

# Verpackungs-Rundschau

Literaturhinweis: Verpackungs-Rundschau **23** (1972) Nr. 11, Techn.-wiss. Beilage, Seiten 89 – 92

## Merkblätter für die Prüfung von Packmitteln

Herausgegeben von den Arbeitsgruppen des Instituts für Lebensmitteltechnologie und Verpackung an der Technischen Universität München – Institut der Fraunhofer-Gesellschaft

### Merkblatt 15

#### Bestimmung der Gesamtkeimzahl, der Anzahl an Schimmelpilzen und Hefen und der Anzahl an coliformen Keimen vorgefertigter Verpackungen

Herausgegeben von der Untergruppe „Oberflächenkeimzahlbestimmung“ der Arbeitsgruppe „Lebensmittelerhaltung und Mikrobiologie“ – Juli 1972

#### 1. Zweck und Anwendung

Die erhöhte mikrobiologische Empfindlichkeit von Lebensmitteln verlangt mikrobiologisch einwandfreie Verpackungen. Da in immer größerem Umfang vorgefertigte Verpackungen zum Verpacken von Lebensmitteln eingesetzt werden, müssen diese vor dem Einfüllen der Lebensmittel in mikrobiologischer und hygienischer Hinsicht einwandfrei sein. Dies bedeutet, daß der Hersteller vorgefertigter Verpackungen – auch von Tuben und Dosen – mikrobiologische Kontrolluntersuchungen durchführen muß, um Verpackungen zu liefern, die den Anforderungen des Verwenders entsprechen. Gleichzeitig dienen diese Kontrolluntersuchungen zur Prüfung der verwendeten Herstellungsmaschinen (Stufenkontrolle) und der Lagerungsbedingungen. Auch der Verwender der Verpackungen muß diese kontrollieren, um gegebenenfalls feststellen zu können, ob die vorgefertigten Verpackungen während des Transportes durch unzureichende oder ungeeignete Umverpackung Sekundärinfektionen ausgesetzt waren. Die in diesem Merkblatt beschriebenen mikrobiologischen Prüfverfahren dienen zur Ermittlung der Gesamtzahl an Bakterien (= Keimzahl), der Anzahl der coliformen Bakterien sowie der Ermittlung der Anzahl von Schimmelpilzen und Hefen.

Unter den Prüfmethode werden zwei Verfahren vorgeschlagen, die je nach Art der vorgefertigten Verpackung oder deren Form angewandt werden müssen. Die Prüfmethode sind nicht auf enghalsige Verpackungen anwendbar.

#### 2. Begriffe

Bei vorgefertigten Verpackungen wird die Keimzahl ( $KZ_B$ ), die Anzahl an coliformen Keimen ( $KZ_C$ ) und die Anzahl an Schimmelpilzen und Hefen ( $KZ_{SH}$ ) auf 100 g bzw. 100 ml Verpackungsinhalt bezogen, wobei die festgestellte Anzahl an bestimmten Keimen auf 100 g bzw. 100 ml Inhalt umzurechnen ist.

Bei Deckeln wird die Anzahl der gleichen, oben erwähnten Keimgruppen auf 100 cm<sup>2</sup> Fläche bezogen, wobei jedesmal die Anzahl der Keime der gesamten Deckelfläche auf 100 cm<sup>2</sup> umzurechnen ist.

Die Keimzahl  $KZ_B$  gibt die Anzahl aller Keimkolonien an, die nach einer Bebrütungszeit von 3 Tagen bei 25 °C auf Nähragar bestimmt wird. Auf Nähragar sind Bakterienkolonien vorherrschend.

Die Keimzahl an Schimmelpilzen und Hefen  $KZ_{SH}$  gibt die Anzahl der Schimmelpilze und Hefen an, die nach einer Bebrütungszeit von 3 Tagen bei 25 °C auf Sabouraudagar

(modifiziert) bestimmt wird. Die Anzahl Hefen und Schimmelpilze ist getrennt anzugeben (vgl. die Abschnitte 6.3.1 und 6.3.2).

