



Gesamtkeimzahl KBE im Brauwasser u.a. KBE - Kolonie bildende Ein- heiten aerober mesophiler Keime



**BrauLabor
11**
Physik / Chemie
Biologie

**Keimzahlen
KBE-Einheiten**

| | | | | |
|---------------------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------------------|----------------------------|
| Aufwand: mittel-gross | Material: gross | Zeit: mittel | Experimenttyp: Untersuchung | Anspruch: mittel |
|---------------------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------------------|----------------------------|

I. Einführung "Keimzahlen"

Die bakteriologische Wasseruntersuchung ist die wichtigste Prüfmethode zur Beurteilung der Hygiene. Bakterien ("Keime") sind vermehrungsfähig. Die von krankheitserregenden Keimen ausgehende Gefahr ist daher sehr viel grösser und unüberschaubarer als die Gefahr, die von giftigen Stoffen im Wasser ausgeht. Letztere können u.U. durch Verdünnung mit einwandfreiem Wasser auf eine dem Menschen ungefährliche Konzentration gebracht werden. Bei Keimen kann dieses Prinzip nicht angewendet werden, da sich die Mikroorganismen meist exponentiell vermehren können, sofern ausreichende Nährstoffmengen zur Verfügung stehen.

Jedes Wasser enthält Keime

An der Erdoberfläche findet man in 1 g Erdboden rund 25 Milliarden lebender Einzelbakterien. Mikroorganismen haben unterschiedliche Wege gefunden, sich zu verbreiten, so über die Luft und verschiedenste Wasserwege. Ein wichtiger ist auch der über die Darmausscheidungen (Gülle, Mist → bei Regen Eintrag in Gewässer; Abwasser; ungewaschene Hände u.a.). 20-30% des Kots besteht aus Bakterien.

Die Fäkalien bestehen zum grössten Teil aus unappetitlichen, aber harmlosen Bestandteilen. Aber daneben werden auch Krankheitserreger (pathogene Mikroorganismen) ausgeschieden, die auch in kleinen Mengen schwere Erkrankungen hervor rufen können. Da es unmöglich ist in Routineuntersuchungen heraus zu finden, ob und mit welchem Keim eine Probe verunreinigt ist, ist es wichtig, das Trinkwasser zu jeder Zeit frei von Fäkalien zu halten.

Mikroorganismen in Flüssigkeiten wie Trinkwasser

In den meisten Flüssigkeiten sind naturgemäss mikrobielle Keime enthalten. Lebensmittel und Trinkwasser dürfen Inhaltsstoffe, Zusatzstoffe, Fremdstoffe und Mikroorganismen nur soweit enthalten, als dadurch die Gesundheit nicht gefährdet werden. Nach der Schweizerischen "Lebensmittel- und Gebrauchsgegenständeverordnung" vom 16. Dezember 2016 (LGV) werden als Mikroorganismen folgende Gruppen von Kleinstlebewesen definiert:

- Viren (Sommergrippe, Hepatitis, Kinderlähmung, u.v.a.)
- Bakterien (Kolibakterien, Salmonellen, Legionellen, u.v.a.)
- Parasiten (Giardia, Cryptosporien, u.a.)
- Schimmelpilze und Hefen
- Algen
- mikroskopisch kleine Würmer (Einheiten, die Zoonosen verursachen können).

Viele dieser Mikrolebewesen sind für Mensch und Tier harmlos, die meisten neutral oder nützlich. Nicht wenige reinigen sogar die Umweltgewässer wie Fliessgewässer (natürliche Selbstreinigung). Andere allerdings sind wiederum für schwere Erkrankungen verantwortlich und haben deshalb keine Berechtigung in Lebensmittel, worunter natürlich auch das Trinkwasser fällt. Je keimärmer Wasser ist, desto geringer ist ein Infektionsrisiko. Insbesondere dürfen keine Fäkalbakterien in Trinkwasser nachzuweisen sein.

Laufende amtliche Wasserüberwachung

Die Wasserqualitäten unterliegen einer strengen Überwachung und in den verschiedenen Verordnungen sind Höchstwerte festgelegt.

Für die laufende Wasserüberwachung werden häufig zwei Kriterien (KBE & EC), neuerdings drei Kriterien (KBE, EC & SC) benutzt:



1. **“Gesamtkoloniezahl” KBE:** Die Bestimmung der **Koloniezahl**, d.h. die Bestimmung der auf einem bestimmten Nährmedium vermehrungsfähigen Keime (KBE: Kolonie-bildender Einheiten) → **gesamte mikrobielle Belastung**.
2. **Fäkalbakterien EC:** Der Nachweis von **Fäkal-Indikatorkeimen** wie **Escherichia coli**, d.h. Keimen, die aus Darm von Mensch und Tier stammen und auf eine fäkale Verunreinigung des Wassers und damit auf erhöhte Wahrscheinlichkeit der Anwesenheit von Krankheits- und Seuchenerregern schliessen lassen. Das Ergebnis “keine Coli” heisst aber nicht unbedingt, dass das Wasser von einwandfreier Qualität ist, können doch resistendere Mikroorganismen oder gar Viren immer noch unerkannt vorhanden sein → **fäkale Verunreinigung**.
3. **Desinfektionstest SC:** Der Nachweis von sulfitreduzierenden **Clostridien**, d.h. eine Gruppe von Bakterien, die in der Lage sind, Sporen (Überdauerungsformen) zu bilden und in dieser Form teilweise härtere Umweltbedingungen, wie z.B. auch eine Desinfektion zu überleben → **Überprüfung der Desinfektion**.

