

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 54

Bestimmung der Oberflächenkolonienzahl (Bakterien, Schimmelpilze und Hefen) auf flächigen Packstoffen für Fette und fetthaltige Lebensmittel

Herausgegeben von der Arbeitsgruppe „Mikrobiologie der Packstoffe“ – Oktober 1986

1. Zweck und Anwendung

Dieses Merkblatt beschreibt ein Prüfverfahren zur Bestimmung der Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE) von Bakterien, Schimmelpilzen und Hefen auf flächigen, flexiblen Packstoffen, wie sie zum Verpacken von Fetten tierischer und/oder pflanzlicher Herkunft und fetthaltigen Erzeugnissen verwendet werden. Für Buttereinwickler gemäß DIN 10 082, Ausgabe August 1978, gilt die Prüfung der Keimzahl nach DIN 10 050 Blatt 3 „Prüfung von Buttereinwicklern: Keimzahlbestimmung“, Ausgabe April 1972. Beim mikrobiellen Verderb von fetthaltigen, pH-neutralen Erzeugnissen mit teilweise hohem Wassergehalt spielen aber auch Bakterien eine Rolle, so daß ihre gesonderte Erfassung auf einem geeigneten Nährboden notwendig erscheint.

Schimmelpilze, die in fortgeschrittenem Wachstumsstadium makroskopisch sichtbare, nicht abwaschbare Flecke (Stockflecke) erzeugen, werden nach dieser Vorschrift separat bestimmt.

2. Begriffe

Die Oberflächenkolonienzahl ist ein Maß für den mikrobiologischen Zustand eines Einwicklers und wird nach den Festlegungen dieses Merkblattes bestimmt.

Dabei wird die Anzahl der koloniebildenden Einheiten von aeroben, mesophilen Bakterien (Gesamtkolonienzahl) OKZ_B und die Anzahl an koloniebildenden Einheiten von Schimmelpilzen und Hefen OKZ_{SH} auf

100 cm² Packstoff bezogen. Die Gesamtkolonienzahl OKZ_B gibt die Anzahl aller koloniebildenden Einheiten (KBE) an, die nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen bei 30 °C auf Plate-Count-Agar bestimmt wird. Auf diesem Nähragar sind Bakterienkolonien vorherrschend. Die Kolonienzahl für Schimmelpilze und Hefen OKZ_{SH} gibt die Anzahl koloniebildender Einheiten an, die nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen bei 25 °C auf modifiziertem Sabouraud-Agar bestimmt wird. Die Anzahl an koloniebildenden Einheiten von Schimmelpilzen und Hefen ist getrennt zu ermitteln.

3. Probennahme, Probenzahl

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

Die Proben sind an Ort und Stelle so zu entnehmen, daß keine Sekundärinfektion eintreten kann. Die entnommenen Proben sind sofort aufeinander und in ein sterilisiertes Probengefäß zu legen. Falls ein solches Gefäß nicht vorhanden ist, werden die Proben in Echt-Pergament oder sterilisierte Aluminiumfolie eingeschlagen.

3.2. Die Probenzahl soll pro Entnahmeeinheit mindestens 10 betragen.

4. Prüfgeräte

4.1. Heißluftsterilisator, regelbar auf Temperaturen zwischen 160 °C und 180 °C.

4.2. Autoklav für einen Betriebsdruck bis 2,5 bar und eine Sterilisationstemperatur bis 135 °C. Er muß so eingerichtet sein, daß eine Mindesttemperatur zwischen 110 und 120 °C auf ± 2 K genau eingehalten werden kann.

