwischen 70% und 80% ein weitaus höheres Produktivitätsverhältnis für 500 ml Agar auf als bei der durchgeführten Aufschmelzmethode der Routinearbeit.

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBD 500 ml Flasche I-III <i>S. enterica</i>			
$i=$	t_0	t_1	t_2
Referenz	52	49	56
KBE (Prüfagar-xi)	43	36	43
r_i	0,82	0,73	0,76
$ r_i - r_{i-1} $		0,09	0,03

AA- Tabelle 26: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBD 500 ml *S.enterica* während $t_{max}=95^{\circ}C$

Der Produktivitätsbereich der Salmonelle bewegt sich während des Untersuchungszeitraumes dicht ober und unterhalb des mittleren P_R -Wertes und ist keinen auffälligen Schwankungen unterlegen, anders als bei den Ergebnissen zu demselben Volumen für die vorherige Aufschmelzmethode.



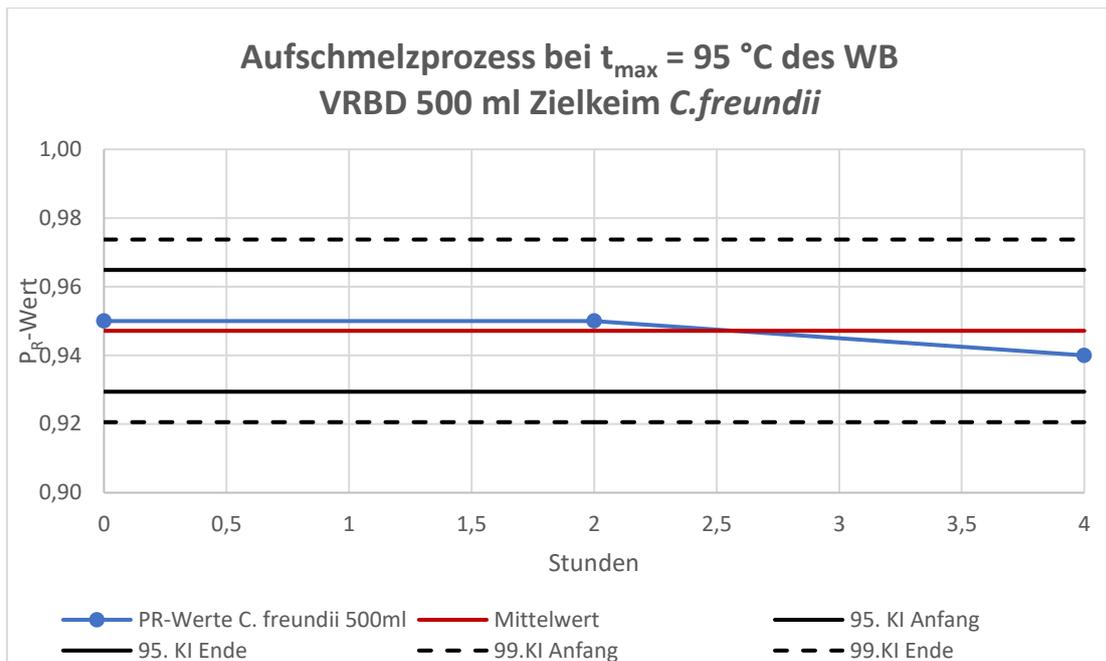
AA- Abbildung 18: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *S.enterica* auf VRBD 500 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95\text{ °C}$

Die nachfolgende Tabelle weist eine optimale Produktivität von *C.freundii* auf. Über vier Stunden sind Schwankungen von lediglich 1% zu beobachten, die ausschließlich in einem Produktivitätsbereich von 90% festzustellen sind. Auch hier schneiden vorliegende Ergebnisse deutlich besser ab als die Ergebnisse des zuvor durchgeführten Aufschmelzprozesses für dieselbe Volumenanzahl an Agar.

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBD 500 ml Flasche I-III <i>C.freundii</i>			
i=	t_0	t_1	t_2
Referenz	152	165	157
KBE (Prüfagar-xi)	144	157	148
r_i	0,95	0,95	0,94
$ r_i - r_{i-1} $		0,00	0,01

AA- Tabelle 27: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBD 500 ml *C.freundii* während $t_{max}=95\text{ °C}$

Die Regekkarte des Zielkeims *C.freundii* hat einen ähnlichen Verlauf, wie die Regelkarte des Zielkeimes *S.enterica* und zeigt somit ein exemplarisches Produktivitätsverhältnis auf.



AA- Abbildung 19: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *C.freundii* auf VRBD 500 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95\text{ °C}$

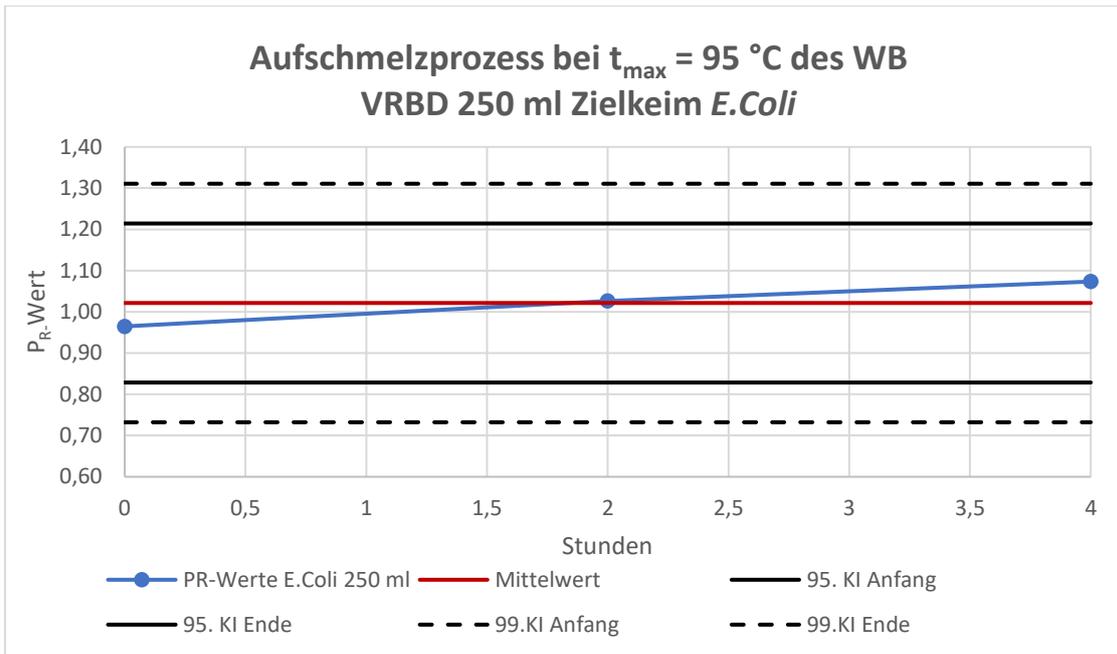
Oxoid 250 ml VRBD Agar-Flaschen

Die Tabelle zeigt den Zielkeim *E.Coli* bei 250 ml VRBD Agar und beschreibt einen beispielhaften Produktivitätsverlauf. Die P_R -Werte liegen näherungsweise zwischen 95% und 100% und sind somit als überdurchschnittlich zu betrachten.

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBD 250 ml Flasche I-III E.Coli			
$i=$	t_0	t_1	t_2
Referenz	170	190	177
KBE (Prüfagar-xi)	164	195	190
r_i	0,96	1,03	1,07
$ r_i - r_{i-1} $		0,06	0,05

AA- Tabelle 28: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBD 250 ml *E.Coli* während $t_{max}=95\text{ °C}$

Die dazugehörige Regelkarte beschreibt bis zur letzten Messung t_2 einen schwach konstanten Produktivitätsanstieg, der sich in der Nähe des mittleren P_R -Werts ereignet.



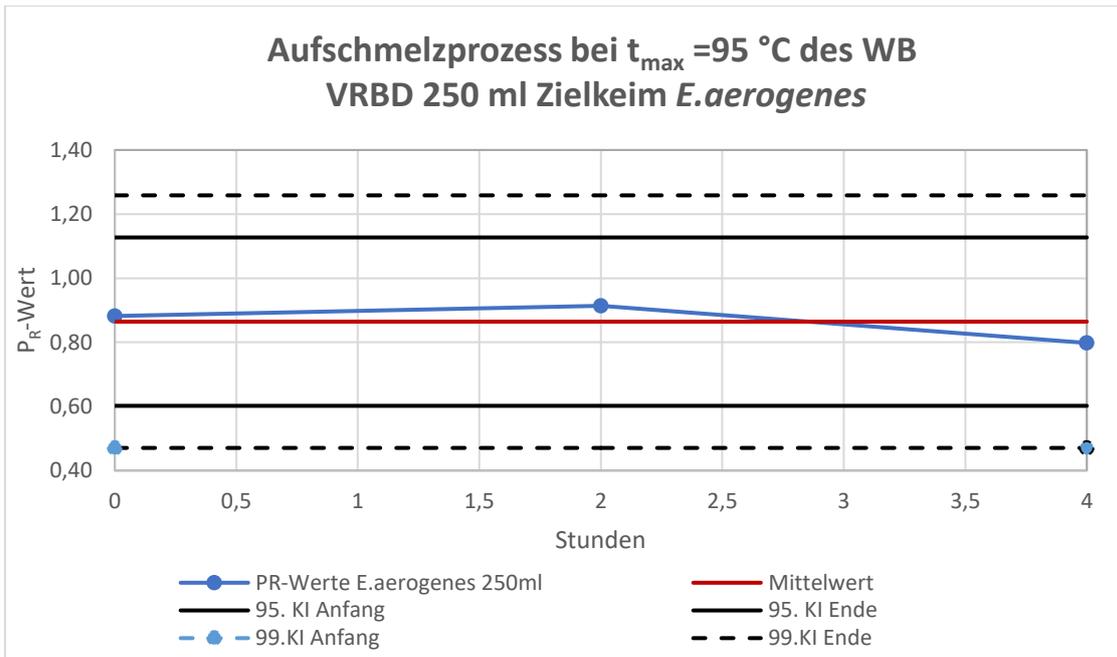
AA- Abbildung 20; Regelkarte Produktivitätsverhältnis *E.Coli* auf VRBD 250 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95\text{°C}$

Der Enterobacter dieser Untersuchung verhält sich gleichermaßen gut wie bei der ersten Aufschmelzmethode für ein Volumen von 250 ml Agar. Auch hier liegt die Produktivität des Zielkeimes zwischen 80% und 90%.

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBD 250 ml Flasche I-III <i>E.aerogenes</i>			
$i=$	t_0	t_1	t_2
Referenz	170	190	177
KBE (Prüfagar-xi)	55	57	57
r_i	0,88	0,91	0,80
$ r_i - r_{i-1} $		0,03	0,12

AA- Tabelle 29: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBD 250 ml *E.aerogenes* während $t_{max} = 95 \text{ °C}$

Die Regelkarte des Enterobacter zeigt einen unauffälligen Verlauf an. Auch hier sind alle Werte dicht um den mittleren P_R -Wert angeordnet und somit eindeutig innerhalb der errechneten Vertrauensgrenzen.



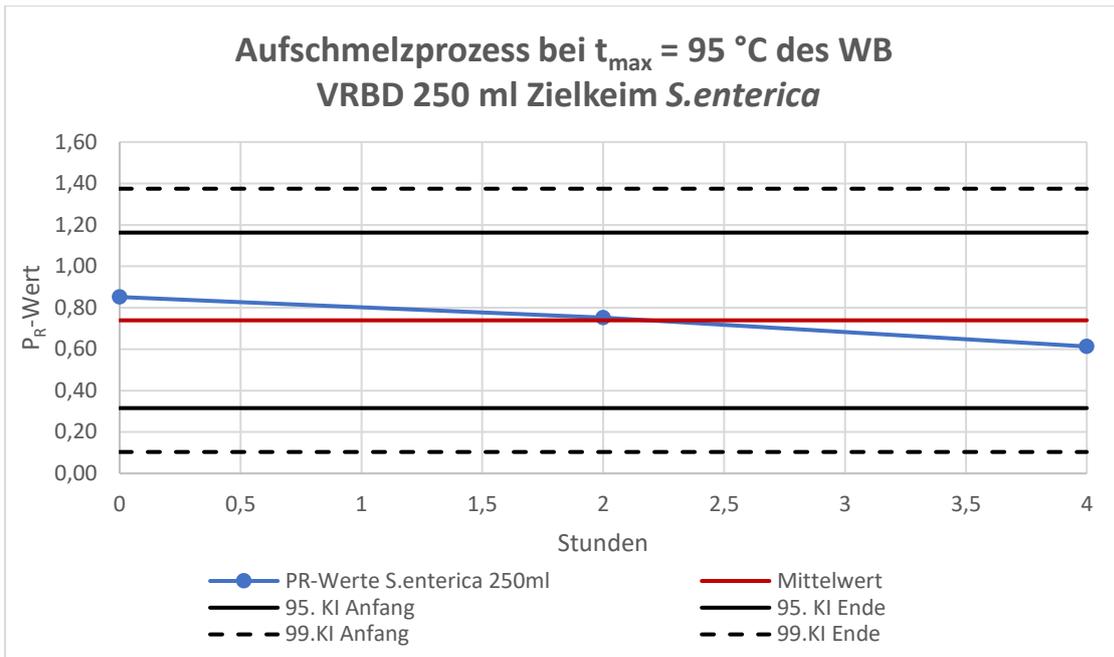
AA- Abbildung 21: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *E.aerogenes* auf VRBD 250 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95\text{ °C}$

Die höchste gemessene Produktivität der Salmonelle in dieser Untersuchung liegt 15% höher als bei den Messungen der ersten Aufschmelzvariante. Bei beiden Methoden für 250 ml VRBD Agar liegt der untersten gemessene P_R -Wert für *S.enterica* bei ca. 0,60.

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBD 250 ml Flasche I-III <i>S.enterica</i>			
$i=$	t_0	t_1	t_2
Referenz	153	31	62
KBE (Prüfagar-xi)	130	23	38
r_i	0,85	0,75	0,61
$ r_i - r_{i-1} $		0,10	0,14

AA- Tabelle 30: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBD 250 ml *S.enterica* $t_{max}=95\text{ °C}$

Die Regelkarte der Salmonelle beschreibt, wie bei den Zielkeimen *E.Coli* und *E.aerogenes* eine dichte Anordnung der Werte um den mittleren P_R -Wert. Der Graph hat eine schwach negative Steigung, die sich nach 4 Stunden knapp unter dem mittleren P_R -Wert einfindet.



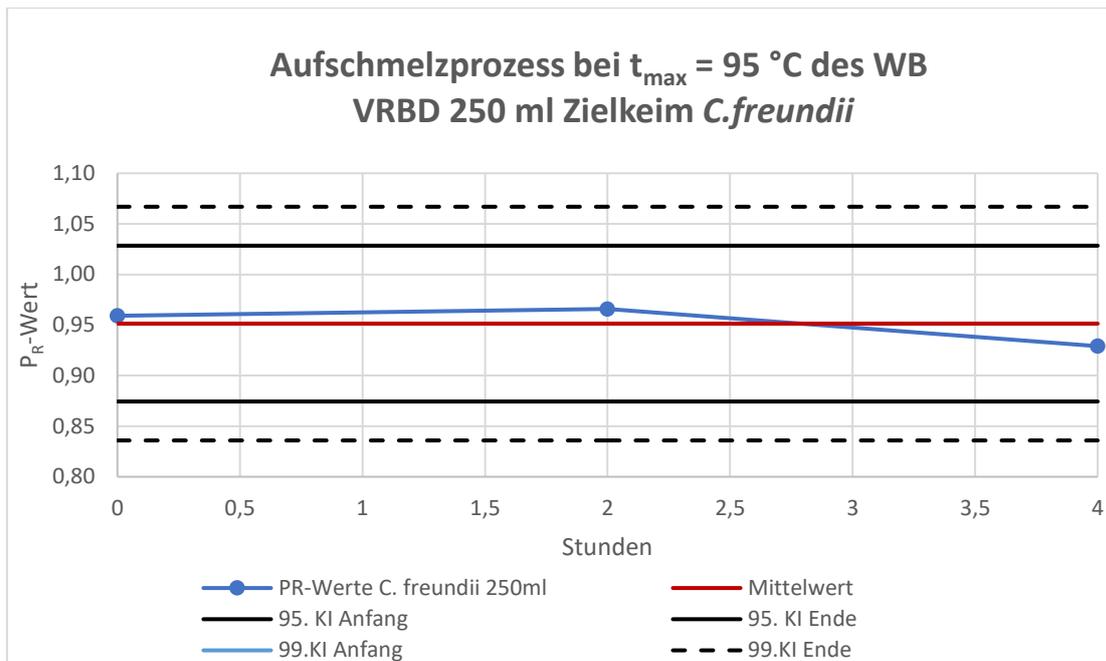
AA- Abbildung 22: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *S. enterica* auf VRBD 250 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95\text{ °C}$

C. freundii weist bei einem Volumen von 250 ml Agar ähnlich wie bei den restlichen Zielkeimen einen idealen Produktivitätsverlauf auf. Er liegt mit P_R -Werten zwischen 0,90 und 1,00 direkt hinter dem Zielkeim *E. Coli* und übertrifft deutlich die Ergebnisse der ersten Aufschmelzmethode.

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBD 250ml Flasche I-III <i>C. freundii</i>			
$i=$	t_0	t_1	t_2
Referenz	270	303	315
KBE (Prüfagar-xi)	259	293	293
r_i	0,96	0,97	0,93
$ r_i - r_{i-1} $		0,01	0,04

AA- Tabelle 31: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBD 250 ml *C. freundii* während $t_{max}=95\text{ °C}$

Die Regelkarte für den Zielkeim *C. freundii* verläuft wie bei den restlichen Zielkeimen dieses Aufschmelzprozesses unauffällig. Auch hier sind die P_R -Werte dicht neben dem mittleren P_R -Wert positioniert.



AA- Abbildung 23: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *C.freundii* auf VRBD 250 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95\text{ °C}$

VRBD Aufschmelzmethode 3 (abweichend von DIN EN ISO11133)

Untersuchung die Agar-Flaschen über den Aufschmelzprozess hinaus im WB stehen lassen

Diese Art der Aufschmelzmethode für VRBD sollte ursprünglich ausschließlich aufgrund des Vergleichs zweier unterschiedlicher Hersteller gegenübergestellt werden. Xebios hatte zu der Zeit, in der die Durchführung des Aufschmelzprozesses zu VRBD vorgesehen war, erhebliche Liefer-schwierigkeiten, sodass der Agar wochenlang nicht lieferbar war. Aus diesem Grund mussten die Versuche hierzu gestrichen werden.

Oxoid 500 ml Agar-Falschen und Xebios 400 ml Agar-Flaschen

Nicht durchgeführt.

Oxoid 250 ml Agar-Flaschen und Xebios 250 ml Agar-Flaschen

Nicht durchgeführt.

Routinebegleitende Leistungsprüfung von 400 ml VRBD Agar-Flaschen (Xebios) über einen Zeitraum von maximal 34 Stunden

Die Ergebnisse der Untersuchung der Standzeitenkontrolle pro Stunde für den Hersteller Xebios wurde zum Vergleich mit den bereits vom Labor verwendeten 500 ml VRBD Agar-Flaschen von Oxoid vorgenommen. Allgemein zeigen die Ergebnisse, dass die Produktivität der Xebios VRBD Agar-Flaschen bei allen verwendeten Zielkeimen schwächer ausfällt als bei den VRBD Flaschen

von Oxoid. Wo die Produktivität des Zielkeims *E.Coli* beispielsweise bei Oxoid um 100% liegt, ist bei Xebios nur eine Produktivität ab 70% zu vermerken.

Alle Xebios Ergebnisse weisen einen größeren Produktivitätsbereich als Oxoid auf. Beispielsweise beträgt der Produktivitätsbereich des Zielkeims *E.aerogenes* auf Oxoid-Agar 80% bis 100% und bei Xebios Agar 55% bis 95%.

S.enterica zeigt für Xebios dieselbe Produktivität wie für Oxoid ($P_R=0,6$ bis $P_R=0,9$) über einen Versuchstag an, wohingegen Oxoid die Produktivität über den gesamten Untersuchungszeitraum von zwei Versuchstagen abdecken kann.

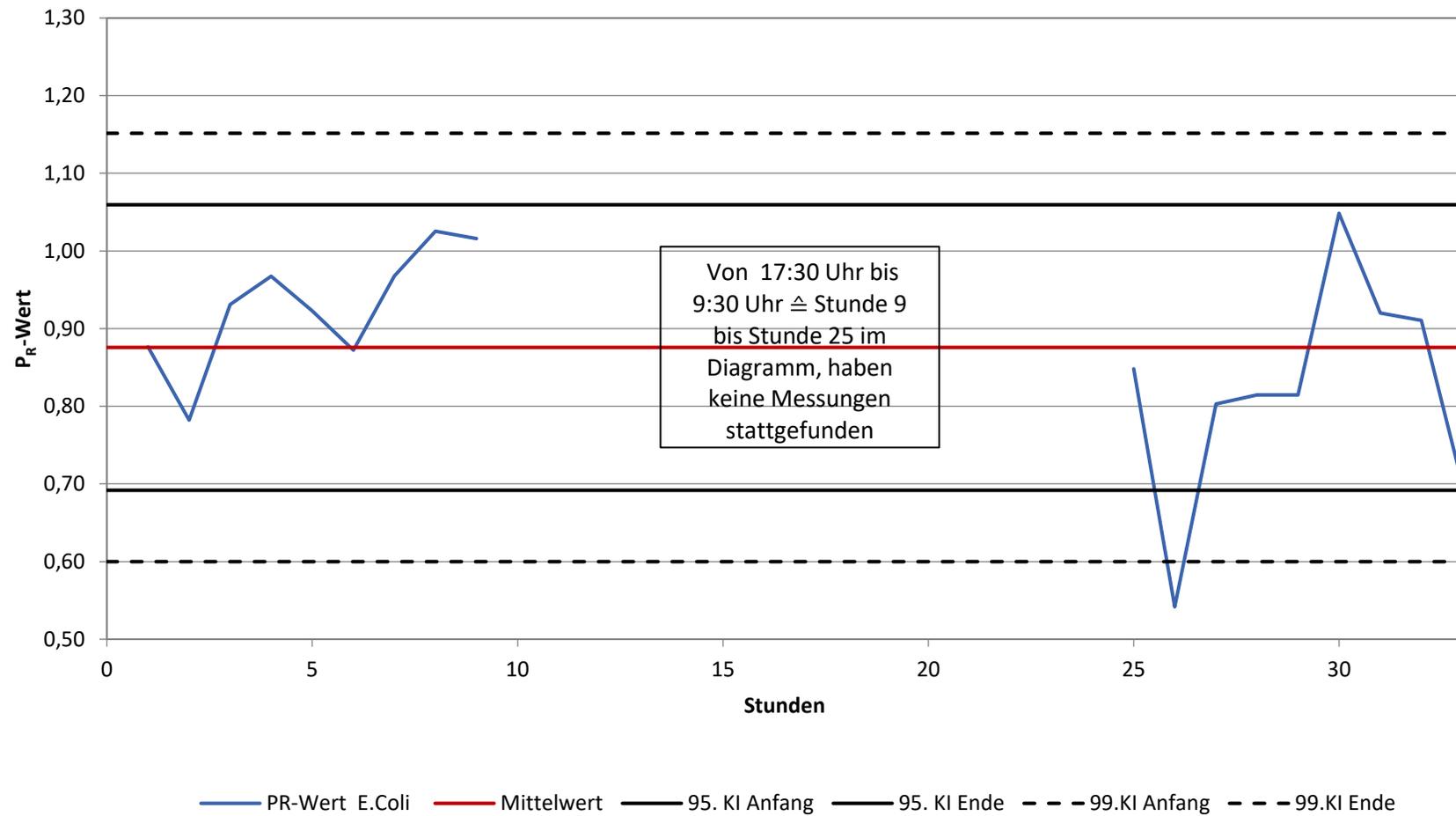
Tabelle AA-32 beschreibt die Produktivität des 400 ml VRBD-Agars von Xebios mit Hilfe des Zielkeims *E.Coli*. Der erste Versuchstag zeigt eine Produktivitätsspanne zwischen 80% und 100% auf, die sich im Laufe des zweiten Versuchstages auf 70% bis 100% erweitert. Werden die P_R -Werte der zwei Hersteller des VRBD Agars miteinander verglichen, geht der Oxoid Agar als eindeutig produktiver hervor, da deren P_R -Werte kontinuierlich im 100% Bereich liegen.

	Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBD 400 ml Flasche I bis Flasche III <i>E.Coli</i>								
<i>i</i> =	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Referenz	81	98	82	82	82	94	93	92	105
KBE (Prüfagar-xi)	71	77	76	79	76	82	90	94	107
<i>r_i</i>	0,88	0,78	0,93	0,97	0,92	0,87	0,97	1,03	1,02
$ r_i - r_{i-1} $		0,09	0,15	0,04	0,04	0,05	0,10	0,06	0,01
<i>i</i> =	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Referenz	68	112	71	81	81	55	75	67	80
KBE (Prüfagar-xi)	58	61	57	66	66	58	69	61	56
<i>r_i</i>	0,85	0,54	0,80	0,81	0,81	1,05	0,92	0,91	0,70
$ r_i - r_{i-1} $	0,17	0,31	0,26	0,01	0,00	0,23	0,13	0,01	0,21

AA- Tabelle 32: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von *E.Coli* für VRBD 400 ml beschreiben

Aus der Regelkarte des 400 ml Xebios VRBD Agars, gemessen am Zielkeim *E.Coli* liegen die P_R -Werte des ersten Versuchstages deutlich über der Grenze des mittleren P_R -Wertes. Am zweiten Versuchstag ist eine deutliche Absenkung der P_R -Werte zu vermerken, die daraufhin leicht an Steigung gewinnt und erneut abfällt, woraufhin der Produktivitätsbereich von 70% bis 80% für den zweiten Versuchstag entstand.

Standzeiten VRBD (Xebios) 400 ml *E.Coli*



AA- Abbildung 24: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *E.Coli* auf VRBD 400 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h

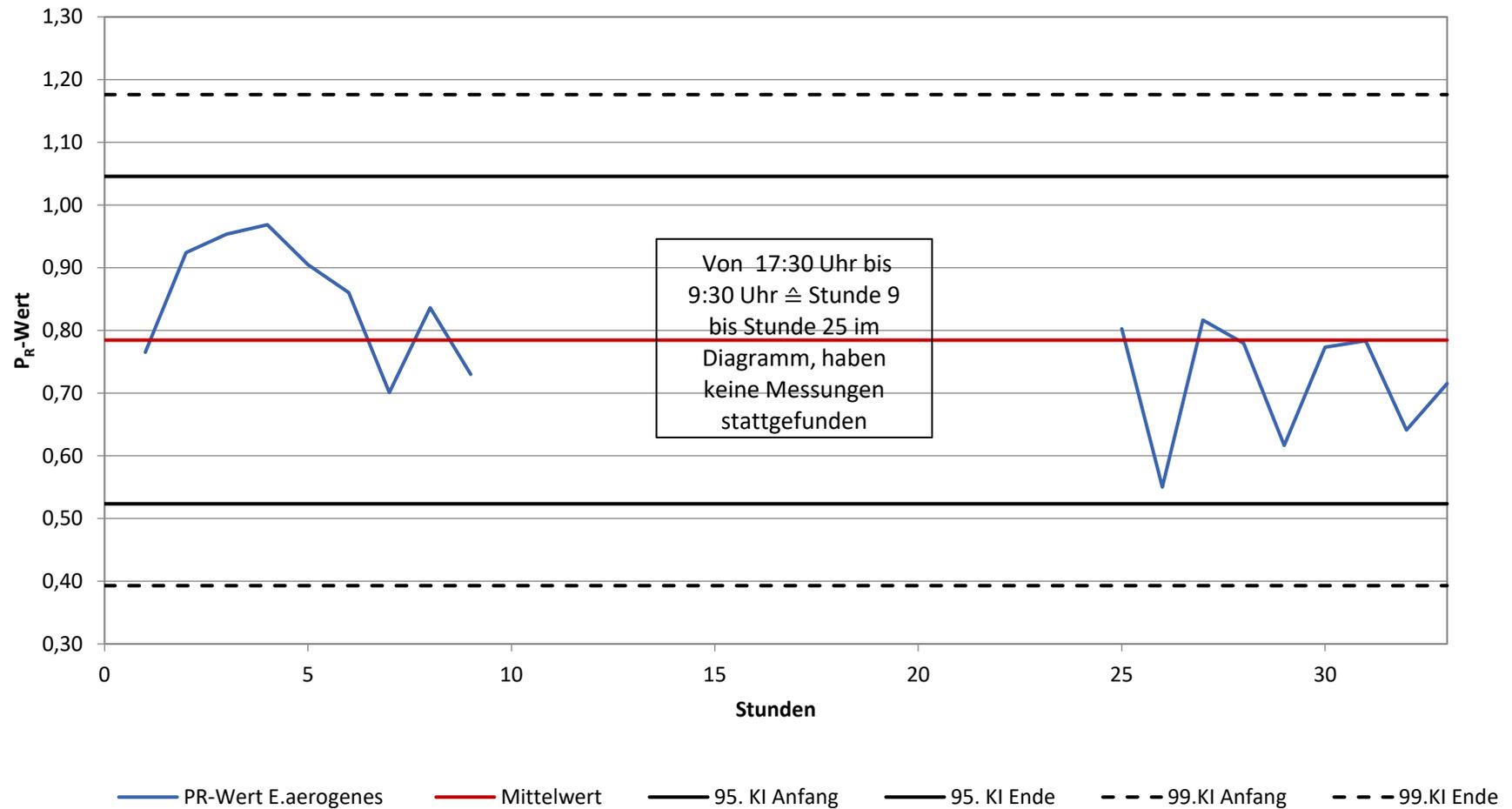
Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBD 400 ml Flasche I bis Flasche III <i>E. aerogenes</i>									
<i>i</i> =	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Referenz	61	57	50	53	49	62	68	61	84
KBE (Prüfagar-xi)	47	53	48	51	44	53	48	51	61
<i>r_i</i>	0,77	0,92	0,95	0,97	0,90	0,86	0,70	0,84	0,73
<i> r_i-r_{i-1} </i>		0,16	0,03	0,02	0,06	0,04	0,16	0,14	0,11
<i>i</i> =	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Referenz	71	83	69	62	80	50	57	65	62
KBE (Prüfagar-xi)	57	46	56	48	49	39	45	42	44
<i>r_i</i>	0,80	0,55	0,82	0,78	0,62	0,77	0,78	0,64	0,72
<i> r_i-r_{i-1} </i>	0,07	0,25	0,27	0,04	0,16	0,16	0,77	0,14	0,07

AA- Tabelle 33: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von *E.aerogenes* für VRBD 400 ml beschreiben.