Gesamtkoloniezahl: Eine plötzliche Erhöhung der Koloniezahl kann zum Beispiel bei Grundwasser auf eine Überforderung der Filtrationskraft des Bodens (Regenperiode, Schneeschmelze) oder auf mangelnde Entkeimung hindeuten, in einem Oberflächengewässer auf eine Verunreinigung durch Abwasser. Im Trinkwasser sind Abweichungen vom normalen KBE-Wert Anzeichen einer

Escherichia coli: Als sicherer Fäkalienindikatorkeim wird hauptsächlich das Bakterium **Escherichia coli** benutzt. E. coli wird in grosser Zahl im Darminhalt des Menschen und warmblütiger Tiere angetroffen. Ihr Nachweis im Wasser gilt als Zeichen einer fäkalen Verunreinigung mit allen sich daraus ergebenden Konsequenzen: pathogene (krankheitserregende) Mikroorganismen, Seuchengefahr, Übertragungsgefahr. Wenngleich nur etwa 10% aerob wachsende (O₂-bedürftige) Bakterien im menschlichen Stuhl vorhanden sind - knapp 2% davon sind Colibakterien und etwa 0.5% Enterokokken - scheidet der Mensch doch täglich etwa 500 Billionen (5×10^{14}) bis zur einer Trillion (10^{15}) Kolibakterien aus. Daneben wird auch gelegentlich auf andere coliforme Bakterien und auf Enterokokken (Streptokokken) geprüft. Die **coliformen Bakterien** können fäkalen Ursprungs sein, ihr Hauptvermehrungsort haben sie jedoch im Abwasser und Oberflächenwasser; ihr Nachweis im Wasser gilt so lange als Zeichen einer fäkalen Verunreinigung, bis ihre nicht-fäkale Herkunft gesichert ist. Alle diese Indikatorkeime lassen sich auf geeigneten Nährböden selektiv, d.h. unter Unterdrückung anderer Keime, vermehren.

Desinfektionstest auf sulfitreduzierende Clostridien (auch: sulfitreduzierende sporenbildende Anaerobier): zeigen Verunreinigungen an, welche fäkaler Natur sein können. Diese Verunreinigungen können, durch die Sporenresistenz bedingt, bereits sehr lange zurückliegen. Die Sporen können Desinfektionsmassnahmen widerstehen. Beim Nachweis von sulfitreduzierenden Clostridien werden sowohl humanmedizinisch bedeutsame Arten wie der Gasbranderreger **Clostridium perfringens**, aber auch unproblematische (apathogene) Clostridienarten erfasst.

2. Bestimmung der “Keimzahlen” als KBE - Kolonie bildende Einheiten

Im Folgenden wird ein zentrales Verfahren zur Bestimmung von Höchstwerten im Rahmen der Lebensmittelüberwachung kurz charakterisiert. Zum einen wird die **totale Anzahl Keime** bestimmt. Zum anderen wird, wie in der Einführung beschrieben, auf einzelne Mikroorganismen zurückgegriffen, welche als **Indikatoren für spezifische Kontaminationen** benutzt werden, so vor allem Escherichia coli. Daher darf Trinkwasser wohl eine gewisse Anzahl aerober, mesophiler Keime, aber keine E. coli Bakterien enthalten. Die entsprechenden gesetzlichen Toleranzwerte in der Schweiz für Trinkwasser sind laut Hygieneverordnung des EDI (**SR817.024.1**):

| Trinkwasser | Untersuchungskriterien | Toleranzwerte (KBE) |
|--------------------------|----------------------------------|-----------------------|
| an der Fassung | aerobe, mesophile Keime - E.coli | 100/mL - nn/100 mL |
| im Verteilnetz | aerobe, mesophile Keime - E.coli | 300/mL - nn/100 mL |
| abgefüllt in Behältnisse | aerobe, mesophile Keime - E.coli | nn/100 mL - nn/100 mL |

nn = nicht nachweisbar aerob: sauerstoffbedürftig; mesophil: optimal bei "mittleren" Temperaturen, d. h. ungefähr zw. 20 und 45 Grad Celsius wachsen.

Verfahren:

