

Keimgehaltsbestimmung von Bakterien, Schimmelpilzen und Hefen in Futtermitteln Nährböden und Methodik

Von H.-L. SCHMIDT*), E. BUCHER**) und G. SPICHER***)

Eingegangen am 27. 7. 1981/19. 10. 1981

Einleitung

Die mikrobiologische Untersuchung von Futtermitteln, zu der die Ermittlung des Keimbesatzes an Bakterien, Schimmelpilzen und Hefen gehört, wird u.a. durch die Anforderungen des Futtermittelrechts an die Qualität von Handels- und auch von Wirtschaftsfuttermitteln begründet: Die im FMG (§ 3 Abs. 3 und § 7 Abs. 3) geforderte handelsübliche Reinheit und Unverdorbenheit bezieht sich u.a. auch auf den Befall mit Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukte. Im Hinblick auf die Zielsetzung futtermittelrechtlicher Vorschriften (Erhaltung der Leistungsfähigkeit und Gesundheit von Nutztieren) muß der Qualitäts- und allgemeine Hygienezustand der für die Erzeugung tierischer Produkte bedeutsamen Futterstoffe heute weit mehr beachtet und überprüft werden als in der Vergangenheit.

Das Fehlen an Grundlagenkenntnissen über die allgemeine Mikrobiologie der Handelsfuttermittel hatte einer gezielten Untersuchungsarbeit lange entgegengestanden. Erst nachdem sich 1969 innerhalb des VDLUFA ein Arbeitskreis gebildet hatte, der 1971 unter Beteiligung von Untersuchungsanstalten benachbarter Länder zur Sektion Mikrobiologie der Internationalen Arbeitsgruppe für Futtermitteluntersuchung (IAG) erweitert wurde, konnten viele methodische Fragen systematisch erörtert werden. Dabei ging man von einigen neueren Ergebnissen aus (SCHMIDT, 1963, 1968) und begann mit der Durchführung von Ringuntersuchungen, die 1974 zu einer Empfehlung für eine IAG-Standardmethode zur Bestimmung des Keimgehaltes an aeroben mesophilen Bakterien sowie an Hefen und Schimmelpilzen führte.

Die IAG-Methode wurde 1976 als Verbandsmethode vom Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA) übernommen und 1978 nach Erörterung durch das Technische Komitee der Internationalen Gesellschaft für Getreidechemie (ICC) als ICC-Standard-Methode Nr. 133 (1980) für die Bakterienkeimzahlbestimmung, als Standard Nr. 134 (1980) für die Bestimmung der Schimmelpilzkeimzahl bei der Untersuchung von Futtermitteln und Futtergetreide angenommen. Vorausgegangen waren Untersuchungen über methodische Fragen der mikrobiologischen Untersuchung des Getreides (SPICHER, 1962, 1969, 1976, 1977) sowie Punkt-für-Punkt-Anhörungen der ICC-Mitglieder durch den Vorsitzenden der Arbeitsgruppe „Mikrobiologische Untersuchungsmethoden“ (G. SPICHER, Detmold). Bei der Ausarbeitung der verschiedenen methodischen Arbeitsschritte und der Auswahl der Nährböden für die Keimzählung wurde von der Zielsetzung ausgegangen, ein möglichst breites Spektrum von Keimen zu erfassen, um auch Informationen über die qualitative Zusammensetzung einer

*) Dr. H.-L. SCHMIDT, Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt Speyer, Obere Langgasse 40, D-6720 Speyer

**) Dr. E. BUCHER, Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau München/Freising, Menzinger Str. 54, D-8000 München 19

***) Dr. G. SPICHER, Bundesforschungsanstalt für Getreide- und Kartoffelverarbeitung, Schützenberg 12, D-4930 Detmold

Mikroflora zu erhalten. Die Differenzierung der unterschiedlichen Mikroorganismenpopulationen macht insbesondere bei den Bakterien ergänzende Bestimmungen mit geeigneten Selektiv-Nährböden (BUCHER, 1973, 1974; SPICHER, 1972) erforderlich.

