

Verpackungs-Rundschau

Literaturhinweis: Verpackungs-Rundschau 27 (1976) Nr. 10, Techn.-wiss. Beilage, Seiten 82 bis 84

Merkblätter für die Prüfung von Packmitteln

Merkblatt 28

Bestimmung von Clostridiensporen in Papier, Karton, Vollpappe und Wellpappe

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 28

Bestimmung von Clostridiensporen in Papier, Karton, Vollpappe und Wellpappe

Herausgegeben von der Untergruppe „Mikrobiologie der Packstoffe“ der Arbeitsgruppe
„Lebensmittelerhaltung und Mikrobiologie“ — Mai 1976*

1. Zweck und Anwendung

Diese Vorschrift beschreibt ein Prüfverfahren zur Bestimmung von Clostridien in Papier, Karton, Vollpappe und Wellpappe. Clostridien sind anaerob lebende Mikroorganismen, die unter bestimmten Bedingungen bei der Papiererzeugung vorkommen und deren Sporen in Packstoffe gelangen können. Das Verfahren ist sinngemäß auf Stoff Suspensionen und Wässer anzuwenden.

Zur orientierenden Prüfung auf Anwesenheit pathogener Clostridien (Gasbranderreger, Botulinuserreger) ist ein Testverfahren vorgesehen, das eine Verdachtsaussage zuläßt.

2. Begriff

Clostridien sind Sporenbildner, deren Sporen durch eine 30-minütige Erhitzung bei 75 °C nicht abgetötet werden. Viele Species der Gattung Clostridium können eine Schwarzfärbung des angewandten Nährmediums bewirken. Es wird die niedrigste Packstoffmenge angegeben, in der die Clostridiensporen nach 3 — 7 Tagen Bebrütung bei 30 °C noch nachzuweisen sind.

3. Probenahme, Probenzahl

- 3.1. Die Probenahme erfolgt 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 Echtpergament eingeschlagen.
- 3.2. Die Probenzahl soll pro Entnahmeeinheit mindestens 10 betragen.

4. Prüfgeräte

- 4.1. Brutschrank, regelbar auf eine Temperatur von 30 °C ± 1 K (diese Temperatur muß an allen Stellen im Brutraum gleichmäßig sein).
- 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 °C ± 2 K eingehalten werden kann.
- 4.3. Dampftopf.
- 4.4. Heißluftsterilisator für eine Sterilisationstemperatur von 160 bis 170 °C.
- 4.5. Schere: Gipsschere oder ähnlich starke Schere aus nichtrostendem Stahl.

- 4.6. Aufschlaggerät Ultra-Turrax TP 18/2 N mit auswechselbarem Schaft und Schlitzlager aus Polytetrafluoräthylen.
- 4.7. 200-ml-Babyflaschen aus Glas mit 100-ml-Markierungen.
- 4.8. Wägegäschchen, Durchmesser 3 cm, Höhe 3 cm, DIN 12 605. Es ist empfehlenswert, diese Gläschen mit laufender Nummer versehen zu beziehen.
- 4.9. Waage mit einer Genauigkeit von ± 0,0001 g.
- 4.10. Membranfiltrationsgerät.
- 4.11. Bunsenbrenner oder Spirituslampe.
- 4.12. Bechergläser, DIN 23 312, 200 ml, 1 l.
- 4.13. Meßpipetten mit weitem Ausfluß, die es gestatten, 0,1 — 2 ml genau zu messen.
- 4.14. Vollpipette nach DIN 12 690, Klasse B, 10 ml.
- 4.15. Pipettenbüchse.
- 4.16. Reagenzgläser (ca. 18 × 150 mm) mit Schraubverschluß, sterilisierbar.
- 4.17. Wasserbad, regelbar für den Temperaturbereich 75 °C ± 2 K.
- 4.18. Pinzetten oder Kornklammern.
- 4.19. Nährbodenflaschen, 300 ml, z. B. mit Kapsenbergkappen.
- 4.20. Reagenzglasschüttler.
- 4.21. Anaerobier-Topf.