Bei der Bestimmung der Gesamtmenge der vorhandenen Keime wird ein nicht-selektives Nährmedium eingesetzt: Selektive Medien lassen fast nur eine spezielle Art bzw. Gruppe von verwandten Mikroorganismen wachsen. Je nach Probengröße oder festgelegtem Höchstwert werden 1. der **Flächenausstrich** (syn. Spatelplattenverfahren, Ausplattieren, Abb. 1) oder 2. die Membranfiltertechnik (Filtration einer bekannten Probenmenge, meist 100 mL durch einen Membranfilter der Porengröße 0.45 μ m) gewählt. Für den Heimbrauer ist das 2. Verfahren zu aufwändig, daher wird der Flächenausstrich bevorzugt: eine genau definierte Volumenmenge wird mit der ausgewählten Pipette auf einen vorher gegossenen Spezialagar pipettiert und mit einem Glasspaten möglichst gleichmässig verteilt. Jede dabei auf der Agaroberfläche verteilte Einzelzelle bzw. manchmal auch Cluster von Zellen ("verklebte Zellen") entwickeln sich infolge des mikrobiellen exponentiellen Wachstums (1 Zelle \rightarrow 2 Zellen \rightarrow 4 Zellen \rightarrow etc.) zu einer Kolonie ("Zellanhäufung"), die je nach **Generationszeiten** der verschiedenen **Mikroorganismen nach einer bestimmten Inkubationszeit (Bebrütungszeit) von bloßem Auge ausgezählt werden kann**. Da die Koloniebildung nicht notwendigerweise immer von Einzelzellen ausgeht, benutzt man häufig anstelle von "Keimzahl" die Bezeichnung "**Kolonie bildende Einheiten**" (**KBE**) oder engl. cfu (colony forming unit). Dieses Verfahren wird für die Bestimmung von Keimzahlen in kleinen Probenvolumina gewählt (z.B. 0.1 mL).

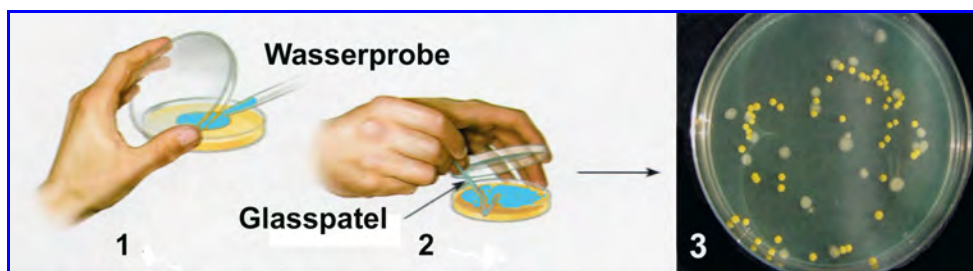


Abb. 1. Das Spatelplattenverfahren (Flächenausstrich, Ausplattieren, Vereinzelung und Vermehrung) zur Bestimmung von "Gesamtkeimzahlen" sauerstoffbedürftiger, mittlerer Temperaturen bevorzuger mikrobieller Keime (cf. auch Abb. 7).

1: Eintrag eines genau definierten Wasservolumens (z.B. 0.1 mL) auf die sterile Nähragaroberfläche in einer Petrischale. **2:** Gleichmässiges Verteilen der Wassermenge auf der Agaroberfläche durch kombinierte sorgfältige Kreisbewegungen der Petrischale und gleichzeitiges Hin- und Herziehen des Glasspatels. **3:** Resultat nach wenigen Tagen Bebrütung: von bloßem Auge sichtbare Kolonien (aus 10^7 - 10^9 Zellen bestehend, je nach Mikroorganismenart und Koloniedurchmesser).

Brauwasser = Trinkwasser:

Dass der Braurohstoff Wasser, auch als Körper des Bieres bei einem Massenanteil von 80-95% nicht einfach H_2O ist, sondern eine Lösung verschiedenster Stoffe darstellt - mit den für den Brauprozess wichtigsten 6 Ionen **Karbonate/Bikarbonate CO_3^{2-}/HCO_3^- , Calcium Ca^{2+} , Magnesium Mg^{2+} , Chlorid Cl^- , Natrium Na^+ und Sulfat SO_4^{2-}** wurde in den bisherigen 10 physikalisch-chemischen Braulaboren aufgezeigt. In den allermeisten Fällen kann das Trinkwasser nach einer leichten Wasseraufbereitung, sei es z.B. durch Milchsäurezugabe (Säureenthärtung) oder Aufsalzen (z.B. durch Zugabe von Braugips $CaSO_4$) verwendet (cf. Website MUG-Mikrobrauerei > [Brauwasser](#) > 4. Brauwasser Aufbereitungsverfahren). Vom mikrobiologisch-hygienischen Aspekten spricht kaum ein Brauer, was i.d.R. auch gar nicht notwendig ist. Denn wir sind in den deutschsprachigen Ländern (und vor allem im "Wasserschloss Europas", der Schweiz) i.d.R. verwöhnt mit einer Spitzenqualität, was die mikrobielle Seite anbelangt. Das Wasser wird trinkfähig mit einer kontrollierten gesundheitlich und prozesstechnisch Spitzenqualität direkt ins Haus geliefert, auch wenn es kein Quellwasser ist, sondern aufbereitetes Wasser z.B. aus dem Bodensee (St.Gallen, Stuttgart, u.a. [vgl. Links unter [Brauwasser](#) > 2.12. Kenngrösse 11: Die MIKROBIOLOGISCHEN Kenngrössen]).

Das Brauwasser wird zudem im Verlaufe des Sudprozesses über längere Zeit (60 - 90 min) zum Sieden gebracht und dadurch sterilisiert.