Prinzip der Methode und Anwendungsbereich

Der Methode liegt das Plattengußverfahren zugrunde, bei dem die zu untersuchende Probe in einer sterilen, gepufferten physiologischen Lösung suspendiert wird, um die an den Partikeln haftenden Keime in der Lösung zu verteilen. Die Abpufferung der Suspension ist erforderlich, um bei Anwesenheit von Konservierungsstoffen (Propion-, Sorbin-, Fumarsäure u.a.) eine Schädigung empfindlicher Mikroorganismen durch das saure Milieu zu vermeiden.

Von der Ausgangssuspension stellt man eine dezimale Verdünnungsreihe her. In keimfreie Petrischalen werden aus diesen Verdünnungsstufen jeweils aliquote Volumina einpipettiert und mit einem verflüssigten, temperierten Nährboden vermischt. Nach dem Erstarren des Nährgarns sind die einzelnen Keime im Nährboden lokalisiert und können während der anschließenden Bebrütung zu zählbaren Kolonien heranwachsen.

Mit der vorliegenden Methode kann die Keimzahl aerober und fakulativ anaerober, mesophiler Bakterien sowie der Schimmelpilze und Hefen nach dem Gußplattenverfahren bestimmt werden. Sie ist anwendbar für Einzel- und Mischfuttermittel sowie die Ausgangsstoffe für die Futterherstellung (pflanzl. und tierische Rohstoffe, Zusatzstoffe).

Arbeitsvorschrift

1. *Geräte und Materialien*
- 1.1. Autoklav, regelbar, bis 125 °C
- 1.2. Brutschrank, regelbar, bis 40 °C ± 0,2 °C
- 1.3. Schüttelapparat (Horizontalschüttler)
- 1.4. alternativ: Ultra-Turrax, Typ 18/2 N mit sterilisierbarem Schaft (Fa. Janke & Kunkel KG)
- 1.5. alternativ: Stomacher 400 (Fa. Colworth) mit sterilen Polyethylenchlorid-Copolymer-Einwegbeuteln (z.B. Cryovac Beutel) 100 × 150 mm
- 1.6. Analysenmühle Typ A 10 (Fa. Janke & Kunkel KG)
- 1.7. Wasserbad, regelbar
- 1.8. Erlenmeyerkolben (graduiert oder mit Abfüllmarke versehen) mit 50, 200, 300 und 500 ml Fassungsvermögen und passenden Stopfen aus Silicon-Kautschuk bzw. Metallkappen
- 1.9. Meßpipetten mit Inhalt 1,0 – 2,0 – 5,0 ml, sowie 5-ml-Meßpipetten mit abgeschnittener Spitze (erweiterter Auslauf)
- 1.10. Petrischalen aus Glas oder Kunststoff (steril), Unterschale 9 cm Ø
- 1.11. Abfüllgerät für verflüssigten Nährboden z.B. Kippautomat aus Glas zur Dosierung von 12 ml Nährboden pro Petrischale

Die Glasgeräte nach 1.9., 1.10. und 1.11. bzw. der Ultra-Turraxschaft (1.4.) sind vor Gebrauch in passende Sterilisierbüchsen aus Metall zu verbringen und für 3 Stunden bei 180 °C zu entkeimen. Die Sterilisierbüchsen dürfen erst nach Abkühlung des Trockenschanks auf Zimmertemperatur entnommen werden. Die Analysenmühle ist vor jedem Gebrauch zu desinfizieren.

- 1.12. Suspendierungs- und Verdünnungslösung:
Pepton aus Fleisch, trypt. 1,0 g; Kochsalz 4,0 g; NaH₂PO₄ · 2H₂O, 0,58 g; Na₂HPO₄ · 2H₂O, 2,50 g; lösen in 1000 ml Aqua dest.; pH = 7,0 ± 0,2

- 1.12.1. Abfüllmengen für Suspendierungslösung: Je 90 ml in 200-ml-Kolben, je 180 bzw. 190 ml in 300-ml-Kolben und je 360 ml in 500-ml-Kolben (1.8.)
- 1.12.2. Abfüllmengen für Verdünnungsreihe: Zu 18 ml in 50-ml-Kolben