Tabelle AA-33: zeigt die Entwicklung der Produktivität von *E.aerogenes* auf 400 ml VRBD Agar. Die P_R -Werte liegen am ersten Versuchstag zwischen 0,70 und 0,95. Am zweiten Versuchstag fällt diese Spanne auf 0,55 bis 0,80 deutlich ab, wobei die unterste Produktivitätsgrenze von 0,50 nicht unterschritten wird und somit für den Zeitraum der getesteten Untersuchungstage laut des Zielkeims *E.aerogenes* weiterhin verwendet werden kann.

Aus der Regelkarte aus Abbildung AA-25 geht hervor, dass die P_R -Werte des ersten Versuchstages über dem mittleren P_R -Wert lagen und am zweiten Versuchstag deutlich unter dem mittleren P_R -Wert angeordnet waren. Diese Darstellung zeigt zudem ebenfalls eine deutlich geringere Produktivität an als der VRBD Agar von Oxoid (Vergleich: Routineüberprüfung VRBD 500ml Ergebnisteil).

Standzeiten VRBD (Xebios) 400 ml *E.aerogenes*



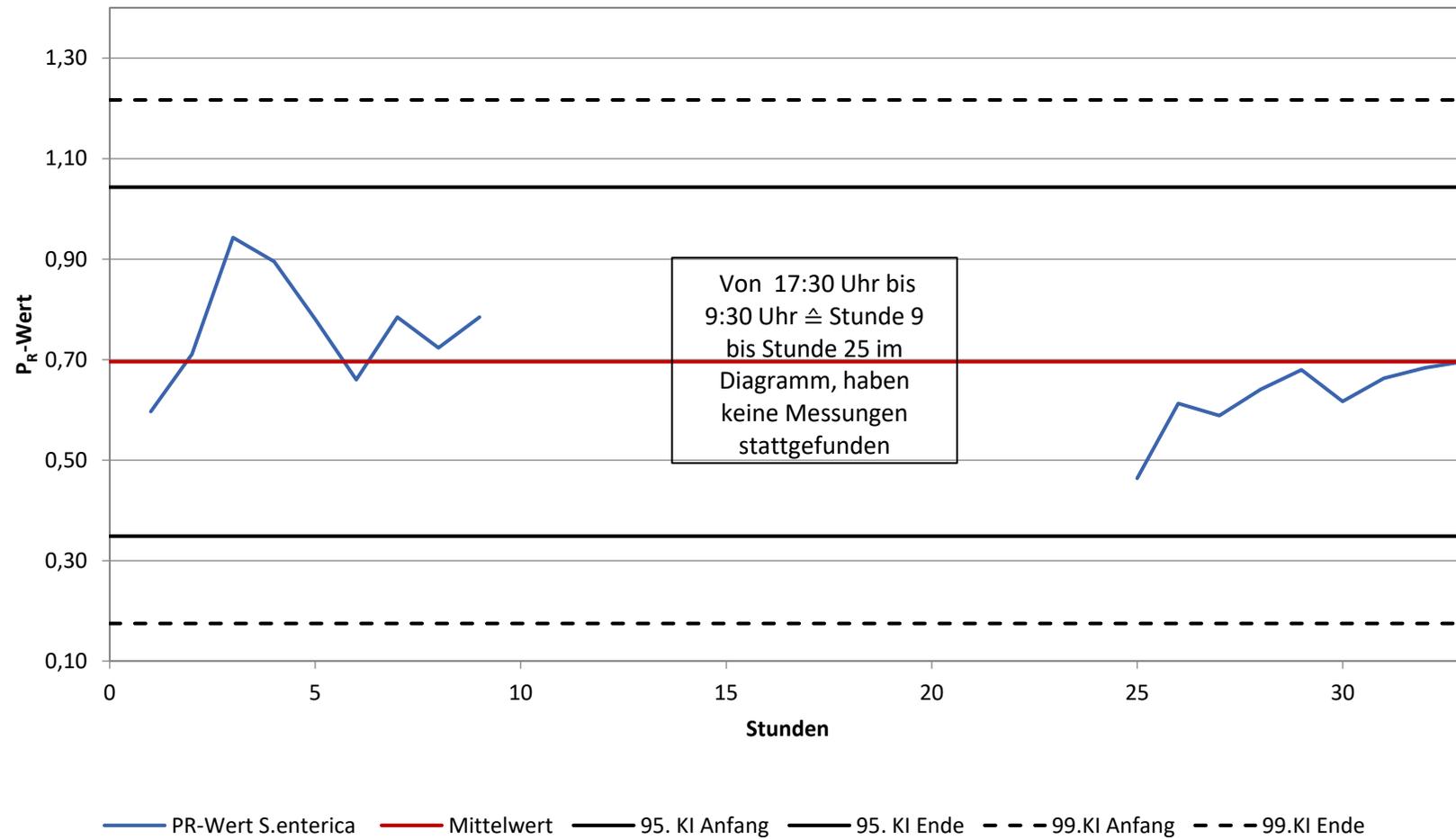
AA- Abbildung 25: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *E.aerogenes* auf VRBD 400 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max.34 h

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBD 400 ml Flasche I bis Flasche III <i>S. enterica</i>									
<i>i</i> =	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Referenz	100	98	70	70	76	100	82	82	96
KBE (Prüfagar-xi)	60	70	66	63	59	66	64	59	75
<i>r_i</i>	0,60	0,71	0,94	0,90	0,78	0,66	0,78	0,72	0,78
$ r_i - r_{i-1} $		0,11	0,23	0,05	0,11	0,12	0,66	0,78	0,72
<i>i</i> =	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Referenz	115	93	98	88	79	80	90	79	77
KBE (Prüfagar-xi)	53	57	58	56	54	49	60	54	54
<i>r_i</i>	0,46	0,61	0,59	0,64	0,68	0,62	0,66	0,68	0,70
$ r_i - r_{i-1} $	0,32	0,15	0,02	0,05	0,04	0,06	0,05	0,02	0,01

AA- Tabelle 34: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von *S. enterica* für VRBD 400 ml beschreiben.

Tabelle AA-34 beschreibt die Produktivität der *S. enterica* auf Xebios 400 ml VRBD Agar. Die Produktivität des ersten Versuchstages beträgt 60% bis 90%. Die Ergebnisse des zweiten Versuchstages werden mit Produktivitätswerten zwischen 60% und 70% eingedämmt, sodass der zweite Versuchstag eine weniger gute Produktivität nach dem Zielkeim *S. enterica* aufweist. Die Salmonelle der 500 ml Oxoid Agar-Flaschen hält den Produktivitätsbereich von 60% bis 90% beispielsweise für beide Versuchstage stand, wohingegen Xebios ausschließlich den ersten Versuchstag mit diesen Produktivitätswerten abdeckt (siehe Routineüberprüfung VRBD Ergebnisteil). Die Abbildung AA-26, die die Regelkarte für *S. enterica* darstellt, veranschaulicht die im späteren Versuchsdurchlauf abklingende Produktivität der Salmonelle. So liegen alle P_R -Werte des zweiten Versuchstages bereits unter dem mittleren P_R -Wert, wohingegen sich die P_R -Werte des ersten Versuchstages überwiegend über der Richtlinie des mittleren P_R -Wertes befinden. *S. enterica* kann für Xebios Agar zudem nicht alle Kriterien der DIN EN ISO 11133 erfüllen, sodass er in Bezug auf die Leistungsprüfung dem Oxoid Agar nicht vorgezogen werden sollte.

Standzeiten VRBD (Xebios) 400 ml *S.enterica*



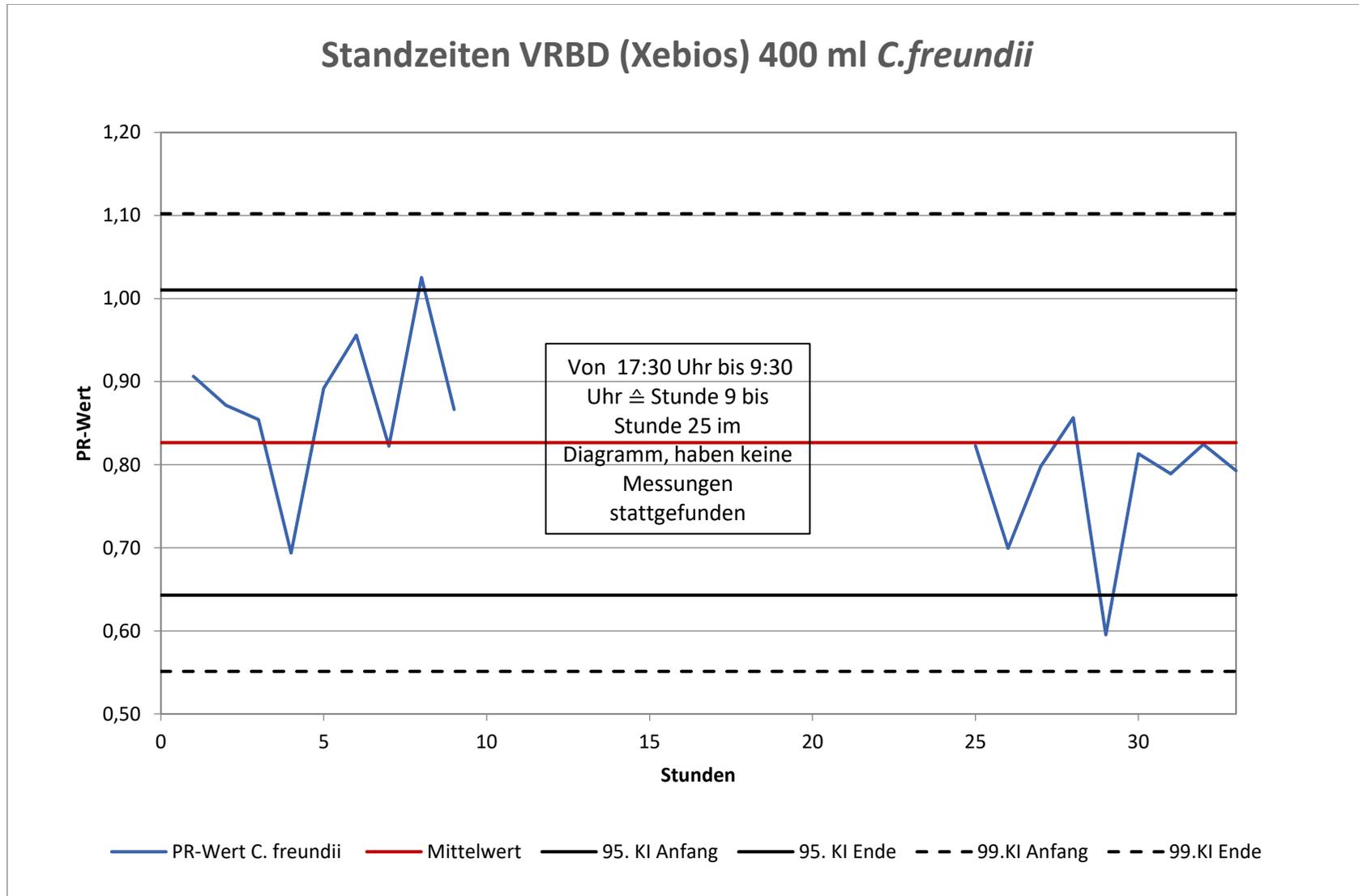
AA- Abbildung 26: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *S. enterica* auf VRBD 400 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max.34 h

	Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBD 400 ml Flasche I bis Flasche III <i>C.freundii</i>								
<i>i</i> =	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Referenz	57	70	64	86	71	68	92	79	95
KBE (Prüfagar-xi)	52	61	55	60	63	65	76	81	82
<i>r_i</i>	0,91	0,87	0,85	0,69	0,89	0,96	0,82	1,03	0,87
$ r_i - r_{i-1} $		0,04	0,02	0,16	0,20	0,06	0,13	0,2	0,16
<i>i</i> =	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Referenz	64	82	61	65	84	66	68	57	66
KBE (Prüfagar-xi)	53	57	49	56	50	54	54	47	52
<i>r_i</i>	0,82	0,70	0,80	0,86	0,60	0,81	0,79	0,82	0,79
$ r_i - r_{i-1} $	0,04	0,12	0,10	0,06	0,26	0,22	0,02	0,04	0,03

AA- Tabelle 35: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von *C.freundii* für VRBD 400 ml beschreiben.

Tabelle AA-35 beschreibt die Ergebnisse der Produktivität des Zielkeims *C.freundii* auf 400 ml Xebios VRBD Agar während der Standzeitenüberprüfung pro Stunde über einen Untersuchungszeitraum von maximal 34 Stunden im Routinelabor. Über die gesamten zwei Tage liegen die Produktivitätswerte zwischen 70% und 100%, was weit über den geforderten Mindestwert von 50 % liegt. Die Produktivität verändert sich zwischen Versuchstag 1 und Versuchstag 2. Keine Messung des zweiten Versuchstages erreicht eine Produktivität von 90 %, sodass wie in nachstehender Abbildung AA-27 zu erkennen ist, die P_R -Werte am 2. Tag der durchgeführten Messungen pro Stunde alle unter dem mittleren P_R -Wert vorzufinden sind. Wie bereits im Ergebnisteil der Routineüberprüfung zu VRBD zu sehen war, liegt die Leistung für *C.freundii* bei dem Hersteller Oxoid um 10% höher als bei Xebios.

Standzeiten VRBD (Xebios) 400 ml *C.freundii*



AA- Abbildung 27: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *C.freundii* auf VRBD 400 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max.34 h

Routinebegleitende Leistungsprüfung von 250 ml VRBD Agar-Flaschen (Xebios) über einen Zeitraum von maximal 34 Stunden

Oxoid 250 ml Agar-Flaschen

Keine Untersuchung durchgeführt.

Wie bei den Aufschmelzprozessen erwähnt wurde, konnten auch hier durch Materialbeschaffungsschwierigkeiten keine Routinebegleitenden Untersuchungen mit 250 ml VRBD Agar-Flaschen von Oxoid und Xebios durchgeführt und miteinander verglichen werden.

Xebios 250 ml Agar-Flaschen

Keine Untersuchung durchgeführt.

Ergebnisse zu den Aufschmelzprozessen VRBL

VRBL Aufschmelzmethode 1 gemäß DIN EN ISO 11133

Untersuchung des Aufschmelzprozesses der Agar-Flaschen während sich das WB auf 95°C erhitzt

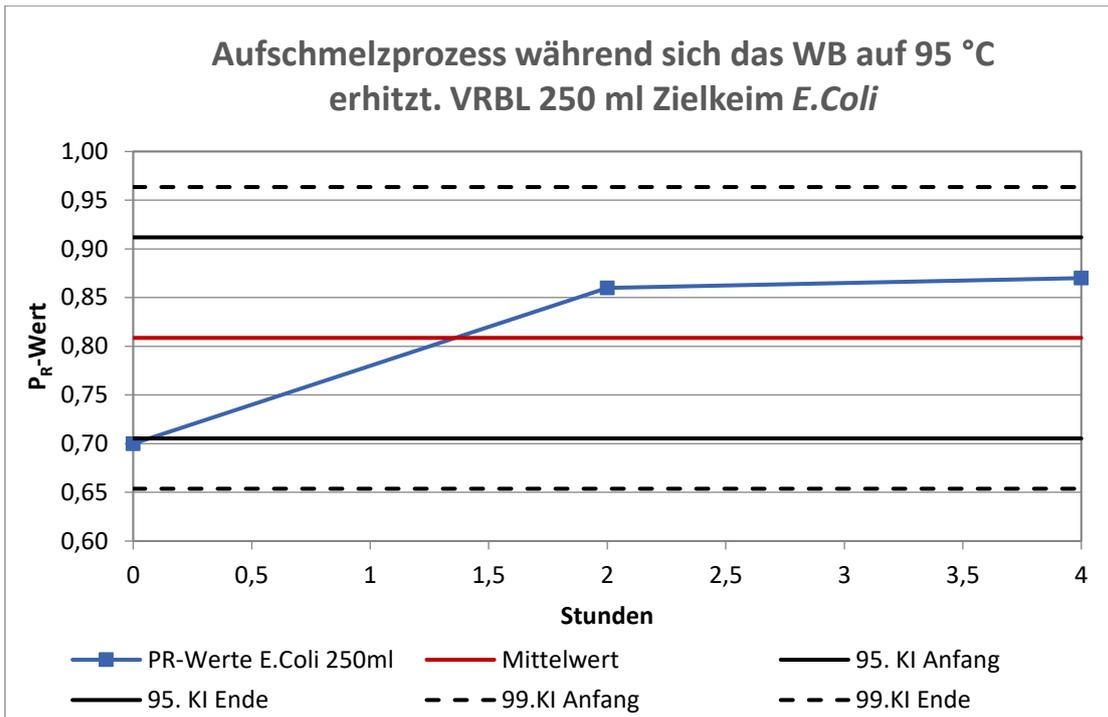
250 ml VRBL Agar-Flaschen

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBL 250 ml Flasche I-III E.Coli			
<i>i</i> =	<i>t</i> ₀	<i>t</i> ₁	<i>t</i> ₂
<i>Referenz</i>	149	145	144
KBE (Prüfagar-xi)	104	124	126
<i>r_i</i>	0,70	0,86	0,87
<i> r_i-r_{i-1} </i>		0,16	0,02

AA- Tabelle 36: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBL 250 ml E.Coli während der Erwärmung des WB auf 95 °C

Tabelle AA-36 weist auf die sich ergebenden P_R -Werte des Zielkeims *E.Coli* für VRBL Agar auf. Alle Ergebnisse liegen weit über $P_R > 0,5$, was für eine starke Produktivität des Agars während des Aufschmelzprozesses spricht. Der Bereich indem sich die P_R -Werte befinden liegen zwischen ca. 70% und 90%.

Aus Abbildung AA-28 erkennt man die steigende Produktivität nach Messung t_0 . Nach der zweistündigen Messung findet sich der P_R -Wert bis Abschluss der Untersuchung parallel über dem mittleren P_R -Wert ein.



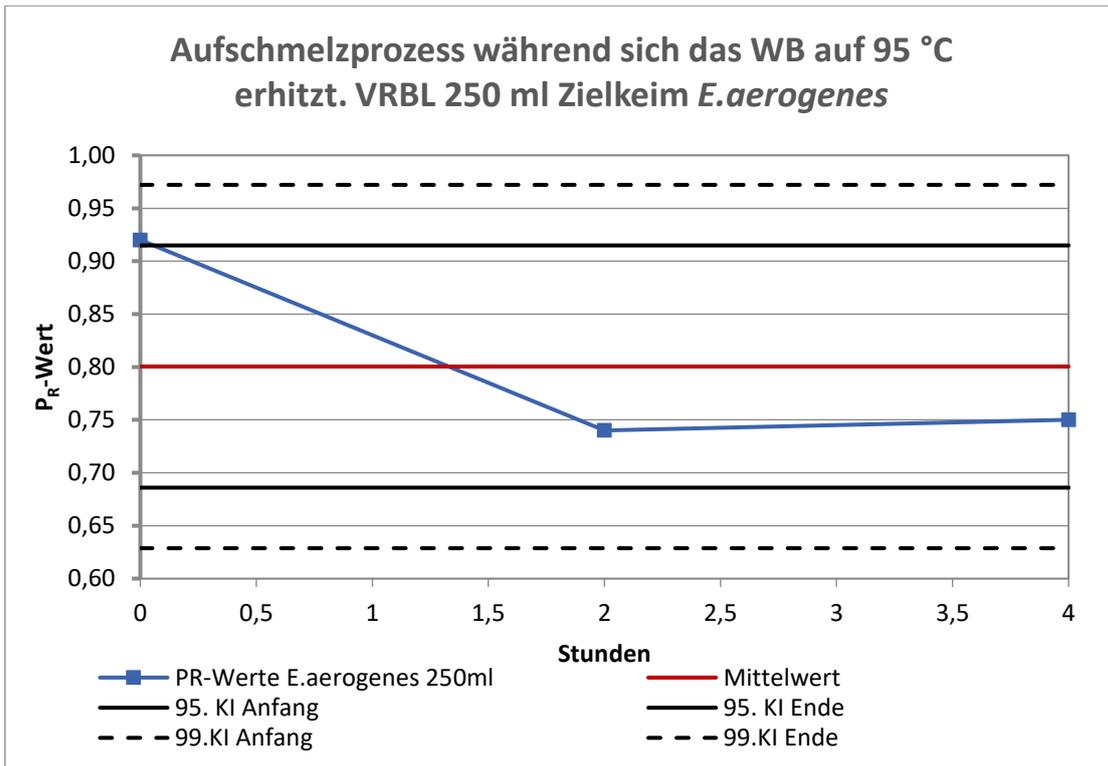
AA- Abbildung 28: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *E.Coli* auf VRBL 250 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBL 250 ml Flasche I-III <i>E.aerogenes</i>			
$i=$	t_0	t_1	t_2
Referenz	62	53	63
KBE (Prüfagar-xi)	57	39	47
r_i	0,92	0,74	0,75
$ r_i - r_{i-1} $		0,18	0,01

AA- Tabelle 37: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBL 250 ml *E.aerogenes* während der Erwärmung des WB auf 95 °C

Der Zielkeim *E.aerogenes* hat, wie Tabelle AA-37 darstellt, mit einer Produktivität, die zwischen ca. 75% und 90% liegt, eine ähnliche P_R -Wertspanne wie der Zielkeim *E.Coli*. VRBL Agar erweist sich *E.aerogenes* zu urteilen als stabil.

Die Regelkarte, die in Abbildung AA-29 dargestellt ist, zeigt den zwischen Messung t_0 und Messung t_1 relativ steilen Produktivitätsabfall von 18%, woraufhin sich bis Ende der Untersuchung eine konstante Produktivität von etwa 75% unter dem mittleren P_R -Wert der Regelkarte einstellt.



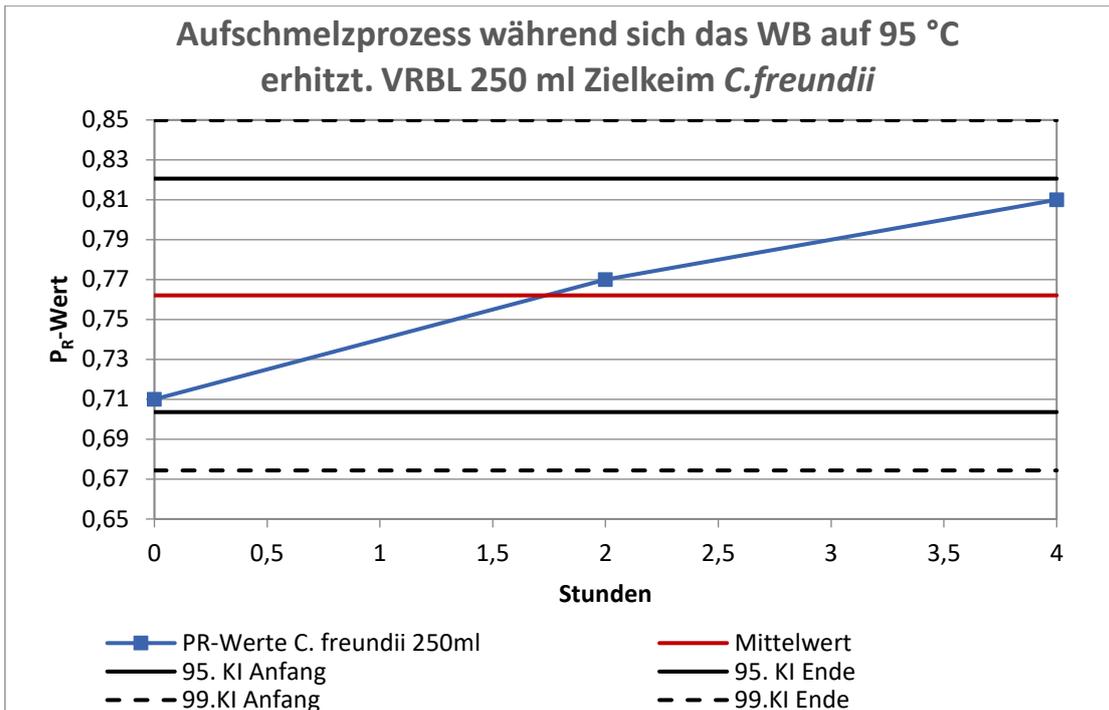
AA- Abbildung 29: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *E.aerogenes* auf VRBL 250 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBL 250 ml Flasche I-III <i>C.freundii</i>				
i=	t ₀	t ₁	t ₂	
Referenz	66	72	55	
KBE (Prüfagar-xi)	47	56	44	
r _i	0,71	0,77	0,81	
r _i -r _{i-1}		0,07	0,03	

AA- Tabelle 38: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBL 250 ml *C.freundii* während der Erwärmung des WB auf 95 °C

Der Zielkeim *C.freundii* hat ebenso wie die beiden anderen Zielkeime keine Auffälligkeiten zu vermerken. Die Produktivitätswerte liegen näherungsweise in denselben Bereichen.

Die Abbildung AA-30 präsentiert den Produktivitätsverlauf von *C.freundii* in Form der erstellten Regelkarte. *C.freundii* erfährt mit zunehmendem Untersuchungszeitraum einen kontinuierlichen Produktivitätsanstieg.



AA- Abbildung 30: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *C.freundii* auf VRBL 250 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C

VRBL Aufschmelzmethode 2 (abweichend von DIN EN ISO 11133)

Untersuchung des Aufschmelzprozesses der Agar-Flaschen bei der Temperatur von 95°C (WB ist bereits auf t_{max} erhitzt)

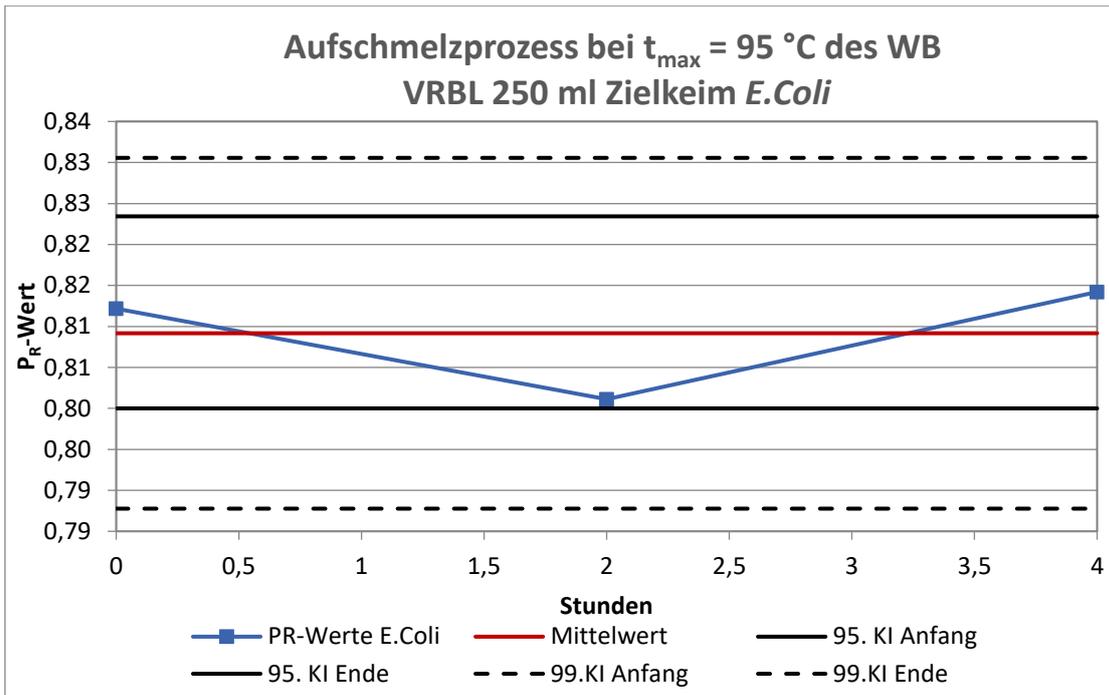
250ml Agar-Flaschen

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBL 250 ml Flasche I-III <i>E.Coli</i>			
$i=$	t_0	t_1	t_2
Referenz	126	119	122
KBE (Prüfagar-xi)	102	95	99
r_i	0,81	0,80	0,81
$ r_i - r_{i-1} $		0,01	0,01

AA- Tabelle 39: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBL 250 ml *E.Coli* während $t_{max}=95$ °C

Nach den Ergebnissen der Tabelle AA-39 wird *E.Coli* zu urteilen VRBL-Agar bei dieser Aufschmelzmethode in keine Richtung beeinflusst. Die P_R -Werte der Messung liegen zu jedem Zeitpunkt um 0,8.

