

Merkblätter für die Prüfung von Packmitteln

Merkblatt 21

Bestimmung der Oberflächenkeimzahl

(Bakterien, Schimmelpilze, Hefen und coliforme Keime)

auf nicht saugfähigen Packstoffen

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 21

Bestimmung der Oberflächenkeimzahl (Bakterien, Schimmelpilze, Hefen und coliforme Keime) auf nicht saugfähigen Packstoffen

Herausgegeben von der Untergruppe „Oberflächenkeimzahlbestimmung“ der Arbeitsgruppe „Lebensmittelerhaltung und Mikrobiologie“ — März 1974

1. Zweck und Anwendung

Packstoffe für die Verpackung von Lebensmitteln müssen genügend frei von Mikroorganismen sein. Deshalb müssen zur Kontrolle geeignete Prüfverfahren vorliegen. Dieses Merkblatt beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl, der Anzahl von Schimmelpilzen und Hefen und der Anzahl coliformer Bakterien auf nicht saugfähigen Packstoffen. Es erfaßt beschichtete, lackierte, imprägnierte und kaschierte Packstoffe aus Papier, Karton, Vollpappe und Wellpappe. Auch Kunststoff- und Aluminiumfolien, unkaschiert, kaschiert oder beschichtet, können nach diesem Verfahren untersucht werden. Für Buttereinwickler gemäß DIN 10 082, Blatt 1, gilt für die Prüfung der Keimzahl DIN 10 050, Blatt 3, „Prüfung von Buttereinwicklern: Keimzahlbestimmung“, Ausgabe April 1972.

2. Begriffe

Die Oberflächenkeimzahl ist ein Maß für den mikrobiologischen Zustand eines Packstoffes und wird nach den Festlegungen dieses Merkblattes bestimmt. Bei Packstoffen wird die Gesamtkeimzahl OKZ_B , die Anzahl an Schimmelpilzen und Hefen OKZ_{SH} und die Anzahl an coliformen Keimen OKZ_C auf 100 cm² Packstoff bezogen. Die Gesamtkeimzahl OKZ_B gibt die Anzahl aller Keimkolonien an, die nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen bei 25 °C auf Nähragar bestimmt wird. Auf Nähragar sind Bakterienkolonien vorherrschend. Die Keimzahl an Schimmelpilzen und Hefen OKZ_{SH} gibt die Anzahl der Schimmelpilze und Hefen an, die nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen bei 25 °C auf Sabouraudagar (modifiziert) bestimmt wird. Die Anzahl an Hefen und Schimmelpilzen ist getrennt anzugeben. Die Zahl coliformer Bakterien OKZ_C gibt die Anzahl coliformer Bakterien an, die nach einer Inkubationszeit von 20 ± 2 Stunden bei 37 °C auf Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Agar bestimmt wird.

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. Die entnommenen Proben sind sofort aufeinander und in ein sterilisiertes Probenahmegefäß zu legen.
- 3.2. Die Probenzahl soll pro Entnahmeeinheit mindestens 10 betragen.

4. Prüfgeräte

- 4.1. Brutschrank, regelbar auf eine Temperatur von 25 °C ± 1 grd und 37 °C ± 1 grd.
- 4.2. Autoklav für einen Betriebsdruck bis 3,5 bar und eine Sterilisationstemperatur bis 134 °C. Er muß so eingerichtet sein, daß eine Mindesttemperatur zwischen 110 und 120 °C auf ± 2 grd genau eingehalten werden kann.
- 4.3. Dampftopf.

- 4.4. Heißluftsterilisator für eine Sterilisationstemperatur von 160 bis 170 °C.
- 4.5. Kolonienzählgerät. Zur Arbeitserleichterung ist es zweckmäßig, nach Möglichkeit ein Kolonienzählgerät zu verwenden, das mit einer elektrischen Zählrichtung 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. Messer, Papiermesser, sterilisierbar.
- 4.8. Pinzetten, Kornklammern und Drigalski-Spatel.
- 4.9. Bunsenbrenner oder Spirituslampe.
- 4.10. Sterilisierbare Metallschablone, 6 x 6 cm.
- 4.11. Sterilisierbarer Kreisschneider, 50 cm².
- 4.12. Gippschere oder ähnlich starke Schere aus nichtrostendem Stahl.
- 4.13. Becherglas, DIN 23 312, 2 l.
- 4.14. Glasstab, Länge 30 cm, ϕ 0,5 cm.
- 4.15. Nährbodenflaschen, 300 ml mit Kapsenbergkappen oder passenden Zellstoffstopfen.
- 4.16. Rollrandflaschen mit Bügelverschluß, 250 ml.
- 4.17. Zentimetermaß.
- 4.18. 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 vollentsalztem 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 °C mit aufgesetzten Kapsenbergkappen. Der pH-Wert des gebrauchsfertigen Nährbodens soll bei 20 °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 · H₂O
- 10 g Maltose · H₂O
- 10—15 g Agar-Agar
- 40—45 g

5.2.2. **Bereitung:**

Die angegebenen Mengen Nährstoffe werden einem Liter frisch destilliertem oder vollentsalztem 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 °C mit aufgesetzten Kapsenbergkappen. Der pH-Wert des fertigen Nährmediums soll $5,4 \pm 0,1$, bezogen auf eine Meßtemperatur von 20 °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
12,0—13,0	g	Agar-Agar
<hr/>		
38,532	bis	39,532 g

5.3.2. **Bereitung:**

Die angegebenen Mengen Nährstoffe werden einem Liter frisch destilliertem oder vollentsalztem 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.