Auf die Kolben (1.12.1. und 1.12.2.) wird ein Silicon-Kautschuk Stopfen lose aufgesetzt. Die Gefäße sind anschließend im Autoklaven (1.1.) für 15 Minuten bei 121 °C zu sterilisieren. Nach dem Abkühlen muß die erforderliche Menge an Verdünnungslösung in den Gefäßen (Markierungsstrich) enthalten sein, andernfalls muß sterile Verdünnungslösung unter aseptischen Bedingungen zugefügt oder abgezogen werden.

- 1.13. Bakteriennährboden nach Schmidt (1968):
 Pepton aus Fleisch, pept. 10,0 g; Pepton aus Fleisch, trypt. 1,0 g; Hefeextrakt 2,0 g; Glukose 1,0 g; Kochsalz 5,0 g; Agar-Agar frei von Hemmstoffen 10–12 g je nach Qualität, einwiegen in 1000 ml dest. Wasser; pH-Wert des Nährbodens: 7.2.

Der Nährboden wird 20 Minuten bei 121 °C im Autoklaven (1.1.) sterilisiert.

Zusatz: Vor Gebrauch zu 1000 ml sterilisiertem auf 50 °C im Wasserbad (1.7.) temperiertem Nährboden sind 10 ml einer 0,1 %igen sterilfiltrierten TTC-Lösung (2, 3, 5-Triphenyltetrazoliumchlorid) hinzuzugeben und zu vermischen. Wahlweise kann Tryptose-Agar (Merck, Art. Nr. 10236) verwendet werden unter Zusatz von TTC-Lösung (s.o.).

- 1.14. Nährboden für Schimmelpilze und Hefen – nach Schmidt (1975):
 Malzextrakt 40,0 g; Hefeextrakt 2,0 g; Bengalrosa (Chroma GMBH) 0,06 g; Agar-Agar, frei von Hemmstoffen 11–13 g je nach Qualität; dest. Wasser 1000 ml; Marlophen 810® (= Nonylphenolpolyethylenglycoläther mit 10 ÄO; von diesem Tensid (Chem. Werke Hüls/Marl) wird eine 10 %ige (V/V) Lösung mit heißem dest. Wasser hergestellt und 10 ml / 1000 ml Nährboden zugesetzt).
 Der Nährboden wird 20 Minuten bei 121 °C im Autoklaven (1.1.) sterilisiert; der pH-Wert des gebrauchsfertigen Nährbodens soll 6,0 bis 6,2 betragen.
 Zusatz: Vor dem Gießen der Platten sind zu 1000 ml verflüssigtem auf 50 °C im Wasserbad temperierten Nährboden 1,0 ml Masarun® (Präparat der Pfizer GMBH, Karlsruhe; – Kombination von Oxytetracyclin und Polymyxin B) oder 1,0 ml steril filtrierte Oxytetracyclin-Lösung (5 % G/V) hinzuzugeben und zu vermischen.

Anmerkung: Bei verschiedenen Malzextrakt-Chargen können während des Autoklavierens störende Eiweißausflockungen auftreten. In diesem Fall wird der Malzextrakt in einem sterilen Kolben eingewogen und der sterilisierte kochendheiße Basisnährboden (Hefeextrakt, Bengalrosa, Agar-Agar, Marlophen) und Antibiotikum zugegeben (s.o.).

2. *Probenvorbereitung und -suspendierung*

Die Proben sind gründlich zu mischen. Klumpen werden gesondert unter aseptischen Bedingungen zerdrückt und mit dem übrigen Material vermengt.