In der zugehörigen Regelkarte der Abbildung AA-31 ist zu beobachten, dass sich alle erhobenen Datenwerte um den mittleren P_R -Wert von *E.Coli* angeordnet haben.

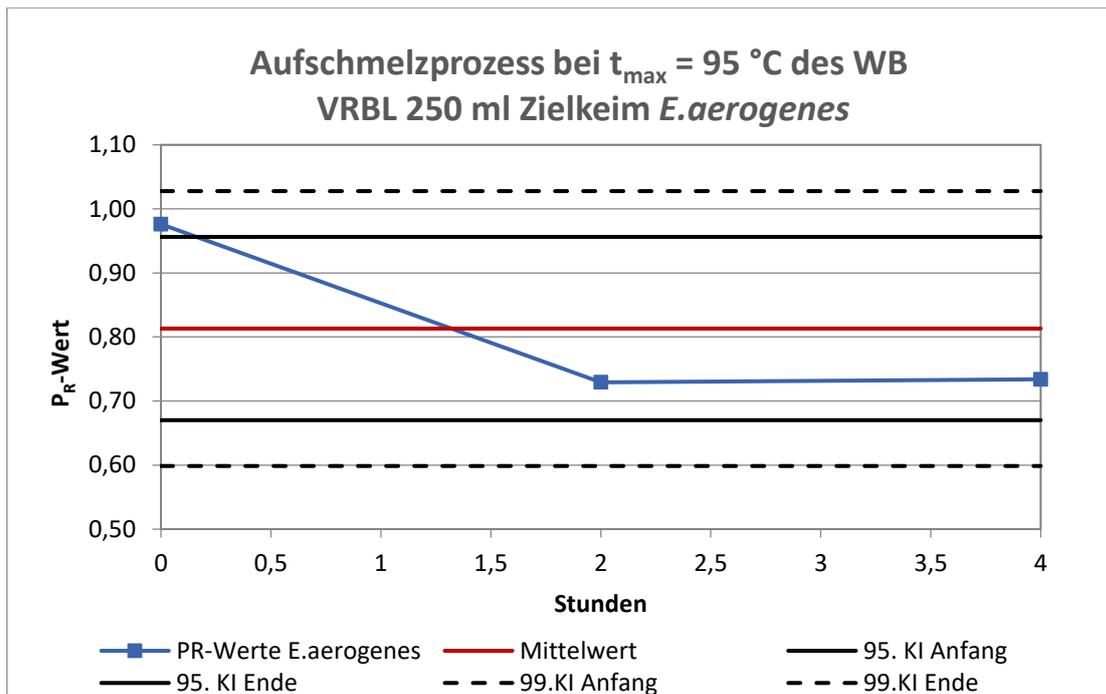


AA- Abbildung 31: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *E.Coli* auf VRBL 250 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95\text{ °C}$

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBL 250 ml Flasche I-III <i>E.aerogenes</i>			
i=	t_0	t_1	t_2
Referenz	84	96	84
KBE (Prüfagar-xi)	82	70	62
r_i	0,98	0,73	0,73
$ r_i - r_{i-1} $		0,25	0,00

AA- Tabelle 40: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBL 250 ml *E.aerogenes* während $t_{max}=95\text{ °C}$

Der Zielkeim *E. aerogenes* verhält sich von seinem Produktivitätsverlauf genau gleich, wie bei der vorherigen Aufschmelzmethode. Die nachfolgende Abbildung AA-32 zeigt die für *E.aerogenes* erstellte Regelkarte und dokumentiert dieselbe Anordnung der P_R -Werte wie bei der Aufschmelzmethode bei der die Agar Flaschen während sich das Wasserbad erhitzt aufgeschmolzen werden.



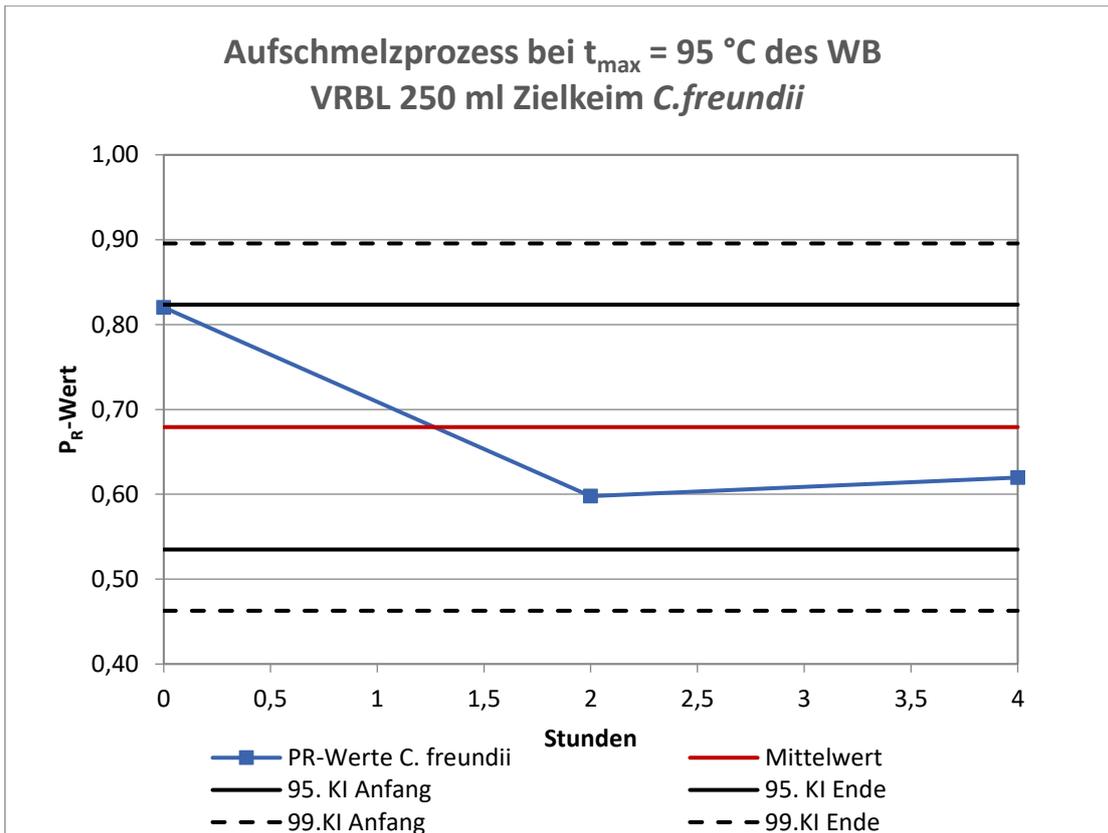
AA- Abbildung 32: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *E.aerogenes* auf VRBL 250 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95 \text{ °C}$

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBL 250 ml Flasche I-III <i>C.freundii</i>			
i=	t_0	t_1	t_2
Referenz	76	92	85
KBE (Prüfagar-xi)	62	55	53
r_i	0,82	0,60	0,62
$ r_i - r_{i-1} $		0,22	0,02

AA- Tabelle 41: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses VRBL 250 ml *C.freundii* während $t_{max}=95 \text{ °C}$

Tabelle AA-41 zeigt die Produktivitätswerte des Zielkeims *C.freundii* für VRBL Agar, die sich im Vergleich zum vorherigen Aufschmelzprozess von den Produktivitätsbereichen her unwesentlich unterscheiden.

C.freundii zeigt, wie *E.aerogenes* eine erst negative Steigung an und verläuft bis Abschluss der Untersuchung unterhalb und parallel der Grenze des mittleren P_R -Wertes entlang.



AA- Abbildung 33: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *C.freundii* auf VRBL 250 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95\text{°C}$

VRBL Aufschmelzmethode 3 (abweichend von DIN EN ISO 11133)

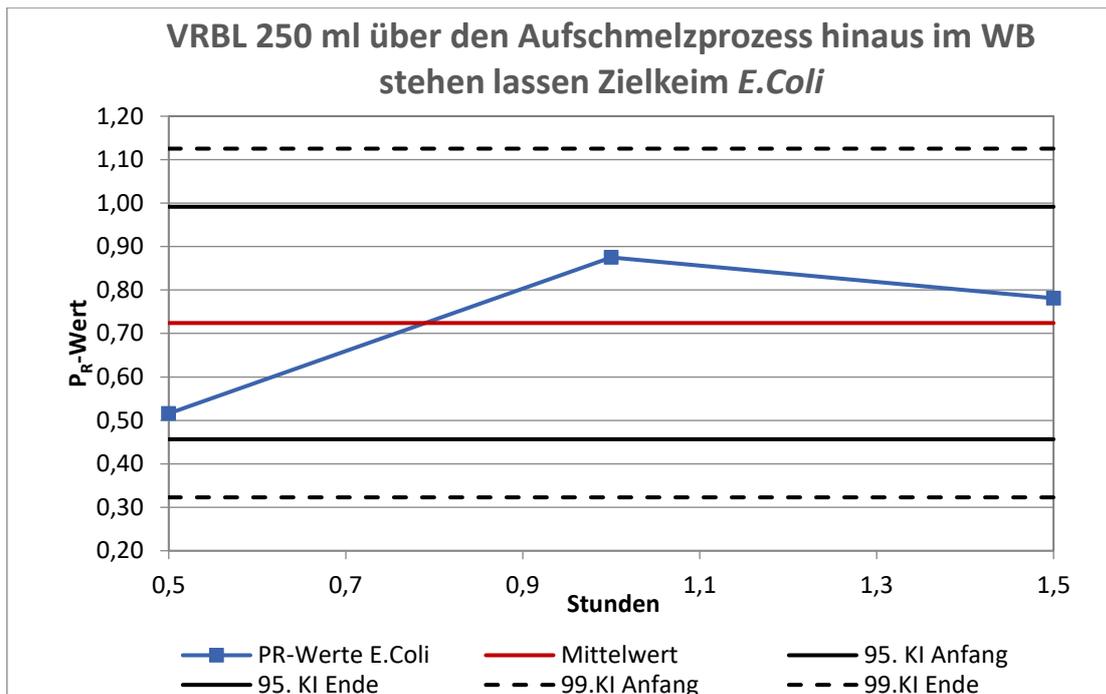
Untersuchung die Agar-Flaschen über den Aufschmelzprozess hinaus im WB stehen lassen

250ml Agar-Flaschen

Ergebnis von Prüfung Nummer (<i>i</i>) VRBL 250 ml <i>E.Coli</i>			
<i>i</i> =	t_0	t_1	t_2
Referenz	126	120	151
KBE (Prüfagar-xi)	65	105	118
<i>r_i</i>	0,52	0,88	0,78
$ r_i - r_{i-1} $		0,36	0,09

AA- Tabelle 42: Aufeinanderfolgende Überprüfungen bei Überschreitung des Aufschmelzprozesses VRBL 250 ml *E.Coli*

In Tabelle AA-42 zeigen die P_R -Werte von *E.Coli* zwischen 0,5 Stunden und 1 Stunde ein Produktivitätswachstum auf. Im weiteren Verlauf nimmt der P_R -Wert bis Ende der Messung leicht ab, ohne die Grenze unterhalb des mittleren P_R -Wertes zu passieren. Der hier beschriebene Produktivitätsverlauf (siehe auch Abbildung AA-34) gleicht den folgenden zwei Zielkeimen *E.aerogenes* und *C.freundii*.

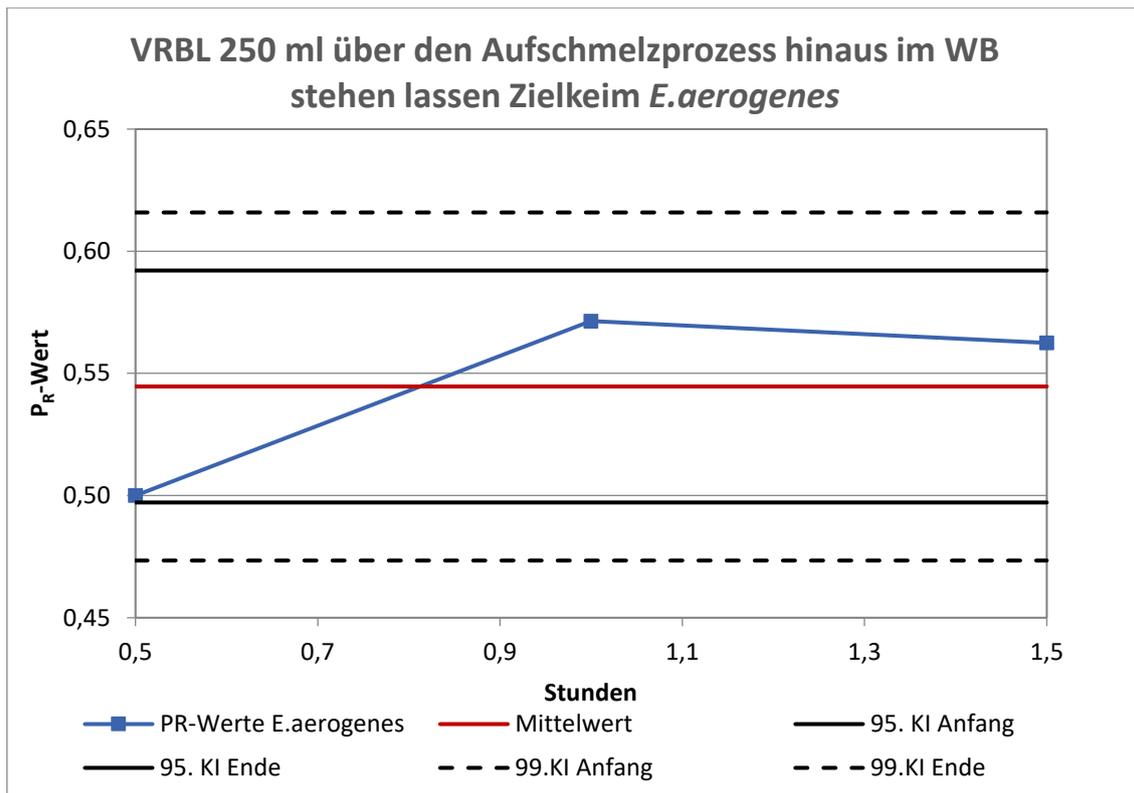


AA- Abbildung 34: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *E.Coli* auf VRBL 250 ml, Überschreitung des Aufschmelzprozesses

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBL 250 ml <i>E.aerogenes</i>			
i=	t ₀	t ₁	t ₂
Referenz	72	70	80
KBE (Prüfagar-xi)	36	40	45
r _i	0,50	0,57	0,56
r _i -r _{i-1}		0,07	0,01

AA- Tabelle 43: Aufeinanderfolgende Überprüfungen bei Überschreitung des Aufschmelzprozesses VRBL 250 ml *E.aerogenes*

Die Produktivitätswerte von *E.aerogenes*, die der Tabelle AA-43 zu entnehmen sind, haben eine deutlich kleiner P_R-Wertspanne als die anderen zwei Zielkeime *E.Coli* und *C.freundii*. Dennoch liegen sie mit einer Produktivität von ca.50% bis 60% noch nicht <P_R0,5 und verhalten sich bezüglich des Produktivitätsverlaufes, wie die Regelkarte auf Abbildung AA-35 aufzeigt nicht ungewöhnlich anders als die anderen beiden Zielkeime.

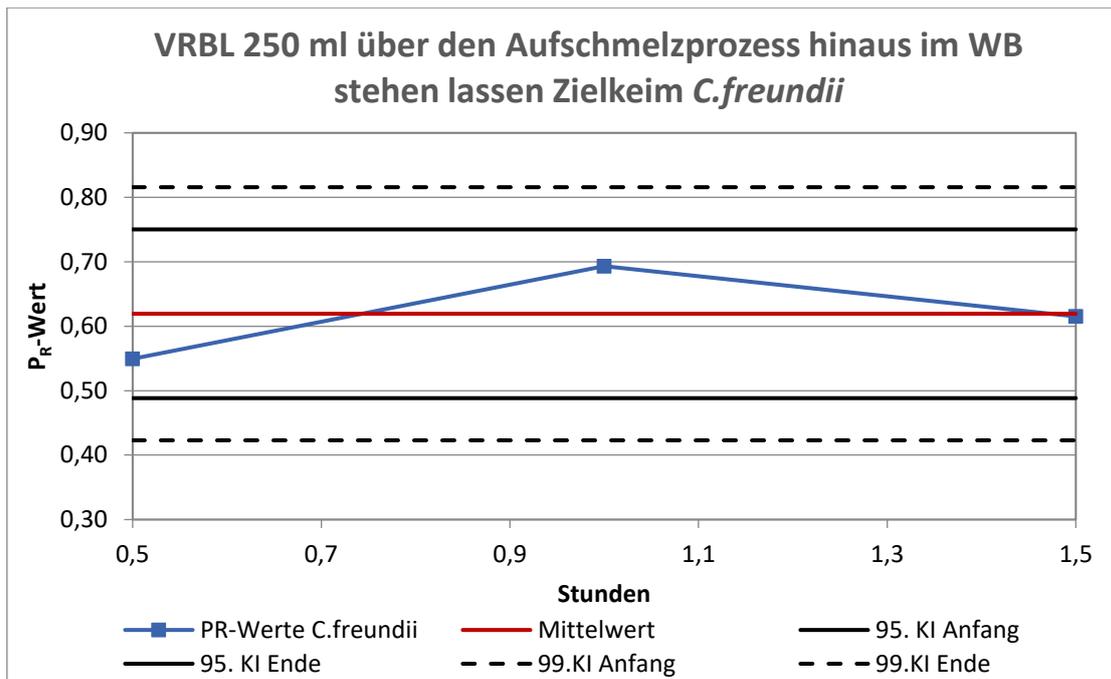


AA- Abbildung 35: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *E.aerogenes* auf VRBL 250 ml, Überschreitung des Aufschmelzprozesses

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBL 250 ml <i>C.freundii</i>			
i=	t ₀	t ₁	t ₂
Referenz	91	88	91
KBE (Prüfagar-xi)	50	61	56
r _i	0,55	0,69	0,62
r _i -r _{i-1}		0,14	0,08

AA- Tabelle 44: Aufeinanderfolgende Überprüfungen bei Überschreitung des Aufschmelzprozesses VRBL 250 ml *C.freundii*

Tabelle AA-44 zeigt die P_R-Werte des Zielkeims *C.freundii*, die in einem unkritischen Bereich von P_R=0,55 und P_R=0,70 zu finden sind. Die Anordnung der Werte in der Regelkarte gleichen den anderen Zielkeimen und liegen relativ dicht um den mittleren P_R-Wert herum (siehe Abbildung AA-36).



AA- Abbildung 36: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *C. freundii* auf VRBL 250 ml, Überschreitung des Aufschmelzprozesses

Routinebegleitende Leistungsprüfung von VRBL über einen Zeitraum von maximal 34 Stunden, 250 ml Agar-Flaschen

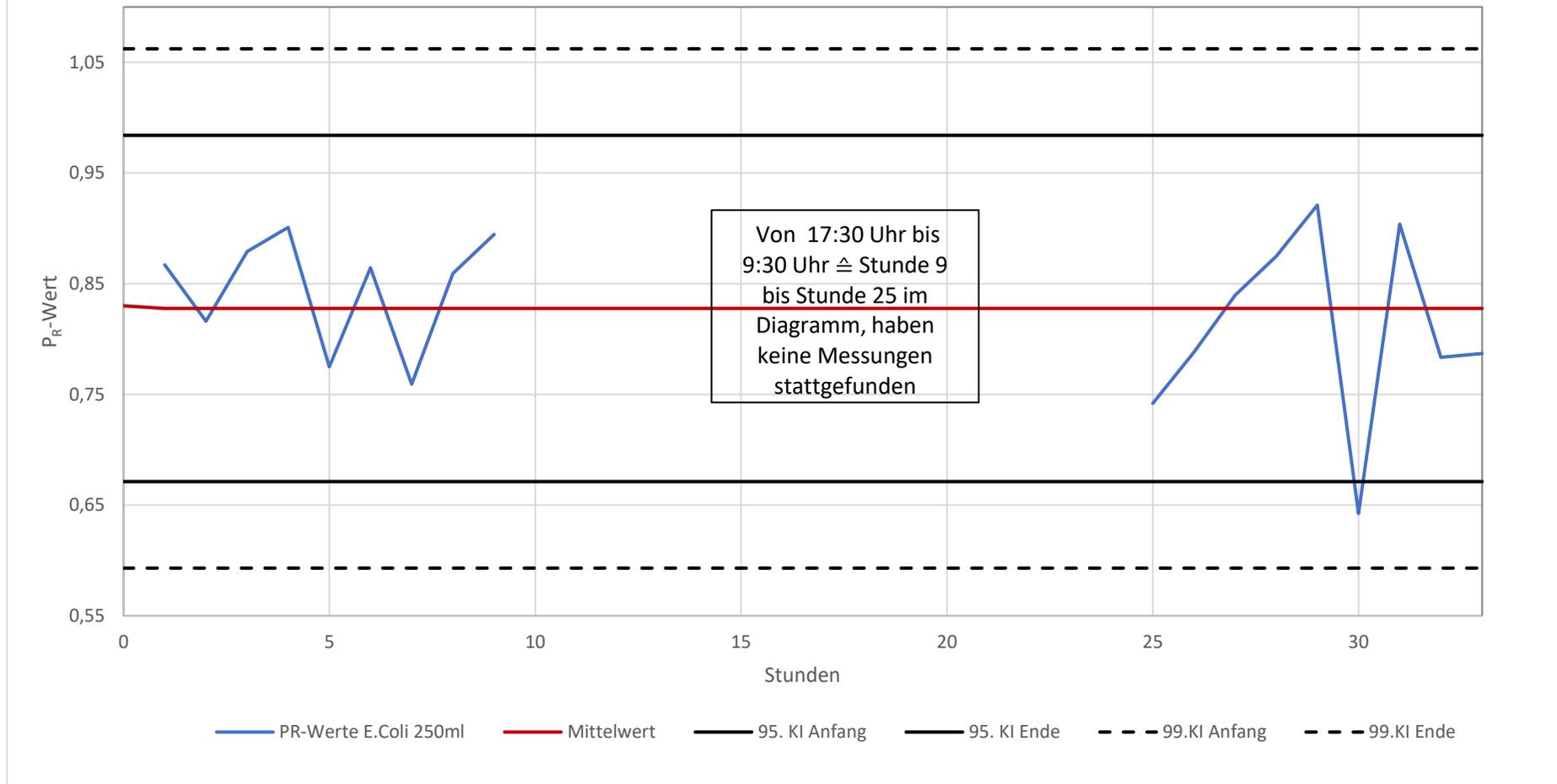
	Ergebnis von Prüfung Nummer (<i>i</i>) VRBL 250 ml Flasche I bis Flasche III <i>E.Coli</i>								
<i>i</i> =	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Referenz	133	145	124	131	151	150	162	135	136
KBE (Prüfagar-xi)	115	118	109	118	117	130	123	116	122
<i>r_i</i>	0,87	0,82	0,88	0,90	0,77	0,86	0,76	0,86	0,89
$ r_i - r_{i-1} $		0,05	0,06	0,02	0,13	0,09	0,11	0,10	0,04
<i>i</i> =	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Referenz	142	129	131	136	135	165	142	157	144
KBE (Prüfagar-xi)	105	102	110	119	124	106	128	123	113
<i>r_i</i>	0,74	0,79	0,84	0,88	0,92	0,64	0,90	0,78	0,79
$ r_i - r_{i-1} $	0,15	0,05	0,05	0,04	0,05	0,28	0,26	0,12	0,00

AA- Tabelle 45: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von *E.Coli* für VRBL 250 ml beschreiben.

Tabelle AA-45 gibt Auskunft über die aus dem Produktivitätsverhältnis entstehenden P_R -Werte des Zielkeims *E.Coli*, für den zu testenden VRBL Agar. Innerhalb des ersten Versuchstages liegt die Produktivitätsspann zwischen ca. 80% und 90%. Die Ergebnisse des zweiten Versuchstags liegen bei einer Produktivität zwischen 65% und 90% weiter auseinander und zeigen, dass sich die Produktivität bei einigen der stündlich durchgeführten Messungen unwesentlich verringert hat. Den vorliegenden Produktivitätswerten zu urteilen lässt sich ein sicherer Produktivitätsnachweis bestätigen, der ebenso für nachfolgende Zielkeime gültig ist. Die für diese Arbeit aufgestellte Hypothese kann für VRBL ausnahmslos angenommen werden.

Die in nachstehender Abbildung AA-37 vorgestellte Regelkarte des Zielkeims *E.Coli* verdeutlicht die von Messung $i=1$ bis $i=9$ näher um den mittleren P_R -Wert liegende Werte von *E.Coli*. Die für Messung $i=10$ bis $i=18$ aufgeführten Werte haben einen deutlich größeren Abstand zum mittleren P_R -Wert, was auf die teilweise niedriger liegenden P_R -Werte des zweiten Versuchstags zurückzuführen ist.