4.3. Dampftopf.

4.4. Brutschrank, regelbar auf 30 °C ± 1 K.

4.5. Nährbodenflaschen, 200–300 ml Inhalt, mit Kapsenbergkappen oder anderen entsprechenden sterilen Verschlüssen.

4.6. Sterile Einweg-Petrischalen aus Kunststoff, Durchmesser 87–97 mm.

4.7. Sterilisierbarer Kreisschneider zum Ausschneiden von Prüfstücken mit 50-cm²-Flächenabschnitten.

4.8. Metallschablone, 6 × 6 cm.

4.9. Schere mit ca. 150 mm Schneidlänge, z. B. Gips-Hebelschere, sterilisierbar.

4.10. Messer, sterilisierbar; Pinzette, ca. 150 mm lang.

4.11. Drigalski-Glasspatel mit einer Basisbreite von 60 mm.

4.12. Lupe, 10- bis 12fache Vergrößerung oder Kolonienzählgerät, nach Möglichkeit ausgerüstet mit mechanischer oder elektronischer Zählrichtung.

4.13. Mikroskop.

4.14. pH-Meßgerät mit Elektrode.

4.15. Bunsenbrenner.

4.16. Glasringe (Außendurchmesser 84 mm, Innendurchmesser 78 mm, Höhe 4 mm) plangeschliffen.

5. Nährmedien und Nährmedienherstellung

5.1. Nähragar zur Bestimmung der Anzahl der koloniebildenden Einheiten von Bakterien (Plate-Count-Agar)

Zusammensetzung:

5 g Pepton aus Casein, tryptisch verdaut

2,5 g Hefeextrakt

1,0 g D (+) Glukose · H₂O

14 g Agar-Agar

1000 ml destilliertes oder vollentsalztes Wasser.

5.2. Pilznährboden nach Sabouraud, modifiziert

Zusammensetzung:

5 g Pepton aus Casein, tryptisch verdaut

5 g Pepton aus Fleisch, tryptisch verdaut

10 g D (+) · Glukose · H₂O

10 g Maltose · H₂O

14 g Agar-Agar

1000 ml destilliertes oder vollentsalztes Wasser

5.3. Bereitung der Nährböden

Die angegebenen Nährstoffmengen werden einem Liter frisch destilliertem oder vollentsalztem Wasser zugesetzt, unter ausgiebigem Umschütteln gleichmäßig verteilt und im Dampftopf bis zum vollständigen Lösen erhitzt. Die Lösung wird in 300-ml-Nährbodenflaschen umgefüllt, verschlossen und im Autoklaven 15 min bei 121 °C mit aufgesetzten Kapsenbergkappen sterilisiert. Der pH-Wert des gebrauchsfertigen Nährbodens soll bei 20 °C 7,0 \pm 0,2 (Plate-Count-Agar) bzw. 5,4 \pm 0,1 (Pilznährboden nach Sabouraud) betragen. Falls erforderlich, wird der pH-Wert des Nährbodens mit verdünnter Salzsäure bzw. verdünnter Natronlauge eingestellt.

6. Durchführung der Prüfung

6.1. Sterilisation

Pinzetten, Messer, Schere, Kreisschneider und Schablone werden im Heißluftsterilisator für 3 Stunden bei mindestens 160 °C sterilisiert. Bei Serienanalysen kann auch durch Abflammen der in Ethanol getauchten Gerätschaften sterilisiert werden.

6.2. Vorbereitung der Prüfstücke (Proben)

Aus den zu untersuchenden Probenmustern werden mit einem sterilen Kreisschneider Prüfstücke der Größe 50 cm² oder mit einem sterilen Messer oder einer sterilen Schere mit Hilfe der sterilen Schablone Prüfstücke der Größe 6 × 6 cm herausgeschnitten. Die Prüfstücke dürfen nur mit sterilen Pinzetten oder einem Drigalski-Spatel, auf keinen Fall mit den Fingern berührt werden.