- 2.1. Probenvorbehandlung: Körnerfrüchte, Chips und grobe Expeller für 30 Sekunden mit der Analysenmühle (1.6.) mahlen, Heu und Stroh zerkleinern (sterile Schere oder Brabender-Häcksler).
- 2.2. Probeneinwaage: Bei Behandlung mittels Schüttelapparat (1.3.) oder Ultra-Turrax (1.4.) Futtermittel in Kolben mit Suspendierungslösung (1.12.1.) einwiegen. Bei Stomacher-Behandlung Probe in Beutel einwiegen und die Suspendierungslösung zugeießen.
- 2.2.1. Mehlartige, geschrotete und gepresste Futtermittel: 10 g zu 90 ml Suspendierungslösung (Schütteln bzw. Ultra-Turrax) bzw. 20 g zu 180 ml (Stomacher) – Ausgangsverdünnung 1:10 (G/V).

- 2.2.2. Quellende Futterstoffe (Heu, Stroh; Grünmehl, Brauereinebenerzeugnisse und Leinprodukte): 10 g zu 190 ml Suspendierungslösung, im Stomacher behandeln – Ausgangsverdünnung 1:20 (G/V).
- 2.2.3. Gärfutter und verklumpte Futtermittel: 40 g zu 360 ml Suspendierungslösung, im Stomacher behandeln – Ausgangsverdünnung 1:10 (G/V).
- 2.3. Suspendierung: Die Ausgangsverdünnungen (2.2.) werden wie folgt hergestellt:
 Schüttelapparat (1.3.): 20 Minuten bei 130–150 U/min
 Ultra-Turrax (1.4.) : 30 Sekunden, vorher 20 min quellen lassen
 Stomacher (1.5.) : 5 Minuten, vorher 20 min quellen lassen

3. *Verdünnungsreihe und Befüllen der Kulturschalen*

- 3.1. Verdünnungsreihe: Von der Ausgangsverdünnung wird eine dezimale Verdünnungsreihe hergestellt, indem man 2 ml Ausgangssuspension zu 18 ml Verdünnungslösung (1.1.2.) pipettiert. Von diesen Verdünnungen werden weitere Verdünnungsstufen auf gleiche Weise hergestellt. Verdünnungsstufen nicht schütteln, nur umschwenken. Im allgemeinen sind wenigstens 3 aufeinander folgende Verdünnungsstufen herzustellen und zu untersuchen. Zu empfehlen sind:
 Für die Bestimmung der Bakterienkeimzahl: 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} ; in keimarmen Futterstoffen wie z.B. Pellets: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ; für die Bestimmung der Pilzkeimzahl: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ; in keimarmen Futterstoffen wie z.B. Pellets: 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ;
- 3.2. Übertragung der Verdünnungsstufen (3.1.) auf Petrischalen: 2 ml aus der zu untersuchenden Verdünnungsstufe in 4facher Wiederholung.
- 3.3. Nährbodenzugabe: Von dem verflüssigten und auf 50°C temperierten Nährboden sind mittels eines Abfüllgeräts (1.11.) 12 ml/Platte zu gießen. Nährboden und Suspension sind in der Platte zu mischen.
 Von jeder Nährbodencharge ist mindestens eine unbeimpfte Platte zur Kontrolle der Keimfreiheit der Nährböden zu gießen.
- 3.4. Bebrütung: Die fertig beschickten Platten werden mit dem Deckel nach unten im Brutschrank (1.2.) bei 27–28°C für 5 bis 6, bei langsam wachsenden Kolonien eventuell 7 Tage bebrütet.