Wie im "[Physikalisch-chemischen Braulabor](#)" dieser Website unter "3.11.3. Nachweis von aeroben mesophilen Mikroorganismen ("Gesamtkeimzahl") - Warum "Keimzahlen" bestimmen?" aufgeführt, gibt es neben der reinen wissenschaftlichen Neugier und Experimentierfreude interessante Fragestellungen und Gebrauchsobjekte, um der Keimzahlfrage nachzugehen (Stichworte: abge-

standenes Wasser, nährstoffreicheres Wasser, Biofilmentwicklung, dest./ention. Wasser, mikrobielle Kontamination von Gerätschaften wie z.B. nichtsterile Pipetten und nichtentkeimte Schläuche/Gefäße zur Probeentnahme, Abziehhöhre und Heber zum Abfüllen, Messinstrumente wie Bierwürzespindeln, Kontaminationen während Gär- und Abfüllprozesse, u.a.). Zudem können mit der im folgenden beschriebenen Keimzahlbestimmungsverfahren und geeigneten Selektivnährmedien auch echte Bierschädlinge nachgewiesen werden (vgl. Mikrobiologisches Braulabor - Braulabor 31 Nachweis von Bierschädlingen - in Bearbeitung).



Kernwissen für Braupraxis:

Keimzahlbestimmungen im Brauwasser und wässrigen Lösungen: Spatelplattenverfahren

Als Brauwasser wird i.d.R. Trinkwasser verwendet, höchstens leicht aufbereitet. Dies wird vom Trinkwasserversorger meist in mikrobiologisch-hygienischer Hinsicht in einwandfreier Qualität, unabhängig von dem Wasserbezugsort (Quelle, Grundwasser, See). Zudem wird das Brauwasser im Sudprozess (Würzpfanne) während 60-90 min. Zum Kochen erhitzt, was (fast) einer Sterilisation entspricht.

Einsatzbereiche zur Keimzahlbestimmung ergeben sich in Spezialfällen wie Kontaminationen (mikrobielle Verunreinigungen durch Gerätschaften, Probeentnahmen, Abfüllverfahren, Lagerung). Die Bestimmungstechnik beruht auf einem Flächenausstrich bzw. Ausplattieren eines kleinen, genauen Probenvolumens (meist 0.05 - 0.2 mL = 50-200 ÷ L). Je nach Verwendung eines spezifischen Nährbodens können mit der gleichen Technik auch Indikatororganismen wie *Escherichia coli* oder allg. Bierschädlinge nachgewiesen werden.



Mit dem Verfahren der Keimzahlbestimmung als KBE (Kolonie bildende Einheiten), auch als Flächenausstrich bzw. Spatelplattenverfahren oder Ausplattieren bezeichnet, wird eine einfaches Verfahren vorgestellt, das eine Abschätzung der hygienischen Qualität wässriger Medien erlaubt. Dieses grundlegende Verfahren hat eine breite Anwendung, auch zur Bestimmung von Bierschädlingen.

Materialien

| | |
|--------------------------------------|--|
| Glaswaren Geräte, andere Materialien | Petrischalen steril, Drigalski-Glasspatel, sterile Probeentnahmegefäße (z.B. RG mit Verschluss wie Alukappe oder Alufolie, EMK), kleine Bechergläser, Gefäß mit Deckel (als Alkoholgefäß, um Drigalski-Glasspatel darin keimfrei zu lagern). Pipetten: Kunststoff-Einweg-Pasteurpipetten, evtl. mit Volumenangabe [1 mL, 0.25 mL-Eichung], oder Glas-Pasteurpipetten mit Gumminuggi, oder 1-mL-Messpipetten aus Glas mit 0.01-mL-Einteilung (bzw. 0.20 mL, 0.001 mL Graduierung; vgl. Abb. 6), oder Dispenser-Mikropipette (mit variabler Volumeneinstellung, z.B. 100-1'000 ÷ L) inkl. Einwegspitzen (Info). Für Volumeneichung bei Pasteurpipetten: 5 ml oder 10 mL Messzylinder, kleines Becherglas. |
| Verbrauchsmaterial | Haushaltpapier, Kosmetiktüchlein, wasserfester Faserschreiber |
| Chemikalien | Für KBE: Standard-Nährbouillon (Info) und Agar-Agar (Info , oder Agar-Agar aus einem Reformhaus (z.B. Info)) oder fixfertiger Standard Nähragar I (Info). Für coliforme Bakterien: Coli-Agar (coliforme chromogener Agar, Info , Info), oder ENDO-Agar (Info , Info). Für Bierschädlinge: Universal-Bier-Agar (Info , Info , Einsatz/Kultivierung: Info). Dest./ention. Wasser. Evtl. Verschiedene Desinfektions- und Reinigungsmittel |
| Untersuchungsmaterial | Brauwasser (Trinkwasser ab Wasserhahn, evtl. aufbereitetes Brauwasser), weitere Wasserproben bzw. Proben wässriger Lösungen (vgl. Pkt. I "Beschaffung der Wasserproben") |

3. Bestimmung der Keimzahlen als KBE im Brauwasser bzw. wässriger Proben

I. Beschaffung der Wasserprobe(n) bzw. wässriger Flüssigkeitsproben

- Trinkwasser ab Leitungshahn: Wasser sollte zunächst einige Minuten fließen um die "echte" Keimzahl zu erfassen (abgestandenes Wasser z.B. über Nacht weist immer höhere Keimzahlen auf)
- abgestandenes Trinkwasser (Zeit festhalten)
- dest. bzw. entionisiertes Wasser aus der Spritzflasche
- mit einem definierten Volumen an abgekochtem Wasser Gerätschaften mit Kontakt zur Bierwürze, Bier etc. spülen
- Bier während Reifung und nach dem Abfüllen
- selbstgebrautes Bier aufbewahrt während längerer Zeit im Kühlschrank oder bei Umgebungstemperatur