Die Zahl coliformer Bakterien  $KZ_C$  gibt die Anzahl coliformer Bakterien an, die nach einer Bebrütungszeit von  $20 \pm 2$  Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  auf Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Agar bestimmt wird (vgl. Abschnitt 6.3.1).

Der Titer an coliformen Keimen wird bis zu 3 Tagen bei  $37^\circ\text{C}$  in Brillantgrün-Galle-Lactose-Bouillon über deren Gasbildung bestimmt (vgl. Abschnitt 6.3.2).

### 3. Probenahme, Probenzahl

3.1. Die Probenahme erfolgt nach Vereinbarung. In Zweifelsfällen empfiehlt es sich, die Probenahme sinngemäß nach DIN 53 101 durchzuführen. Die Proben sind an Ort und Stelle so zu entnehmen, daß keine Sekundärinfektion eintreten kann. Das für den Transport der Proben verwendete Packmittel muß keimfrei sein (vgl. Zellcheming-Merkblatt Nr. VIII/3/68).

3.2. Die Probenzahl muß pro Entnahmeeinheit mindestens 30 betragen.

### 4. Prüfgeräte

- 4.1. Brutschrank, regelbar auf eine Temperatur von  $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ$  und  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ$ .
- 4.2. Autoklav für einen Betriebsdruck bis 3,5 at und eine Sterilisationstemperatur bis  $134^\circ\text{C}$ . Er muß so eingerichtet sein, daß eine Mindesttemperatur zwischen  $110$  und  $120^\circ\text{C}$  auf  $\pm 2^\circ$  genau eingehalten werden kann.
- 4.3. Dampftopf.
- 4.4. Heißluftsterilisator für eine Sterilisationstemperatur von  $160$  bis  $170^\circ\text{C}$ .
- 4.5. Kolonienzählgerät. Zur Arbeitserleichterung ist es zweckmäßig, nach Möglichkeit ein Kolonienzählgerät zu verwenden, das mit einer elektrischen Zählleinrichtung versehen ist mit Lupe von 8–10facher Vergrößerung.
- 4.6. Petrischalen aus Glas nach DIN 12 339 bzw. Einweg-Petrischalen aus Kunststoff, Durchmesser 87–89 mm.
- 4.7. Abdeckschalen (Petrischalen mit einem Durchmesser bis zu 140 mm).
- 4.8. Meßpipetten.
- 4.9. Pipettenbüchsen.

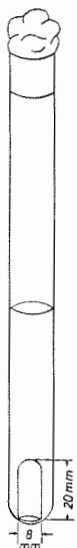


Bild 1: Durham-Röhrchen.

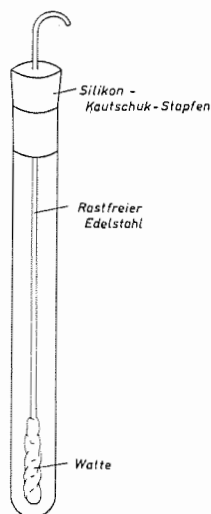


Bild 2: Wischer.

- 4.10. Nährbodenflaschen, 300 ml mit Kapsenbergkappen.
- 4.11. Durham-Röhrchen entsprechend Bild 1.
- 4.12. Wischer entsprechend Bild 2 (Stopfen: Siliconkautschuk, Stab: rostfreier Stahl).
- 4.13. Bakteriologisches Wasserbad.
- 4.14. Bunsenbrenner oder Spirituslampe.
- 4.15. Lange Pinzetten.
- 4.16. Elektronisches pH-Meßgerät mit Glaselektrode.

### 5. Nährmedien und Nährmedienherstellung

#### 5.1. Nähragar

##### 5.1.1. Zusammensetzung:

- 1 g Fleischextrakt
- 2 g Hefeextrakt
- 5 g Pepton aus Fleisch, tryptisch verdaut
- 5 g Natriumchlorid, reinst
- 15 g Agar-Agar
- 28 g

##### 5.1.2. Bereitung:

Die angegebenen Mengen Nährstoffe werden einem Liter frisch destilliertem oder voll entsalztem Wasser zugesetzt, unter ausgiebigem Umschütteln gleichmäßig verteilt und 15 min gewechselt. Die Lösung wird in vier 300 ml-Nährbodenflaschen umgefüllt. Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven 15 min bei  $120^\circ\text{C}$  mit aufgesetzten Kapsenbergkappen. Der pH-Wert des gebrauchsfertigen Nährbodens soll bei  $20^\circ\text{C}$   $7,4 \pm 0,2$  betragen.