4. *Zählung und Auswertung*

- 4.1. Auszählung der Platten: Auswertbar sind Kulturschalen mit 30 bis ca. 200 Kolonien bei den Bakterien und mit 25 bis ca. 120 Kolonien bei den Pilzen. Da sich im Laufe der Bebrütung die Koloniezahl ändern kann, ist das höchste Zählergebnis für die Berechnung der Keimzahl heranzuziehen.
 Laufkolonien sind als eine Kolonie zu werten, Sekundärkolonien sind nicht zu zählen! Kleine Kolonien sind mit der Lupe zu prüfen, (Verwechslung mit Futterpartikeln!)
- 4.2. Differenzierung nach Koloniemerkmalen: Bei der Auszählung ist zu beachten, daß sich auf dem Bakteriennährboden auch Hefen und Schimmelpilze entwickeln können. Diese Kolonien werden nicht ausgezählt. Ohne deutliche TTC-Reduktion wachsende Kolonien sind mikroskopisch zu überprüfen (Hefen oder Milchsäurebakterien).
 Der Schimmelpilznährboden erfaßt auch Hefen sowie gelegentlich Antibiotikaresistente Bakterien. Die Anzahl der Hefen bzw. ihr Anteil an der Flora kann gesondert angegeben werden. Allenfalls auftretende Bakterienkolonien sind von der Auszählung auszunehmen.
- 4.3. Berechnung der Keimgehalte: Die Keimzahl pro g Einwaage errechnet sich durch Multiplikation des Mittelwertes aus den Platten der auszählbaren Verdünnungsstufe mit dem dazugehörigen Verdünnungsfaktor (reziproker Wert der Verdünnung). Da 2 ml Suspension zur Beimpfung der Platten einpipettiert werden, ist

mit dem Faktor $F = \frac{1}{2}$ zu multiplizieren. Falls die Einwaage verändert werden muß (z.B. stark quellende Stoffe), ist ein entsprechender Umrechnungsfaktor einzusetzen.

4.4. Angabe der Resultate:

Bakterienkeimzahl: in Millionen/g, Pilzkeimzahl: in Tausend/g. Unter- oder überschreitet die Koloniezahl den Erfassungsbereich der angelegten Verdünnungsstufen, so kann die Angabe der Keimzahl mit „kleiner als“ (<) oder „größer als“ (>) erfolgen, soweit dies die Untersuchungsaufgabe gestattet.

Prüfung der Methode

Der Schimmelpilznährboden ließ sich bislang nicht durch ein Handelspräparat (Fertignährboden) ersetzen. Er erfüllt nicht nur die Wachstumsansprüche vieler verderberregender und toxinogener Pilze sowie mancher Hefen, sondern führt auch zur Ausbildung nicht wuchernder, charakteristischer Kolonien. Es wird damit möglich, die Zusammensetzung einer Mykoflora zu bestimmen, um so Informationen über Art und Umfang eines etwaigen Befalls zu bekommen. Die Ermittlung der Pilzkeimzahl kann daher mit einer Identifizierung der erhaltenen Kolonien verbunden werden, aus der vielfach weiterführende Aufschlüsse über die Bedeutung einer Flora zu erhalten sind (SCHMIDT, 1975). Die Differenzierung des Zählergebnisses ist nicht zuletzt eine Voraussetzung, um zu einer Aussage über die Produkthygiene zu kommen.

Den Substratansprüchen der in Futterstoffen verbreitet auftretenden *Bakterien* genügt auch der Tryptose-Agar (Merck, Art. Nr. 10237), wie aus dem Vergleich (Tab. 1) ersichtlich ist.

Tab. 1
Nährbodenvergleich für die Ermittlung der Bakterienkeimzahl
Comparison of culture media for the enumeration the bacterial counts
 Keimzahlmittelwert (Mio/g) bei n = 7 Teilnehmern

Bakterien-Nährboden	Rinder-mastfutter	Weizen-bollmehl	Tapioka-mehl	Sporenstandard (BGA)
I Nährboden SCHMIDT (1968)	0,95	0,33	7,79	8,31
II Tryptose-Agar (Merck)	0,94	0,30	8,36	8,96
Relation I/II	1 : 0,99	1 : 0,93	1 : 1,07	1 : 1,08

Die beschriebene Methode wurde von 1973–1980 in Ringuntersuchungen geprüft. An diesen Untersuchungen beteiligten sich fallweise insgesamt 12 Fach-Laboratorien von Landwirtschaftlichen Untersuchungsanstalten (LUFA), Universitäten und Tiergesundheitsdiensten.

In diesen Enquêtes wurden 30 Futtermittelproben auf den Bakteriengehalt und 15 weitere Proben auf den Schimmelpilzbesatz geprüft (Tab. 2 und 3). Außerdem wurden Sporensuspensionen in Ampullen mit *Bacillus subtilis* (BGA) zur Prüfung der Arbeits-

genauigkeit der Untersuchungsstellen und ein Lyophilisat von Milchsäurebakterien (*Lactobacillus plantarum* var. *plantarum*) verschickt als Modell-Substanz für eine homogene Mikroorganismenverteilung (Tab. 2).