5. Nährmedien und Nährmedienherstellung

5.1. Clostridien-Differential-Bouillon (DRCM)

5.1.1. Zusammensetzung:

5,0 g	Pepton aus Fleisch, tryptisch verdaut
5,0 g	Pepton aus Casein, tryptisch verdaut
8,0 g	Fleischextrakt
5,0 g	Natriumacetat, kristallin, p. a.
1,0 g	Hefeextrakt
1,0 g	Stärke, wasserlöslich
1,0 g	D (+) - Glucose · H ₂ O p. a.
0,5 g	L-Cysteinumchlorid
27,5 g	

5.1.2. Bereitung:

Pepton, Fleischextrakt, Natriumacetat und Hefeextrakt werden zu 800 ml frisch destilliertem oder voll entsalztem Wasser gegeben und unter ausgiebigem Umschütteln gleichmäßig verteilt. Die Stärke wird in 200 ml destilliertem Wasser bis zur Lösung gekocht und zu den 800 ml gegeben. Anschließend wird bis zur vollständigen Lösung im Dampftopf behandelt. Danach werden Glucose und Cystein zugesetzt. Das Medium wird mit verdünnter Natronlauge auf einen pH-Wert von 7,1 ± 0,1, bezogen auf eine Meßtemperatur von 20 °C, eingestellt.

Jeweils 10 ml des Nährmediums werden in Reagenzgläser gefüllt und mit aufgesetztem Schraubverschluß

* Erarbeitet unter Berücksichtigung der Arbeiten von B. Freame und B. W. F. Fitzpatrick "The Use of Differential Reinforced Clostridial Medium for the Isolation and Enumeration of Clostridia from Food" aus "Isolation of Anaerobes", Academic Press 1971, unter Beachtung der Vorschläge von Dr. Henning, Dr. Möller, Frau Dr. Roeder und Frau Zschaler, Mitglieder der Untergruppe.

im Autoklaven 15 min bei 120 °C sterilisiert. Die Schraubverschlüsse sind unmittelbar nach dem Sterilisieren, d. h. bei noch heißen Nährmedien, fest anzuziehen. Das Medium ist bei + 4 °C aufzubewahren. Eine Lagerzeit von 14 Tagen sollte nicht überschritten werden.

5.1.3. Herstellung weiterer Lösungen:

5.1.3.1. 4 g Natriumsulfit, wasserfrei

5.1.3.2. 7 g Eisen(III)-citrat

5.1.3.3. Bereitung:

Natriumsulfit bzw. Eisencitrat werden in jeweils 100 ml destilliertem oder voll entsalztem Wasser gelöst und durch Membranfiltration sterilisiert. Die Lösungen sind bei einer Lagerung von + 4 °C mindestens zwei Wochen haltbar.

5.1.4. Herstellung des gebrauchsfertigen Clostridien-Nährmediums:

An dem Tag, an dem das Medium gebraucht wird, werden gleiche Teile Natriumsulfit-Lösung und Eisen (III)-citrat-Lösung gemischt und 0,2 ml dieser Mischung dem Nährmedium unter sterilen Bedingungen zugefügt und vorsichtig verteilt.

5.2. Pepton-Lösung

5.2.1. Zusammensetzung:

1,0 g Pepton aus Fleisch, tryptisch verdaut.

5.2.2. Bereitung:

Pepton wird in 1000 ml frisch destilliertes oder voll entsalztes Wasser gegeben und gelöst. Die frisch ange-setzte Lösung wird auf Nährbodenflaschen verteilt und 15 min bei 120 °C sterilisiert. Die Lösung muß bei Lagerung bei Zimmertemperatur innerhalb von 8 Tagen verbraucht werden. Wird sie bei + 4 °C gelagert, darf eine Lagerzeit von 14 Tagen nicht überschritten werden. Es ist auch möglich, diese Lösung über Membranfilter zu sterilisieren.

