

# Verpackungs-Rundschau

Literaturhinweis: Verpackungs-Rundschau 25 (1974) Nr. 1, Techn.-wiss. Beilage, Seiten 5—8

## 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 18

#### Prüfung auf antimikrobielle Bestandteile in Packstoffen

Herausgegeben von der Untergruppe „Oberflächenkeimzahlbestimmung“ der Arbeitsgruppe „Lebensmittelerhaltung und Mikrobiologie“ — September 1973

##### 1. Zweck und Anwendung

Zur Beurteilung von Verpackungen im Rahmen des Lebensmittelgesetzes liegen Empfehlungen vor. Die XXXVI. Empfehlung behandelt Papiere, Kartons und Pappen für die Lebensmittelverpackung<sup>1</sup>. Unter B, Absatz VIII: Konservierungsstoffe steht: „Das Verpackungsmaterial darf durch den Zusatz dieser Stoffe (Sorbinsäure, p-Hydroxybenzoesäureäthyl- und/oder -propylester, Ameisensäure, Benzoesäure, Addukt aus 70% Benzylalkohol und 30% Formaldehyd) keinesfalls eine konservierende Wirkung auf die verpackten Lebensmittel ausüben.“

Prüfmethoden liegen für diese Beurteilungen nicht vor. Daher beschreibt dieses Merkblatt ein Prüfverfahren, nach dem der Übergang von Konservierungsstoffen geprüft werden kann. Für viele Packstoffe, die nicht für die Lebensmittelverpackung gedacht sind, ist es jedoch oft angebracht, sie antimikrobiell auszurüsten. Antimikrobielle Ausrüstungen von Verpackungen können nach diesem Merkblatt überprüft werden.

##### 2. Begriff

Die Widerstandsfähigkeit von Packstoffen gegen Mikroorganismen wird danach beurteilt, ob der Packstoff unter bestimmten Bedingungen von Mikroorganismen bewachsen wird. Die Bildung einer Hemmzone beim Auflegen des Packstoffs auf Nähragar zeigt an, ob der Packstoff wasserlösliche antimikrobielle Bestandteile abgeben kann. Die Intensität des Bewuchses ist ein Maß für die Widerstandsfähigkeit des Packstoffs gegen Mikroorganismen, der Durchmesser der Hemmzone ist ein Kriterium für das Ausmaß der Abgabe von Hemmstoffen.

##### 3. Probenahme, Probenzahl

- 3.1. Die Probenahme erfolgt nach Vereinbarung oder in Zweifelsfällen sinngemäß 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 nicht vorhanden ist, werden die Proben in Echtpergament eingeschlagen.
- 3.2. Die Probenzahl soll pro Entnahmeeinheit mindestens 10 betragen.

##### 4. Prüfgeräte

- 4.1. Brutschrank, regelbar auf eine Temperatur von 25 °C ± 1 grad und 30 °C ± 1 grad.
- 4.2. Autoklav für einen Betriebsdruck bis 3,5 at und eine Sterilisationstemperatur bis 134 °C. Er muß so eingerichtet sein, daß eine Mindesttemperatur zwischen 110 und 120 °C auf ± 2 grad eingehalten werden kann.
- 4.3. Dampftopf.
- 4.4. Heißluftsterilisator für eine Sterilisationstemperatur von 160 bis 170 °C.
- 4.5. Petrischalen aus Glas nach DIN 12 339 bzw. Einweg-Petrischalen aus Kunststoff, Durchmesser 87 bis 89 mm.
- 4.6. Korkbohrer und Korkbohrerschärfer. Der Korkbohrer soll einen Durchmesser von 10 mm haben.
- 4.7. Pinzetten.
- 4.8. Vollpipetten nach DIN 12 690, Klasse B 2 ml, 3 ml, 10 ml, 30 ml.
- 4.9. Pipettenbüchse.
- 4.10. Zentrifuge.
- 4.11. Zentrifugengläser 40 ml.