Ausgewertet wurden die Ergebnisse hinsichtlich des gemeinsamen Mittelwertes (\bar{x}) und der Standardabweichung ($s \pm \%$ von \bar{x}).

Tab. 2
Ergebnisse der Ringuntersuchungen 1973 – 1980 zur Bestimmung der Bakterienkeimzahl
Results of expert inquiries 1973 – 1980 of the enumeration the bacterial counts

Probe	Enquête-Jahr	Teilnehmerzahl (n)	Mittelwert \bar{x} (Mio/g)	Standard-Abweichung $s (\pm \%)$
BGA-Sporenstandard I	1974	6	8,71	9,6
BGA-Sporenstandard II	1974	8	8,46	8,2
BGA-Sporenstandard II	1979	8	156,3	7,1
Lactobacillen-Lyophilisat	1975	6	45,37	22,6
Weizenbollmehl	1974	8	0,406	14,2
Sojaextraktionsschrot	1975	7	6,33	19,0
Sojaextraktionsschrot	1976	8	5,24	22,5
Kokosexpeller	1980	8	0,262	21,2
Tapioka	1973	7	33,82	14,7
Tapioka	1974	8	10,62	20,8
Biertreber	1976	7	1049,8	27,4
Malzkeime	1977	6	103,8	28,7
Malzkeime	1978	6	1239,8	24,1
Malzkeime	1979	5	47,8	20,6
Fischmehl	1977	6	0,082	20,3
Tiermehl	1978	6	0,222	19,1
Tiermehl I	1979	5	0,543	16,5
Tiermehl II	1979	9	0,126	21,9
Milchaustauschfutter	1973	7	0,174	14,4
Milchaustauschfutter	1976	8	0,971	24,8
Kälbernährmehl	1975	6	2,86	14,7
Rindermastfutter	1974	8	1,11	16,1
Rindermastfutter	1975	7	1,61	32,8
Schweinefutter	1973	7	0,409	15,5
Schweinefutter	1980	11	1,47	29,1
Schweinefutter, gepreßt	1977	5	1,12	7,3
Schweinefutter, gepreßt	1979	5	2,32	27,3
Ferkelaufzuchtfutter	1979	7	1,91	22,6
Eiweißkonzentrat	1975	6	0,735	29,0
Eiweißkonzentrat	1979	5	0,228	4,9
Geflügelfutter, gepreßt	1978	6	0,046	14,8
Geflügelfutter, gepreßt	1980	11	0,575	16,1
Pferdefutter, gepreßt	1978	6	0,681	9,7
Kaninchenfutter, gepreßt	1979	9	3,69	27,6

Tab.3

Ergebnisse der Ringuntersuchungen 1973 – 1979 zur Bestimmung der Schimmelpilzkeimzahl
Results of expert inquiries 1973 – 1979 of the enumeration the mould counts

Futtermittel	Enquête-Jahr	Teilnehmerzahl (n)	Mittelwert \bar{x} (Tsd/g)	Standard-Abweichung s (\pm %)
Getreideschrot	1974	8	37,4	13,7
Weizenkleie	1978	8	2270,0	13,1
Maisschrot	1974	8	394,5	18,4
Maisschrot	1978	8	237,1	15,5
Maismehl	1975	7	61,2	13,8
Tapiokamehl	1973	6	146,3	12,2
Tapiokagrieß	1976	7	325,7	14,4
Mälzereiabfälle	1976	8	323,8	20,7
Milchaustauschfutter	1973	7	1,9	18,9
Milchaustauschfutter	1978	8	23,3	15,4
Schweinemastfutter	1973	7	162,8	15,0
Futtermischung, gesiebt	1975	7	48,6	16,2
Mischfutter	1975	7	24,9	9,1
Mischfutter	1979	9	103,8	21,3
Mischfutter	1979	9	26,9	13,0