5.3. Paraffin dickflüssig DAB 7

Das Paraffin wird 15 min bei 150 °C sterilisiert.

6. Durchführung der Prüfung

6.1. Sterilisation der Geräte

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

6.2. Trockengehaltsbestimmung

Die Trockengehaltsbestimmung des zu untersuchenden Materials erfolgt anhand einer Parallelprobe nach DIN 53 103. Bei der Probenahme ist zu beachten, daß ausreichendes Versuchsmaterial für die Trockengehaltsbestimmung mit entnommen wird.

6.3. Probenvorbereitung

Aus den Proben werden mit einer sterilen Schere Versuchsstücke in der Größe von etwa 15 × 15 mm geschnitten. Die Versuchsstücke dürfen nur mit sterilen Pinzetten oder Kornklammern, nicht aber mit den Fingern berührt werden. Je Probe sind mindestens 10 Versuchsstücke von je etwa 1,5 g auszuschneiden.

Anhand des ermittelten Trockengehaltes der Probe wird die lufttrockene Einwaage berechnet, die genau 1 g absolut trockenes Untersuchungsmaterial betragen soll. Die berechnete Menge ist unter sterilen Bedingungen in ein steriles Wägeglas einzuwägen. Die Einwaage wird in eine sterile Babyflasche gegeben, die mit 99 ml Peptonlösung 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.

6.4. Herstellung der fertigen Proben

Jeweils 0,1/0,25/0,5/0,75/1,0/1,5 und 2,0 ml der Basissuspension werden den Reagenzgläsern mit den Nährmedien zugesetzt und mit Hilfe des Reagenzglasschüttlers gleichmäßig verteilt. Nach der Verteilung wird mit 1 ml vorher bei 150 °C sterilisiertem Paraffin sicherheitshalber überschichtet. Die Schraubverschlüsse der Reagenzgläser dürfen nicht mehr fest angezogen werden (Gasbildung). Die Verdünnungen werden 30 min bei 75 °C im Wasserbad erhitzt und danach zur sofortigen Abkühlung in kaltes Wasser getaucht. Es sind jeweils 3 Proben je Verdünnungsstufe anzusetzen.

6.5. Bebrütung

Die nach 6.4 vorbereiteten Reagenzgläser werden 3 — 7 Tage bei 30 °C bebrütet.

7. Versuchsauswertung

Clostridien lösen eine Schwarzfärbung des Nährmediums aus. Die Reagenzgläser werden nach 3 Tagen Bebrütung dem Brutschrank entnommen und kontrolliert. Falls noch keine Verfärbung festzustellen ist, wird weitere 4 Tage bebrütet und dann ausgewertet.

Die niedrigste Verdünnungsstufe, bei der eine Verfärbung des Nährmediums auftritt, wird angegeben und die entsprechende Packstoffmenge in g berechnet.

8. Beispiel

Trockengehalt der Probe = 94,5%

Einwaage: 1,0582 g lufttrockene Pappe $\hat{=}$ 1,0 g absolut trockener Pappe/100 ml Peptonlösung (Basissuspension)

Auswertung: Nach 3 Tagen Bebrütung Verfärbung bei 0,5 ml = 0,005 g absolut trockener Pappe

Ergebnis: In 0,5 ml Basissuspension $\hat{=}$ 0,005 g absolut trockener Pappe sind nach 3 Tagen Bebrütung Clostridien sporen nachweisbar.

9. Prüfbericht

Im Prüfbericht sind anzuführen:

- Art der untersuchten Probe;
- Ort, Datum und Zeit der Probenahme;
- Trockengehalt der Probe nach DIN 53 103;
- Packstoffmenge in g absolut trockenen Materials, in der noch Clostridien sporen nachzuweisen sind;
- Bebrütungszeit;
- gegebenenfalls Abweichungen von dieser Vorschrift.

