

Merkblätter für die Prüfung von Packmitteln

Herausgegeben von den Arbeitsgruppen der Industrievereinigung für Lebensmitteltechnologie und Verpackung e.V. am
Fraunhofer-Institut für Lebensmitteltechnologie und Verpackung, Institut an der Technischen Universität München

Merkblatt 47

Prüfung von Papier, Karton und Pappe auf schleimbildende Mikroorganismen

Herausgegeben von der Arbeitsgruppe „Mikrobiologie der Packstoffe“ – September 1984

1. Zweck und Anwendung

Das vorliegende Merkblatt beschreibt ein Prüfverfahren zur Bestimmung von Schleimbildnern in Papier, Karton und Pappe. Schleimbildende Bakterien können bei der Papierfertigung auftreten.

2. Begriff

Die Prüfvorschrift ermöglicht die Bestimmung der Anzahl koloniebildender Einheiten von Schleimbildnern, die nach einer Bebrütungszeit von 3 Tagen bei einer Temperatur von 30 °C in 1 g der zu untersuchenden, ofentrockenen Probe gefunden werden. Unter Schleimbildnern versteht man Mikroorganismen, die aus niedermolekularen Zuckern hochmolekulare Polymere (Dextrane u. dgl.) bilden können. Eine wichtige Gattung schleimbildender Bakterien ist *Leuconostoc*, doch können auch andere Bakteriengattungen (z. B. *Bacillus*-Arten) Schleime produzieren. Das eingesetzte Nährmedium ist nicht selektiv für *Leuconostoc*-Arten.

3. Probenahme, Probenzahl

3.1. Die Probenahme erfolgt nach Vereinbarung bzw. nach DIN 53 101.

Es dürfen nur die Ränder der Proben angefaßt werden. Die entnommenen Proben sind sofort aufeinander in ein sterilisiertes Probenahmegefäß zu legen. Falls ein solches Gefäß nicht vorhanden ist, werden die Proben in Echt Pergament eingeschlagen.

3.2. Die Probenzahl soll pro Entnahmeeinheit mindestens 10 betragen.

4. Prüfgeräte

4.1. Brutschrank, regelbar auf eine Temperatur von $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$. (Diese Temperatur muß an allen Stellen im Brutraum vorliegen.)

4.2. Autoklav für einen Betriebsdruck bis 3,5 bar und eine Sterilisationstemperatur bis 134 °C. Er muß so eingerichtet sein, daß eine Mindesttemperatur von $(120 \pm 2)^\circ\text{C}$ eingehalten werden kann.

4.3. Dampftopf.

4.4. Heißluftsterilisator für eine Sterilisationstemperatur von 160 bis 170 °C.

4.5. Kolonienzählgerät. Es ist zur Arbeitserleichterung zweckmäßig, nach Möglichkeit ein Kolonienzählgerät zu verwenden, das mit einer elektrischen Zähleinrichtung und einer Lupe von 10- bis 12facher Vergrößerung versehen ist.

4.6. Petrischalen aus Glas nach DIN 12 339 bzw. sterile Einweg-Petrischalen aus Kunststoff, Durchmesser 87 bis 97 mm.

4.7. Schere: Gipschere oder ähnlich starke Schere aus nicht-rostendem Stahl. Die Schere darf beim Sterilisieren ihre Schneidkraft nicht verlieren.

4.8. Korkbohrer und Korkbohrerschärfer. Der Korkbohrer soll einen Durchmesser von 15 mm haben.

4.9. Pinzetten.

4.10. Meßpipetten mit weitem Ausfluß, die es gestatten, 1,0 ml genau zu messen.

4.11. Pipettenbüchse.

4.12. Aufschlaggerät. (Empfohlen wird Ultra-Turrax TP 18 2 N nach Professor Willems mit auswechselbarem Schaft und Schlitzlager aus Polytetrafluorethylen.)

4.13. 200-ml-Babyflaschen aus Glas mit 100-ml-Markierungen.

4.14. Nährbodenflaschen, 500 ml, mit Kapsenbergkappen.

4.15. Wägegläschen, Durchmesser 30 mm, Höhe 30 mm, DIN 12 605. Es ist empfehlenswert, diese Gläschen mit laufender Nummer versehen zu beziehen.

4.16. Waage mit einer Genauigkeit von $\pm 0,001$ g.

4.17. Bunsenbrenner.

4.18. pH-Meßgerät mit Glaselektrode.