<sup>1</sup> Diese Empfehlung wird laufend ergänzt. Gültig ist der jeweils neueste Stand laut Bundesgesundheitsblatt bzw. Franck, R.: Kunststoffe im Lebensmittelverkehr. — Carl Heymanns Verlag KG, Köln-Berlin-Bonn-München 1971.

- 4.12. Elektrophotometer mit 10 mm-Küvette und Filter Hg 546.
- 4.13. Kulturkolben nach Roux, 600 ml.
- 4.14. Nährbodenflaschen, 300 ml, z. B. mit Kapsenbergkappen.
- 4.15. Rollrandflaschen, 250 ml.
- 4.16. Reagenzgläser, randlos für Bakteriologie, 18 x 150 mm.
- 4.17. Zellstoffstopfen.
- 4.18. Glasperlen.
- 4.19. Wasserbad, regelbar für den Temperaturbereich  $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ grd.}$
- 4.20. Bunsenbrenner oder Spirituslampe.
- 4.21. Elektrisches pH-Meßgerät mit Glaselektrode.
- 4.22. Zonenablesegerät zum Ausmessen der Hemmzonen-durchmesser.
- 4.23. Wägegäler.
- 4.24. Impfösen.

## 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  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit aufgesetzten Kapsenbergkappen. Der pH-Wert des gebrauchsfertigen Nährbodens soll bei  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$   $7,4 \pm 0,2$  betragen.

#### 5.1.3. Vorbereitung der Reagenzgläser:

Nach Abkühlen des Nährbodens auf ca.  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  werden in die sterilen Reagenzgläser jeweils etwa 10 ml des flüssigen sterilen Nährbodens unter sterilen Bedingungen eingegossen und sofort mit sterilen Zellstoffstopfen verschlossen. Die Reagenzgläser werden so gelegt, daß der Nährboden mit schräger Oberfläche erstarrt. Sie sind bei  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufzubewahren, eine Lagerzeit von 14 Tagen darf nicht überschritten werden.

### 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 ·  $\text{H}_2\text{O}$
- 10 g Maltose ·  $\text{H}_2\text{O}$
- 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  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit aufgesetzten Kapsenbergkappen. Der pH-Wert des fertigen Nährmediums soll  $5,4 \pm 0,1$ , bezogen auf eine Meßtemperatur von  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , betragen. Falls erforderlich, wird der pH-Wert des Nährmediums mit verdünnter Natronlauge oder verdünnter Salzsäure eingestellt.

#### 5.2.3. Vorbereitung der Reagenzgläser:

Nach Abkühlen des Nährbodens auf ca.  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  werden in die sterilen Reagenzgläser jeweils etwa 10 ml des flüs-

sigen sterilen Nährbodens unter sterilen Bedingungen eingegossen und sofort mit sterilen Zellstoffstopfen verschlossen. Die Reagenzgläser werden so gelegt, daß der Nährboden mit schräger Oberfläche erstarrt. Sie sind bei  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufzubewahren, eine Lagerzeit von 14 Tagen darf nicht überschritten werden.

### 5.3. Testagar für den Allgemeinen Hemmstofftest

- #### 5.3.1. Zusammensetzung:
- 6,9 g Spezialpepton
  - 5,1 g Natriumchlorid
  - 13,0 Agar-Agar
  - 25,0 g

#### 5.3.2. Bereitung:

Die angegebenen Mengen Nährstoffe werden einem Liter frisch destilliertem oder vollentsalztem Wasser zugesetzt und 15 min gewechselt. Anschließend wird im Dampftopf bis zur vollständigen Lösung gekocht und in vier 300 ml-Nährbodenflaschen umgefüllt. Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven 15 min bei  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit aufgesetzten Kapsenbergkappen. Der pH-Wert des gebrauchsfertigen Nährbodens soll bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  7,0 bis 7,6 betragen. Ist dies nicht der Fall, muß mit verdünnter Natronlauge oder verdünnter Salzsäure eingestellt werden.