6. **Durchführung der Prüfung**

6.1. **Sterilisation**

Pinzetten, Messer, Schere, Kreisschneider, Schablone und Glaspetrischalen nach DIN 12 339 sind im Heißluftsterilisator 2 Stunden lang bei mindestens 160 °C zu sterilisieren. Bei Serienanalysen können Pinzetten, Messer, Schere, Kreisschneider und Schablone auch durch Abflammen sterilisiert werden.

6.2. **Vorbereitung der Versuchsstücke**

Aus den Proben werden mit einem sterilen Messer oder einer sterilen Schere mit Hilfe der sterilen Schablone Versuchsstücke der Größe 6 x 6 cm oder mit einem sterilen Kreisschneider Versuchsstücke der Größe 50 cm² herausgeschnitten. Die Versuchsstücke dürfen nur mit sterilen Pinzetten, Kornklammern oder Drigalski-Spatel, nicht aber mit den Fingern berührt werden.

6.3. **Zahl der Versuchsstücke**

Ist nur eine Seite des Packstoffes zu prüfen, so sind je Entnahmeeinheit mindestens 10 Versuchsstücke pro zu prüfender Mikroorganismenart auszuscheiden; sind beide Seiten des Packstoffes zu prüfen, so erhöht sich die Zahl der Versuchsstücke auf mindestens 20 pro zu prüfender Mikroorganismenart. Die zugeschnittenen Versuchsstücke sind bis zur weiteren Verwendung vor Fremdinfection zu schützen.

6.4. **Herstellung der fertigen Proben mit Nährbodenplatte**

In die sterilen Petrischalen sind jeweils etwa 10 ml des im Dampftopf verflüssigten Nährbodens unter sterilen Bedingungen einzugießen. Nach Erstarren wird auf die noch feuchte Nährbodenoberfläche das Versuchsstück aufgelegt und mit einer sterilen Pinzette oder einem sterilen Drigalski-Spatel angedrückt, so daß keine Luftpolster unter ihm vorhanden sind. Anschließend wird das Versuchsstück vom Rande her durch Eingießen von etwa 7,5 bis 10 ml Nährboden mit einer Temperatur von höchstens $48 \text{ °C} \pm 2 \text{ grad}$

gleichmäßig 2 mm hoch übergossen. Nach dem Erstarren werden die Platten so in den Brutschrank gelegt, daß der Deckel der Petrischale unten liegt, um das Auftropfen von Kondenswasser auf das Versuchsstück zu verhindern. Die Versuchsstücke müssen nach dem Überschichten glatt liegen bleiben. Versuchsstücke, die sich zusammenrollen, werden verworfen und sind zu ersetzen. Je nach Vereinbarung sind für die Prüfung folgende Nährböden zu verwenden:

6.4.1. Keimzahl: Nähragar nach Abschnitt 5.1,

6.4.2. Schimmelpilze und Hefen: Sabouraud, modifiziert, nach Abschnitt 5.2,

6.4.3. Coliforme Keime: Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Agar nach Abschnitt 5.3.

6.5. **Bebrütung**

Die nach Abschnitt 6.4 vorbereiteten Versuchsstücke mit den Nährmedien nach den Abschnitten 5.1 und 5.2 werden 3 Tage bei 25 °C, die Versuchsstücke mit dem Nährmedium nach Abschnitt 5.3 werden 20 ± 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

7. **Versuchsauswertung**

Die Petrischalen mit den Versuchsstücken werden nach Ablauf der Inkubationszeit dem Brutschrank entnommen. Mit dem Keimzählgerät wird die Anzahl der Kolonien, die auf dem Versuchsstück vorhanden sind, gezählt. Nach Möglichkeit sollte angegeben werden, welche Kolonien (Keimgruppen) dominieren (gegebenenfalls unter Zuhilfenahme eines Mikroskops). Das Ergebnis der Auszählung von 10 Platten wird addiert, das arithmetische Mittel gebildet und wie folgt die Oberflächenkeimzahl berechnet:

7.1. Oberflächenkeimzahl

7.1.1. Versuchsstücke 6 x 6 cm
 $KZ \cdot 2,78 = OKZ_X/100 \text{ cm}^2$

7.1.2. Versuchsstücke 50 cm²
 $KZ \cdot 2,00 = OKZ_X/100 \text{ cm}^2$

Die Auszählung erfolgt getrennt nach den verwendeten Nährmedien.