- gekauftes "Profibier" einer Kleinbrauerei (meist nicht pasteurisiert) und einer Grossbrauerei (Kurzeiterhitzung (KZE), oder durch Tunnelpasteurisation, cf. [hier](#))
- nicht pasteurisiertes Bier (z.B. unter verschiedenen Lagerbedingungen wie gekühlt vs. ungekühlt)
- offen stehen gelassenes Bier (evtl. Zeit des offen stehen Lassens festhalten)
- Proben aus verschiedene Phasen des Brauprozesses im Vergleich (z.B. frisches Brauwasser, Einmaischen, anfangs Sud [bei verschiedenen Temperaturen], Ende Sud, Gärbehälter, aus abgefüllter Bierflasche)
- frische und eingesetzte Braureinigungslösung kommerzieller Produkte (z.B. PBW, Star San HB Five Star [\[Info\]](#)) oder frische und eingesetzte Desinfektionslösungen (z.B. Halapur MP [\[Info\]](#) oder Chemioxi pro)
- abgekratzte Proben (mit z.B. sterilem* Skalpell oder Taschenmesser gewonnen [*: mind. 60 sec lang in 65-70%igem Ethanol oder Isopropanol eintauchen]) von Oberflächen im Braukessel, an Dichtungen, in Spalten und Ritzen (= sog. Biofilme) können bierschädliche Mikroorganismen enthalten (z.B. Lactobacillen, wie Lactobacillus brevis oder Pediococcus damnosus u.v.a.)

—> **Wichtig: alle Proben sollten ein kleines definiertes Volumen aufweisen (bzw. bei trockenen Proben: diese in eine sterile Wasserprobe von bekanntem Volumen überführen)**



Abb 2. Wässrige Proben zur Keimzahlbestimmung - einige Anregungen. Proben von links nach rechts:

Trinkwasserproben (kaltes Leitungswasser frisch, abgestandenes Leitungswasser, heisses Wasser aus Boiler); dest./ention. Wasser, selbstgebrautes Bier, kommerzielles Bier, frisch eingeschenktes Bier, abgestandenes Bier; PBW-Reinigungslösung aus Gärbehälter [PBW = Waschgranulat, [PBW](#)], Chemipro oxilösung aus Gärbehälter [Chemipro oxi = Desinfektionsgranulat, [Info](#)].

2. Vorbereitung zur Keimzahlbestimmung:

2.1. Herstellung der Nährbodenplatten mit Nähragar:

- Für **Bakterien allgemein - KBE-Wert**: cf. "Mikrobiologische Grundlagen zur Hefezüchtung Teil I [hier](#) > "Braulabor 8: Nährmedienzubereitung für Hefen und Bakterien" (Nährmedien cf. 2.3.2. Nährmedien für bakterielle Mikroorganismen" > Festes Nährmedium für Bakterien: Standard-Nähragar Rezept 5".
Für **E. coli bzw. coliforme Bakterien**: Coli-Agar ([Info](#), [Info](#)).Für **Bierschädlinge**: "Universal-Bier-Agar (Basis): zur Kultivierung bierverderbender Mikroorganismen (Abb. 25) Rezept 6"
- Nähragarschalen nach dem Giessen beschriften: 1: Nährbodentyp (Abkürzung, z.B. **UNA** für **U**niversal-**N**ähragar, **BA** für **B**ieragar, etc.), 2: Datum der Beimpfung, 3. Typ Wasserprobe, 4. Ausplattiertes Volumen (z.B. 0.2 mL). Info: [Video](#).

2.2. Sterile Pipetten (= Pipettenentkeimung):

je nach verwendeter Pipettenart und der damit verbundenen Genauigkeit:

- Einweg-Pasteurpipetten, steril verpackt, graduiert (1 mL Nutzvolumen, graduiert 0.25 mL-Einheiten)
- gebrauchte Einweg-Pasteurpipetten: mit 70%iger Ethanollösung (EtOH) mehrfach spülen bzw. in Glasbehälter mit 70%-EtOH vollgesogen bis zum Gebrauch stehen lassen (≥ 1 min)
- Glas-Pasteurpipetten: mit 70%-EtOH wie Kunststoffpasteurpipetten behandeln, oder im Backofen durch Erhitzen auf 180 °C während 20-30 min, eingepackt in Alufolie, Backfolie oder Vernichtungsbeutel
- 1 mL-Messpipette (mit 1/100 mL [0.01 mL] Graduierung, oder 0.20 mL mit 0.001 mL Graduierung: wie Glaspasteurpipetten chemisch entkeimen bzw. Hitze-Sterilisation
- Dispenser-Mikropipette (z.B. 100-1'000 μ L, sowie passende Pipettenspitze): nur die Pipettenspitze muss keimfrei sein (wenn nicht steril: in 70%-EtOH einlegen)



2.3. Probenauftrag:

Möglichkeit 1: mit Pasteurpipetten - mässig genau, aber einfache Durchführung

- mit der sterilen bzw. entkeimten Pasteurpipette zunächst das Volumen bestimmen:

1: entweder mittels Graduierung, meistens 0.25 mL als kleinste mögliche Volumeneinheit

2: mehrfach ≥ 50 Tropfen aus 45 Grad-Winkel gehaltener Pasteurpipette in einen 5- oder 10 mL-Messzylinder "abnabeln" lassen (Abb. 4) - aus dem Gesamtvolumen kann das Volumen eines Wassertropfens berechnet werden (z.B. 50 Tr. = 2.4 mL \rightarrow 1 Tr. = 0.048 mL).