### 5.4. Kochsalz-Pepton-Lösung

#### 5.4.1. Zusammensetzung:

- 1,0 g Pepton aus Fleisch, tryptisch verdaut
- 8,5 g Natriumchlorid, reinst
- 9,5 g

#### 5.4.2. Bereitung:

Die angegebene Menge Nährstoffe wird in 1000 ml frisch destilliertes oder voll entsalztes Wasser, das einen pH-Wert nicht unter 6 haben soll, gegeben und gelöst. Die frisch angesetzte Lösung wird auf drei Nährbodenflaschen verteilt und 15 min bei  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  sterilisiert. Die Lösung muß bei Lagerung bei Zimmertemperatur innerhalb von acht Tagen verbraucht werden. Wird sie bei  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert, darf eine Lagerzeit von 14 Tagen nicht überschritten werden. Es ist auch möglich, diese Lösung über Membranfilter zu sterilisieren.

## 6. Durchführung der Prüfung

### 6.1. Sterilisation

Pinzetten (in Aluminiumfolie verpackt), Glaspetri-schalen, Korkbohrer, Zentrifugengläser (in Aluminium-folie verpackt), Rollrandflaschen mit Aluminiumfolien-verschluß, Kulturkolben nach Roux, Reagenzgläser mit Zellstoffstopfen, Glasperlen, Wägegäler und Pipetten in Pipettenbüchsen werden im Heißluftsterilisator 2 h lang bei  $160\text{ }^{\circ}\text{C}$  sterilisiert. Die Luftlöcher der Pipetten-büchsen werden während der Sterilisation offen ge-halten und danach verschlossen.

### 6.2. Herstellung der Impfsuspensionen

#### 6.2.1. Testorganismen:

Als Testorganismen werden für die Widerstands-prüfung gegen Bakterien *Bac. subtilis* ATCC 6633 und gegen Schimmelpilze *Asp. niger* BL 89 verwendet. Die Testkeime werden auf Stammkulturen vorrätig gehalten.

#### 6.2.2. Herstellung der Impfsuspension von *Bac. subtilis*:

Von der *Bac. subtilis*-Stammkultur werden Nähragar-Schrägröhrchen als Arbeitskulturen angelegt, sieben Tage bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  bebrütet und dann im Kühlschrank auf-bewahrt.

Pro Röhrchen werden die Keime mit 3 ml steriler phy-siologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt und auf der Oberfläche eines Rouxkolbens, der vorher mit 300 ml sterilem Nähragar (Abschnitt 5.1) gleichmäßig beschickt wurde, mit Hilfe steriler Glasperlen gut verteilt. Nach siebentägiger Bebrütung bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  werden die Keime

mit 30 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt, in eine sterile Rollrandflasche gefüllt und mit steriler Aluminiumfolie verschlossen. Anschließend wird zur Abtötung der vegetativen Formen 30 min im Wasserbad auf 65 °C erhitzt. Die Sporensuspension wird danach in ein steriles Zentrifugenglas gefüllt und zentrifugiert. Die überstehende Lösung wird vorsichtig abgegossen und verworfen. Der Bodensatz wird mit 30 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und der Vorgang wiederholt. Nach dreimaligem Waschen werden die Sporen in 20 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und mit dem Elektrophotometer (Filter Hg 546) auf etwa 80% Lichtdurchlässigkeit durch Verdünnen mit physiologischer Kochsalzlösung eingestellt.

Die Impfsuspension ist, im Kühlschrank aufbewahrt, 14 Tage verwertbar. Diese Suspension kann auch fertig von der Firma Merck bezogen werden (Art. 10 649).

### 6.2.3. Herstellung der Impfsuspension von *Asp. niger*:

Von einer *Asp. niger*-Stammkultur, die auf Sabouraud-Schrägröhrchen (Abschnitt 5.2.3) vorrätig gehalten wird, wird mit einer abgeflamten Impföse auf eine Sabouraud-Petrishale ungeimpft. Nach drei Wochen Inkubationszeit bei 25 °C werden mit einer abgeflamten und mit steriler physiologischer Kochsalzlösung angefeuchteten Impföse durch vorsichtiges Abstreichen Konidien entnommen, in ein steriles Reagenzglas mit 10 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung gegeben und mit Zellstoffstopfen verschlossen. Die physiologische Kochsalzlösung sollte möglichst mit 0,001 ml Tween 80 oder einem ähnlichen Netzmittel versetzt werden.