Standzeiten VRBL 250 ml *E.Coli*



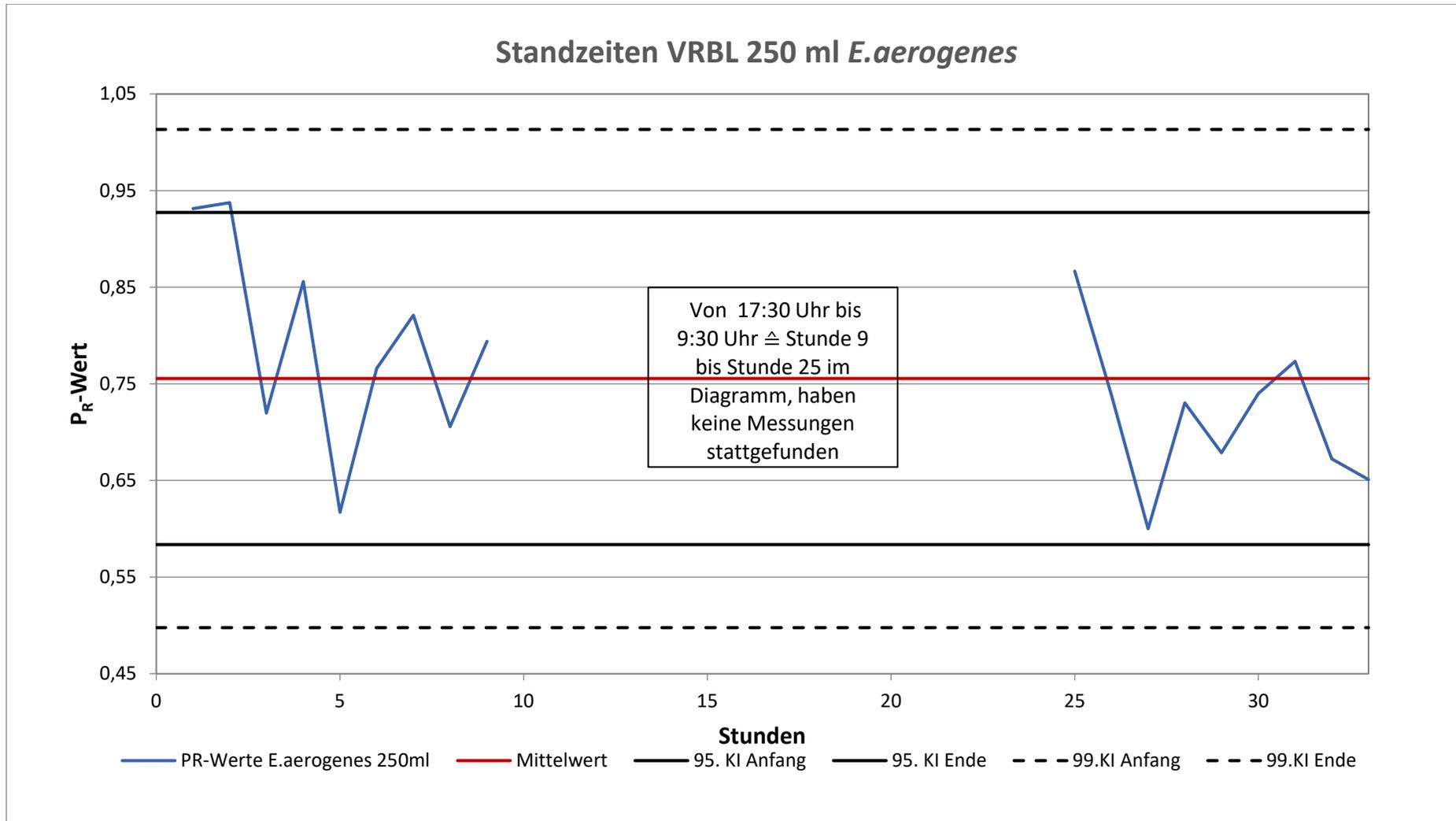
AA- Abbildung 37: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *E.Coli* auf VRBL 250 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBL 250 ml Flasche I bis Flasche III <i>E.aerogenes</i>									
<i>i</i> =	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Referenz	102	112	119	104	121	114	95	120	102
KBE (Prüfagar-xi)	95	105	86	89	75	87	78	85	81
<i>r_i</i>	0,93	0,94	0,72	0,86	0,62	0,77	0,82	0,71	0,79
$ r_i - r_{i-1} $		0,01	0,22	0,14	0,24	0,15	0,05	0,12	0,09
<i>i</i> =	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Referenz	105	116	130	136	111	109	100	117	105
KBE (Prüfagar-xi)	91	86	78	99	75	81	77	79	68
<i>r_i</i>	0,87	0,74	0,60	0,73	0,68	0,74	0,77	0,67	0,65
$ r_i - r_{i-1} $	0,07	0,13	0,14	0,13	0,05	0,06	0,03	0,10	0,02

AA- Tabelle 46: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von *E.aerogenes* für VRBL 250 ml beschreiben.

Tabelle AA-46 verweist auf die Standzeitenkontrolle von VRBL Agar, der anhand des Zielkeims *E.aerogenes* überprüft wurde. Es ist ersichtlich, dass weder aus den resultierenden Ergebnissen des ersten noch den Ergebnissen des zweiten Versuchstags auffällig niedrige oder gar unzureichende Produktivitätswerte hervorgehen. Der Produktivitätsverlauf ist beispielhaft anzusehen.

Mit Hilfe der Regelkarte aus Abbildung AA-38 lässt sich die Bestätigung der Hypothese einwandfrei argumentieren. Nach einem Produktivitätsabfall von ca. 20% nach den ersten stündlichen Messungen pendelt sich der P_R -Wert über beide Versuchstage gleichmäßig um den mittleren P_R -Wert herum ein ohne große Schwankungen zu unterliegen.



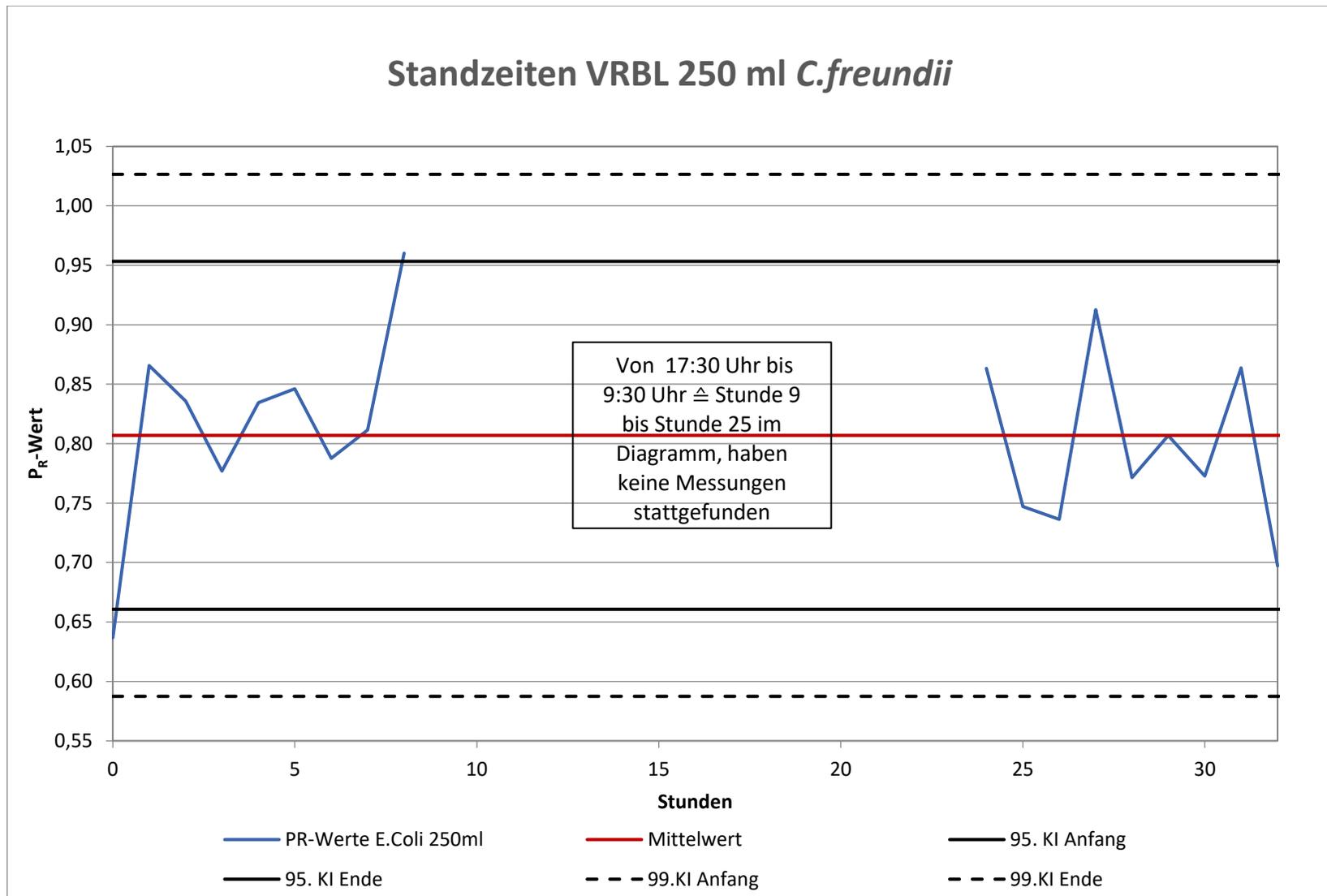
AA- Abbildung 38: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *E.aerogenes* auf VRBL 250 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) VRBL 250 ml Flasche I bis Flasche III <i>C.freundii</i>									
<i>i</i> =	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Referenz	145	124	140	148	145	143	168	152	134
KBE (Prüfagar-xi)	92	107	117	115	121	121	132	123	129
<i>r_i</i>	0,64	0,87	0,84	0,78	0,83	0,85	0,79	0,81	0,96
$ r_i - r_{i-1} $		0,23	0,03	0,06	0,06	0,01	0,06	0,02	0,15
<i>i</i> =	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Referenz	95	112	115	103	105	107	113	110	120
KBE (Prüfagar-xi)	82	84	85	94	81	86	87	95	84
<i>r_i</i>	0,86	0,75	0,74	0,91	0,77	0,81	0,77	0,86	0,70
$ r_i - r_{i-1} $	0,10	0,12	0,01	0,18	0,14	0,04	0,03	0,09	0,17

AA- Tabelle 47: 18 hintereinander durchgeführte Standzeiten-Überprüfungen für die Routinearbeit, die das Produktivitätsverhältnis von *C.freundii* für VRBL 250 ml beschreiben.

Die für den Zielkeim *C.freundii* zustande gekommenen Ergebnisse unterscheiden sich geringfügig von den zwei anderen für VRBL Agar überprüften Zielkeimen *E.Coli* und *E.aerogenes*. Die Bereiche, in denen sich die Produktivitätswerte befinden liegen beim ersten Versuchstag zwischen ca. 65% und 95% und beim Zweiten Versuchstag zwischen 70% und 90%.

Nach einem steilen Produktivitätsanstieg finden sich die Produktivitätswerte von *C.freundii* gleichmäßig um den mittleren P_R -Wert ein, der sich bei 81% befindet.



AA- Abbildung 39: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *S.enterica* auf VRBL 250 ml, Routinebegleitende Standzeiten-Überprüfung über max. 34 h

Ergebnisse zu den Aufschmelzprozessen YGC

YGC Aufschmelzmethode 1 gemäß DIN EN ISO 11133

Untersuchung des Aufschmelzprozesses der Agar-Flaschen während sich das WB auf 95°C erhitzt

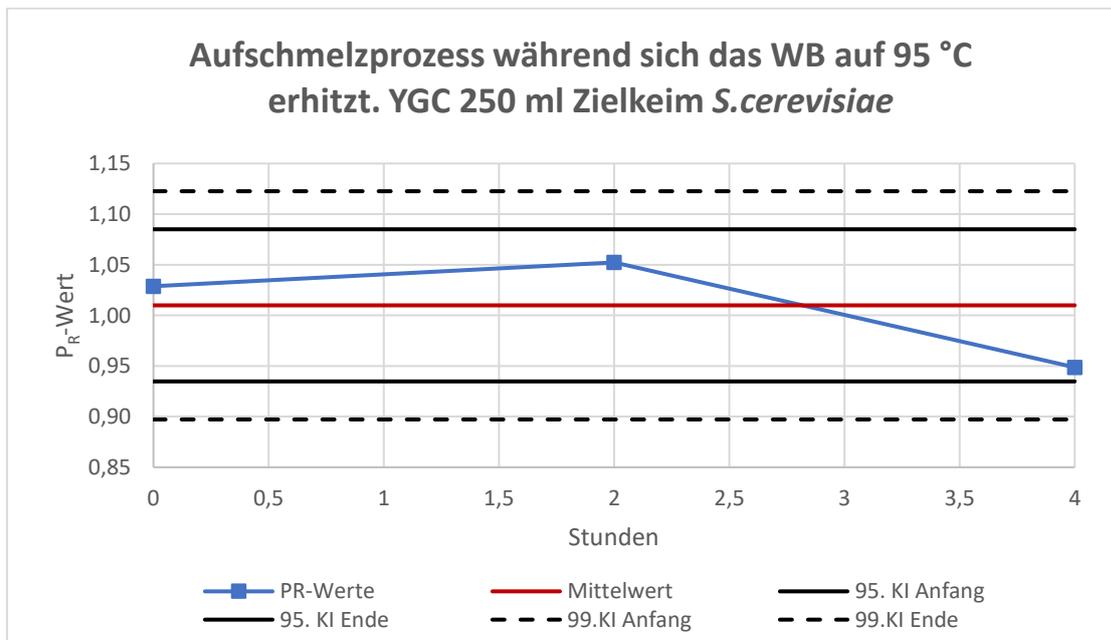
Für alle verwendeten Zielkeime lässt sich vorwegnehmen, dass keiner die erforderliche Produktivität von 50% während dieser Aufschmelzmethode unterschreitet.

250 ml YGC Agar-Flaschen

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) YGC 250 ml Flasche I-III <i>S.cerevisiae</i>				
$i=$	t_0	t_1	t_2	
Referenz	58	51	52	
KBE (Prüfagar-xi)	60	54	49	
r_i	1,03	1,05	0,95	
$ r_i - r_{i-1} $		0,02	0,10	

AA- Tabelle 48: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses YGC 250 ml *S.cerevisiae* während der Erwärmung des WB auf 95 °C

Tabelle AA-48 zeigt auf, dass *S.cerevisiae* innerhalb von 4 Stunden keine bedeutenden P_R -Wertschwankungen aufweist. Die Produktivität sinkt lediglich nach 2 Stunden Richtung 90% ab und unterschreitet den mittleren P_R -Wert erst bei ca. 3 Stunden. In nachstehender Abbildung AA-40 sind die Vorgänge in Form der Regelkarte für *S.cerevisiae* graphisch abgebildet.



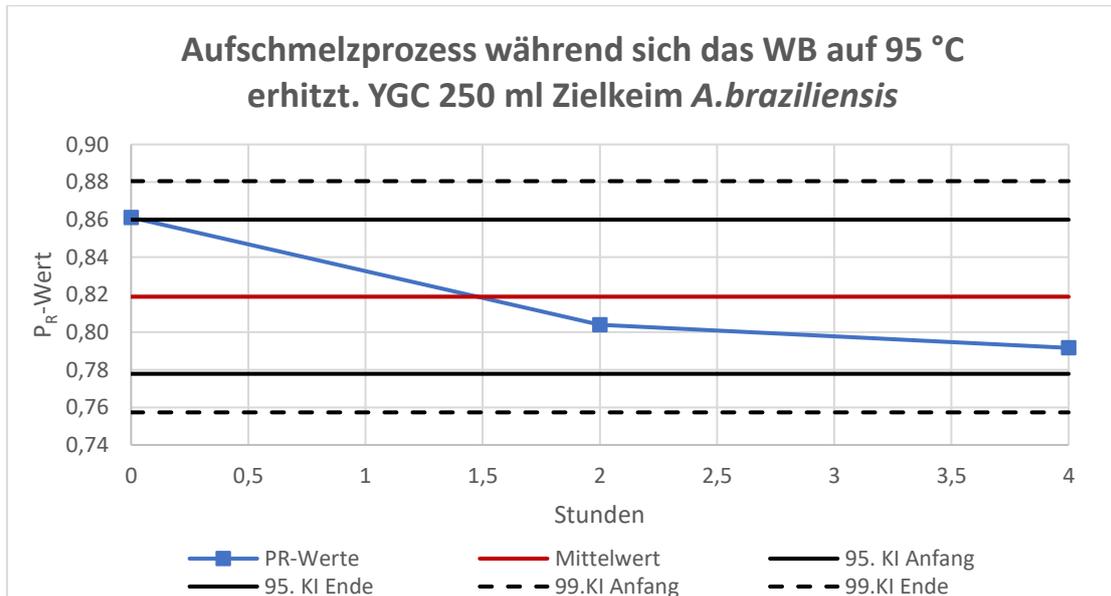
AA- Abbildung 40: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *S.cerevisiae* auf YGC 250 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C

Der Zielkeim *A.braziliensis*, ist im Gegensatz zu der einfachen Backhefe *S.cerevisiae* etwas sensibler in Bezug auf die Produktivität einzustufen. Die Produktivität liegt nur zwischen 80% und 85%, wobei ein geringere Produktivitätsabfall von ca. 5 % innerhalb der 4 Stunden als positiv zu vermerken ist. Der Gesamtabfall von *S.cerevisiae* liegt um das Doppelte, wobei die generell höher liegende Produktivität des Zielkeims diese Feststellung ausgleicht.

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) YGC 250 ml Flasche I-III <i>A.braziliensis</i>			
$i=$	t_0	t_1	t_2
Referenz	108	119	96
KBE (Prüfagar-xi)	93	96	76
r_i	0,86	0,80	0,79
$ r_i - r_{i-1} $		0,06	0,01

AA- Tabelle 49: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses YGC 250 ml *A.braziliensis* während der Erwärmung des WB auf 95 °C

Abbildung AA-41 stellt die Regelkarte des Zielkeims *A.braziliensis* dar. Der Produktivitätsabfall hat eine geringe Steigung und verläuft kontinuierlich. Der mittlere P_R -Wert wird bereits vor der zweiten Messung bei 2 Stunden unterschritten.

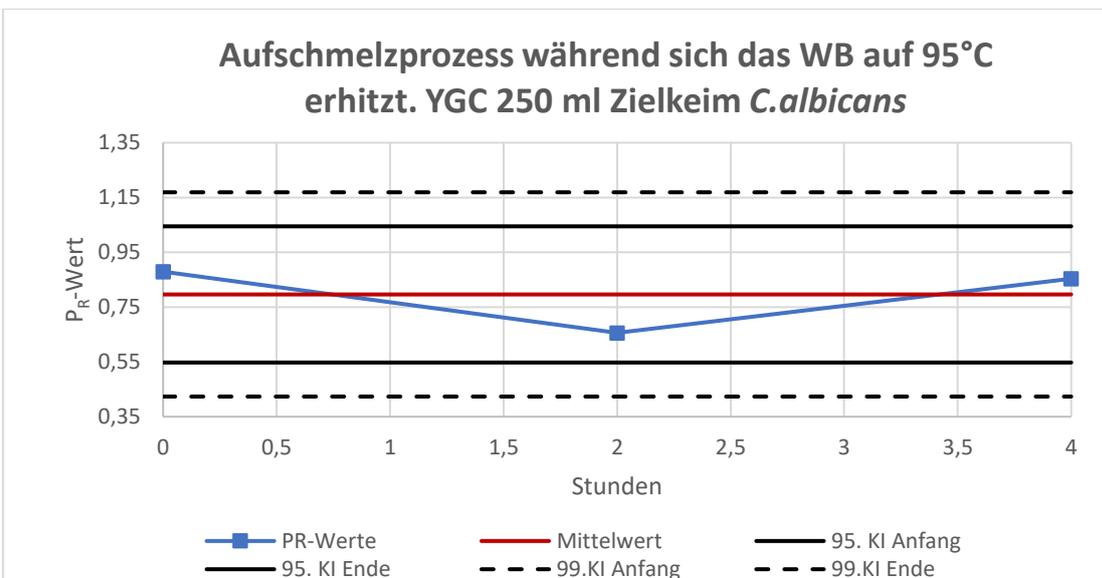


AA- Abbildung 41: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *A.braziliensis* auf YGC 250 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C

Ergebnis von Prüfung Nummer (j) YGC 250 ml Flasche I-III <i>C.albicans</i>			
j=	t ₀	t ₁	t ₂
Referenz	58	63	50
KBE (Prüfagar-xi)	51	41	43
r _i	0,88	0,66	0,85
r _i -r _{i-1}		0,22	0,20

AA- Tabelle 50: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses YGC 250 ml *C.albicans* während der Erwärmung des WB auf 95 °C

Tabelle AA-50 beschreibt die P_R-Werte des Zielkeims *C.albicans* für einen Untersuchungszeitraum von 4 Stunden für YGC-Agar. Die Werte liegen zwischen ca. 65% und 90% und weisen die größte Spanne, in der sich die Produktivitätswerte für diese Aufschmelzmethode befinden auf. Die P_R-Werte orientieren sich sehr stark an dem mittleren P_R-Wert, wodurch sie während der gesamten Untersuchung ober- und unterhalb dieser Grenze angeordnet sind (siehe Abbildung AA-42).

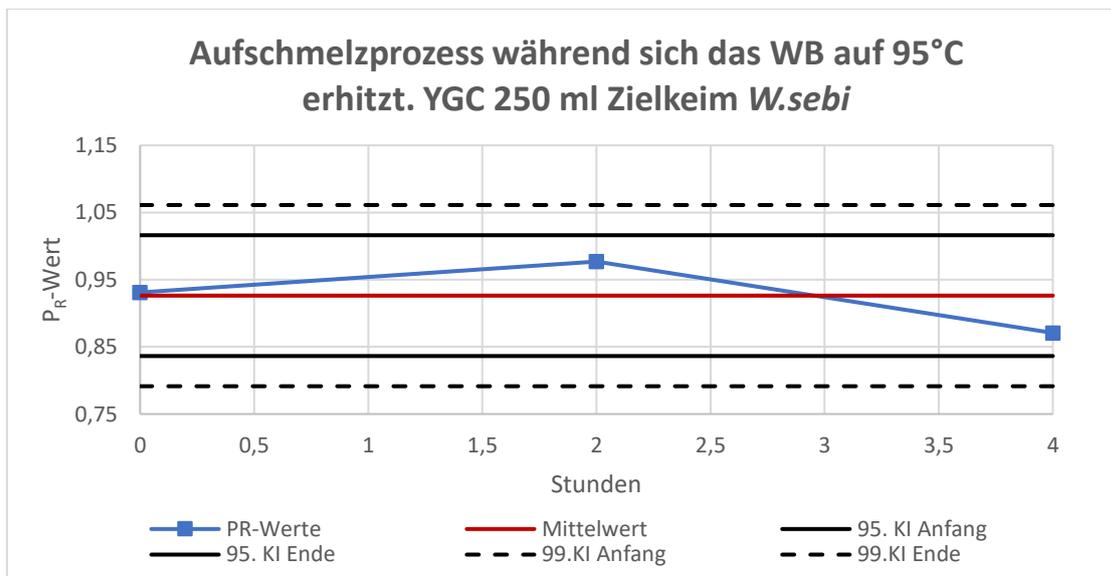


AA- Abbildung 42: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *C.albicans* auf YGC 250 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) YGC 250 ml Flasche I-III <i>W.sebi</i>			
$i=$	t_0	t_1	t_2
Referenz	87	87	80
KBE (Prüfagar-xi)	81	85	70
r_i	0,93	0,98	0,87
$ r_i - r_{i-1} $		0,05	0,11

AA- Tabelle 51: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses YGC 250 ml *W.sebi* während der Erwärmung des WB auf 95 °C

Die Daten, die in Tabelle AA-51 erscheinen zeigen den Produktivitätsverlauf von *W.sebi* auf 250 ml YGC Agar. Die gemessenen P_R -Werte über 4 Stunden liegen in einem ähnlichen Abstand wie bei dem Zielkeims *S.cerevisiae*. So fällt der P_R -Wert bei beiden bei ca. 3 Stunden unter den Bereich des mittleren P_R -Wertes. Die Anordnung um den mittleren P_R -Wert herum ähnelt ebenso dem Zielkeim *C.albicans*.



AA- Abbildung 43: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *W.sebi* auf YGC 250 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C

YGC Aufschmelzmethode 2 (abweichend von DIN EN ISO 11133)

Untersuchung des Aufschmelzprozesses der Agar-Flaschen bei der Temperatur von 95°C (WB ist bereits auf t_{max} erhitzt)

Die Ergebnisse der Untersuchung zeigen in zwei Fällen höhere Produktivität auf, als die Methode die Agar-Flaschen direkt während der Erwärmung im Wasserbad zu platzieren und aufzuschmelzen. Es handelt sich um die Zielkeime *A.braziliensis* und *C.albicans*, die jeweils höhere P_R -Werte

bei vorliegender Untersuchung als bei der nach Routinebedingungen durchgeführten Aufschmelz-
methode haben. *W.sebi* weist bei beiden Aufschmelzmethoden denselben Produktivitätsbereich
von 90% bis 100% auf. Die Produktivität der Backhefe *S.cerevisiae* nimmt bei vorliegender Unter-
suchung leicht ab. Es kann in Erwägung gezogen werden den Aufschmelzprozess umzustellen, da-
mit *A.braziliensis* und *C.albicans* leistungsfähiger auftreten.

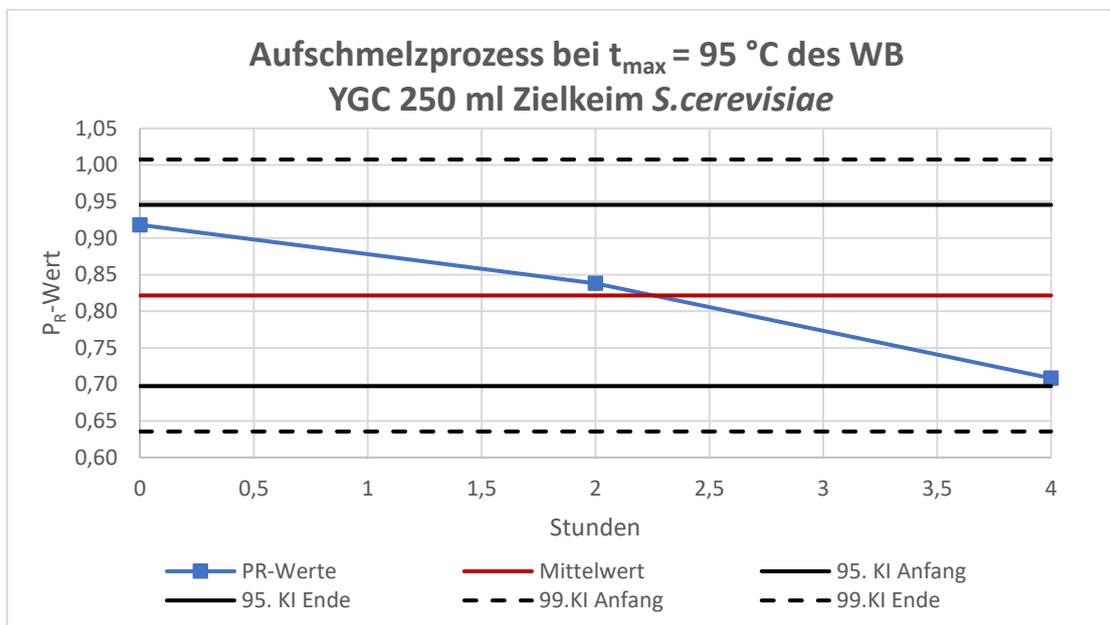
250ml YGC Agar-Flaschen

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) YGC 250 ml <i>S.cerevisiae</i>			
$i=$	t_0	t_1	t_2
Referenz	61	70	72
KBE (Prüfagar-xi)	56	59	51
r_i	0,92	0,84	0,71
$ r_i - r_{i-1} $		0,08	0,13

AA- Tabelle 52: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses YGC 250 ml *S.cerevisiae* während $t_{max}=95$
°C

Tabelle AA-52 beschreibt die Produktivität von *S.cerevisiae* während des Aufschmelzens bei 95 °C
auf 250 ml YGC-Agar. Der Zielkeim erfährt eine kontinuierliche Produktivitätsabnahme innerhalb
der Spanne der P_R -Werte, die zwischen 0,7 und 09 liegt.

Der mittlere P_R -Wert wird kurz nach der Messung nach 2 Stunden unterschritten.

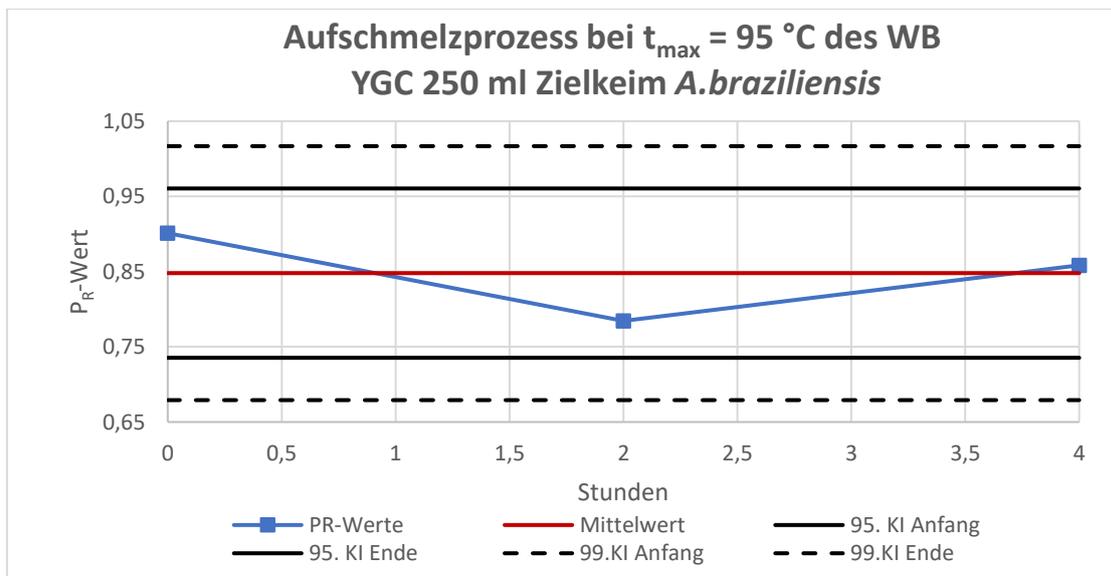


AA- Abbildung 44: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *S.cerevisiae* auf YGC 250 ml, Aufschmelzprozess während
 $t_{max}=95$ °C

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) YGC 250 ml <i>A.braziliensis</i>			
$i=$	t_0	t_1	t_2
Referenz	91	116	120
KBE (Prüfagar-xi)	87	99	106
r_i	0,96	0,86	0,89
$ r_i - r_{i-1} $		0,10	0,03

AA- Tabelle 53: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses YGC 250 ml *A.braziliensis* während $t_{max}=95^\circ\text{C}$

Tabelle AA-53 stellt den Zielkeim *A.braziliensis* und dessen Produktivitätswerte dar. Es ist ersichtlich, dass die P_R -Werte in einem Bereich zwischen ca.90% und 95% auftreten, was im Gegensatz zu der ersten Aufschmelzmethode deutlich besser einzustufen ist. Die nachstehende Abbildung AA-45 stellt die Anordnung der P_R -Werte um den mittleren P_R -Wert während der gesamten Untersuchung dar.