#### 5.2. Pilznährboden nach Sabouraud, modifiziert

##### 5.2.1. Zusammensetzung:

- 5 g Pepton aus Casein, tryptisch verdaut
- 5 g Pepton aus Fleisch, tryptisch verdaut
- 10 g D (+)-Dextrose  $\cdot \text{H}_2\text{O}$
- 10 g Maltose  $\cdot \text{H}_2\text{O}$
- 10–15 g Agar-Agar
- 40–45 g

##### 5.2.2. Bereitung:

Die angegebenen Mengen Nährstoffe werden einem Liter frisch destilliertem oder voll entsalztem Wasser zugesetzt und unter ausgiebigem Umschütteln gleichmäßig verteilt. Anschließend wird im Dampftopf bis zur vollständigen Lösung gekocht und in vier 300-ml-Nährbodenflaschen umgefüllt. Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven 15 min bei  $120^\circ\text{C}$  mit aufgesetzten Kapsenbergkappen. Der pH-Wert des fertigen Nährmediums soll  $5,4 \pm 0,1$ , bezogen auf eine Meßtemperatur von  $20^\circ\text{C}$ , betragen. Falls erforderlich, wird der pH-Wert des Nährmediums mit verdünnter Natronlauge oder verdünnter Salzsäure eingestellt.

#### 5.3. Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Agar

##### 5.3.1. Zusammensetzung:

- 7,0 g Pepton aus Fleisch, tryptisch verdaut
- 3,0 g Hefeextrakt
- 10,0 g D(+)-Lactose
- 5,0 g Natriumchlorid, reinst
- 1,5 g Gallesalzmischung
- 0,03 g Neutralrot
- 0,002 g Kristallviolett
- 12–13,0 g Agar-Agar
- 38,532 bis 39,532 g

##### 5.3.2. Bereitung:

Die angegebenen Mengen Nährstoffe werden einem Liter frisch destilliertem oder voll entsalztem Wasser zugesetzt und unter ausgiebigem Umschütteln gleichmäßig verteilt. Nach 15 min Stehen wird die Suspension in vier 300 ml-Nährbodenflaschen verteilt und bis zur vollständigen Lösung im Dampftopf gekocht.

Der Beginn des Kochprozesses wird durch leichtes Aufwallen angezeigt. Der pH-Wert soll bei 37 °C  $7,4 \pm 0,1$  betragen.

#### 5.4. Brillantgrün - Galle - Lactose - Bouillon

##### 5.4.1. Zusammensetzung:

10,0	g	Pepton aus Fleisch, tryptisch verdaut
10,0	g	D(+)-Lactose
20,0	g	Ochsen- bzw. Rindergalle, getrocknet und gereinigt
0,0133	g	Brillantgrün
40,0133	g	

##### 5.4.2. Bereitung:

Die angegebenen Mengen Nährstoffe werden einem Liter frisch destilliertem oder voll entsalztem Wasser zugesetzt und unter ausgiebigem Schütteln gleichmäßig verteilt. Hierauf kocht man die Lösung 30 min lang. Sollte die Lösung nicht klar sein, muß sie abfiltriert werden. Der pH-Wert des Nährmediums muß elektrometrisch mit 0,1 n Natronlauge bzw. 0,1 n HCl so eingestellt werden, daß nach dem Sterilisieren und Abkühlen der pH-Wert zwischen 7,1 und 7,4 liegt. Von der so hergestellten Nährflüssigkeit werden 7 ml in Reagenzgläser abgefüllt. In diese versenkt man zum späteren Gasnachweis etwa 2 ml fassende Durham-Röhrchen mit der Öffnung nach unten und verschließt das so vorbereitete Reagenzglas mit Kapsenbergkappen oder Zellstoffstopfen. Die so vorbereiteten Reagenzgläser werden 15 min bei 120 °C sterilisiert. Beim Sterilisieren verschwindet die im Durham-Röhrchen eingeschlossene Luft. Die Nährlösung darf nicht zweimal sterilisiert werden, da sich bei erneuter Wärmeeinwirkung der zugesetzte Farbstoff zersetzt. Dies geschieht auch bereits dann, wenn bei normaler Erhitzung der pH-Wert zu hoch eingestellt war.