Beim Ausplattieren gibt man i.d.R. 2 - 5 Tropfen auf die Nähragaroberfläche zum Verteilen mit dem Drigalski-Glasspatel (ca. 0.1 mL wäre günstig); diese Tropfenzahl passt man beim Erhalt der KBE-Werte für spätere Untersuchungen so an, dass man zwischen 30 bis max. 300 Kolonien (optimal 100 - 200 pro Agarplatte).



Abb. 4. Bestimmung des Volumens von 1 Tropfen Wasser aus einer Pasteurpipette.

Links: ≥ 50 Tropfen aus einer Pasteurpipette in einen 5-mL- oder 10-mL-Messzylinder abnabeln lassen, dann Volumen auf mindestens 0.05 mL genau ablesen.

Rechts: Die Pasteurpipette muss in einem 45-Grad Winkel gehalten werden, das Wasser sanft aus der Einweg-Kunststoffpipette heraus gedrückt werden und warten, bis er sich selbstständig abnabelt. Dieses Verfahren garantiert reproduzierbare Tropfenvolumina. Dieser "Tropfen-Volumenwert" muss für jeden Pasteur-Pipettentyp einmal bestimmt werden.



Abb. 3. Drei Pipettentypen zur Keimzahlbestimmung.

Von oben nach unten:

3 verschiedene Einweg-Pasteurpipetten: mit Graduierung (1.0 mL Nutzvolumen, 0.25 mL Graduierung), ohne Graduierung, steril verpackt. Dazwischen: Glas-Pasteurpipette mit daneben liegendem Nuggi. Messpipette aus Glas (1.0 mL Nutzvolumen, 0.01 mL Graduierung; vgl. Abb. 6). Dispenser-Mikropipette (einstellbar zwischen 100-1'000 μ l) mit Einwegspitze.

Möglichkeit 2: mit 1-mL-Messpipetten, 0.01 mL-Graduierung

- dieses Pipettierverfahren ist genauer und einfacher, wenn man das Pipettieren eines Volumens von exakt 0.1-0.2 mL beherrscht
- geübte Personen stoppen den Ausfluss der zu verteilenden Probenflüssigkeit auf dem Nähragar mit dem Zeigfinger (Abb. 5A)
- weniger geübte Personen nehmen eine Pipettierhilfe für Pipetten bis 2 mL bzw. 0.2 mL ([Info](#))

Hinweis: mit 0.2 mL-Messpipetten und 0.001 mL Graduierung kann das Volumen noch genauer bestimmt werden (cf. Abb. 6).

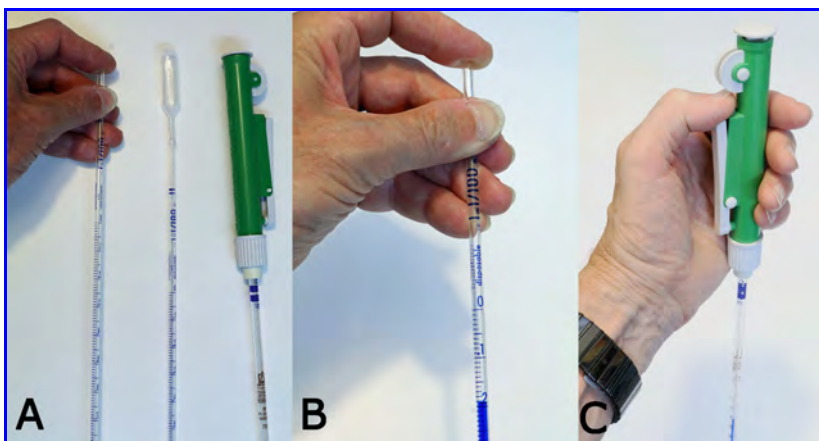


Abb. 5. Pipettiertechniken und Hilfsmittel.

A: links: 1-mL-Messpipette mit Zeigfinger-Ausflusssteuerung; Mitte: 1-mL-Messpipette mit Ballon-Steuerung (Ballon: abgeschnittener Oberteil einer Einweg-Pasteurpipette); rechts: Pipette mit grüner Pipettierhilfe.

B: Mit dem Zeigfinger ganz leicht über der Pipettieröffnung geöffnet wurden bislang 1.9 mL Flüssigkeit abgelassen.

C: Mit der 2.0-mL oder der 0.2 mL-Pipettierhilfe kann nach einiger Übung sehr genau die Ausflussmenge dosiert werden.

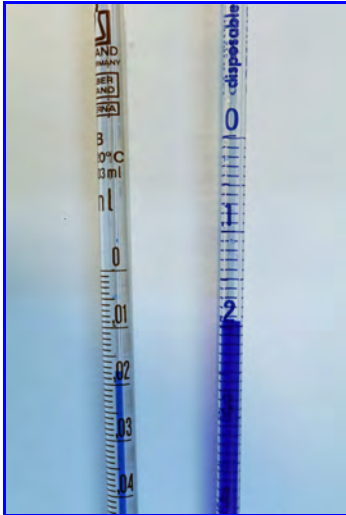


Abb. 6. Glas-Messpipetten mit verschiedenen Nutzvolumina und Graduierung.