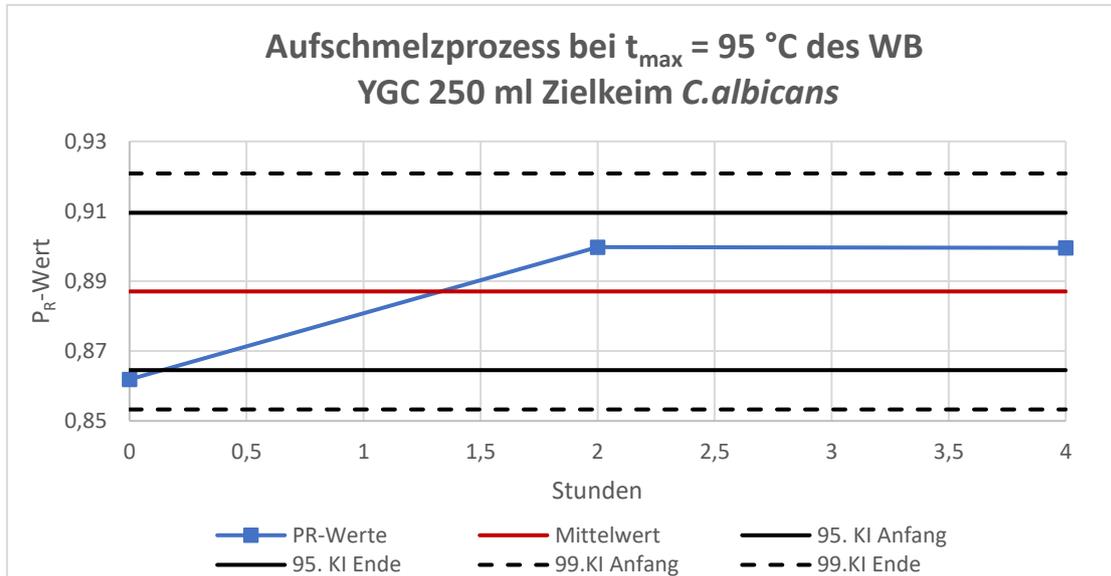


AA- Abbildung 45: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *A.braziliensis* auf YGC 250 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95^\circ\text{C}$

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) YGC 250 ml <i>C.albicans</i>			
$i=$	t_0	t_1	t_2
Referenz	251	266	282
KBE (Prüfagar-xi)	216	239	254
r_i	0,86	0,90	0,90
$ r_i - r_{i-1} $		0,04	0,00

AA- Tabelle 54: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses YGC 250 ml *C.albicans* während $t_{max}=95^\circ\text{C}$

Der Zielkeim *C.albicans* weist ebenso wie *A.braziliensis* eine verbesserte Produktivitätsexposition als bei der im Ergebnisteil auftretenden Aufschmelzmethode.auf. Die Daten liegen zahlentech- nisch mit einem Leistungsbereich von 85% bis 90% näher beieinander. In der Abbildung AA-46 stellt sich ab der Messung 2 Stunden ein nahezu konstant bleibender Leistungsbereich ein.



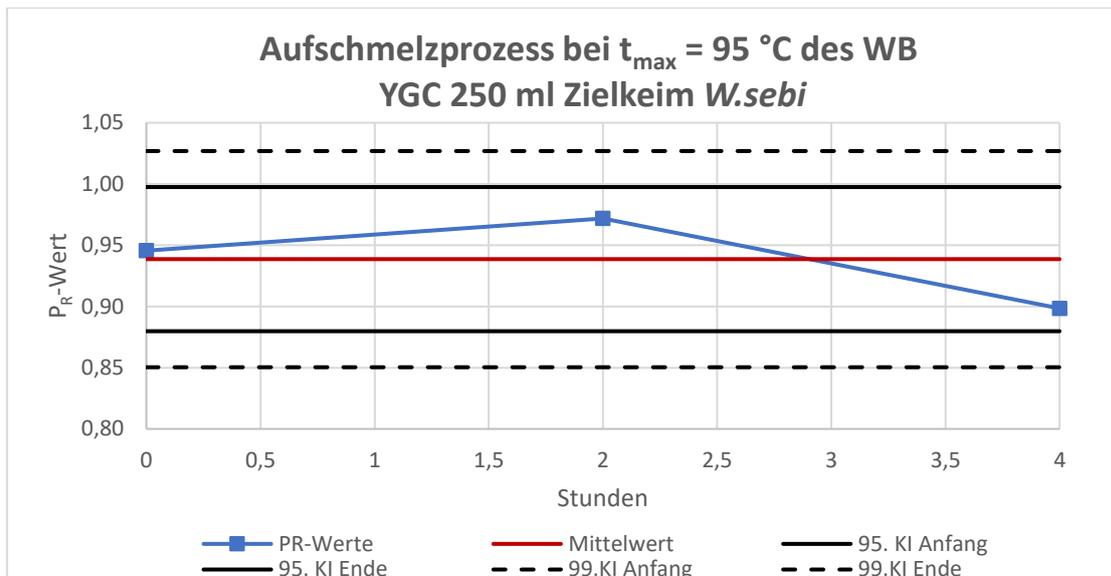
AA- Abbildung 46: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *C.albicans* auf YGC 250 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95^{\circ}C$

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) YGC 250 ml <i>W.sebi</i>				
$i=$	t_0	t_1	t_2	
Referenz		141	142	174
KBE (Prüfagar-xi)		133	138	156
r_i		0,95	0,97	0,90
$ r_i - r_{i-1} $			0,02	0,07

AA- Tabelle 55: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses YGC 250 ml *W.sebi* während $t_{max}=95^{\circ}C$

Die Produktivität von *W.sebi* liegt zwischen ca. 90% und 100%, für diese Art des Aufschmelzens. Diese Ergebnisse sind bezüglich des Produktivitätsbereiches des Zielkeims *W.sebi* identisch mit der im Ergebnisteil vorkommenden Aufschmelzmethode.

Die nachfolgende Regelkarte der zugehörigen Abbildung AA-47 beschreibt die Anordnung der P_R -Werte von *W.sebi* um den mittleren P_R -Wert herum, der sich bei 0,94 befindet.



AA- Abbildung 47: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *W.sebi* auf YGC 250 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95^{\circ}C$

YGC Aufschmelzmethode 3 (abweichend von DIN EN ISO 11133)

Untersuchung die Agar-Flaschen über den Aufschmelzprozess hinaus im WB stehen lassen

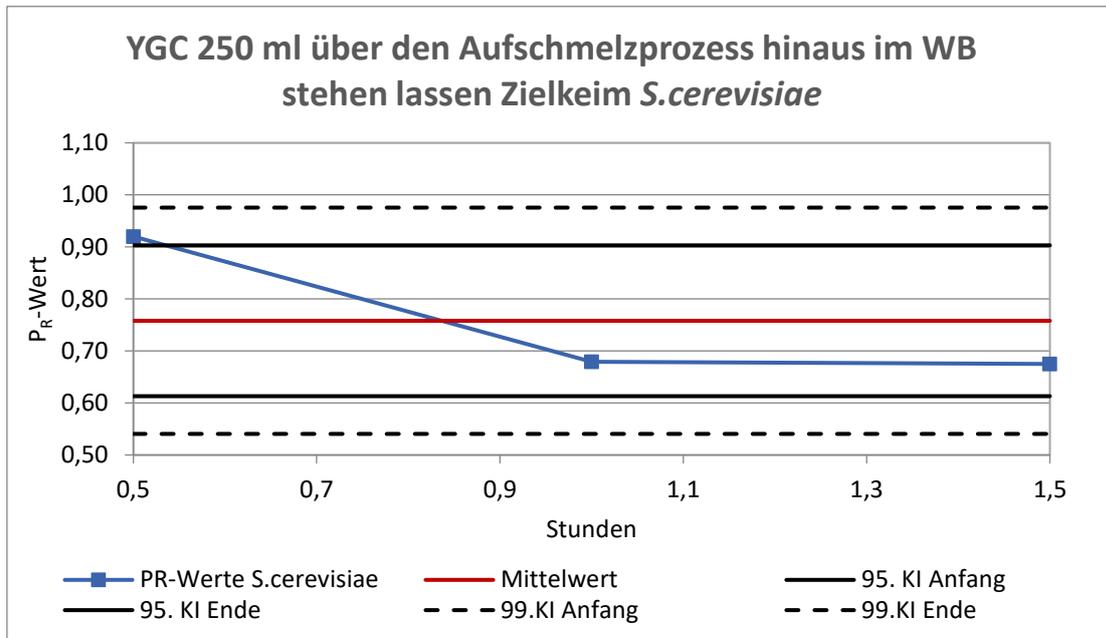
Die YGC-Agar-Flaschen nach dem Aufschmelzprozess für eine längere Zeit im Wasserbad bei 95 °C weiter kochen zu lassen hat keinen der vier Zielkeime unter die Grenze des PR-Wert <0,5 sinken lassen, was eine erhebliche Produktivitätsbeeinträchtigung durch das längere Kochen von bereits aufgeschmolzenen Agar-Flaschen ausschließen lässt. *A.braziliensis* sowie *C.albicans* wiesen keinen sichtbaren Produktivitätsabfall auf. Die P_R -Werte lagen für *A.braziliensis* im Bereich zwischen $P_R=0,9$ und $P_R=1,0$ und für *C.albicans* im Bereich zwischen $P_R=0,70$ und $P_R=0,90$. *W.sebi* zeigte einen geradezu linearen Produktivitätsabfalls im Bereich von $P_R=0,85$ auf $P_R=0,65$. *S.cerevisiae* stellte einen beginnenden Produktivitätsrückgang von $P_R=0,90$ auf $P_R=0,68$ dar, der bis zum Ende der Messung nicht weiter sank, vielmehr konstant über dem mittleren P_R -Wert der Regelkarte verlief.

250 YGC ml Agar-Flaschen

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) YGC 250 ml <i>S.cerevisiae</i>			
$i=$	t_0	t_1	t_2
Referenz	50	81	120
KBE (Prüfagar-xi)	46	55	81
r_i	0,92	0,68	0,68
$ r_i-r_i-1 $		0,24	0,00

AA- Tabelle 56: Aufeinanderfolgende Überprüfungen bei Überschreitung des Aufschmelzprozesses YGC 250 ml *S.cerevisiae*

Die Untersuchung YGC nach dem Aufschmelzprozess bis zu 1,5 Stunden weiter kochen zu lassen beeinflusst den Zielkeim *S.cerevisiae* erst nach einer Stunde (siehe Tabelle AA-56), wobei der P_R -Wert von 0,92 auf 0,68 sank und über den restlichen Versuchszeitraum konstant geblieben ist. Die Abbildung AA-48 zeigt die zu *S.cerevisiae* zugehörige Regelkarte und verdeutlicht den Produktivitätsabfall zwischen Messung nach 0,5 Stunde und 1,0 Stunden.



AA- Abbildung 48: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *S.cerevisiae* auf YGC 250 ml, Überschreitung des Aufschmelzprozesses

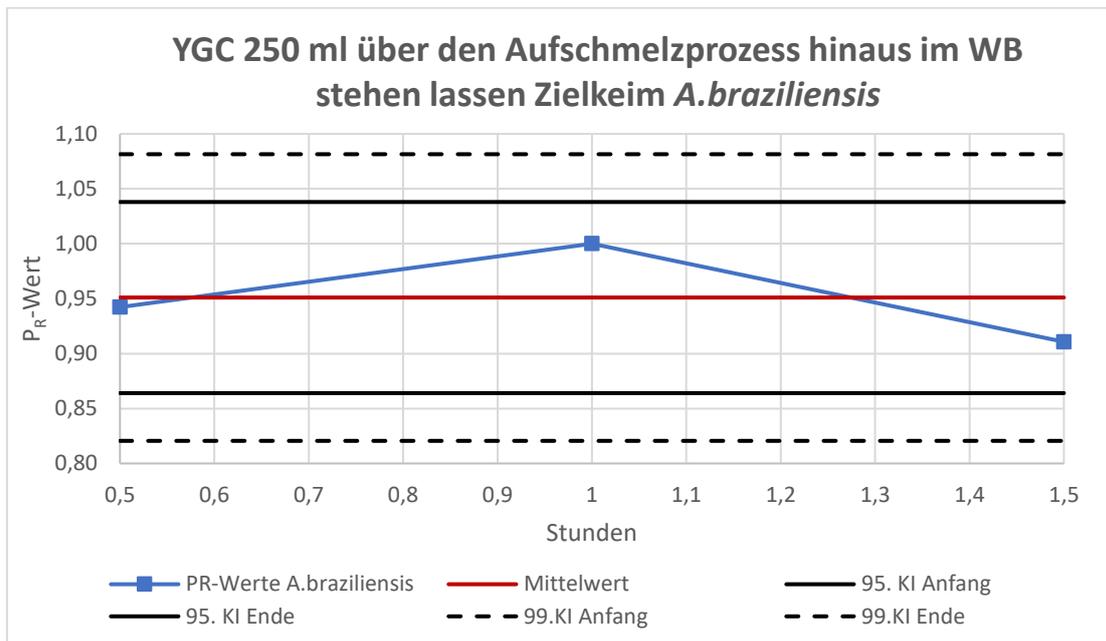
Ergebnis von Prüfung Nummer (i) YGC 250 ml <i>A.braziliensis</i>				
$i=$	t_0	t_1	t_2	
Referenz		52	47	56
KBE (Prüfagar-xi)		49	47	51
r_i		0,94	1,00	0,91
$ r_i - r_{i-1} $			0,06	0,09

AA- Tabelle 57: Aufeinanderfolgende Überprüfungen bei Überschreitung des Aufschmelzprozesses YGC 250 ml *A.braziliensis*

Tabelle AA-57 stellt die Werte des Produktivitätsbereiches des Zielkeims *A.braziliensis* dar. Es werden während des Untersuchungszeitraumes keine auffälligen Werte festgestellt. Alle P_R -Werte finden sich in einem kleinen Produktivitätsbereich wieder.

Die Regelkarte des Zielkeims *A.braziliensis* hat anders als der Zielkeim *S.cerevisiae* keinen eindeutigen Produktivitätsabfall. Vielmehr ordnen sich die P_R -Werte der Messung um den mittleren P_R -

Wert herum an, die eine Produktivität von 90% bis 100% aufweisen und so nicht von der Überschreitung des Aufschmelzprozesses beeinflusst werden.

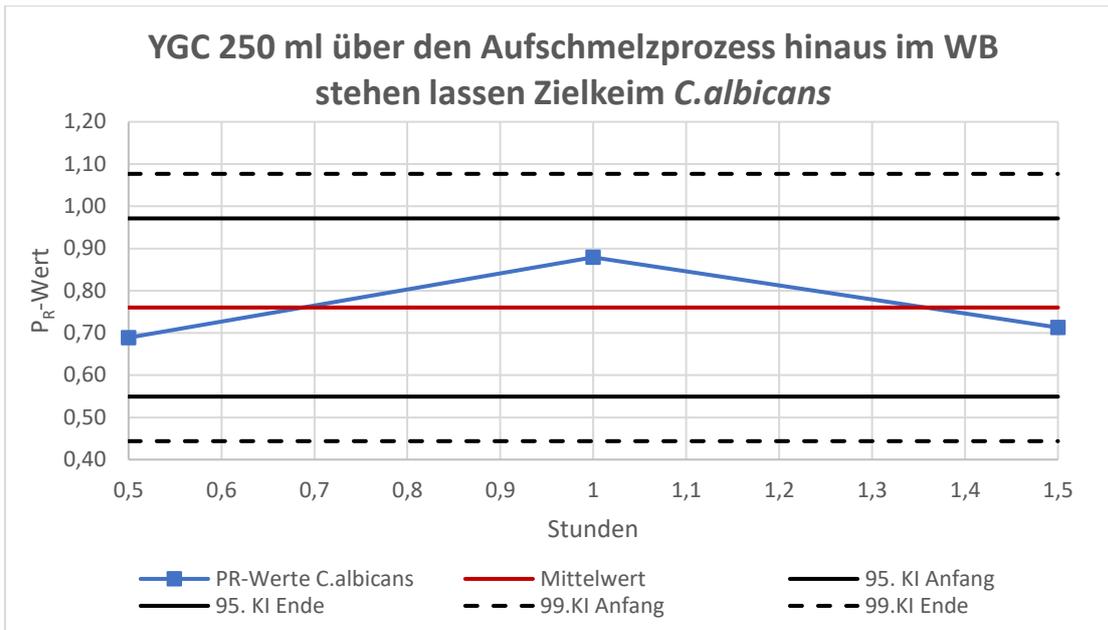


AA- Abbildung 49: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *A. braziliensis* auf YGC 250 ml, Überschreitung des Aufschmelzprozesses

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) YGC 250 ml <i>C. albicans</i>			
i=	t ₀	t ₁	t ₂
Referenz	90	91	94
KBE (Prüfagar-xi)	62	80	67
r _i	0,69	0,88	0,71
r _i -r _{i-1}		0,19	0,17

AA- Tabelle 58: Aufeinanderfolgende Überprüfungen bei Überschreitung des Aufschmelzprozesses YGC 250 ml *C. albicans*

C. albicans, dessen Produktivität in Tabelle AA-58 aufgestellt ist, weist ein Produktivitätsbereich auf, der ca. zwischen $P_R=0,70$ und $P_R=0,90$ liegt. Ein eindeutiger Abfall der Produktivität ist wie bei *A. braziliensis* nicht zu erkennen, sodass die Leistung des YGC Agars durch diese Aufschmelzmethode nicht beeinträchtigt wird. Die zugehörige Regelkarte, die Abbildung AA-50 darstellt verweist auf die Aufstellung der drei Messungen, deren Ergebnisse sich um den mittleren P_R -Wert sammeln.

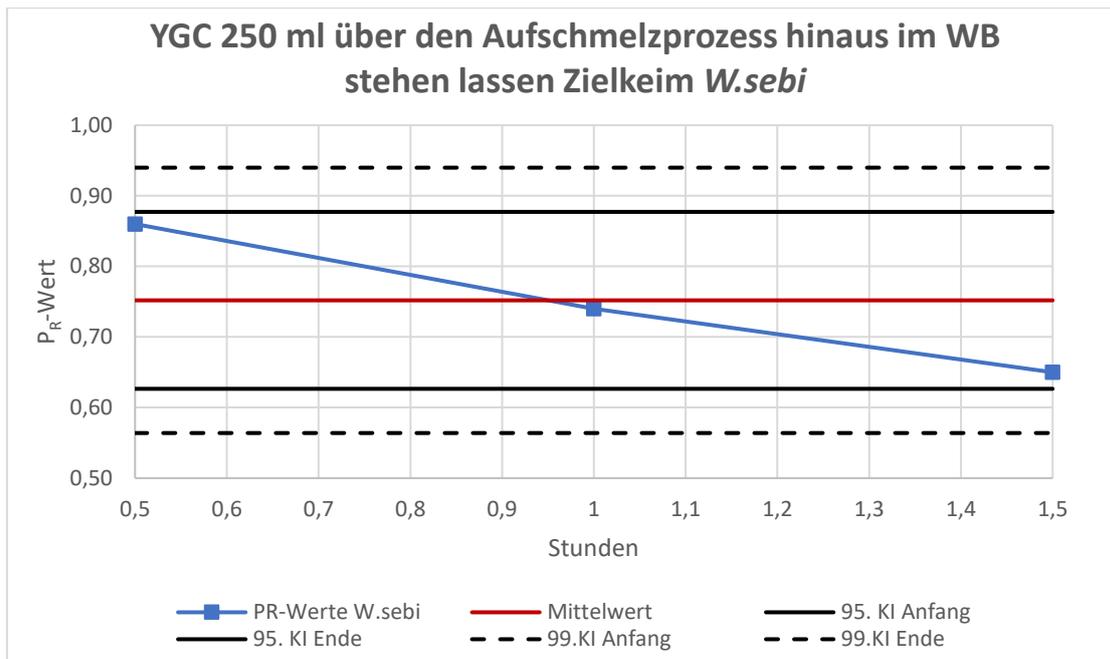


AA- Abbildung 50: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *C.albicans* auf YGC 250 ml, Überschreitung des Aufschmelzprozesses

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) YGC 250 ml <i>W.sebi</i>			
i=	t ₀	t ₁	t ₂
Referenz	87	78	80
KBE (Prüfagar-xi)	75	58	52
r _i	0,86	0,74	0,65
r _i -r _{i-1}		0,12	0,09

AA- Tabelle 59: Aufeinanderfolgende Überprüfungen bei Überschreitung des Aufschmelzprozesses YGC 250 ml *W.sebi*

W.sebi weist als einziger Zielkeim dieser Untersuchung einen konstanten Produktivitätsabfall auf, wie aus Tabelle AA-59 hervorgeht. Demnach ist *W.sebi* für diese Prüfung am wenigsten widerstandsfähig im Gegensatz zu *S.cerevisiae*, *A.braziliensis* und *C.albicans*. Der P_R-Wert unterschreitet bei knapp einer Stunde den mittleren P_R-Wert, wie die Regelkarte aus Abbildung AA-51 verdeutlicht.



AA- Abbildung 51: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *W.sebi* auf YGC 250 ml, Überschreitung des Aufschmelzprozesses

Ergebnisse zu den Aufschmelzprozessen MRS

Die aus AI-5 hervorgehenden erforderlichen P_R -Werte der Zielkeime für MRS-Agar, liegen gemäß DIN EN ISO 11133 in folgenden Bereichen:

P.pentosaceus = $P_R > 0,8$

L.sakei = $P_R > 0,7$

L.lactis = $P_R > 0,7$

MRS Aufschmelzmethode 1 gemäß DIN EN ISO 11133

Untersuchung des Aufschmelzprozesses der Agar-Flaschen während sich das WB auf 95°C erhitzt

Die Zielkeime des MRS-Agars haben einen geringeren Toleranzbereich als die bisher untersuchten Nährmedien bezüglich der erforderlichen P_R -Werte. Dies zeigt sich bereits bei den Ergebnissen des vorliegenden Aufschmelzprozesses.

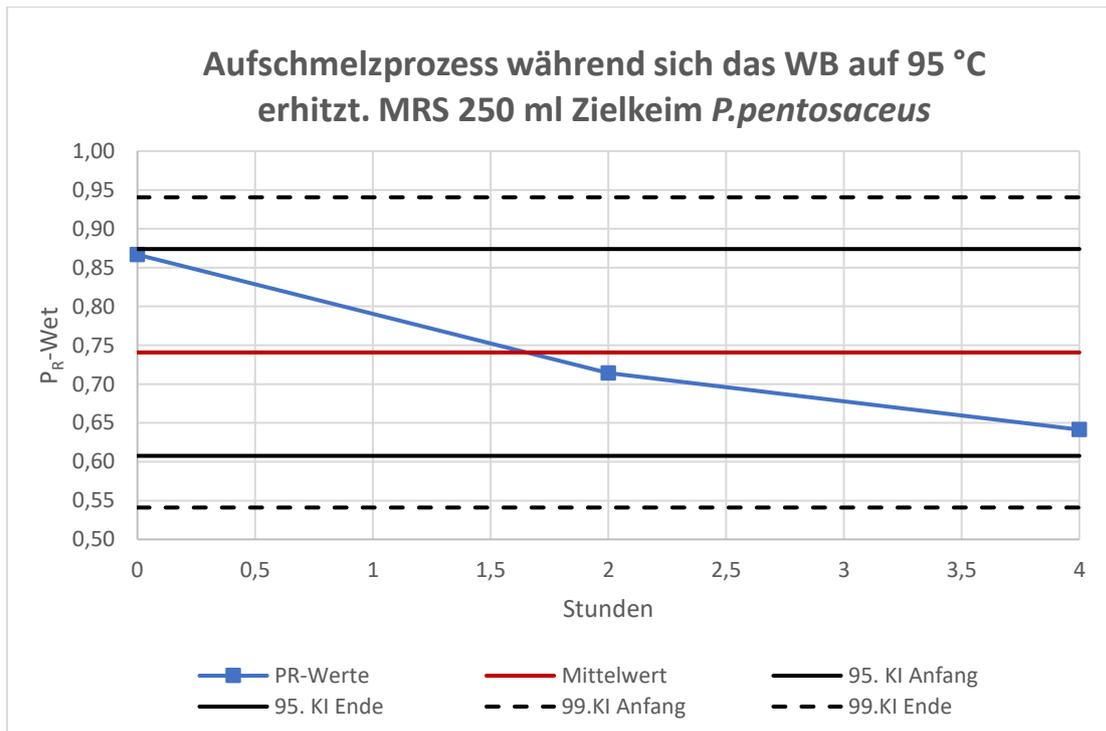
250 ml MRS Agar-Flaschen

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) MRS 250 ml Flasche I-III <i>P.pentosaceus</i>			
<i>i</i> =	t_0	t_1	t_2
Referenz	70	70	79
KBE (Prüfagar-xi)	61	50	51
<i>r_i</i>	0,87	0,71	0,64
$ r_i - r_{i-1} $		0,15	0,07

AA- Tabelle 60: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses MRS 250 ml *P.pentosaceus* während der Erwärmung des WB auf 95 °C

Der Zielkeim *P.pentosaceus* weist in Tabelle AA-60 einen steilen Produktivitätsabfall zwischen t_0 und t_1 auf. Dies sorgt für einen unzureichenden P_R -Wert kurz vor der durchgeführten Messung nach 2 Stunden. Im weiteren Verlauf sinkt der P_R -Wert weiterhin, charakterisiert durch eine etwas abflachender negative Steigung innerhalb des nicht mehr zulässigen P_R -Wertbereichs.

Die Abbildung AA-52 zeigt den graphischen Verlauf des Zielkeims *P.pentosaceus* in der Regelkarte. Es wird deutlich, dass die Produktivität innerhalb einer knappen Stunde, nachdem die aufgeschmolzenen Agar-Flaschen in den Trockenschrank überführt wurden einen P_R -Wert $< 0,8$ besitzt.



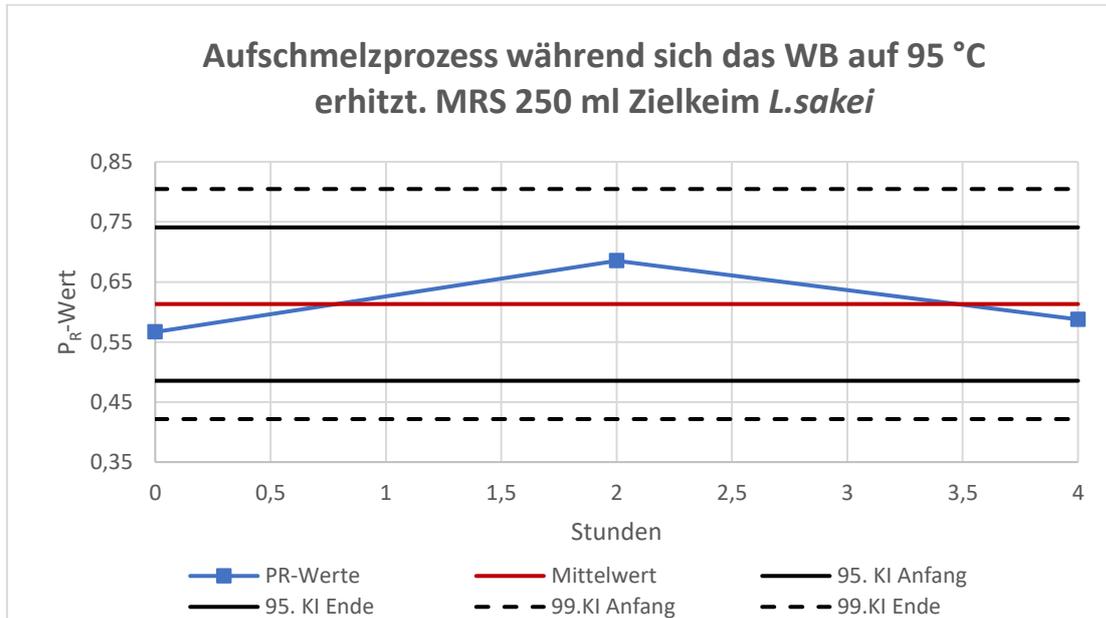
AA- Abbildung 52: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *P.pentosaceus* auf MRS 250 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) MRS 250 ml Flasche I-III <i>L.sakeii</i>			
$i=$	t_0	t_1	t_2
Referenz	110	90	97
KBE (Prüfagar-xi)	62	62	57
r_i	0,57	0,69	0,59
$ r_i - r_{i-1} $		0,12	0,10

AA- Tabelle 61: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses MRS 250 ml *L.sakeii* während der Erwärmung des WB auf 95 °C

Die Ergebnisse der Produktivität für *L.sakeii* fallen für dieses Aufschmelzprozess negativ aus. Alle Messungen befinden sich, wenn auch nur knapp, unterhalb des zulässigen P_R -Wertes von 0,7. Es ist keine konstante Produktivitätsabnahme zu vermerken. Die Werte liegen dicht ober und

unterhalb des mittleren P_R -Wertes (siehe Abbildung AA-53), der sich auch schon deutlich unter P_R 0,7 befindet.