6.3. Zahl der Prüfstücke (Proben)

Ist nur eine Seite des Packstoffes (Einwickler) zu prüfen, sind je Entnahmeeinheit mindestens 10 Proben für die Prüfung auf die Gesamtkolonienzahl und die gleiche Anzahl für die Prüfung der Anzahl an koloniebildenden Einheiten von Schimmelpilzen und Hefen auszuscheiden; müssen beide Seiten des Packstoffes geprüft werden, so verdoppelt sich die Anzahl der erforderlichen Proben. Die zugeschnittenen Proben sind bis zur weiteren Verwendung vor Sekundärinfektionen zu schützen.

6.4. Durchführung der Prüfung

Sterile Petrischalen werden jeweils mit ca. 10 ml des flüssigen, sterilen Nährbodens unter sterilen Bedingungen befüllt. Nach dem Erstarren wird auf die noch feuchte Nährbodenoberfläche die Probe mit der zu prüfenden Seite nach oben aufgelegt und mit einer sterilen Pinzette oder einem sterilen Drigalski-Spatel vorsichtig angedrückt, so daß keine Luftblasen unter dem Einwickler auftreten. Anschließend wird die Einwicklerprobe mit dem gleichen Nährboden (Temperatur um 48 °C) ca. 2 mm hoch überschichtet. Die Proben müssen nach dem Überschichten in einer Ebene liegen bleiben. Prüflinge, die sich zusammenrollen, was bei Folienlaminaten nicht selten auftritt, werden mit sterilisierten Ringen aus Glas, die in die Petrischalen passen, in ihrer Lage fixiert.

Nach dem Erstarren des Nährbodens werden die Petrischalen mit den Deckeln nach unten liegend in den Brutschrank gestellt.

6.5. Bebrütung

Die nach Abschnitt 6.4 vorbereiteten Proben mit dem Nährboden nach Abschnitt 5.1 werden 3 Tage bei 30 °C, die Prüfstücke mit dem Nährboden nach Abschnitt 5.2 werden 5 Tage bei 25 °C inkubiert.

6.5.1. Mesophile Gesamtkeimzahl: Nährboden nach Abschnitt 5.1.

6.5.2. Schimmelpilze und Hefen auf modifiziertem Sabouraud-Agar nach Abschnitt 5.2.

7. Auszählen der koloniebildenden Einheiten

Auf dem Nähragar (Plate-Count-Agar) wird die Anzahl der koloniebildenden Einheiten der mesophilen Bakterien (Gesamtkolonienzahl) bestimmt. Schimmelpilze und Hefen werden auf modifiziertem Sabouraud-Agar bestimmt und können aufgrund ihrer spezifischen Koloniebildung makroskopisch unterschieden werden. Mit einer Lupe oder dem Keimzählgerät wird die Anzahl der koloniebildenden Einheiten, die auf einer Probe vorhanden sind, gezählt. Handelt es sich bei dem untersuchten Einwickler um einen transparenten Packstoff, so werden die Kolonien auf oder in der Probe im durchscheinenden Licht ausgezählt und den Oberflächenkolonien zugerechnet; deren Anzahl wird jedoch im Prüfbericht gesondert vermerkt.

Ein Kolonienwachstum auf dem Druckbild ist ebenfalls gesondert zu vermerken.

Werden bei noch geschlossener Petrischale dunkle Flecke auf einem Prüfstück beobachtet, so werden diese, ohne die Petrischale zu öffnen, ausgezählt und weitere 7 Tage bei 25 °C bebrütet. Danach wird die Probe vom Nähragar gelöst und kräftig mit kaltem Leitungswasser gespült. Verbleiben dunkle Flecke, so ist mit einem Mikroskop bei ca. 240facher Vergrößerung zu prüfen, ob Myzelien und Gemmen zu erkennen sind, gegebenenfalls werden diese Flecke als **Stockflecke** gezählt.

Außerhalb der Probe befindliche Kolonien können durch Rekontaminationen während des Versuchsansatzes auftreten. Proben, bei denen mehr als zwei Kolonien außerhalb der Probefläche gezählt werden, dürfen nicht berücksichtigt werden.