Vor Gebrauch muß die Suspension gut durchgeschüttelt werden. Die Impfsuspension ist, im Kühlschrank aufbewahrt, 14 Tage verwertbar.

### 6.3. Probenvorbereitung

Aus den zu untersuchenden Proben werden mit einem sterilen Korkbohrer Prüfblättchen mit einem Durchmesser von 10 mm ausgestanzt und sofort in ein steriles Wägegglas gegeben. Die Versuchsstücke dürfen nur mit steriler Pinzette, nicht aber mit den Fingern berührt werden. Es sind für jeden Testkeim mindestens 20 Versuchsblättchen anzustanzen.

### 6.4. Herstellung der fertigen Proben

#### 6.4.1. Bakterien: *Bac. subtilis*:

Verflüssigter steriler Testagar (nach Abschnitt 5.3) wird auf ca. 60 °C abgekühlt, mit 2 ml eingestellter Impfsuspension nach Abschnitt 6.2.2 pro 300 ml Nährboden versetzt und die Suspension unter vorsichtigem Umschütteln gleichmäßig verteilt. Der geimpfte Nährboden wird sofort in Petrischalen ausgegossen, wobei man 10 bis

15 ml Nährboden pro Petrischale rechnet. Auf den noch leicht verflüssigten Boden werden drei Prüfblättchen (Beispiel siehe Abschnitt 7.1, Bild 1) mit einer sterilen Pinzette aufgelegt und etwas angedrückt. Es ist darauf zu achten, daß sich beim Auflegen der Prüfblättchen keine Luftpolster bilden, da sonst das Ergebnis verfälscht werden könnte. Die Widerstandsfähigkeit wird von beiden Seiten, d. h. von Oberseite und Unterseite der Probe, bestimmt. Pro Probe und Seite sind mindestens drei Petrischalen anzusetzen. Bei jeder Bestimmung muß eine Kontrollpetrischale ohne Versuchsblättchen angesetzt werden. Nach dem Erstarren werden die Platten so in den Brutschrank gelegt, daß der Deckel der Petrischale unten liegt, um das Auftropfen von Kondenswasser auf die Probe zu verhindern.

#### 6.4.2. Schimmelpilze: *Aspergillus niger*:

Die Bestimmung erfolgt nach Abschnitt 6.4.1, aber statt Testagar wird Sabouraud-Agar (Abschnitt 5.2) und 0,5 ml der Impfsuspension nach Abschnitt 6.2.3 pro 300 ml Nährboden genommen.

#### 6.5. Bebrütung

Die nach Abschnitt 6.4.1 vorbereiteten Petrischalen werden bei 30 °C und die nach Abschnitt 6.4.2 vorbereiteten Petrischalen bei 25 °C bebrütet, nachdem sie 2 h im Kühlschrank bei +5 °C ± 1 grad gelagert haben.

### 7. Versuchsauswertung

#### 7.1. Beurteilung für das Lebensmittelgesetz

Die Petrischalen nach 6.4.1 werden nach drei Tagen, die nach 6.4.2 nach sieben Tagen Inkubationszeit dem Brutschrank entnommen und ausgewertet. Zeigen die Kontrollpetrischalen mit den Testkeimen (*Bac. subtilis* und *Asp. niger*) keinen Bewuchs, so ist der Versuch mit einer neuen Impfsuspension zu wiederholen.

Die Proben, die keine Hemmzonen aufweisen (Bild 1) entsprechen der XXXVI. Empfehlung B, VIII. Proben mit Hemmzonen (Bild 2) entsprechen nicht.

Proben, die nach dieser Prüfzeit überwachsen sind, entsprechen der Empfehlung, sind jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit nicht mit Konservierungsstoffen behandelt.

#### 7.2. Beurteilung von Packstoffen auf antimikrobielle Ausrüstung

Die Petrischalen nach 6.4.1 werden nach drei Tagen, die nach 6.4.2 nach sieben Tagen Inkubationszeit dem Brutschrank entnommen und ausgewertet. Zeigen die Kontrollpetrischalen mit den Testkeimen (*Bac. subtilis* und *Asp. niger*) keinen Bewuchs, so ist der Versuch mit einer neuen Impfsuspension zu wiederholen.