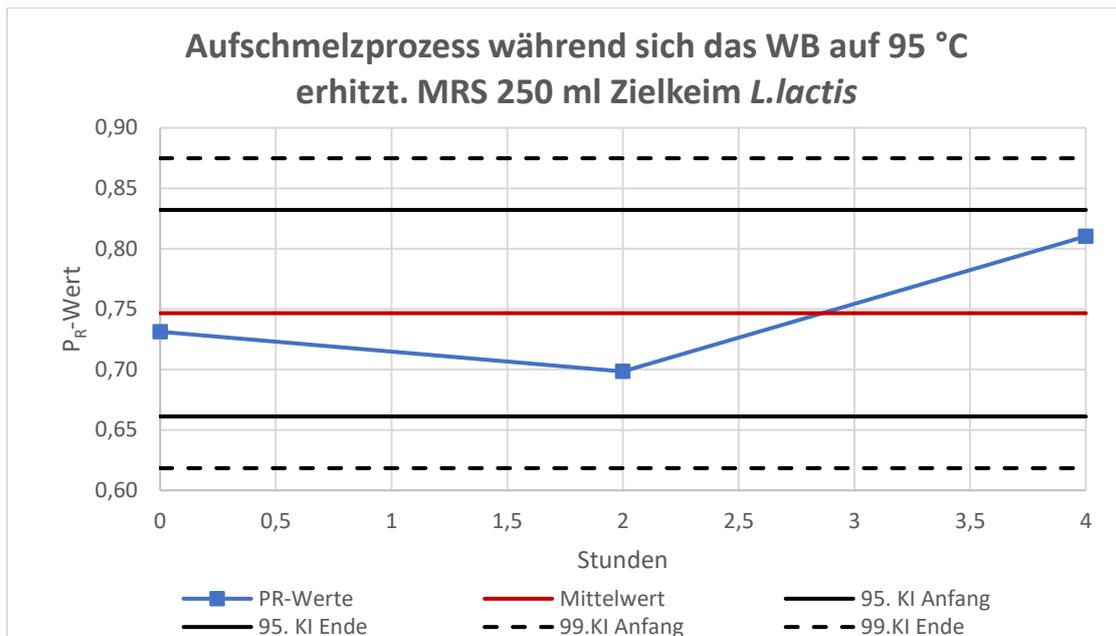
AA- Abbildung 53: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *L.sakei* auf MRS 250 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) MRS 250 ml Flasche I-III <i>L.lactis</i>			
i=	t ₀	t ₁	t ₂
Referenz	62	84	65
KBE (Prüfagar-xi)	45	59	53
r _i	0,73	0,70	0,81
r _i -r _{i-1}		0,03	0,11

AA- Tabelle 62: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses MRS 250 ml *L.lactis* während der Erwärmung des WB auf 95 °C

L.lactis besteht über den Untersuchungszeitraum als einziger Zielkeim von MRS die Produktivitätsprüfung des vorliegenden Aufschmelzprozesses mit den in Tabelle AA-62 aufgeführten Ergebnissen.

Der mittlere P_R -Wert liegt bei 0,75, um den sich die sich aus dem errechneten Produktivitätsverhältnis ergebenden P_R -Werte anordnen (siehe Abbildung AA-54). Demnach liegt kein linearer Produktivitätsabfall, wie zum Beispiel beim Zielkeim *P.pentosaceus* zu beobachten ist vor.



AA- Abbildung 54: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *L.lactis* auf MRS 250 ml, Aufschmelzprozess während der Erwärmung des WB auf 95 °C

MRS Aufschmelzmethode 2 (abweichend von DIN EN ISO 11133)

Untersuchung des Aufschmelzprozesses der Agar-Flaschen bei der Temperatur von 95°C (WB ist bereits auf t_{max} erhitzt)

Die Ergebnisse dieser Aufschmelzmethode ergaben leichte produktivitätssteigernde Merkmale bezüglich der Zielkeime *L.sakei* und *L.Lactis*.

L.sakei unterschreitet $P_R 0,7$ nun erst nach 1,5 Stunden.

L.lactis weist höhere P_R -Werte auf, die deutlich $P_R > 0,7$ liegen.

P.pentosceus zeigt wie bei vorheriger Aufschmelzmethode eine eindeutig mangelhafte Produktivität auf.

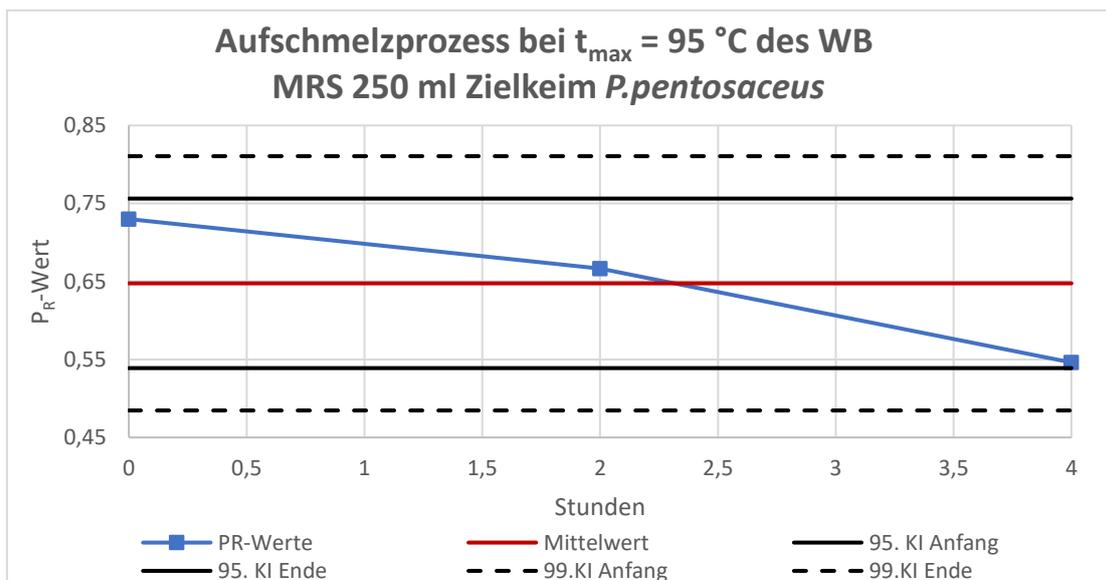
Eine Umstellung des Aufschmelzprozesses würde sich nicht lohnen, da ausschließlich *L.sakei* für einen Zeitraum von 1,5 h davon profitieren würde. Die Zeitspanne, in der der Keim eine hinreichende Produktivität aufweist, ist außerdem sehr klein. *P.pentosaceus* bleibt ohnehin unverändert und *L.lactis* ist bei beiden Methoden stabil, wenn auch bei letzterer Methode leistungsfähiger. Weitere Messungen können hilfreich sein, um die Eindeutigkeit der beiden sich bezüglich der Produktivität verbessernden Zielkeime zu bestätigen.

250 ml MRS Agar-Flaschen

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) MRS 250 ml <i>P.pentosaceus</i>			
$i=$	t_0	t_1	t_2
Referenz	79	82	94
KBE (Prüfagar-xi)	58	55	51
r_i	0,73	0,67	0,55
$ r_i - r_{i-1} $		0,06	0,12

AA- Tabelle 63: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses MRS 250 ml *P.pentosaceus* während $t_{max}=95\text{ °C}$

Die Ergebnisse der Tabelle AA-63 zeigen, dass ein konstanter Produktivitätsabfall für *P.pentosaceus* ebenso vorliegt, wie bei der ersten durchgeführten Aufschmelzmethode im Ergebnisteil. Die Regelkarte auf Abbildung AA-55 zeigt den konstanten Abfall der Produktivität von *P.pentosaceus*, die während der gesamten vier Stunden der Untersuchung im unzulässigen Bereich auftritt.

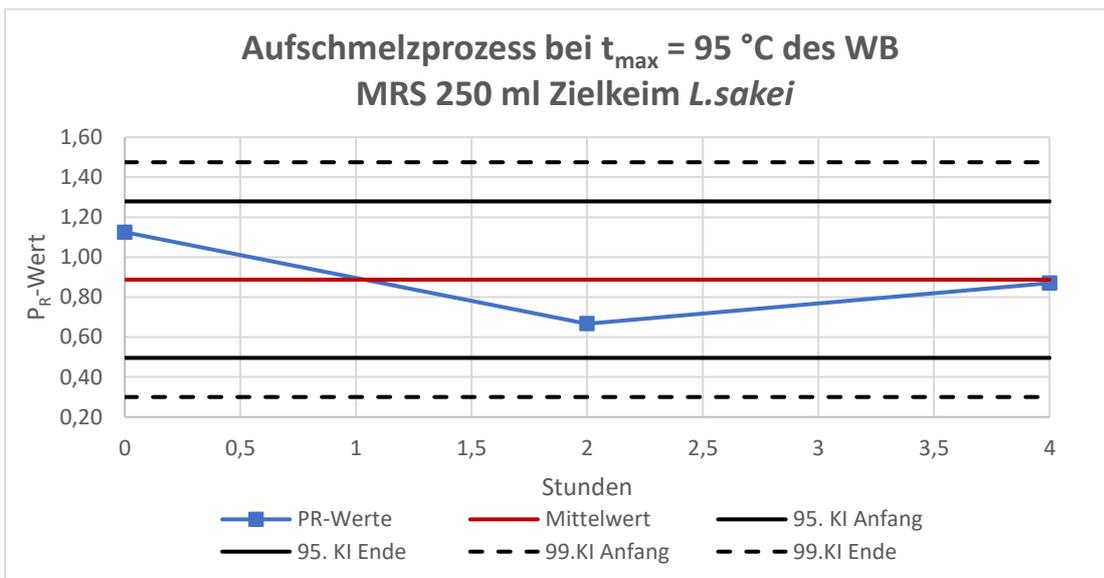


AA- Abbildung 55: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *P.pentosaceus* auf MRS 250 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95\text{ °C}$

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) MRS 250 ml <i>L.sakei</i>			
i=	t ₀	t ₁	t ₂
Referenz	64	109	80
KBE (Prüfagar-xi)	72	73	70
r _i	1,13	0,67	0,87
r _i -r _{i-1}		0,46	0,20

AA- Tabelle 64: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses MRS 250 ml *L.sakei* während t_{max}=95 °C

Die Ergebnisse von *L.sakei* fallen auf den gesamten Untersuchungszeitraum betrachtet positiver aus, als in der ersten Aufschmelzmethode, in der die P_R-Werte von Anfang an der Messung P_R < 0,7 lagen. Die Leistung des Zielkeims kann nach vorliegenden Daten bis zu 1,5 Stunden gewährleistet sein, bevor der P_R-Wert erneut < 0,7 fällt. Der mittlere P_R-Wert liegt zudem > 0,80, was ebenso eine verbesserte Produktivität darstellt. Die äußeren Gegebenheiten der Regelkarte ähneln der Regelkarte des vorher durchgeführten Aufschmelzprozess (Anordnung der P_R-Werte um den mittleren P_R-Wert herum), wie folgende Abbildung AA-56 veranschaulicht.



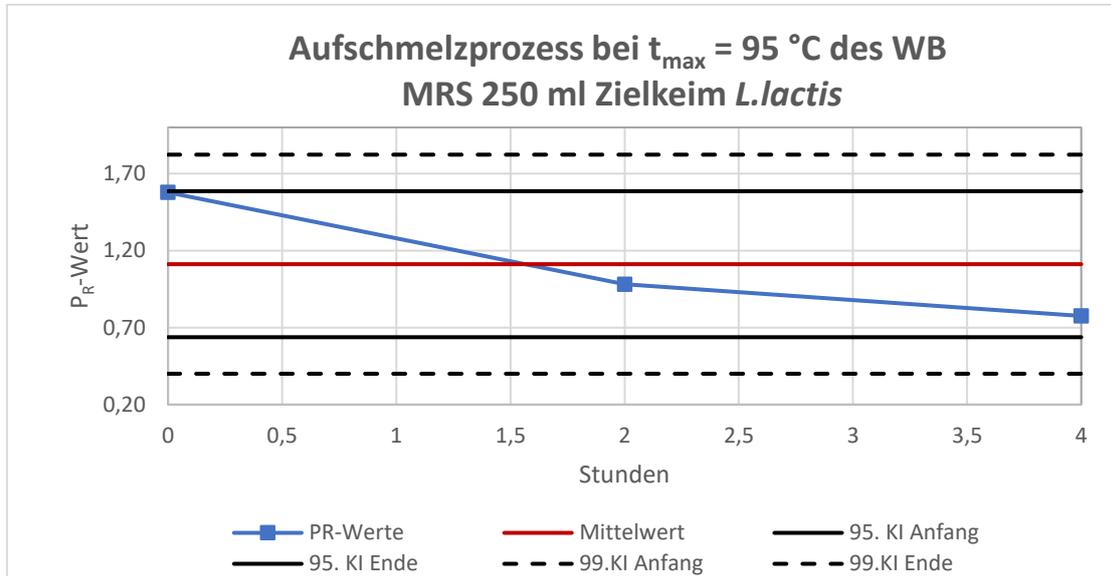
AA- Abbildung 56: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *L.sakei* auf MRS 250 ml, Aufschmelzprozess während t_{max}=95°C

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) MRS 250 ml <i>L.lactis</i>			
i=	t ₀	t ₁	t ₂
Referenz	49	72	110
KBE (Prüfagar-xi)	77	71	85
r _i	1,58	0,98	0,78
r _i -r _{i-1}		0,60	0,21

AA- Tabelle 65: Aufeinanderfolgende Überprüfungen des Aufschmelzprozesses MRS 250 ml *L.lactis* während t_{max}=95 °C

L.lactis ist bei dieser Untersuchung des Aufschmelzprozesses, genau wie in der ersten Methode am leistungsfähigsten, wobei hier ein konstanter Produktivitätsabfall der P_R -Werte zu vermerken ist. Die Ergebnisse der Tabelle AA-65 weisen dennoch eine bessere Produktivität auf als bei der ersten Methode. Alle P_R -Werte liegen über 0,7.

Der mittlere P_R -Wert wird bei ca. 1,5 Stunden unterschritten.



AA- Abbildung 57: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *L.lactis* auf MRS 250 ml, Aufschmelzprozess während $t_{max}=95\text{ °C}$

MRS Aufschmelzmethode 3 (abweichend von DIN EN ISO 11133)

Untersuchung die Agar-Flaschen über den Aufschmelzprozess hinaus im WB stehen lassen

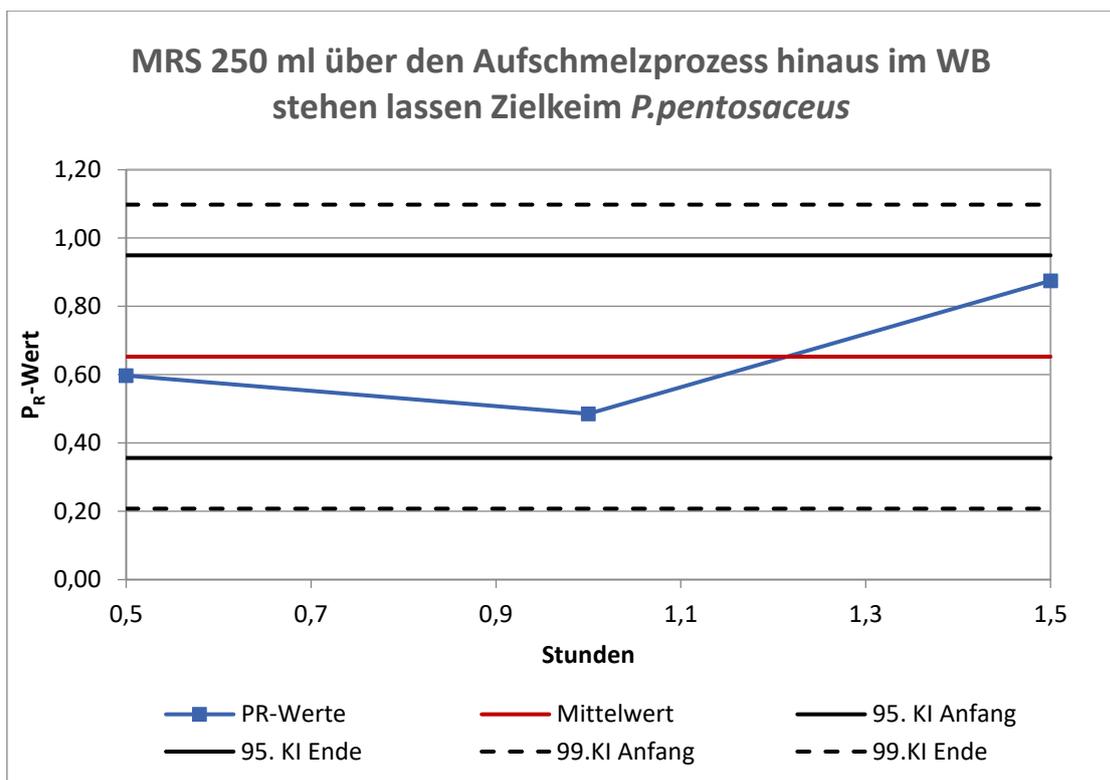
Ähnlich wie in den zwei vorher durchgeführten Untersuchungen des Aufschmelzprozesses lässt sich erkennen, dass *P.pentosaceus* und *L.sakei* weniger leistungsfähig sind als *L.lactis*. *L.lactis* zeigt im Gegensatz zu den beiden anderen Zielkeimen über den gesamten Untersuchungszeitraum P_R -Werte weitaus über 0,70 auf. Bei allen drei Zielkeime lässt sich kein konstanter Produktivitätsabfall über den Untersuchungszeitraum von 1,5 feststellen. Alle Daten liegen auf unterschiedlichen Höhen über und unterhalb des mittleren P_R -Wertes.

250 ml MRS Agar-Flaschen

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) MRS 250 ml <i>P.pentosaceus</i>			
$i=$	t_0	t_1	t_2
Referenz	92	103	64
KBE (Prüfagar-xi)	55	50	56
r_i	0,60	0,49	0,88
$ r_i - r_{i-1} $		0,11	0,39

AA- Tabelle 66: Aufeinanderfolgende Überprüfungen bei Überschreitung des Aufschmelzprozesses MRS 250 ml *P.pentosaceus*

Die in Tabelle AA-66 aufgeführten Ergebnisse zu *P.pentosaceus* liegen bis nach der zweiten Messung weit unter dem erforderlichen P_R -Wert von 0,8. Nach einer Stunde erfährt der Zielkeim ein Produktivitätsaufschwung und passiert zum Ende der Messung die Mindestgrenze von $P_R > 0,8$ (siehe Abbildung AA-58).



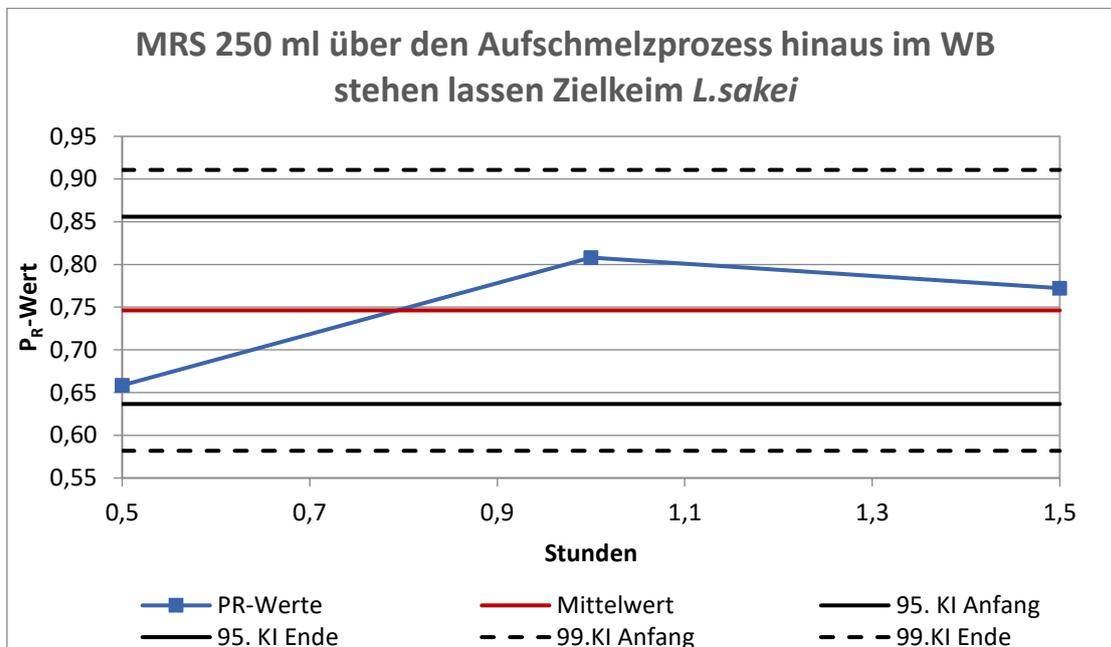
AA- Abbildung 58: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *P.pentosaceus* auf MRS 250 ml, Überschreitung des Aufschmelzprozesse

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) MRS 250 ml <i>L.sakei</i>			
$i=$	t_0	t_1	t_2
Referenz	123	99	79
KBE (Prüfagar-xi)	81	80	61
r_i	0,66	0,81	0,77
$ r_i - r_{i-1} $		0,15	0,04

AA- Tabelle 67: Aufeinanderfolgende Überprüfungen bei Überschreitung des Aufschmelzprozesses MRS 250 ml *L.sakei*

Ähnlich wie *P.pentosaceus* weist *L.sakei* am Anfang der Messung deutlich schlechtere Produktivitätswerte auf, als am Ende der Untersuchung. Nach der ersten Messung wird kein $P_R > 0,7$ erreicht, wohingegen die P_R -Werte der zwei folgenden Messungen deutlich über $P_R > 0,7$ liegen.

Nachstehende Abbildung AA-59 zeigt die Regelkarte und den Produktivitätsverlauf von *L.sakei*, deren mittlerer P_R -Wert zumindest über $P_R > 0,7$ liegt.

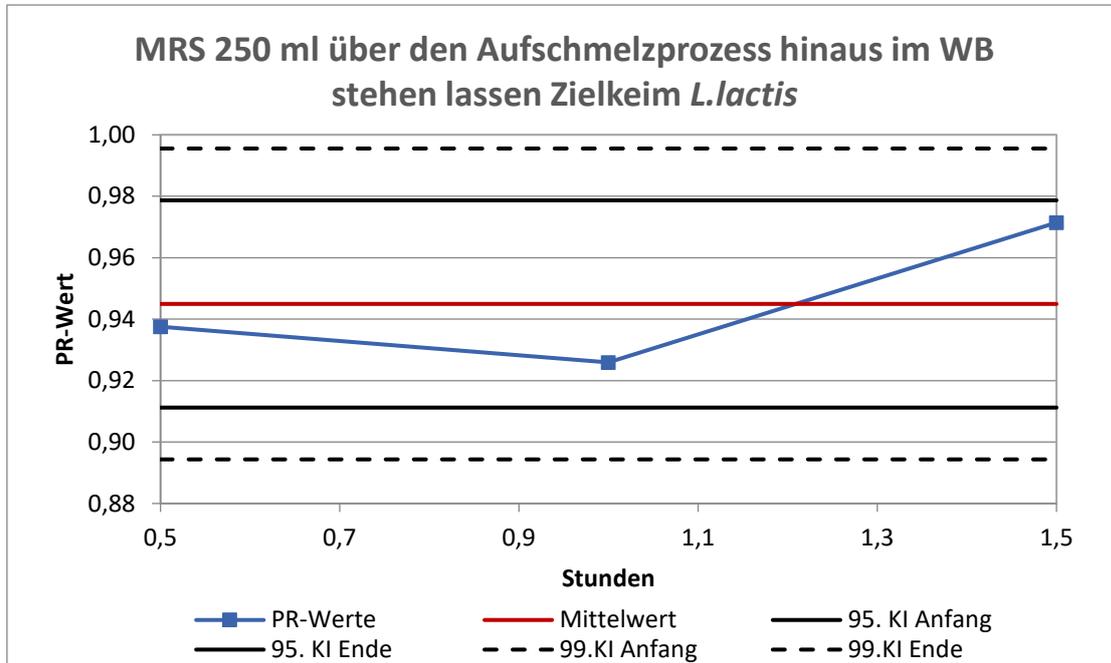


AA- Abbildung 59: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *L.sakei* auf MRS 250 ml, Überschreitung des Aufschmelzprozesses

Ergebnis von Prüfung Nummer (i) MRS 250 ml <i>L.lactis</i>			
$i=$	t_0	t_1	t_2
Referenz	64	54	70
KBE (Prüfagar-xi)	60	50	68
r_i	0,94	0,93	0,97
$ r_i - r_{i-1} $		0,01	0,05

AA- Tabelle 68: Aufeinanderfolgende Überprüfungen bei Überschreitung des Aufschmelzprozesses MRS 250 ml *L.lactis*

Die Ergebnisse des Zielkeims *L.lactis* weisen mit Produktivitätswerten zwischen rund 90% und 100% die mit Abstand höchste Produktivität im Vergleich zu den anderen zwei Zielkeimen auf. *L.lactis* ist zudem gegenüber der Überschreitung des Aufschmelzprozesses am widerstandsfähigsten.