X = B, SH oder C.

8. **Prüfbericht**

Im Prüfbericht sind unter Hinweis auf dieses Merkblatt anzugeben:

- Art des zu untersuchenden Packstoffes,
- Ort, Datum und Zeit der Probenahme,
- Gesamtkeimzahl OKZ_B , bezogen auf 100 cm² Packstoffoberfläche,
- Anzahl der Schimmelpilze und Hefen OKZ_{SH} , bezogen auf 100 cm² Packstoffoberfläche,
- Anzahl der coliformen Keime OKZ_C , bezogen auf 100 cm² Packstoffoberfläche,
- Keimbefall auf der Druckfarbe als qualitativer Vermerk,
- gegebenenfalls Keimbefall an der Schnittkante,
- gegebenenfalls Abweichungen von den Vorschriften des Merkblattes.

9. **Anmerkungen**

Dieses Merkblatt wurde von der Untergruppe „Oberflächenkeimzahlbestimmung“ ausgearbeitet und die Prüfverfahren durch mehrere Ringversuche in verschiedenen Laboratorien geprüft. Es soll der Öffentlichkeit zur Stellungnahme vorgelegt werden und als vorläufige Arbeits- und Diskussionsgrundlage dienen. Wegen der grundsätzlichen Bedeutung dieses Merkblattes werden noch folgende Hinweise gegeben:

9.1. Das Wachstum von Mikroorganismen und der dadurch hervorgerufene Abbau ist ein komplizierter biologischer Vorgang, der durch viele Faktoren einflußbar ist. Aus diesem Grund lassen sich biologische Versuche nur bis zu einem gewissen Grad standardisieren. Diese immer wieder zu machende Erfahrung muß

bei allen biologischen Prüfverfahren beachtet werden. Ringversuche zeigten, daß das beschriebene Prüfverfahren reproduzierbare Werte liefert.

- 9.2. Das Ausschneiden der Versuchsstücke bereitet in gewissem Umfang Schwierigkeiten. Um ein immer gleich großes Versuchsstück zu erhalten, wurde die Verwendung einer Schablone als Hilfsmittel beim Schneiden vorgeschlagen. Günstiger erscheint der Einsatz eines Kreisschneiders, da dieser immer gleich große Versuchsstücke liefert. Der Nachteil der bisher angebotenen Kreisschneider ist jedoch, daß diese schlecht sterilisierbar sind, die Klingen umständlich ausgewechselt werden müssen und sich schlecht abflambieren lassen. Das Modell 936a der *Karl Frank GmbH*, Mannheim-Rheinau, hat sich für diesen Zweck ganz gut bewährt; es hat jedoch den Nachteil, daß es nicht unfallsicher ist. Trotzdem wurde das Kreisschneidverfahren in das Merkblatt aufgenommen, und es wäre zu begrüßen, wenn die zuständige Industrie ein geeignetes sterilisierbares Kreisschneidegerät entwickeln könnte.
- 9.3. Falls eine Untersuchung der Packstoffe an ihren Originalschnittkanten gewünscht wird, wird diese Untersuchung getrennt an weiteren 10 Versuchsstücken durchgeführt. Diese Versuchsstücke werden in Form von Dreiecken ausgeschnitten, die Originalschnittkante soll dabei mit 60 mm Länge die längste Seite des Dreiecks sein. Im Prüfbericht ist zu vermerken, ob diese Kante ein deutlich höheres Keimwachstum gegenüber der eigentlichen Probe aufweist.
- 9.4. Außerhalb der Versuchsstücke befindliche Kolonien deuten auf Sekundärinfektionen während des Versuchsansatzes hin. Versuche, bei denen mehr als zwei Kolonien solcher Sekundärinfektionen auftreten, sind zu verwerfen.
- 9.5. Die Nährmedien können auch aus Trocken-Nährboden hergestellt oder fertig zubereitet in den Zusammensetzungen, wie beschrieben, bezogen werden. Trocken-nährmedien werden nach der 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
- für Nähragar: Oxoid CM 3
Merck 7883 (ähnliche Formulierung)
- für Pilznährboden nach Sabouraud, modifiziert:
Merck 7662
DIFCO 0747 } ähnliche Formulierung
BBL 11589 } wie unter Punkt 5.2
- für Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Agar:
BBL 11807
DIFCO B 12
Oxoid CM 107
Merck 1406
- Fertignährböden
- für Nähragar: Merck 10416 (ähnliche Formulierung)
- für Pilznährboden nach Sabouraud, modifiziert:
Sartorius-Membranfiltergesellschaft
mbH
SM 141 14 Fertigplatte
SM 141 34 Einwegröhrchen
Biotest-Serum-Institut GmbH
(ähnliche Formulierung)
862.400.6 Dextrose } Fertigplatten und
862.500.5 Maltose } Einwegröhrchen
- für Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Agar:
Biotest-Serum-Institut
9000 73 Einwegröhrchen
9000 70 Fertigplatten