Reproduzierbarkeit der Methode

Aussagen über die Brauchbarkeit der Methode werden nur möglich, wenn die labor-internen Fehlerquellen erkannt und vermieden werden können. Aus den Erfahrungen dieser Enquêtes zur Keimgehaltsbestimmung ergab sich, daß bei Einhaltung der Methoden-Vorschrift eine recht befriedigende Übereinstimmung in der Keimzahlermittlung des Sporenstandards ($s = \pm 7,1$ bis $9,6$ %) durch verschiedene Untersucher im Bundesgebiet erreicht werden konnte. Untersuchungsergebnisse, deren Standardabweichungen erheblich darüber hinaus gingen, ließen sich z.T. mit subletaler Schädigung der Keime (Lyophilisat, Tab. 2), der ungleichen Verteilung der Mikroorganismen an den Futterpartikeln sowie der Labilität einer Mikroflora erklären.

Die Vergleichbarkeit der Untersuchungsergebnisse ist mit Standardabweichungen zwischen $\pm 9,1$ und $21,3$ % bei den Schimmelpilzenquäten recht befriedigend, zumal nur in 2 Fällen $s > \pm 20$ % war. Bei den Bakterienkeimzählungen bewegten sich die Standardabweichungen in einem weiteren Bereich, d.h. von $4,9$ bis $32,8$ %, darunter befanden sich 7 von 30 Futterproben, bei denen $s \pm 25$ % überstieg.

In diesem Zusammenhang sei auf Untersuchungen von WERNERY (1971) sowie WERNERY und HILLIGER (1973) hingewiesen, die bei der Prüfung von zwei Mischfuttermitteln bei 28 bzw. 10 Versuchsansätzen als Maß für die Wiederholbarkeit in einem Untersuchungslabor recht hohe Standardabweichungen von $\pm 29,3$ bzw. $\pm 29,1$ % mit einer anderen als der beschriebenen Methode errechneten.

Zusammenfassung

Es wird die von den Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalten angewendete Gußplatten-Standardmethode zur Bestimmung der Bakterien- sowie der Pilzkeimzahlen in Futtermitteln beschrieben. Die Arbeitstechnik und die verwendeten

Nährböden einschließlich Zusätze wurden in mehrjährigen Ringuntersuchungen überprüft und ihre Anwendbarkeit und Reproduzierbarkeit bei verschiedenen Futtermitteln und Standard-Präparaten verglichen.

Die Methodik wird ebenfalls von der Sektion Mikrobiologie der Internationalen Arbeitsgruppe für Futtermitteluntersuchung (IAG) empfohlen, deren Mitglieder an den Ringuntersuchungen beteiligt waren, sowie von der Internationalen Gesellschaft für Getreidechemie (ICC), Arbeitsgruppe Nr. 20, „Mikrobiologische Untersuchungsmethoden“.

Summary

SCHMIDT, H. L., BUCHER, E. und SPICHER, G.: *Keimgehaltsbestimmung von Bakterien, Schimmelpilzen und Hefen in Futtermitteln – Nährböden und Methodik (Evaluation of the numbers of bacteria, moulds and yeasts in feeding stuffs – culture media and method)*.

Landwirtsch. Forsch. **34**, 1981

The standard-method for estimating the bacterial and fungal numbers in feed-stuffs using a plate-count technique, accepted by the Agricultural Experiment and Research Stations, is described. The working technique and the culture media inclusive additions were tested for several years by expert inquiries, in course of which the practicability and reproducibility was compared at various feeding-stuffs and standard-preparations.

The method also is employed by the Section of Microbiology of the International Working Group for Feed-Examination (IAG), the members of which participated in testing the method, and the International Association for Cereal Chemistry (ICC), Working Group Nr. 20 for Microbiological Methods.

Résumé

SCHMIDT, H. L., BUCHER, E. und SPICHER, G.: *Keimgehaltsbestimmung von Bakterien, Schimmelpilzen und Hefen in Futtermitteln – Nährböden und Methodik (Détermination du nombre de bactéries, moisissures et levures dans les aliments du bétail – milieu nutritif et méthodologie)*.