AA- Abbildung 60: Regelkarte Produktivitätsverhältnis *L.lactis* auf MRS 250 ml, Überschreitung des Aufschmelzprozesses

Anhang I: Tabellen zur Leistungsprüfung verwendeter Nährmedien

Die für die Leistungsprüfung von TBX, VRBD, VRBL, YGC und MRS wichtigen Parameter einer erfolgreichen mikrobiologischen Qualitätskontrolle sind folgenden Tabellen zu entnehmen:

Leistungsprüfung von Nährmedien nach ISO 11133

Nährmedium	TBX	Hersteller	Eigenherstellung		
Zielorganismus	Enterobacteriaceae	Lagerung	2-8 °C		
Methode	DIN ISO 16649				
Physikalische Qualitätskontrolle					
Füllmenge/Schichtdicke Soll:	3-4 mm				
Klarheit/Vorliegen optischer Artefakte Soll:	klar				
Aussehen/Farbe/Homogenität Soll:	gelblich gefärbt				
Gelfestigkeit/Konsistenz/Feuchtigkeit Soll:	festes Gel				
pH-Wert	7,2±0,2 bei 25 °C				
Sterilitätsprüfung	(24 ± 2) h; (44 ± 1) °C				
Mikrobielle Qualitätskontrolle					
Produktivität					
Kontrollstämmen	Bebrütung	Referenzmedium	Prüfverfahren	Kriterien	Charakteristische Reaktion
<i>Escherichia Coli</i> DSM 1576	(24 ± 2) h; (44 ± 1) °C	TSA	Quantitativ	PR>0,5	typisch blau gefärbte Kolonien
Selektivität					
Kontrollstämmen	Bebrütung	Referenzmedium	Prüfverfahren	Kriterien	Charakteristische Reaktion
<i>Enterococcus faecalis</i> DSM 20478	(24 ± 2) h; (44 ± 1) °C	-	Qualitativ	vollständige Hemmung	Keine Kolonien vorhanden
Spezifität					
Kontrollstämmen	Bebrütung	Referenzmedium	Prüfverfahren	Kriterien	Charakteristische Reaktion
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 1117	(24 ± 2) h; (44 ± 1) °C	-	Qualitativ	Geringes Wachstum	farblose bis beige Kolonien
<i>Citrobacter freundii</i> DSM 14984	(24 ± 2) h; (44 ± 1) °C	-	Qualitativ	Geringes Wachstum	farblose bis beige Kolonien

AI- Tabelle 1: Übersicht der für TBX relevante morphologische Merkmale, Faktoren der Qualitätskontrolle in Bezug auf die jeweiligen Zielkeime

Leistungsprüfung von Nährmedien nach ISO 11133					
Nährmedium	VRBD	Hersteller	Eigenherstellung		
Zielorganismus	Enterobacteriaceae	Lagerung	2-8 °C		
Methode	ISO 21528-2				
Physikalische Qualitätskontrolle					
Füllmenge/Schichtdicke Soll:	3-4 mm				
Klarheit/Vorliegen optischer Artefakte Soll:	transparent				
Aussehen/Farbe/Homogenität Soll:	violett				
Gelfestigkeit/Konsistenz/Feuchtigkeit Soll:	festes Gel				
pH-Wert	pH 7,4 ± 0,2 bei 25 °C				
Sterilitätsprüfung	(24 ± 2) h; (37 ± 1) °C				
Mikrobielle Qualitätskontrolle					
Produktivität					
Kontrollstämme	Bebrütung	Referenzmedium	Prüfverfahren	Kriterien	Charakteristische Reaktionen
<i>Escherichia Coli</i> DSM 1576	(24 ± 2) h; (37 ± 1) °C	TSA	Quantitativ	PR>0,5	rosa bis rote Kolonien mit oder ohne Präzipitathof
<i>Enterobacter aerogenes</i> DSM 12058	(24 ± 2) h; (37 ± 1) °C	TSA	Quantitativ	PR>0,5	rosa bis rote Kolonien mit oder ohne Präzipitathof
<i>Salmonella enterica</i> DSM 17420	(24 ± 2) h; (37 ± 1) °C	TSA	Quantitativ	PR>0,5	rosa bis rote Kolonien mit oder ohne Präzipitathof
Selektivität					
Kontrollstämme	Bebrütung	Referenzmedium	Prüfverfahren	Kriterien	Charakteristische Reaktionen
<i>Enterococcus faecalis</i> DSM 20478	(24 ± 2) h; (37 ± 1) °C		Qualitativ	Vollständige Hemmung	Keine Kolonien vorhanden
Spezifität					
Kontrollstämme	Bebrütung	Referenzmedium	Prüfverfahren	Kriterien	Charakteristische Reaktionen
-	-	-	-	-	-

AI- Tabelle 2: Übersicht der für VRBD relevante morphologische Merkmale, Faktoren der Qualitätskontrolle in Bezug auf die jeweiligen Zielkeime

Leistungsprüfung von Nährmedien nach ISO 11133

Nährmedium	VRBL	Hersteller	Oxid		
Zielorganismus	Coliforme	Lagerung	2-8 °C		
Methode	ISO 8432				
Physikalische Qualitätskontrolle					
Füllmenge/Schichtdicke Soll:	3-4mm				
Klarheit/Vorliegen optischer Artefakte Soll:	transparent				
Aussehen/Farbe/Homogenität Soll:	violett				
Gelfestigkeit/Konsistenz/Feuchtigkeit Soll:	festes Gel				
pH-Wert	pH 7,4 ± 0,2 bei 25 °C				
Sterilitätsprüfung	(24 ± 2) h; (30 ± 1) °C				
Mikrobielle Qualitätskontrolle					
Produktivität					
Kontrollstämme	Bebrütung	Referenzmedium	Prüfverfahren	Kriterien	Charakteristische Reaktion
<i>Escherichia Coli DSM 1576</i>	(24 ± 2) h; (30 ± 1) °C	TSA	Quantitativ	PR>0,5	Purpurrote Kolonien mit oder ohne Präzipitathof
Selektivität					
Kontrollstämme	Bebrütung	Referenzmedium	Prüfverfahren	Kriterien	Charakteristische Reaktion
<i>Enterococcus faecalis DSM 20478</i>	(24 ± 2) h; (30 ± 1) °C	-	Qualitativ	vollständige Hemmung	Keine Kolonien vorhanden
Spezifität					
Kontrollstämme	Bebrütung	Referenzmedium	Prüfverfahren	Kriterien	Charakteristische Reaktion
<i>Pseudomonas aeruginosa DSM 1117</i>	(24 ± 2) h; (30 ± 1) °C	-	Qualitativ	Geringes Wachstum	farblose bis beige Kolonien

AI- Tabelle 3: Übersicht der für VRBD relevante morphologische Merkmale, Faktoren der Qualitätskontrolle in Bezug auf die jeweiligen Zielkeime

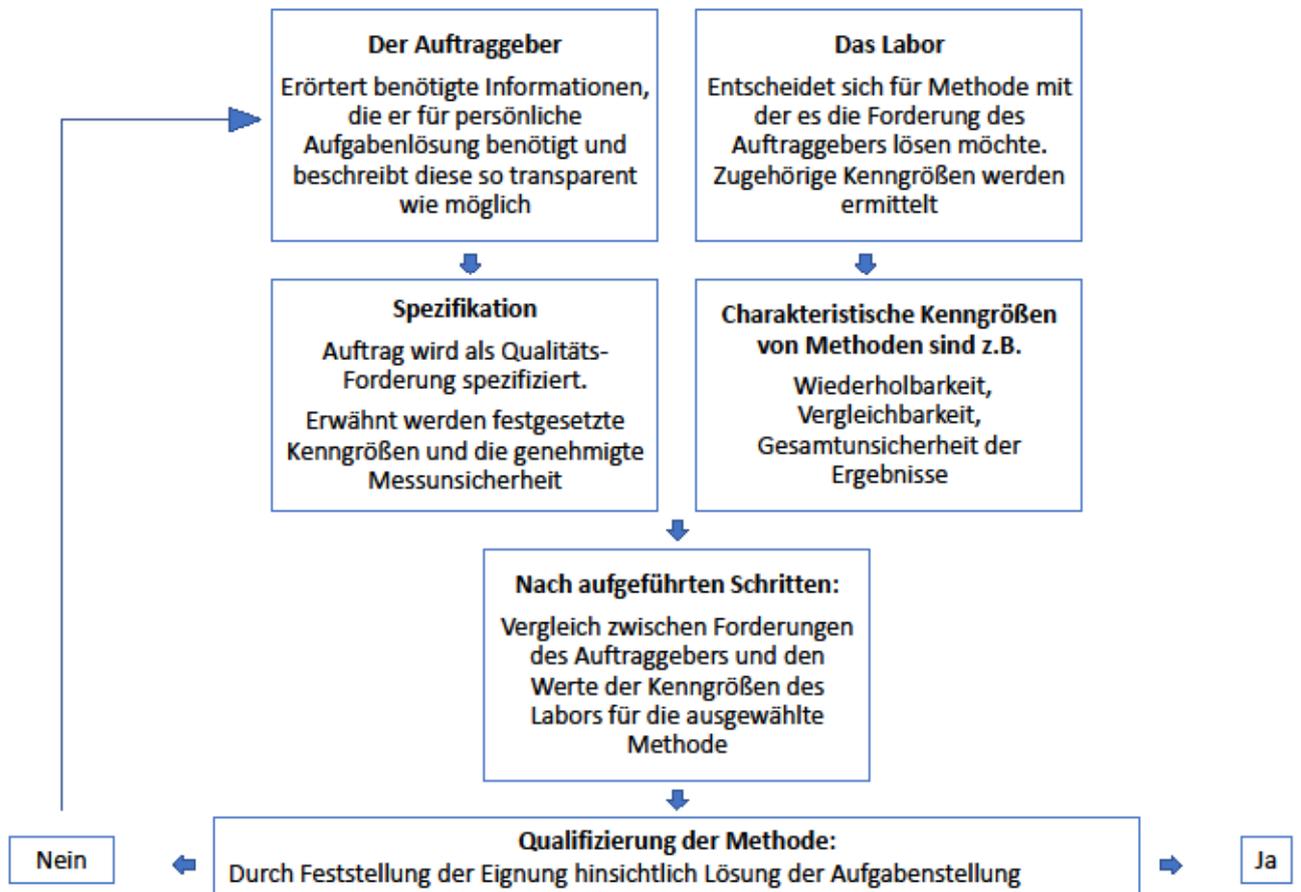
Leistungsprüfung von Nährmedien nach ISO 11133					
Nährmedium	YGC	Hersteller	Eigenherstellung		
Zielorganismus	Hefe Schimmel	Lagerung	2-8 °C		
Methode	ASU L 01.00-37				
Physikalische Qualitätskontrolle					
Füllmenge/Schichtdicke Soll:	3-4 mm				
Klarheit/Vorliegen optischer Artefakte Soll:	Transparent				
Aussehen/Farbe/Homogenität Soll:	Elfenbein				
Gelfestigkeit/Konsistenz/Feuchtigkeit Soll:	festes Gel				
pH-Wert	pH 7,0 ± 0,2 bei 25 °C				
Sterilitätsprüfung	5 Tage; (25± 1) °C				
Mikrobielle Qualitätskontrolle					
Produktivität					
Kontrollstämme	Bebrütung	Referenzmedium	Prüfverfahren	Kriterien	Charakteristische Reaktionen
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DSM 1333	5 Tage; (25± 1) °C	SDA	Quantitativ	PR>0,5	hellgelbe Kolonien mit weiß-beiger Umrandung
<i>Aspergillus brasiliensis</i> DSM 1988	5 Tage; (25± 1) °C	SDA	Quantitativ	PR>0,5	hellgelbe Kolonien mit weiß-beiger Umrandung
<i>Candida albicans</i> DSM 1386	5 Tage; (25± 1) °C	SDA	Quantitativ	PR>0,5	hellgelbe Kolonien mit weiß-beiger Umrandung
<i>Walleimia sebi</i> DSM 101886	5 Tage; (25± 1) °C	SDA	Quantitativ	PR>0,5	hellgelbe Kolonien mit weiß-beiger Umrandung
Selektivität					
Kontrollstämme	Bebrütung	Referenzmedium	Prüfverfahren	Kriterien	Charakteristische Reaktionen
<i>Escherichia coli</i> DSM 1576	5 Tage; (25± 1) °C	-	Qualitativ	vollständige Hemmung	Keine Kolonien vorhanden
<i>Bacillus subtilis</i> DSM 347	5 Tage; (25± 1) °C	-	Qualitativ	vollständige Hemmung	Keine Kolonien vorhanden
Spezifität					
Kontrollstämme	Bebrütung	Referenzmedium	Prüfverfahren	Kriterien	Charakteristische Reaktionen
-	-	-	-	-	-

AI- Tabelle 4: Übersicht der für YGC relevante morphologische Merkmale, Faktoren der Qualitätskontrolle in Bezug auf die jeweiligen Zielkeime

Leistungsprüfung von Nährmedien nach ISO 11133					
Nährmedium	MRS	Hersteller	Oxoid		
Zielorganismus	Milchsäurebakterien	Lagerung	2-8 °C		
Methode	ISO 15214				
Physikalische Qualitätskontrolle					
Füllmenge/Schichtdicke Soll:	3-4 mm				
Klarheit/Vorliegen optischer Artefakte Soll:	transparent				
Aussehen/Farbe/Homogenität Soll:	Karamellfarben				
Gelfestigkeit/Konsistenz/Feuchtigkeit Soll:	festes Gel				
pH-Wert	pH 6,2 ± 0,2 bei 25 °C				
Sterilitätsprüfung	(72 ± 3) h; (30 ± 1) °C (mikroaerophil)				
Mikrobielle Qualitätskontrolle					
Produktivität					
Kontrollstämme	Bebrütung	Referenzmedium	Prüfverfahren	Kriterien	Charakteristische Reaktionen
<i>Lactobacillus sakei</i> DSM 20017	(72 ± 3) h; (30 ± 1) °C (mikroaerophil)	MRS	Quantitativ	PR>0,7	Charakteristische Kolonie je nach Spezies
<i>Lactococcus lactis</i> DSM 20481	(72 ± 3) h; (30 ± 1) °C (mikroaerophil)	MRS	Quantitativ	PR>0,7	Charakteristische Kolonie je nach Spezies
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DSM 20283	(72 ± 3) h; (30 ± 1) °C (mikroaerophil)	MRS	Quantitativ	PR>0,8	Charakteristische Kolonie je nach Spezies
Selektivität					
Kontrollstämme	Bebrütung	Referenzmedium	Prüfverfahren	Kriterien	Charakteristische Reaktionen
<i>Escherichia Coli</i> DSM 1576	(72 ± 3) h; (30 ± 1) °C (mikroaerophil)	-	Qualitativ	vollständige Hemmung	Keine Kolonien vorhanden
Spezifität					
Kontrollstämme	Bebrütung	Referenzmedium	Prüfverfahren	Kriterien	Charakteristische Reaktionen
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-

AI- Tabelle 5: Übersicht der für MRS relevante morphologische Merkmale, Faktoren der Qualitätskontrolle in Bezug auf die jeweiligen Zielkeime

Anhang II: Der Validierungsprozess



AI- Abbildung 1: Ablaufschema zum Validierungsprozess

Anhang III: Verwendete Zielkeime

Enterobacteriaceae

In-fekti- ons-dosis	Inkuba-ti- onszeit	Tem- pera- turbe- reich	Allgemeines Vorkommen	Vorkommen im Lebensmittel	Bedeutung des MO	Ursachen der Kontamination	Symptome/ Folgen der Kon- tamination	Nachweis- verfahren
Enterobacteriaceae								
<i>Escherichia Coli</i>								
10 ⁵	6h-48h	37 °C	Natürlich im Magen-Darm-Trakt von Menschen und Tieren vorkommend	Im Erdboden, in Wasser, in rohen LM tierischen und pflanzlichen Ursprungs	wichtiger Hygiene-indikator für Fäkalverunreinigung. Existenz von pathogenen Stämmen wie EHEC, STEC	In Umwelt lange überlebensfähig-> Mangel an Produktions-/ Personalhygiene Kreuzkontamination rohe/ verarbeitete LM. Kontaminiertes Gemüse durch Ausscheidungen von Vögeln, Nagern, Insekten Erhitzung von LM nicht hinreichend	Lebensmittelvergiftung Lebens-bedrohliche Infektionen Neben GIT Organe wie Niere betroffen	Kultureller Nachweis, Bestimmung Enterotoxin, Isolierung der Erreger, PCR Oxidasereaktion negativ
<i>Enterobacter aerogenes</i>								
abhängig von Enterotoxinbildung		30 bis 37 °C	siehe <i>E.Coli</i>	Milchprodukte, Gras, Getreide, Zuckerrohr, Bananen, Gemüse, Früchte Fleisch, Fischwaren (Austern)	starke Resistenzentwicklung gegenüber Antibiotika, gewinnen an Bedeutung	Meist Krankenhausinfektionen nosokomialer Natur	Blutvergiftung (Septikämien), Entzündungen der unteren Atemwege, Haut, Gewebe, Organen, Herzinnenhaut (Endokarditis), Augen	Bunte Reihe, Voges-Proskauer-Test, IMVIC-Test
<i>Citrobacter freundii</i>								
>10 ⁷	Stunden bis Tage	30 bis 37 °C	siehe <i>E.Coli</i>	Kräuter, Sprossen, Salate, Fleisch, Wurst, Milch, Soßen, Cremespeisen	Können mit Citrat als einzige Energiequelle wachsen	Unhygienische Verarbeitungsweise	Durchfall durch entweder biogene Amine (abgebaute LM) oder durch Toxine, Adhäsine oder virulenz assoziierte Stoffwechselprodukte	Katalasetest positiv (typisch für Enterobacteriaceae) Idol-Test negativ. Unterscheidung Citrobacter von Escherichia und Enterobacter mit IMVIC-Test
<i>Salmonella enterica</i>								
10 ² -10 ⁶	6h bis 10 Tage gewöhnlich 6h-48h	10 bis 47 °C Optimum 35 bis 37 °C	siehe <i>E.Coli</i> , Jauche, Kot, Schlamm	Hackfleisch, Schlachtgeflügel, Speiseeis, Salate, Mayonaise, Rohmilch, Rohwurst	Verbreitung pandemisch, Lange Überlebensdauer	Ausscheider, kontaminierte Nahrungs- und Futtermittel, verunreinigte Oberflächengewässer	wässriger Durchfall mit Fieber und Bauchkrämpfen ähnlich wie bei <i>C. freundii</i>	Anzüchten der Keime, Serovare bestimmen

AIII- Tabelle 1: Verwendete Enterobacteriaceae

Enterococcaceae

In-fekti- ons-dosis	Inkuba-ti- onszeit	Tem- pera- turbe- reich	Allgemeines Vorkommen	Vorkommen im Lebensmittel	Bedeutung des MO	Ursachen der Kontamination	Symptome/ Folgen der Kon- tamination	Nachweis- verfahren
Enterococcaceae								
<i>Enterococcus faecalis</i>								
>10 ⁷	Stunden bis Tage	10 bis 45 °C Opti- mum 35 °C	Pflanzen, Böden, Kom- mensale, GIT des Men- schens und Nutztiere	tierische LM	anaeroben und aeroben Stoffwechsel	siehe <i>C. freundii</i>	siehe <i>C. freundii</i>	Katalase negativ, Differenzierung mittels biochemischer Tests in Form von Karten Streifen-systemen

AllII- Tabelle 2: Verwendete Enterococcaceae

Pseudomonadaceae

In-fekti- ons-dosis	Inkuba-ti- onszeit	Tem- pera- turbe- reich	Allgemeines Vorkommen	Vorkommen im Lebensmittel	Bedeutung des MO	Ursachen der Kontamination	Symptome/ Folgen der Kon- tamination	Nachweis- verfahren
Pseudomonadaceae								
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>								
10 ⁸ gilt für: Mozza- rella u. verur- sacht in- tensive blaue Verfär- bung	Stunden bis Tage, gewöhn- lich 48h	0 bis 41 °C Opti- mum 37 °C	Erboden, Oberflächen Gewässer, Pflanzen	LM mit hohem aW-Wert, wie frisches Fleisch, Fisch, Rohmilch, Sahne, Mozza- rella, zerkleinertes Obst und Gemüse	Vorliebe für feuchtes Milieu -> typischer Feuchtkeim	häufig ausgeprägte Resistenz Anpassungsfähigkeit an unterschiedliche Milieus- Problemkeim im Krankenhaus, wich- tigster human-patho- gener Vertreter der Art Pseudomonas	Haut-infektio- nen, besonders Ver- brennungs- wunden, in- folge schwere Sepsis, YOPIs besonders gefährdet	Kommerzielle manuelle und automatisierte Identifizierungssysteme -> Verzicht auf biochemische Tests zur Identifizierung

AllII- Tabelle 3: Verwendete Pseudomonadaceae

Lactobacillaceae

In-fekti- ons-dosis	Inkuba-ti- onszeit	Tem- pera- turbe- reich	Allgemeines Vorkommen	Vorkommen im Lebensmittel	Bedeutung des MO	Ursachen der Kontamination	Symptome/ Folgen der Kon- tamination	Nachweis- verfahren
Lactobacillaceae								
<i>Lactobacillus sakei</i>								
Ver-meh- rung bei <5% NaCl Kon- zentra- tion	-	<5 °C 30 bis 40 °C	Besiedeln GIT von Vö- geln u. Säu- getieren, aus fermentier- ten Produk- ten tierisch- en u. pflanz- lichen Ur- sprungs iso- liert wie aus Sauerkraut, Sauerteig, geräucher- terFisch	Für die Herstel- lung von Milch- produkten wie Käse, Joghurt ver- wendet, Konser- vierung von fri- schem Fleisch ins- besondere als Starterkultur	ausgeprägte Fähigkeit zur Bildung von Milchsäure, tragen zur Re- gulierung der physiologischen Darmflora bei, genutzt zur Herstellung von Präbiotika	bietet für den menschlichen Organismus kein ge- sundheits- gefährdendes Konta- minationsrisiko	Lactobacillus- Arten werden selten mit op- portunistischen Infektionen in Verbindung gebracht	Katalase, Oxidase negativ
<i>Pediococcus pentosaceus</i>								

Ver-meh-rung zwischen 8-10% NaCl	-	35 bis 40 °C	pflanzliche Materialien, aus Wein, Früchten isoliert, nor- maler- weise in Rot- wein während Fasslagerung zu finden, menschli- cher Spei- chel, Ver- dauungs- trakt	Verwendet bei der Herstellung von Salzgurken, Sauerkraut. Als Starterkultur für Rohwurst	Fermentation von Fleisch-, Gemüse-, Käsesorten	bietet für den menschlichen Organismus kein ge- sundheits- gefährdendes Konta- minationsrisiko	Keine bekann- ten Erkrankungen verursacht, be- kannt als wein- schädigen-der MO durch Aus- bildung eines Fehl-aramas, wie "ranzige Butter", "Bitter- keit", auch bei Fruchtsaft und Bier	Katalase negativ, API-System
---	---	-----------------	--	---	---	---	---	---------------------------------

AIII- Tabelle 4: Verwendete Lactobacillaceae

Streptococcaceae

In-fekti- ons-dosis	Inkuba-ti- onszeit	Tem- pera- turbe- reich	Allgemeines Vorkommen	Vorkommen im Lebensmittel	Bedeutung des MO	Ursachen der Kontamination	Symptome/ Folgen der Kon- tamination	Nachweis- verfahren
Streptococcaceae								
<i>Lactococcus lactis</i>								
Ver-meh- rung bei 4% NaCl	-	Opti- mum bei 28- 32 °C wächst auch bei 10 °C, nicht bei 42 °C	Kann aus fri- schem u. fermentier- tem Pflan- zenmaterial isoliert wer- den	Verwendet bei der Herstellung von Milch-u. Frisch-kä- seprodukten: Quark, Kefir, Käse, Crème Fraiche sowie Bier, Wein, Brot	homofermen- tative Milch- säuregärung u. produziert L-(+)-Milchsäu- re, Konservie- rungstoff Nisin gewonnen	bietet für den menschlichen Organismus kein ge- sundheitsgefährden- des Kontaminations- risiko	für den Orga- nismus nicht schädlich Wildkeime kön- nen als Kontaminati- onskeime mit der Bildung von Estern ein fruchtiges Fehl- aroma in Käse bilden	Katalase und Oxidase negativ, Bunte Reihe

AIII- Tabelle 5: Verwendete Streptococcaceae

Saccharomycetaceae

In-fekti- ons-dosis	Inkuba-ti- onszeit	Tem- pera- turbe- reich	Allgemeines Vorkommen	Vorkommen im Lebensmittel	Bedeutung des MO	Ursachen der Kontamination	Symptome/ Folgen der Kon- tamination	Nachweis- verfahren
Saccharomycetaceae								
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>								
Gene-ra- tions- zeit von 1 bis 2 Stunden	ca. 72 Stunden	Opti- mum 28 °C wächst auch zwi- schen 20 °C und 45°C	kommt aus- schließlich auf reifen Früchten vor. Im Darm von Wespenkö- niginnen von Herbst bis Winter	Getränkeshäd- ling nicht alko- holischer Erfri- schungsge- tränke	Bekannt unter dem Na- men Backhefe. Für die Bier, Wein, Back- warenher- stellung bedeutend	In Bezug auf LM, un- empfindlich gegen- über hoher Säure- konzentration, ge- ringe Nährstoff-an- sprüche/O2-Bedarf, niedriges Temperatu- roptimum	Folgen in Bezug auf LM: Ge- ruchs- und Geschmacks- fehler, Bombagen (starke Gärung)	bilden in zuckerhaltigen Lösun- gen bei der Anwesenheit von Sauerstoff trotzdem Kohlendioxid und Etha- nol. Vergärung und Assimilation: Glucose, Galactose, Saccharose, Maltose
<i>Candida albicans</i>								

Gene- ra- tions- zeit von Spross- zellen 20 min	ca. 72 Stunden	viele Hefe- pilze haben bei 20 bis 25 °C ihr Opti- mum. <i>C. al- bicans</i> jedoch bei 36 bis 37 °C	kommt nicht ubiquitär in der Natur vor: als komensaler Keim in Schleimhaut, GIT des Menschen, (feuchtes und warmes Millieu)	Zucker, zucker- haltige Speisen, wie Schokolade, Kekse Fruchtzucker, wie Früchte, Fruch- säfte, ballaststoff- arme Kohlenhyd- rate, wie Weiß- brot, polierter Reis, Nudeln	fakultativ humanpatho- gener Keim	Umwandlung von harmlosem Kom- mensal zu Pathogen möglich. bei immunge- schwächten Perso- nen und Gleichge- wichtsstörungen der Mikroflora. Übertragung von Mensch zu Mensch, von Tier zu Mensch über Kontakt- oder Schmierinfektionen.	Candidosen (überschüssige Ansiedlung von Hefepilzen im menschlichen Körper), syste- mische Infekti- onen	Merkmale zur biochemischen Differenzierung von Hefen: Glucose, Maltose schnell, Galactose langsam umgesetzt. Lactose nicht anaerob metaboli- siert. Nucleinsäurenachweis
---	-------------------	--	--	--	---	---	---	--

AIII- Tabelle 6: Verwendete *Saccharomycetaceae*

Trichocomaceae

In-fekti- ons-dosis	Inkuba-ti- onszeit	Tem- pera- turbe- reich	Allgemeines Vorkommen	Vorkommen im Lebensmittel	Bedeutung des MO	Ursachen der Kontamination	Symptome/ Folgen der Kon- tamination	Nachweis- verfahren
Trichocomaceae								
<i>Aspergillus brasiliensis</i>								
-	48-72 Stunden	24 bis 26 °C	auf allen Kontinenten in vielen Kli- mazonen entdeckt -> breites Vorkommen, wie Wüste, Steppe, Na- delholzwald, Salzmarsch, Mangroven- schlamm Innenräume	Samen, Erdnüsse, Zwiebeln, Wein- beeren	Ist eine Prüfspezies um fungizide Wirkung von Desinfektions- mitteln zu be- stimmen	Für immunge- schwächte Personen kann es zu Atem- wegsinfektio- nen durch Inhalation kommen	Aspergillose	Antigen-Nach- weis (EIA)

AIII- Tabelle 7: Verwendete *Trichocomaceae*

Wallemiaceae

In-fekti- ons-dosis	Inkuba-ti- onszeit	Tem- pera- turbe- reich	Allgemeines Vorkommen	Vorkommen im Lebensmittel	Bedeutung des MO	Ursachen der Kontamination	Symptome/ Folgen der Kon- tamination	Nachweis- verfahren
Wallemiaceae								
<i>Wallemia sebi</i>								
>50 KBE/m ³ Luft müs- sen vor- handen sein, um aller-gi- sche Reaktion- auslösen zu kön- nen	90- 120min	25 °C 24 bis 38 °C?	Innen- räume, Bö- den, Heu, Textilien	Brot, Käse, Mar- melade, Marzipan, Datteln, Früchte, eingesalzene Boh- nen, Befall bei zu- ckerhaltigen, gepökelten LM wegen Fähigkeit hohen osmotisch- em Druck stand- zuhalten	Mykotoxin- bildner von Wallemiol und Walle- minon, tro- cken- liebender Schimmelpilz	Sporen sind sehr klein (deutlich kleiner als <i>Aspergillus</i> und <i>Penicillium</i>), sodass sie leicht in die Atem- wege gelangen. Stehen unter Ver- dacht chronische "Farmerlunge" zu verursachen (Er- krankung der Lunge speziell be- obachtet bei Feldar- beitern, Land-wirten)	kann Auslöser von hypersensi- tiver Pneumo- nitis, Dermatitis und subkutane Infektionen so- wie Allergien sein	Bei Flächen: Abklatsch, Abstrich, Klebefilm. Abrisspräparat, Mikroskopie, biochemische Summenparameter.

AIII- Tabelle 8: Verwendete Wallemiaceae

Die zugehörigen Quelle der hier im Anhang vorgestellten, verwendeten Mikroorganismen beziehen sich alle auf die im Hauptteil angegebenen Organismenfamilien (siehe Kapitel 3.3 Verwendete Mikroorganismen)

Anhang IV: Zusammensetzung und Herstellung der validierten Nährmedien

Zusammensetzung TBX

Casein, enzymatisch verdaut	20,0g
Gallensalze Nr 3	1,5g
5-Brom-4-Chlor-3-Indol- β -D-Glucuronsäure (BCIG)	144 μ mol ^a
Dimethylsulfoxid (DMSO) ^b	3 ml
Agar	9 g bis 18 g ^c
Wasser	1 000 ml

^a Zum Beispiel 0,075g Cyclhexylammoniumsalz.

^b Dimethylsulfoxid schädigt durch Inhalation und (Haut-)Kontakt. Bei der Handhabung ist die Anwendung eines Abzugs ratsam.

^c In Abhängigkeit von der Gelierfähigkeit des Agars

AIV- Tabelle 1: Rezeptur TBX

Herstellung TBX

In Dimethylsulfoxid wird die BCIG gelöst (alternativ das vom Hersteller empfohlene Verdünnungsmittel). Alle Bestandteile sind in Wasser zu lösen und bis zum Siedepunkt zu erhitzen.

Der pH-Wert beträgt nach der Sterilisation (mittels Autoklavs: 121°C für 15min) $7,2 \pm 0,2$ bei 25°C.

Kurz darauf wird das Medium mit Hilfe eines Wasserbades abgekühlt (44 °C-47 °C).