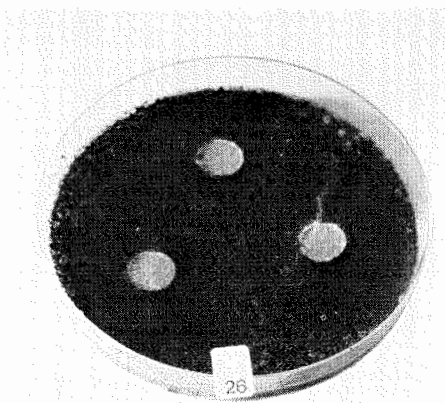


Bild 1: Probe ohne Hemmzonen.

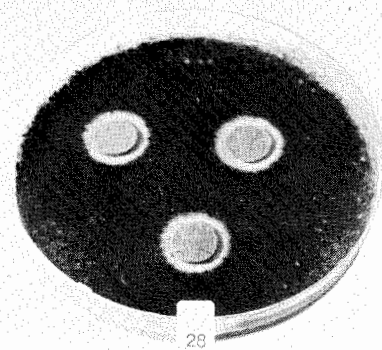


Bild 2: Probe mit Hemmzonen.

Zeigen die Prüfplättchen nach drei (Bakterien) oder sieben (Schimmelpilze) Tagen Bebrütungszeit Bewuchs, gilt der Packstoff als nicht widerstandsfähig gegen die angewandten Testkeime, und der Versuch kann abgebrochen werden. Ist nach drei bzw. sieben Tagen kein Wachstum auf den Prüfplättchen festzustellen, so gilt der Packstoff als bedingt widerstandsfähig. Weist die Probe nach sechs (Bakterien) bzw. 14 (Schimmelpilze) Tagen keinen Bewuchs auf, so gilt der Packstoff als widerstandsfähig gegen die Testkeime.

Bei Bildung von Hemmzonen wird der Durchmesser der Hemmzonen in mm angegeben.

## 8. Prüfbericht

Im Prüfbericht sind unter Hinweis auf dieses Merkblatt anzuführen:

Art des untersuchten Materials,  
Ort, Datum und Zeit der Probenahme,  
Beurteilung der Widerstandsfähigkeit gegen *Bac. subtilis*,  
Beurteilung der Widerstandsfähigkeit gegen *Asp. niger*,  
Beurteilung nach dem Lebensmittelgesetz,  
gegebenenfalls Abweichungen von dieser Vorschrift.

## 9. Erläuterungen

9.1. In einem weiteren Merkblatt soll die Prüfung von in Wasser unlöslichen antimikrobiellen Bestandteilen beschrieben werden. In diesem Merkblatt werden auch

weitere Testorganismen vorgeschlagen werden, die weniger widerstandsfähig sind als die z. Z. verwendeten.

9.2. Die Nährmedien können auch aus Trockennährboden hergestellt oder fertig zubereitet (Fertigplatte, Einwegröhrchen) in den Zusammensetzungen, wie beschrieben, bezogen werden. Trockennährmedien werden nach der Vorschrift des Herstellers aufgelöst, gekocht und sterilisiert.

9.3. Das Nährmedium nach Abschnitt 5.2 entspricht DIN 10 050, Blatt 3.

Die Herstellercodes sind wie folgt:

Trockennährboden

für Nähragar:

Oxoid CM 3

Merck 7883 (ähnliche Formulierung),

für Testagar für den Allgemeinen Hemmstofftest:

Merck 10 663,

für Pilznährboden nach Sabouraud, modifiziert:

Merck 7662;

Fertignährboden

für Nähragar:

Sartorius Membranfilter

SM 14 117 (Fertigplatte)

SM 14 137 (Einwegröhrchen)

für Pilznährboden nach Sabouraud, modifiziert:

Sartorius Membranfilter

SM 14 114 (Fertigplatte)

SM 14 134 (Einwegröhrchen).