4.19. Impfnadel.

5. Nährmedium, Hilfslösung und Filter

Frisch destilliertes oder durch Ionenaustausch vollentsalztes und frisch aufgekochtes Wasser wird im folgenden Test kurz als Wasser bezeichnet.

Reagenzien für Analyse bzw. für Bakteriologie.

5.1. Nährboden nach Weman, modifiziert

5.1.1. Zusammensetzung:

40,0 g Rohzucker*
2,0 g di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat
0,5 g Natriumchlorid
0,1 g Magnesiumsulfat
0,01 g Eisen-II-sulfat
10,0 g Calciumcarbonat, gefällt
15 g Agar Agar
67,61 g

5.1.2. Bereitung:

Die angegebenen Mengen Nährstoffe werden einem Liter Wasser zugesetzt und unter ausgiebigem Umschütteln gleichmäßig verteilt, im Dampftopf gekocht und in vier Nährbodenflaschen (500 ml) umgefüllt. Die Sterilisation erfolgt in Auto-

* Rohzucker ist u. a. in Reformhäusern erhältlich.

klaven 15 min bei 110 °C. Da der Weman-Agar während des Autoklavierens den pH-Wert in unkontrollierbarer Weise verändert, muß der noch flüssige Agar nach dem Autoklavieren unter aseptischen Bedingungen auf den gewünschten Wert mit Hilfe konzentrierter Salzsäure oder konzentrierter steriler Citronensäure eingestellt werden. Zum Nachweis von Leuconostoc ist der pH-Bereich 5,0 – 5,5 empfehlenswert, schleimbildende Bacillus-Arten lassen sich hingegen besser bei pH 6,5 nachweisen. Es erscheint sinnvoll, den pH-Wert des Weman-Agars dem jeweiligen pH-Wert des Betriebswassers anzugleichen.

5.1.3. Vorbereitung der Petrischalen:

Nach Abkühlen des Nährbodens auf ca. 45 °C werden in die sterilen Petrischalen jeweils 15 ml des flüssigen sterilen Nährbodens unter sterilen Bedingungen eingegossen und der Nährboden erstarren lassen. Es empfiehlt sich ein Vortrocknen der mit Weman-Agar ausgegossenen offenen Petrischalen in einer sterilen Werkbank für die Dauer von 30 Minuten bei Raumtemperatur.

Die Petrischalen mit Nährboden sind bei + 4 °C aufzubewahren, eine Lagerzeit von 14 Tagen darf nicht überschritten werden.

5.2. Peptonlösung

5.2.1. Zusammensetzung:

0,1 g Pepton aus Fleisch, tryptisch verdaut
8,5 g Natriumchlorid, reinst

5.2.2. Bereitung:

Die angegebenen Mengen werden in 1000 ml Wasser gegeben, unter ausgiebigem Schütteln gleichmäßig verteilt und in vier 500-ml-Nährbodenflaschen umgefüllt. Die so vorbereiteten Flaschen werden 15 min bei 120 °C sterilisiert. Die Peptonlösung muß innerhalb von 8 Tagen bei einer Lagerung bei Zimmertemperatur verbraucht werden. Wird sie bei + 4 °C gelagert, darf eine Lagerzeit von 14 Tagen nicht überschritten werden.

6. Durchführung der Prüfung

6.1. Sterilisation der Geräte

Korkbohrer, Wägegäler, Babyflaschen, Pinzetten, Scheren, Glaspetrischalen, Pipetten und der Schaft des Aufschlaggerätes sind im Heißluftsterilisator 2 Stunden lang bei mindestens 160 °C zu sterilisieren. Bei Serienanalysen können Pinzetten, Scheren und Korkbohrer und der Schaft des Aufschlaggerätes auch durch Abflammen sterilisiert werden.

6.2. Probenvorbereitung

Aus den Proben werden mit einer sterilen Schere Versuchsstücke in der Größe von etwa 15 × 15 mm ausgeschnitten oder zweckmäßigerweise mit einem sterilen Korkbohrer ausgestanzt. Die Versuchsstücke dürfen nur mit sterilen Pinzetten, nicht aber mit den Fingern berührt werden. Je Probe sind mindestens 10 Versuchsstücke von je etwa 1,5 g auszuschneiden oder auszustanzen. 1 g des zu untersuchenden Materials ist unter sterilen Bedingungen in ein steriles Wägeglas einzuwägen. Die Einwaage wird in eine sterile Babyflasche gegeben, die mit 99 ml Peptonlösung (5.2) gefüllt ist. Mit einem sterilen Aufschlaggerät werden die Versuchsstücke zerfasert. Nach einer Aufschlagzeit von 1 min wird meist eine ausreichende, sehr feine Verteilung erhalten, die sich verhältnismäßig langsam absetzt. Bei der Entnahme ist dafür zu sorgen, daß evtl. abgesetzte Fasern neu aufgewirbelt werden. Dies erfolgt am besten mit der zur Entnahme bestimmten sterilen Pipette. Die erhaltene Faserstoffsuspension stellt die Basissuspension für die weitere Prüfung dar. In vielen Fällen ist es erforderlich, die Basissuspension stufenweise weiter zu verdünnen, bevor die mikrobiologischen Untersuchungen angesetzt werden.