Landwirtsch. Forsch. **34**, 1981

La méthode standard à plaque coulée pour déterminer le nombre de bactéries et germes fongueux dans les aliments du bétail, appliquée par les institutions de recherche et l'investigation agricoles, est décrite. La technique de travail et le milieu nutritif appliqué inclus additions ont été examinés dans recherches à cercle de plusieurs années. L'applicabilité et la reproductibilité ont été comparés chez aliments du bétail différents et préparations standard.

Cette méthodologie est aussi recommandée par la section de microbiologie du groupe de travail international pour la recherche des aliments du bétail (IAG), les membres de laquelle ont participé à les recherches à cercle, ainsi que par la société internationale pour la chimie des céréales (ICC), groupe de travail méthodes d'investigation microbiologiques (Nr. 20).

Literatur

BUCHER, E.: Nachweis und Systematik grampositiver Bakterien in Futtermitteln. *Bodenkultur* **24**, 390–401, 1973

BUCHER, E.: Möglichkeiten der mikrobiologischen Beurteilung des Frischezustandes von Futtermitteln. *Landwirtsch. Forsch., Sonderh.* **30/1**, 238–246, 1974

- ICC-Standard Nr. 133: Methode zur Bestimmung der Keimzahl aerober und fakultativ anaerober, mesophiler Bakterien (Gußplattenverfahren) in Getreide, Getreideprodukten und Futtermitteln.
- ICC-Standard Nr. 134: Methode zur Bestimmung der Pilzkeimzahl (Gußplattenverfahren) in Getreide, Getreideprodukten und Futtermitteln. ICC-Standards der Internationalen Gesellschaft für Getreidechemie (ICC). Verlag Moritz Schäfer, Detmold 1980
- SCHMIDT, H. L.: Bemerkungen zur Vereinheitlichung der Keimzählung bei der Untersuchung von Futtermitteln. *Landwirtsch. Forsch.* **16**, 51–64, 1963
- SCHMIDT, H. L.: Zur Mikrobiologie der Handelsfuttermittel. *Landwirtsch. Forsch.* **21**, 146–163, 1968
- SCHMIDT, H. L.: Über Vorkommen und Häufigkeit von hohen Pilzkeimzahlen sowie einzelner Pilzarten in Futtermitteln. *Landwirtsch. Forsch.* **28**, 224–234, 1975
- SPICHER, G.: Die Ermittlung des Keimgehaltes von Getreide und Getreideprodukten und ihre Problematik. *Brot und Gebäck* **16**, 124–134, 1962
- SPICHER, G.: Beiträge zur Vereinheitlichung der Ermittlung des Keimgehaltes von Getreide und Getreideprodukten. II. *Mitt. Brot u. Gebäck* **23**, 61–69, 1969
- SPICHER, G.: Studien zur Frage der Hygiene des Getreides. *Zentralbl. Bakt., Parasitenkde, Infektionskrh., Hygiene, Abt. II*, **127**, 61–81, 1972
- SPICHER, G.: Bestandsaufnahme über die Methodik zur mikrobiologischen Beurteilung von Futtermitteln (Ergebnis einer ICC-Umfrage). *Getreide, Mehl, Brot* **30**, 94–100, 1976
- SPICHER, G.: Beiträge zur Vereinheitlichung der Ermittlung des Keimgehaltes von Getreide und Getreideprodukten, III. *Mitt. Getreide, Mehl, Brot* **31**, 283–288, 1977
- WERNERY, U.: Einfluß von Schüttelart, Schüttelzeit und Absetzzeit auf die Zahl der nachweisbaren Keime bei der mikrobiologischen Untersuchung von Mischfuttermitteln. Inaugural-Diss. Freie Universität Berlin, 1971
- WERNERY, U., u. H. G. HILLIGER: Beitrag zur Technik und Bewertung der Keimzahlbestimmung bei mehllartigen Futtermitteln. *Landwirtsch. Forsch.* **26**, 110–117, 1973