#### 5.5. Verdünnungsflüssigkeit:

##### Kochsalz - Pepton - Lösung

Die Verdünnungsflüssigkeit dient zum vollständigen Tränken des verwendeten Wischers und anschließend für den Probenansatz.

##### 5.5.1. Zusammensetzung:

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

##### 5.5.2. Bereitung:

Die angegebenen Mengen Nährstoffe werden in 1000 ml frisch destilliertes oder voll entsalztes Wasser gegeben und unter ausgiebigem Schütteln gleichmäßig verteilt. Die frisch angesetzte Verdünnungsflüssigkeit wird zu je genau 10 ml in starkwandige, randlose Reagenzgläser gegeben und mit Kapsenbergkappen oder Zellstoffstopfen verschlossen. Die so vorbereiteten Röhrchen werden 15 min bei 120 °C sterilisiert. Die Verdünnungsröhrchen müssen innerhalb von 8 Tagen bei einer Lagerung bei Zimmertemperatur verbraucht werden. Werden sie bei +4 °C gelagert, darf eine Lagerzeit von 14 Tagen nicht überschritten werden.

*Anmerkung:* Die Nährmedien können selbst bereitete werden oder in Form eines fertigen Nährmediums in den Zusammensetzungen, wie beschrieben, bezogen werden.

Trockennährmedien werden nach der Vorschrift des Herstellers aufgelöst, gekocht und sterilisiert.

Das Nährmedium nach Abschnitt 5.2 entspricht DIN 10 050, Blatt 3, das Nährmedium nach Abschnitt 5.3 dem Internationalen Standard FIL/DF 39. Die Hersteller-codes sind wie folgt:

#### für Brillantgrün-Galle-Lactose-Bouillon

BBL	11080
DIFCO	B 7
Oxoid	CM 31
Merck	5454

#### für Nähragar

Oxoid	CM 3
Merck	7883 (ähnliche Formulierung)

#### für Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Agar

BBL	11807
DIFCO	B 12
Oxoid	CM 107
Merck	1407

## 6. Durchführung der Prüfung

### 6.1. Sterilisation

Glaspetrischalen für die Aufnahme von Nähragar sowie Glaspetrischalen zum Abdecken vorgefertigter Verpackungen bzw. zur Aufnahme von Deckeln sowie Pipetten (in Pipettenbüchsen) sind im Heißluftsterilisator zwei Stunden lang bei mindestens 160 °C zu sterilisieren. Die Wischerröhrchen werden eine halbe Stunde bei 120 °C im Autoklaven sterilisiert. Vor Einbringen der Wischerröhrchen in den Autoklaven sind die Silicon-Kautschuk-Stopfen lose auf das Reagenzglas aufzusetzen. Unmittelbar nach dem Öffnen des Autoklaven sind die Stopfen fest in die Röhrchen zu stecken. Zur Aufrechterhaltung der Sterilität müssen die Geräte nach 14 Tagen Aufbewahrungszeit wieder in der angegebenen Weise sterilisiert werden.

### 6.2. Probenvorbereitung

Das Entfernen der Umverpackung der Proben (siehe Abschnitt 3.1) ist in einem vor Luftzug geschützten Raum vorzunehmen. Es empfiehlt sich, den Arbeitstisch vor Arbeitsbeginn mit einer desinfizierenden Lösung abzuwaschen, z. B. mit 70%igem Alkohol.