6.3. Oberflächenausstrich

Je 0,1 ml der Basissuspension bzw. der davon abgeleiteten Reihenverdünnungen werden auf Petrischalen mit bereits verfestigtem Weman-Agar (5.1.1) mit Hilfe eines Drigalski-Spatels verteilt. Es empfiehlt sich ein Vortrocknen der offenen Petrischalen in einer sterilen Werkbank für etwa 60 Minuten bei Raumtemperatur, um das Schwärmen einiger Bakterienarten zu erschweren bzw. zu unterdrücken. Anschließend werden die Petrischalen so in den Brutschrank gelegt, daß der Deckel der Petrischalen unten liegt.

6.4. Bebrütung

Die vorbereiteten Petrischalen mit Nähragar werden 3 Tage bei 30 °C bebrütet.

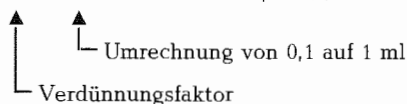
7. Versuchsauswertung

Die Petrischalen werden nach Ablauf der Brutzeit dem Brutschrank entnommen, wonach die Anzahl der Kolonien gezählt wird. Bei der Auszählung ist zu beachten, daß Fasern nicht mitgezählt werden; dazu ist ggf. eine mikroskopische Kontrolle bei 80facher Vergrößerung durchzuführen, wobei Fasern leicht zu erkennen sind. Das Ergebnis der Auszählung von zehn Platten wird addiert und das arithmetische Mittel gebildet. Unter Berücksichtigung des Trockengehaltes und der Verdünnungsfaktoren wird der Mittelwert auf 1 g ofentrockenes Untersuchungsmaterial umgerechnet. Bei der Auswertung ist zu beachten, daß auf den Weman-Nähragarplatten 0,1 ml der jeweiligen Verdünnungen (Basissuspension $\cong 10^{-2}$ -Verdünnung) ausplattiert wurde.

Rechenbeispiel:

Es werden aus der Basissuspension ($\cong 10^{-2}$ -Verdünnung) 0,1 ml mit dem Drigalski-Spatel auf Weman-Agar ausplattiert. Man erhält nach dem Inkubieren z. B. 12 Schleimbildner/Petrischale. Daraus berechnet sich die Anzahl der Schleimbildner pro g Probenmaterial zu:

$$12 \times 10^2 \times 10 = 12 \cdot 10^3 = 1,2 \cdot 10^4.$$



Die Anzahl von 12 000 Schleimbildnern/g Karton müßte noch auf die Trockenmasse umgerechnet werden.

Da auch andere Keime auf dem Weman-Agar wachsen können, werden nur die Schleimbildner ausgewertet. Sie bilden stecknadelkopf- bis perlgroße, halbkuglige, glasartige, durchsichtige, farblose, hellglänzende Kolonien, die sich beim Einstechen mit der Impfnadel als geleeweich erweisen. Die Kolonien sehen aus wie Wassertröpfchen.

8. Prüfbericht

Im Prüfbericht sind unter Hinweis auf dieses Merkblatt anzugeben:

- Art des untersuchten Packstoffes,
- Ort, Datum und Zeit der Probenahme,
- Anzahl der Schleimbildner auf Weman-Agar,
- pH-Wert des Weman-Agars,
- ggf. Abweichungen von der Vorschrift dieses Merkblatts.

9. Anmerkung

Anstelle des modifizierten Weman-Agars können auch Weman-Nährkartonscheiben (z. B. Sartorius SM 14 065) eingesetzt werden. In diesem Fall muß die Basissuspension – ggf. nach weiterer Verdünnung – durch Membranfilter der Porengröße 0,45 µm gesaugt werden, wonach die Filter auf die zuvor genannten, mit 3,5 ml Wasser befeuchteten Nährkartonscheiben aufgelegt und 3 Tage bei 30 °C bebrütet werden.