10. Anmerkungen

10.1. Die aufgeführte Methode wurde von der Untergruppe „Mikrobiologie der Packstoffe“ am Institut für Lebensmitteltechnologie und Verpackung, München, erarbeitet und in Ringversuchen überprüft.

10.2. Eine Zugabe von 0,005 g Resazurin als Redoxindikator/1 Clostridien-Differential-Bouillon (DRCM) ermöglicht

- eine Kontrolle der anaeroben Bedingungen. Die Zugabe von Resazurin wurde von der Untergruppe in den Ringversuchen nicht überprüft, wird aber in der Literatur vorgeschlagen.
- 10.3. Sollen mehr als 2 ml Basissuspension untersucht werden, kann durch Membranfiltration ein größeres Probenvolumen geprüft werden. Hierbei wird die Basissuspension 30 min bei 75 °C erhitzt und anschließend die zu untersuchende Menge über Membranfilter (Porengröße 0,45 µm) filtriert und das Filter mit Hilfe von sterilen Pinzetten aufgerollt. Die Filter werden in das Nährmedium eingebracht und anschließend mit 1 ml Paraffin überschichtet.
- Die Membranfilter können steril bezogen oder müssen nach Vorschrift des Lieferanten sterilisiert werden. Hinweise für das Arbeiten nach der Membranfiltrationsmethode sind im Merkblatt „Bestimmung des Luftkeimgehaltes, Membranfiltermethode“ der Untergruppe „Oberflächenkeimzahlbestimmung“ der Arbeitsgruppe „Lebensmittelerhaltung und Mikrobiologie“ am Institut für Lebensmitteltechnologie und Verpackung, München, zu finden¹.
- 10.4. Bei Auftreten von Schwarzfärbung des DRCM-Nährbodens kann auf Verdacht pathogener Clostridien ein orientierender Test durchgeführt werden, indem mit der Pipette ca. 1 ml des bewachsenen und geschwärzten Nährmediums im Stichverfahren in verflüssigten und auf ca. 50 °C abgekühlten Clostridien-Selektivagar (Hochschicht), SPS-Agar nach *Angelotti*, vom Boden beginnend eingepflegt und gleichmäßig verteilt wird.
- 10.4.1. SPS-Agar nach *Angelotti*
- 10.4.1.1. Zusammensetzung:
- | | |
|---------|---------------------|
| 15,0 g | Pepton aus Casein |
| 10,0 g | Hefeextrakt |
| 0,5 g | Eisen(III)-citrat |
| 0,5 g | Natriumsulfit |
| 0,01 g | Polymyxin-B-sulfat |
| 0,12 g | Sulfadiazin-Natrium |
| 15,0 g | Agar-Agar |
| 41,13 g | |
- 10.4.1.2. Bereitung:
- Die angegebenen Mengen 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 °C mit aufgesetzten Kapsenbergekappen. Eine anschließende sofortige Abkühlung in kaltem Wasser oder im Kühlschrank ist angebracht. Der pH-Wert des gebrauchsfertigen Nährbodens soll bei 37 °C 7,0 ± 0,1 betragen.
- 10.4.2. Bebrütung:
- 24, 48 und 72 h bei 35 °C unter anaeroben Bedingungen.
- 10.4.3. Auswertung:
- Es wird nach 24, 48 und 72 h Bebrütungszeit ausgewertet. Treten schwarze Kolonien auf, besteht die Verdachtsdiagnose: pathogene Clostridien! Alle anderen bewachsenen Kulturen sind im Autoklaven zu sterilisieren, bevor sie zum Abfall kommen. Die Identifizierung des Clostridien-Typs ist ggf. die Aufgabe von dafür eingerichteten Speziallaboratorien, an welche die so veränderten Röhren einzusenden sind (z. B. Hygiene-Institute).

¹ Verpackungs-Rdsch. 23 (1972) Nr. 12, techn.-wiss. Beilage, S. 96–99.