Links: 0.2 mL Nutzvolumen und 0.001 mL-Einheiten; rechts: 1.0 mL Nutzvolumen und 0.01 mL Graduierung.

2.4. Ausplattieren der Wasserprobe(n):

- Glasspatel entkeimen:
zunächst den Drigalski-Glasspatel flambieren:
siehe "Mikrobiologisches Braulabor I" [hier](#) >
Braulabor 6: Minimaltechniken "Steriles bzw. keimarmes Arbeiten in Heimlabor" > Minimaltechnik 4: Sterilisation durch trockenen Hitze - Abflammen mit Ethanol (Flambieren, Abb. 13)

Kurz zusammengefasst:

In einen abdeckbaren Behälter (z.B. Färbewanne) werden ca. 50 mL Ethanol (Brennspritqualität) eingefüllt und so abgedeckt, dass evtl. Alkoholdämpfe nicht durch Feuer entzündet werden kann; davon entfernt wird ein Gasbrenner entzündet.

- Drigalski-Spatel sterilisieren:
 - Drigalskispatelkopfteil in Ethanol eintauchen und abtropfen lassen
 - kurz durch Gasbrennerflamme ziehen → anhaftender Alkohol entzündet sich
 - Drigalskispatel während Abflammen ständig drehen, bis Alkohol verbrannt ist

- Glasspatel abkühlen:
den mit Ethanol (Brennsprit) abgeflamten Drigalski-Glasspatel wird nach dem Abkühlen (= ca. 20 sec am Rand der entsprechenden Agarplatte auf dem Nähragar abkühlen lassen, Deckel der Petrischale darüber liegen lassen, cf. Abb. 8A)
- Ausplattieren (Abb. 7 und 8):
in der Agarmitte aufgetropfte Wassertropfen/Wasserprobe mit dem abgekühlten sterilen Drigalskispatel gleichmässig auf der Agaroberfläche verteilen: durch Drehen der Agar-Bodenplatte und gleichzeitig durch Hin- und Herziehen des Drigalskispatels (cf. Abb. 8BC)
- der Drigalskispatel wird anschliessend wieder in den Alkoholbehälter zurück gestellt bis zum nächsten Flambieren

Möglichkeit 3: mit Dispenser-Mikropipette, variabel 100 - 1'000 ì L

- sehr genau, aber teure Pipetten
- nicht-sterile Pipettenspitzen können durch Einlegen in 65-70%iger alkoholischer Lösung (Ethanol [z.B. Brennsprit], Iso-Propanol) entkeimt werden.
Einfachere Lösung: vor dem Aufbringen der Probemenge auf den entsprechenden Nähragar einfach mehrfach die zu untersuchende Probe aufziehen und wieder verwerfen → Pipettenspitze ist mit den "Originalmikroorganismen" gespült und es erfolgt keine Fremdkontamination.



Probenauftrag:

mit der entsprechenden Pipette je nach zu erwartender Keimzahl ein Probenvolumen von 0.1 - 0.2 mL auf die Mitte der Nähragaroberfläche eintropfen bzw. einfließen lassen

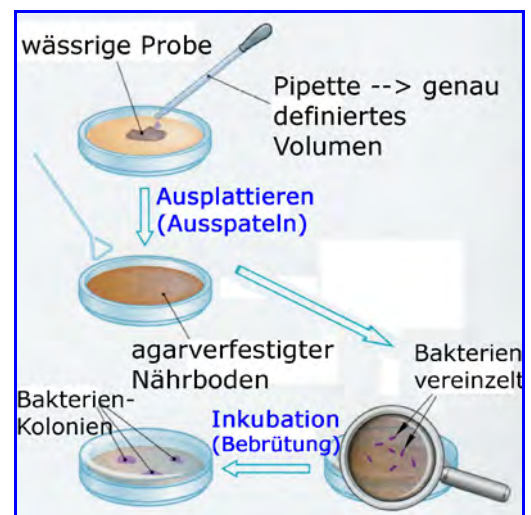


Abb. 7. Ausspateln bzw. Ausplattieren.

Technik zum gleichmässigen Verteilen keimhaltiger Suspensionen auf der Oberfläche von Agarplatten.