### 6.3. Herstellung der fertigen Proben

#### 6.3.1. Erstes Prüfverfahren: Beschichtungsmethode

Die aus der Umverpackung entnommenen Proben werden mit dem entsprechenden Nährmedium beschichtet. Es ist darauf zu achten, daß bei Hohlgefäßen Wandung und Boden vollständig beschichtet sind. Am günstigsten ist es, wenn der Nährboden im Wasserbad auf 45 bis 47 °C gebracht wird, so daß der Nährboden kurz nach dem Aufbringen auf Wandung und Boden erstarrt. Sofort nach dem Beschichten ist die vorgefertigte Verpackung mit einem passenden sterilen Petrischalendeckel abzudecken. Es empfiehlt sich, den Petrischalendeckel auf der zu prüfenden Verpackung mit einer geeigneten Banderole zu befestigen. Werden Deckel geprüft, so sind diese aus der Umverpackung zu entnehmen, in eine passende Petrischale zu legen und mit dem betreffenden Nährmedium zu beschichten. Nach dem Beschichten wird die Petrischale sofort mit dem Petrischalenoberteil abgedeckt. Es sind je 10 Proben (Deckel und zu prüfendes Gefäß) mit den Nährmedien nach den Abschnitten 5.1, 5.2 und 5.3 zu beschichten. Die so vorbereiteten Proben kommen in den Brutschrank.

#### 6.3.2. Zweites Prüfverfahren: Wischermethode

Die aus der Umverpackung entnommenen Proben werden mit dem Wischer vollständig abgestrichen. Bei Hohlgefäßen ist darauf zu achten, daß Boden und Innenwand, bei Deckeln die Deckelunterseite sorgfältig abgestrichen werden. Nach dem Abstreichen kommt der Wischer in das zugehörige Reagenzglas zurück, und es werden 10 ml Lösung nach Abschnitt 5.5 zugegeben.

Zur gleichmäßigen Keimverteilung werden die Röhrchen 30 s von Hand hin und her gerollt. Von den 10 ml Verdünnungsflüssigkeit jedes Wischerröhrchens wird zum Beschicken der bereitgestellten Petrischalen je 1 ml mit einer sterilen Pipette entnommen und in die Petrischalen gegeben. Sofort nach Eingabe der Lösung werden je 10 ml abgekühlter Nähragar (45 bis 47 °C) in die Petrischale gegeben und die Petrischale

verschlossen. Die 1 ml Verdünnungsflüssigkeit werden mit dem Nähragar sorgfältig vermischt, wobei darauf zu achten ist, daß der Petrischalendeckel nicht benetzt wird. Nach dem Erstarren des Nährmediums werden die Petrischalen umgedreht und in den Brutschrank gegeben. Weiterhin wird 1 ml der Verdünnungsflüssigkeit in die in Abschnitt 5.4 beschriebenen, vorbereiteten Prüfröhrchen gegeben. Die so vorbereiteten Proben sind anschließend zu bebrüten. Es wird mit den Nährmedien nach den Abschnitten 5.1, 5.2 und 5.4 geprüft. Je Probe sind 10 Einheiten zu prüfen, so daß je Probe insgesamt 20 Nährböden und 10 Durham-Röhrchen geprüft werden müssen.

#### 6.4. Bebrütung

Die nach den Abschnitten 6.3.1 bzw. 6.3.2 vorbereiteten Proben mit den Nährmedien nach den Abschnitten 5.1 und 5.2 werden 3 Tage bei 25 °C, die Proben mit dem Nährmedium nach Abschnitt 5.3 werden  $20 \pm 2$  Stunden bei 37 °C bebrütet. Die Reagenzgläser mit Durham-Röhrchen mit dem Nährmedium nach Abschnitt 5.4 werden 3 Tage bei 37 °C inkubiert. Diese Röhrchen sind täglich auf Gasbildung zu kontrollieren.

#### 7. Versuchsauswertung

Die Petrischalen werden nach Ablauf der Brutzeit dem Brutschrank entnommen. Alle gebildeten Kolonien auf dem Nährmedium nach Abschnitt 5.1 werden gezählt. Nach Möglichkeit sollte angegeben werden, welche Kolonien (Keimgruppen) dominieren.