8. Auswertung

Das Ergebnis der Auszählung von 10 Platten wird addiert, das arithmetische Mittel gebildet und die **Oberflächenkeimzahl** wie folgt berechnet:

8.1. Prüfstücke 6 × 6 cm

$$\text{Anzahl KBE} \times 2,78 = \text{OKZ}_B \text{ bzw. OKZ}_{SH} \text{ pro } 100 \text{ cm}^2;$$

8.2. Prüfstücke 50 cm²

$$\text{Anzahl KBE} \times 2 = \text{OKZ}_B \text{ bzw. OKZ}_{SH} \text{ pro } 100 \text{ cm}^2.$$

Die Auszählung erfolgt getrennt nach den verwendeten Nährmedien.

9. Prüfbericht

Im Prüfbericht sind unter Hinweis auf dieses Merkblatt anzugeben:

- Art des untersuchten Packstoffes,
- Ort, Datum und Zeit der Probennahme,
- Anzahl der koloniebildenden Einheiten von Bakterien (Gesamtkolonienzahl) OKZ_B , bezogen auf 100 cm² Packstoffoberfläche,

- Anzahl der koloniebildenden Einheiten von Schimmelpilzen und Hefen OKZ_{SH} , bezogen auf 100 cm² Packstoffoberfläche,
- Vorkommen von Stockflecken,
- Keimbefall auf der Druckfarbe als qualitativer Vermerk,
- gegebenenfalls Keimbefall an den Schnittkanten oder im Durchlicht festgestellte Bakterienkolonien bei transparenten Einwicklern,
- gegebenenfalls Abweichungen von den Vorschriften dieses Merkblattes.

10. Anmerkungen

10.1. Das Prüfverfahren dieses Merkblattes wurde durch Ringversuche in zehn unabhängigen Laboratorien geprüft. Der Einsatz eines zusätzlichen Nährbodens zur Bestimmung der Oberflächengesamtkeimzahl (mesophile, aerobe Bakterien) ist zu empfehlen, weshalb Plate-Count-Agar in die vorliegende Prüfvorschrift aufgenommen wurde. Ein Zusatz von Magermilchpulver zum Plate-Count-Agar, bzw. Chloramphenicol zum Sabouraud-Agar, erwies sich in den Ringversuchen als nicht notwendig.

10.2. Falls eine Untersuchung des Einwicklers an seinen Originalschnittkanten (z. B. Schnittkanten von Rollen oder einer der vier Schnittkanten bei Bogenware) erforderlich ist, so wird diese Untersuchung an weiteren 10 Proben gesondert durchgeführt. Diese Proben werden in Form von Dreiecken ausgeschnitten. Die Originalschnittkante soll mit 60 mm Länge die längste Seite des Dreiecks sein. Im Prüfbericht ist zu vermerken, ob diese Kante ein deutlich höheres Keimwachstum gegenüber der übrigen Probe aufweist.

10.3. Die Nährmedien können auch aus Trocken-Nährböden hergestellt werden. Trockennährmedien werden nach Vorschrift des Herstellers aufgelöst, gekocht und sterilisiert. Das Nährmedium nach Abschnitt 5.2 entspricht DIN 10 050 Blatt 3. Die Hersteller-codes sind wie folgt:

Trockennährböden:

Nähragar (Plate-Count-Agar):

Merck Art. Nr. 5463

Oxoid CM 325 oder CM 326 (Tabletten)

BBL Art. Nr. 11638;

Pilznährboden nach Sabouraud, modifiziert:

Merck Art. Nr. 7662

Der Nährboden entspricht den Empfehlungen des Fraunhofer-Instituts für Lebensmitteltechnologie und Verpackung (1974).

10.4. Die Prüfvorschrift ist prinzipiell auch auf andere Packstoffe, z. B. für nichtfetthaltige Lebensmittel, anwendbar.