Zusammensetzung VRBD

Tierische Gewebe, enzymatisch verdaut	7,0 g
Hefeextrakt	3,0 g
Gallensalze Nr. 3	1,5 g
Glucose	10,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Neutralrot	0,03 g
Kristallviolett	0,002 g
Agar	9 g bis 18g ^a
Wasser	1 000 ml

^a In Abhängigkeit von den Gelierfähigkeiten des Agars

AIV- Tabelle 2: Rezeptur VRBD

Herstellung VRBD

Die Komponenten des Nährmediums sind in Wasser aufzukochen und werden durch diesen Vorgang gelöst. Alternativ kann auch das vollständige Trockenmedium direkt aufgekocht und gelöst werden. Das Ziel ist es nach dem Kochen des Agars einen pH-Wert bei 25 °C von $7,4 \pm 0,2$ einzustellen. Das noch flüssige Nährmedium wird in Kolben, die ein Fassungsvermögen von maximal 500ml aufweisen gelagert. Besonders wichtig ist es, dass das Medium nicht sterilisiert wird. VRBD hat eine kurze Haltbarkeit, weshalb es zeitnah vor dem Gebrauch hergestellt werden muss. Gemäß der ISO 11133 ist es bei diesem Medium von großer Bedeutung, dass es spätestens 4 Stunden nach dem Aufschmelzprozess aufgebraucht ist.

Zusammensetzung VRBL

Tierisches Gewebe (enzymatisch verdaut)	7 g
Hefeextrakt	3 g
Lactose	10 g
Natriumchlorid	5 g
Gallensalze	1,5 g
Neutralrot	0,03 g
Kristallviolett	0,002 g
Agar	13-18 g
Wasser	ad 1 000 ml

AIV- Tabelle 3: Rezeptur VRBL

Herstellung VRBL

Die gesamten Komponenten des Agars (39,5 g-44,5 g) werden in einem Liter destilliertem Wasser suspendiert. Für die vollständige Lösung der Zutaten wird das Gemisch unter ständigem Rühren vorsichtig erhitzt.

Eine Sterilisation mittels eines Autoklavs ist nicht notwendig.

Für die Gussplattenmethode ist es wichtig darauf zu achten, dass der Agar hinreichend homogenisiert ist, bevor er gegossen wird. Zusätzlich ist, ähnlich wie bei VRBD, darauf zu achten, den Agar erst kurz vor der Anwendung herzustellen und nach dem Kochen bei 47 °C im Wasserbad abkühlen zu lassen. Zudem ist darauf zu achten, dass er nach drei Stunden nicht mehr verwendet wird.

Zusammensetzung YGC

In der Zusammensetzung des Agar wird eine Antibiotika Art, das sogenannte Chloramphenicol verwendet, das der in der Begleitflora auftretenden Bakterien wirken soll. Durch Chloramphenicol ist es im Gegensatz zu anderen Antibiotika Arten, die als Hemmstoff dienen möglich, YGC durch

einen Autoklav zu sterilisieren. Der mengenmäßig größte Anteil der Teilzutaten ist Glucose, die funktionell gesehen das Wachstum von Hefen und Schimmelpilzen begünstigt.

Hefeextrakt	5,0 g
Glucose	20 g
Chloramphenicol	0,2 g
Agar	15 g
Wasser	1 000 ml

AIV- Tabelle 4: Rezeptur YGC

Herstellung YGC

Die oben aufgestellten Ingredienzen (insgesamt 40,2 g) werden in 1 000 ml destilliertem Wasser gelöst. Das Gemisch wird durch mehrfaches Rühren und Schütteln vermischt und durch Erwärmung bis zur vollständigen Lösung der Teilkomponenten homogenisiert. YGC wird für 15 min im Autoklav bei 121 °C sterilisiert. Nach der Sterilisation soll ein pH- Wert von 7,0 bei einer Temperatur von 25 °C eingestellt sein.

Zusammensetzung MRS

Casein, enzymatisch verdaut	10 g
Fleischextrakt	10 g
Hefeextrakt	4 g
Triammoniumcitrat	2 g
Natriumacetat	5 g
Magnesiumsulfatheptahydrat	0,2 g
Magnesiumsulfattetrahydrat	0,05 g
Dikaliumhydrogenphosphat	2,0 g
Glucose	20 g
Tween 80	1,08 g
Agar	12-18 g
Wasser	ad 1 000 ml

AIV- Tabelle 5: Rezeptur MRS

Herstellung MRS

Alle in der oben aufgeführter Zutatenliste mit spezifischen Mengenangaben für die Herstellung von MRS-Nährboden werden in 1 000 ml destilliertem Wasser während des Erhitzens vollständig gelöst. Wie bei den anderen erwähnten Nährmedien, die autoklaviert werden müssen, wird MRS genauso bei 121 °C für 15 min sterilisiert.

Zusammensetzung und Herstellung der Referenznährböden: TSA, DG18, SDA, MRS

Zusammensetzung von TSA

Casein, tryptisch verdaut	15 g
Sojapepton	5 g
Natriumchlorid	5 g
Agar	15 g
Wasser	1 000 ml

AIV- Tabelle 6: Rezeptur TSA

Herstellung von TSA

Alle Bestandteile werden in 1 Liter destilliertem, zu erhitzendem Wasser gelöst. Für die Sterilisierung wird das Medium in 200 ml große Aliquotes gefüllt und für 15 min bei 121 °C im Autoklav angesetzt. Der gebrauchsfertige Agar wird nun bei ca. 50 °C in Petrischalen gegossen, dessen Füllmenge in etwa bei 5 mm liegen sollte. Sofern der Agar nicht direkt verwendet werden muss, sollte er zwischen 2-8 °C in der Kühlzelle gelagert werden.

Zusammensetzung von DG18

Pepton	5 g
Glucose	10 g
Kaliumphosphat	1 g
Magnesiumsulfat	0,5 g
Chloramphenicol	0,1 g
Dichloran	0,002 g
Agar	15 g
Wasser	1 000 ml

AIV- Tabelle 7: Rezeptur DG18

Herstellung von DG18

Für die herzustellende Suspension der Rezepturbestandteile für DG 18-Agar werden alle Teilkomponenten (ca. 31,6 g) in 1 Liter destilliertem Wasser erhitzt und nach einiger Zeit unter Rühren und Schütteln gelöst, sodass ein homogenes Gemisch entsteht. Kurz darauf werden 175 ml Glycerin ((18 % w/w) (entsprechen 220 g)) der Lösung hinzugefügt. Anschließend erfolgt die durch einen Autoklav durchgeführte Sterilisierung von 15 min bei 118-121 °C.

Zusammensetzung von SDA

Die Komponente des Peptons ist wichtig für die Kultivierung des auf SDA wachsenden Organismus. Sie dient als Vitamin und Stickstoffquelle. Die Dextrose wirkt als Kohlenstoff und stellt die

erforderliche Energiequelle dar. Agar wird für die nötige Festigkeit des Nährmediums hinzugefügt. Für den Fall, dass SDA als antimikrobielles Breitbandmedium zum Einsatz kommen soll, ist die Zugabe von Chloramphenicol oder Tetracyclin erforderlich, denn diese Bestandteile hemmen viele unerwünschte grampositive und gramnegative Bakterien. Gentamicin sorgt speziell für die weitere Hemmung von gramnegativen Bakterien und kann zu der Standardrezeptur ebenfalls beigefügt werden.

Dextrose (Glucose)	40 g
Pepton	10 g
Agar	15 g
Wasser	1 000 ml

AIV- Tabelle 8: Rezeptur SDA/SABC

Herstellung von SDA

Es ist darauf zu achten, dass Antibiotika und das Untermischen von Säuren und Laugen, um den pH-Wert und so die Hemmung der bakteriellen Begleitflora zu beeinflussen, erst nach der Herstellung der Grundrezeptur von Dextrose, Pepton, Agar und Wasser und vor allem erst nach Abschluss der Sterilisation im Autoklav erfolgt. Jeder fertig gekochten Standard-SDA-Charge werden je nach Bedarf die Antibiotika und/oder Säuren/Laugen-Komponenten dem sich noch im flüssigen Aggregatzustand befindendem Nährmedium bei ca. 50 °C beigefügt.

Zusammensetzung und Herstellung von MRS

Siehe Verwendete Nährmedien MRS

Zusammensetzung und Herstellung der Referenznährbouillons: TSB-, MRS-, Hefeextrakt Bouillon

Zusammensetzung von TSB

Das pankreatisch abgebaute Casein wie auch das Sojabohnenmehl bieten komplexe und stickstoffhaltige Substanzen und beinhalten Aminosäuren. Wie zu erwarten ist Glucose die Hauptenergiequelle. Das Natriumchlorid sorgt für eine gleichbleibend osmotische Bilanz und das Kaliumphosphat hat eine Pufferfunktion, um die Aufrechterhaltung des pH-Wertes zu kontrollieren.

Casein, pankreatisch abgebaut	17 g
Sojabohnen, enzymatisch verdaut	3 g
Natriumchlorid	5 g
Dikaliumhydrogenphosphat	2,5 g
Glucose	2,5 g
Wasser	1 000 ml

AIV- Tabelle 9: Rezeptur TSB

Herstellung von TSB

Alle Komponenten (30 g) werden in gereinigtes Wasser (1 Liter) gegeben, in ein lagertaugliches End Gefäß gefüllt, gut vermischt und gelöst. Anschließend wird es bei 121 °C für 15 min autoklaviert. Der pH- Wert soll sich bei 25 °C zwischen $7,3 \pm 0,2$ einstellen.

Zusammensetzung von MRS Bouillon

Pepton	10 g
Hefeextrakt	4 g
Tween 80	1 g
Natriumacetat	5 g
Magnesiumsulfat	0,2 g
Rindfleischextrakt	8,0 g
Glucose	20 g
Dikaliumphosphat	2 g
Ammoniumcitrat	2 g
Mangansulfat	0,05 g
Wasser	1 000 ml

AIV- Tabelle 10: Rezeptur MRS Bouillon

Herstellung von MRS Bouillon

Die festen Bestandteile (52,25 g), die in obiger Rezepturaufstellung angegeben sind, müssen in einem Liter destilliertem Wasser suspendiert werden. Nach hinreichendem Mischen wird das Medium langsam erhitzt, bis die vollständige Lösung des Nährmediums eintritt. Die fertige Lösung wird in geeignete Gefäße für die Sterilisierung bei 121 °C für 12 min umgefüllt. Nach dem Vorgang des Sterilisierens ist darauf zu achten, dass sich der pH-Wert bei $6,2 \pm 0,2$ einfindet.

Zusammensetzung von Malzextrakt Bouillon

Malzextrakt	13 g
Pepton aus Gelatine	5,5 g
Hefeextrakt	0,5 g
Wasser	1 000 ml

AIV- Tabelle 11: Rezeptur Malzextrakt Bouillon

Herstellung von Malzextrakt Bouillon

Die pulverförmigen Komponenten (19 g) werden zu 1 Liter destilliertem Wasser gefügt und suspendiert. Unter Schütteln und Rühren verflüssigt, stufenweise erwärmen und somit vollständig gelöst. Besonders wichtig ist es, das Medium während des Sterilisationsvorganges nicht zu überhitzen. Die Malzextrakt Bouillon wird zwischen 115-118 °C für 15 min im Autoklav sterilisiert.

Die zugehörigen Quelle der hier im Anhang vorgestellten Rezepturen und Herstellungsvorgänge der verwendeten Nährmedien beziehen sich alle auf die im Hauptteil beschriebenen Nährmedien (siehe Kapitel 3.4 Verwendete Nährmedien)

Anhang V: Probenvorbereitung und Herstellen der Zellkulturen- Beispielrechnung

Berechnung des Zelltiters für 50-150 Kolonien auf der Platte

Zellzahl pro ml:

$$\text{Summe der Zellen aus 5 Gruppenquadraten} * \text{Verdünnung} * 10^4$$

Anzahl der Zellen die zu 200 ml Milch gegeben werden müssen, um beim späteren Pipettieren von 1 ml aus den Cryoröhrchen, 50-150 Kolonien auf der Platte auszählen zu können:

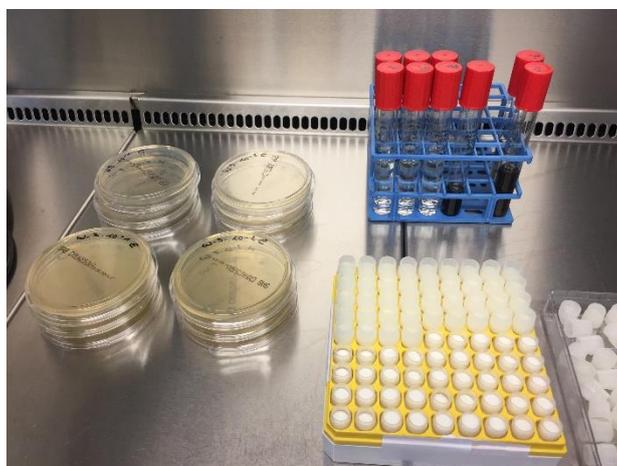
$$\frac{200 \text{ ml} * 1,5 * 10^4}{100}$$

Ergebnis: Zellzahl pro ml

Legende	
Werte der Formel	Definition
200 ml	3% ige Milch
1,5	Höchstzellzahl (150 Kolonien)
10 ⁴	Berechnet auf 1ml (Durch Multiplikation der Zellzahl pro Mittelquadrat mit 10 ⁴ ergibt sich die Zellzahl für ein ml, denn 0,1µl * 10.000 = 1 ml)
Ergebnis: Zellzahl pro ml	In Anlehnung der ausgezählten Zellen für den zu berechnenden Stamm
100	?

AV- Tabelle 1: Berechnung des Zelltiters für ein Volumen von 200 ml Milch

Überführen der 200 ml Zellsuspension in Cryoröhrchen



AV- Abbildung 1: Befülltes Cryoröhrchen Rack mit errechnetem Zellanteil für 200ml Milch

3.3 Beimpfen und Inkubieren der Milchsäurebakterien



AV- Abbildung 2: Anaerobtopf inklusive Becherglas mit angeimpften Zellen und Anaerobbeutel

Anhang VI: Durchführung des Plattengussverfahrens im Rahmen eines Produktivitätsnachweises für Nährmedien



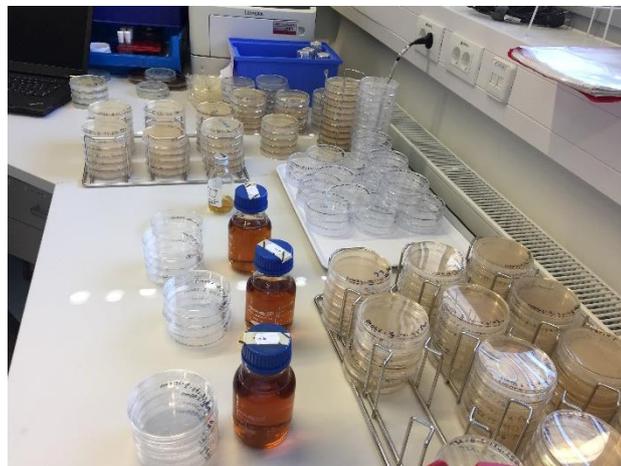
AVI- Abbildung 1: Aus dem $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ Schrank entnommene Zellen im $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ Rack platziert



AVI- Abbildung 2: 250 ml sterile Glasflaschen mit 50 ml errechnetem Zell- und Peptonwasseranteil, Cryoröhrchen und dahinterstehende Verdünnungsröhrchen mit jeweiligen Verdünnungen



AVI- Abbildung 3: Angesetzte Petrischalen mit unterschiedlichen Zielkeimen für die Dreifachbestimmung pro Testdurchlauf und bereits gegossener Referenz-Agar für die erforderlichen Zielkeime des Nährmediums (VRBD)



AVI- Abbildung 4: Angesetzte Petrischalen mit unterschiedlichen Zielkeimen für die Dreifachbestimmung pro Testdurchlauf der erforderlichen Zielkeime des Nährmediums (TBX) mit bereits zuvor gegossenen Platten von vorherigen Testläufen eines Versuchstages



AVI- Abbildung 5: Anaerobe Plastikdosen in denen mikroaerophile Keime bebrütet werden müssen



AVI- Abbildung 6: Stapelstrategie der gegossenen Platten für ein schnelleres Abkühlen und Erstarren

Anhang VII Untersuchungen zum Aufschmelzprozess der Agar-Flaschen

Anordnung der Agar Flaschen bevor sich das Wasserbad auf 95 C erhitzt



AVII- Abbildung 1: Vorbereitete VRBD Flaschen eines Versuchstags bevor sie im WB aufgeschmolzen werden



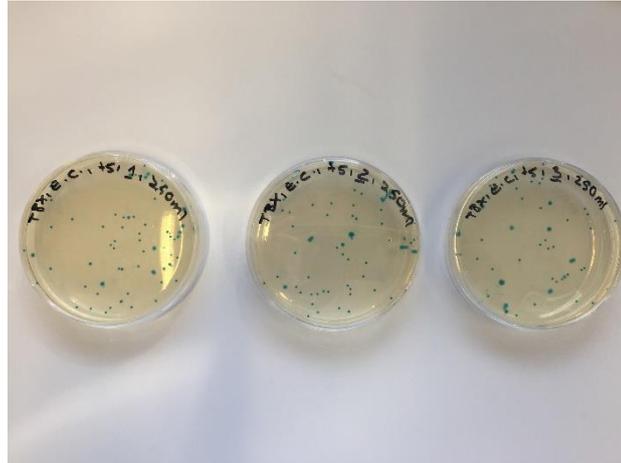
AVII- Abbildung 2: Im WB angeordnete VRBD Flaschen, bevor WB eingeschaltet wird



AVII- Abbildung 3: Stapelstrategie der gegossenen Platten für ein schnelleres Abkühlen und Erstarren
Agar-Flaschen werden über den Aufschmelzprozess hinaus im Wasserbad stehen gelassen

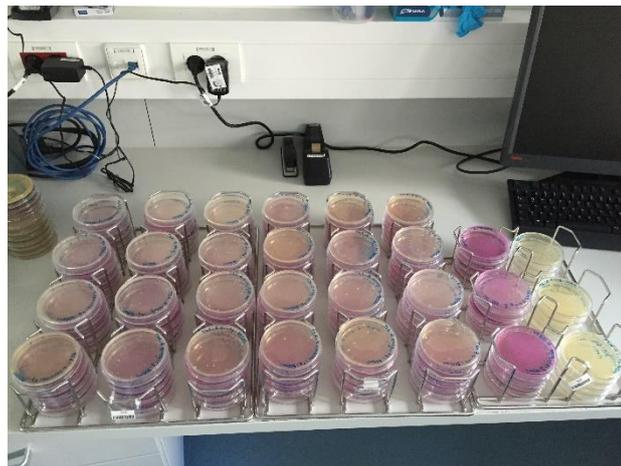


AVII- Abbildung 4: MRS über Aufschmelzprozess hinaus im WB kochen lassen (Einfachbestimmung)
Routinebegleitende Untersuchung der Standzeiten von Nährmedien über einen Zeitraum von maximal 34 Stunden

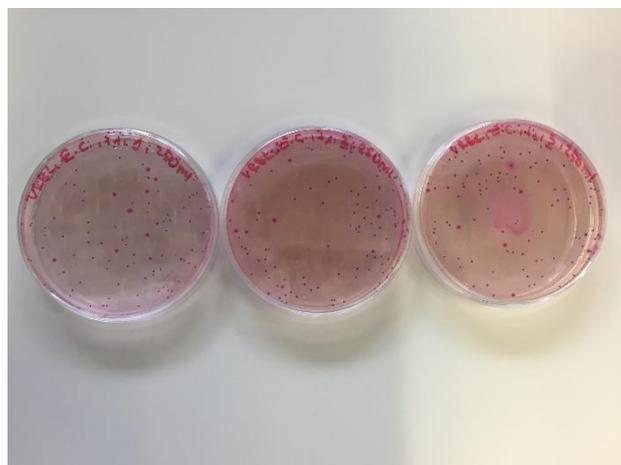


AVII- Abbildung 5: Drei auszählende TBX Platten für einen Zielkeim pro Testdurchlauf

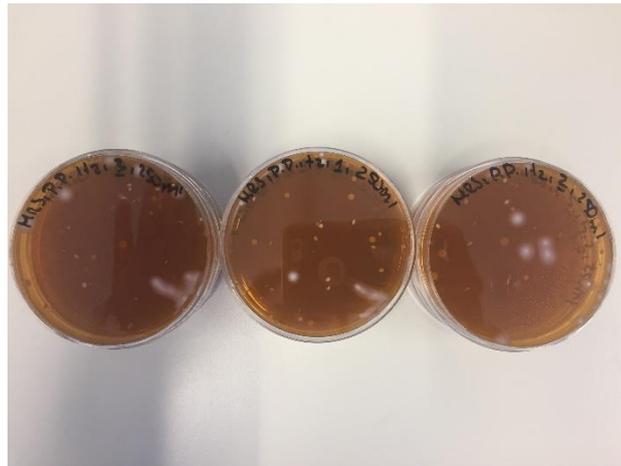
Auswertung und Datenanalyse mit Erstellung von Regelkarten für die Untersuchungen des Aufschmelzprozesses und die der Untersuchung der Standzeiten der Routineprüfung



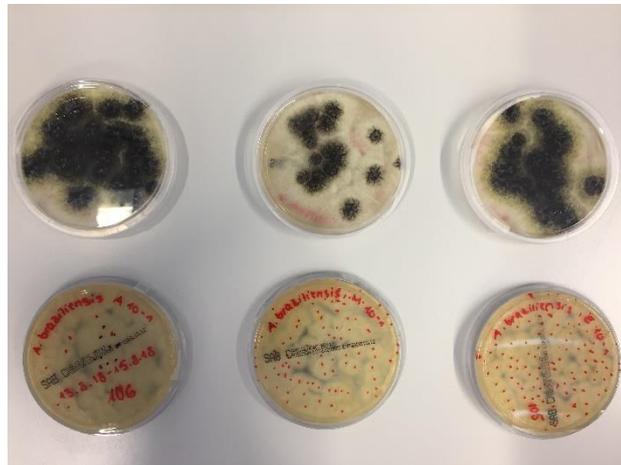
AVII- Abbildung 6: Die nach der Bebrütung auszählenden Racks eines getesteten Nährmediums hier: VRBD



AVII- Abbildung 7: Drei auszählende VRBL Platte für einen Zielkeim pro Testdurchlauf



AVII- Abbildung 8: Drei auszählende MRS Platten für einen Zielkeim pro Testdurchlauf



AVII- Abbildung 9: Drei auszählende YGC Platten für einen Zielkeim pro Testdurchlauf

Anhang VIII Verwendetes Labormaterial

	Definition/Verwendung
Pufferlösungen	
0,9% NaCl	Isotonische Kochsalzlösung, enthält 9 g Kochsalz pro/Liter
Peptonwasser	Anreicherungsmedium zur Probenvorbereitung von Lebensmitteln und Futtermitteln
Sterilisationsartikel	
AquaResist	Wasserbad-Schutzmittel
Bacillol	Flächendesinfektionsmittel
Cyclopropanol Flasche	Verwendet für Flächen, die mit Mikroorganismen in Berührung kamen
Khorsolintücher	Flächendesinfektionstücher
Papiertücherrolle	Desinfektion von Flächen
Technische Hilfsmittel	
Accu-jet für 0,1ml-200ml	Pipettierhilfe
Autoklav	Sterilisationsgerät, mind. Druck 1bar, Temperatur 121 °C
Brutschränke	Unterschiedlich eingestellte Temperaturen je bebrüteter Mikroorganismen
Eppendorf-Pipette 20-100µl	Beimpfung von gebrauchsfertigen Agarplatten
Eppendorf-Pipette 100 -1000µl	Beimpfung der leeren Petrischalen für Plattengussverfahren
Kühlschrank	Lagerung von Gebrauchskulturen, Bouillons, Zoonose Proben
Metallschere	Auftrennen von sterilen Verpackungen
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank	Sterile Werkbank für Zellkulturlabore, schützt Probe sowie den Anwender vor Ausdringen von Mikroorganismen
Mikroskop	Untersuchung von Objekten, die mit dem menschlichen Auge nicht zu erfassen sind
Peleusball	Manuelle Pipettierhilfe
-80°C Schrank	Gefrierschrank mit eingefrorenen Mikroorganismen

	Definition/Verwendung
Stomacher	Homogenisationsgerät
Trockenschrank	Dient zur Entfeuchtung von mikrobiologischem Material über die Entfeuchtung der Luft durch Sorbenzien, Einstellbarer Temperaturbereich von Raumtemperatur bis 250 °C, Aufbewahrungsort für aufgeschmolzene Gussmedien
Wasserbad	Zum Aufkochen für Nährmedien
Zählscheibe	Schwarze Kunststoffplatte mit weißer kreisförmiger Fläche (Größe einer Petrischale) und kuchenförmigen Unterteilungen. Dient zur Hilfestellung für die Auszählung von Kolonien
Zähl Tisch	Keimzählapparat + Vergrößerungsglas + Beleuchtung
Glas und Kunststoffartikel	
Anaerobbeutel	Verursacht anaerobe Gasausbreitung im Anaerobtopf
Anaerobtopf	Behältnis, um anaerobe oder mikroaerophile Umgebung zu schaffen
Anaerob Plastikdosen	Behältnis, um anaerobe oder mikroaerophile Umgebung zu schaffen (Ersatz für Anaerobtopf)
Autoklavierbeutel	Spezielle Plastiktüte, in die ausgezählten bewachsenen Platten kommen, um vor der Entsorgung im Autoklav sterilisiert zu werden
Cryoröhrchen 1,5ml Fassungsvermögen	Kleine Plastikröhrchen für die einzufrierenden Stämme auf Milchbasis
Deckglas Thoma-Kammer	Quadratische, 100-200 µm dünne Glasplatte für Bedeckung mikrobiologischer Präparate
Dreifuß 120mmx250mm	Gestell aus Stahldraht mit Epoxidharz beschichtet für Vernichtungsbeutel
Einweg-Kunststoff Petrischalen Innendurchmesser 90mm	Behältnis (flach, rund, durchsichtig mit Deckel) für Gussmedien oder Fertigmedien zur Kultivierung von Mikroorganismen
Entsorgungsbeutel 120mmx250mm	Entsorgung in Gebrauch gewesener Einmalartikel

	Definition/Verwendung
Erlenmeyerkolben 250ml (Schüttelkolben)	Glasgefäß mit eng werdendem Hals und flachem Boden
Kunststoffpipetten 10ml	Aufsatz für den Akku-jet
Nährbodenflasche 500ml	Für Nährmedienherstellung geeignete Glasbehälter mit verschließbarem Deckel
Nährbodenflasche 250ml	Für Nährmedienherstellung geeignete Glasbehälter mit verschließbarem Deckel
Reagenzglas Gestell	Für Lagerung/Transport von Reagenzgläsern
Sterile Einweg-Impföse 1µ/10 µ l, 200mm lang	Für die Durchführung von Ausstrichen auf Agarplatten Material: Polystyrol
Steriler Kunststoff-Einwegspatel T-förmig	Für die Verteilung der pipettierten Probe auf der Agarplatte
Sterile-PCR Röhrchen	Kulturröhrchen, starkwandig
Sterile Wegwerf-Pipettenspitzen 1000µl	Einweg-Aufsatz für Eppendorf-Pipette
Sterile Wegwerf-Pipettenspitzen 10-100µl	Einweg-Aufsatz für Eppendorf-Pipette
Tablett	Zum Stapeln der gegossenen Platten
Thermometer	Für Temperaturüberprüfung des abzukühlenden Agars nach dem Aufschmelzen
Thoma-Kammer (Hämozytometer)	Neubauer Improved Zählkammer für lichtmikroskopische Zählung von Mikroorganismen
Schreibmaterial	
Bleistift/Kugelschreiber	Zum Protokollieren
Edding (verschiedenfarbig)	Beschriftung der Petrischalen
Erhebungsprotokoll	Untersuchungsunterstützende Notizen
Taschenrechner	Errechnung des Zelltiters
Arbeits- und Schutzkleidung	
Laborkittel Routinebereich	Bekleidungsschutz, schützt vor Gefahrenstoffen, Probenmaterial, helle Farbe macht Kontamination schnell sichtbar, Material: Leinen, Baumwolle, Polyester Mischung

	Definition/Verwendung
Laborkittel für den Bereich des Labors, indem mit pathogenen Keimen gearbeitet wird	Wird gewechselt, wenn im Bereich des Labors gearbeitet wird indem pathogene Keime vorhanden sind
Latexhandschuhe	Werden während des gesamten Labortages getragen, Verhütung vor Kontamination
Schuhüberzieher	Werden während des gesamten Labortages getragen, Verhütung vor Kontamination

AVIII- Tabelle 1: Geräte und Hilfsmittel im mikrobiologischen Labor

Eidstattliche Erklärung und Veröffentlichungserklärung Student oder Studentin

Validierung von Nährmedien für Plattengussverfahren gemäß DIN EN ISO 11133

Eidstattliche Erklärung Student oder Studentin

Verfasst von: Frau Beer, Laura Katharina

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit mit dem o.a. formulierten Thema ohne fremde Hilfe selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Datum:

Unterschrift:

Laura Katharina Beer