Die auf dem Nährmedium nach Abschnitt 5.2 gewachsenen Hefen und Schimmelpilz-Kolonien werden getrennt gezählt, gegebenenfalls unter Zuhilfenahme eines Mikroskopes.

Die auf dem Nährmedium nach Abschnitt 5.3 rot gefärbten Kolonien werden als coliforme Bakterien gezählt.

Das Ergebnis der Auszählung von je 10 Einheiten pro Probe wird addiert und das arithmetische Mittel gebildet. Die Anzahl der gefundenen Keime wird durch den Verpackungsinhalt in g bzw. ml dividiert und das Ergebnis mit 100 multipliziert.

Bei Deckeln wird die Anzahl der Keime auf 100 cm<sup>2</sup> Deckeloberfläche bezogen.

Beim Nährmedium nach Abschnitt 5.4 ist anzugeben, ob Gasbildung und gleichzeitig Trübung aufgetreten ist oder nicht.

#### Berichtigung:

Der vierte Absatz des Abschnitts 7. **Versuchsauswertung** ist folgendermaßen zu ergänzen: ... und das Ergebnis mit 100 multipliziert. Dieses Auswerteverfahren gilt für die Beschichtungsmethode 6.3.1. Bei der Wischermethode 6.3.2 wird genauso vorgegangen, nur muß das Ergebnis (arithmetisches Mittel) mit 10 multipliziert werden.

#### 8. Prüfbericht

Im Prüfbericht sind unter Hinweis auf dieses Merkblatt anzugeben:

Art der zu untersuchenden Verpackung,

Ort, Datum und Zeit der Probenahme,

Gesamtkeimzahl KZ<sub>B</sub>, bezogen auf 100 ml bzw. 100 g Verpackungsinhalt oder bei Deckeln auf 100 cm<sup>2</sup> Deckeloberfläche mit Angabe der angewandten Methode,

Anzahl der Schimmelpilze und Hefen KZ<sub>SH</sub>, bezogen auf 100 ml bzw. 100 g Verpackungsinhalt oder bei Deckeln auf 100 cm<sup>2</sup> Deckeloberfläche mit Angabe der angewandten Methode,

Anzahl der coliformen Keime KZ<sub>C</sub> bezogen auf 100 ml bzw. 100 g Verpackungsinhalt oder bei Deckeln auf 100 cm<sup>2</sup> Deckeloberfläche mit Angabe der angewandten Methode,

Angabe, ob Gasbildung aufgetreten ist oder nicht, bei der Prüfung mit Durham-Röhrchen,

gegebenenfalls Abweichungen von den Vorschriften dieses Merkblatts.

#### 9. Anmerkungen

Dieses Merkblatt wurde von der Untergruppe „Oberflächenkeimzahlbestimmung“ am Institut für Lebensmitteltechnologie und Verpackung, München, ausgearbeitet. Es soll der Öffentlichkeit zur Stellungnahme vorgelegt werden und als vorläufige Arbeits- und Diskussionsgrundlage dienen. Wegen der grundsätzlichen Bedeutung des Merkblattes soll noch folgender Hinweis gegeben werden:

In dem Merkblatt werden zwei Prüfverfahren vorgeschlagen, die zwischen Auftraggeber und Auftragnehmer vereinbart werden können. Es hat sich jedoch gezeigt, daß das Verfahren nach Abschnitt 6.3.1, Beschichtungsmethode, insbesondere dort angewandt werden soll, wo die Nährböden gut an den Wandungen der zu prüfenden Verpackung haften. Das Verfahren nach Abschnitt 6.3.2, Wischer-Methode, kann für alle vorgefertigten Verpackungen angewendet werden; es ist vor allem dann zu empfehlen, wenn sich die Verpackungen nicht beschichten lassen.

Bei der Angabe der Keime wurde bewußt auf 100 g bzw. 100 ml Bezug genommen, da bei einer Vielzahl von Verpackungsgefäßen die Berechnung der Gesamtoberfläche nur schwer möglich ist und die Bestimmung des Gesamtinhaltes vorgefertigter Verpackungen sich durch Ausmessen mit Wasser leicht durchführen läßt.