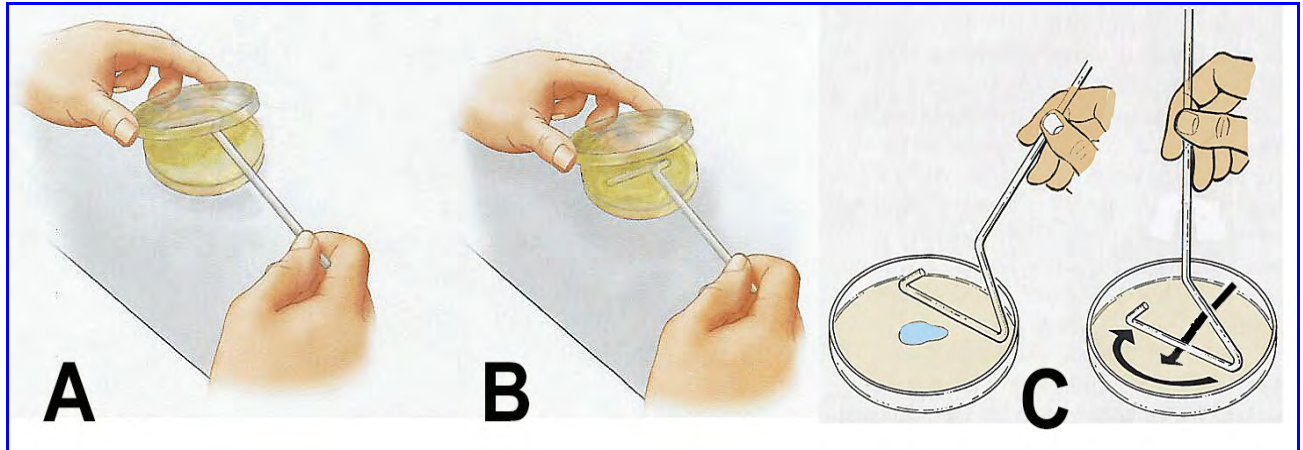


Abb. 8. Ausplattieren einer auf der Agaroberfläche eingebrachten keimhaltigen wässrigen Probe.

A: Abkühlen lassen des Drigalskispatels nach dem Flambieren mit Alkohol.

B: Nach dem Abkühlen wird der Drigalskispatel zur Probe hin- und darüber hinaus gezogen.

C: Nun wird sowohl der Bodenteil der Agarplatte mit dem kleinen Finger und dem Daumen in Kreisbewegung versetzt (grosser Rundpfeil) wie auch der Drigalskispatel durch eine geradlinige Hin- und Herbewegung mit der anderen Hand mehrfach sanft über die Agaroberfläche gezogen, bis er nicht mehr so mühelos gleitet (die keimhaltige Flüssigkeit ist damit gleichmässig über die gesamte Agaroberfläche verteilt worden).

2.5. Beschriftung und Inkubation:

- Beschriftung:

mit einem wasserfesten Faserschreiber wird auf der Rückseite der Petrischale (Bodenplatte) am Rand folgende Informationen festgehalten (falls es nicht schon gemäss Pkt. 2.1, S. 5 erfolgt ist):

1: Nährbodentyp (Abkürzung, z.B. UNA für Universal-Nähragar, BA für Bieragar, etc.), 2: Datum der Beimpfung, 3. Typ Wasserprobe (z.B. frisches Trinkwasser), 4. ausplattiertes Volumen (z.B. 0.20 mL).

- Inkubation (Bebrütung):

Ausplattierte Nähragarböden "auf den Kopf stellen" (d.h. Deckel nach unten, Bodenplatte darüber → bessere Nährstoffversorgung, verhindert Verdunstung) und während mehrerer Tage im Dunkeln bei Raumtemperatur (oder höherer Temperatur bis 30 °C) stehen lassen

2.6. Auswertung inkl. Interpretation:

Quantitative Auswertung: Koloniezahl/mL [= KBE/mL] festhalten:

- geschlossene bewachsene Agarplatte gegen das Licht halten und mit einem wasserfesten Faserschreiber Kolonien auf der Unterseite der Bodenplatte "abpunkten" → Koloniezahl

- Koloniezahlen auf 1 mL umrechnen (cf. Bsp. Tab. S. 9)

- Interpretation aerobe Bakterien (KBE):

▶ Kolonieformen und Koloniefarben: alle identisch - wenige Kolonieformen/-Farben - viele Kolonieformen/-Farben

▶ Bakterien und/oder Pilze: Bakterien haben glänzend-matte oder schleimige Kolonien, Pilze wattig-fädige Kolonien (cf. Braulabor 27 [hier](#) > Abb. S. 3; cf. auch [hier](#)).

▶ KBE-Wert: Vergleich mit gesetzlichen Vorschriften - [Info allgemein](#) [Info](#) (CH: mikrobiologische Anforderungen an Trinkwasser)

- Interpretation E.coli/coliforme Bakterien:

▶ cf. Produktdatenblatt "Coliforme chromogener-Agar" [hier](#) > Einsatzgebiet

▶ cf. Produktdatenblatt "ENDO Agar [hier](#) > Einsatzgebiet

- Interpretation Bierschädlinge:
 - ▶ cf. Produktdatenblatt "Universal-Bier-Agar" [hier](#) > Einsatzgebiet.



Tabellarische Zusammenstellung KBE-Auswertung:

| Wasserprobe Probenbeschrieb | pipettiertes Probenvolumen [mL] | Koloniezahl als KBE pro Petrischale | Umrechnung in KBE/mL | Koloniebeschrieb Kommentar/Interpretation |
|--|---------------------------------------|--|-------------------------|--|
| Brauwasser (= Leitungswasser aus Kellerhahn) | 0.20 mL | 18 | 90 | 300 KBE/mL (= CH-Toleranzwert) -> Trinkwasser erfüllt problemlos gesetzliche Richtwerte |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

***“Malz ist die Seele,
Hopfen die Würze,
Hefe der Geist
und
Wasser der Körper des
Bieres”***

(A. Piendl, em. Prof., TU München)



85%

95 %

Wassergehalt von Bier: zwischen 85 - 95 %