

Verpackungs-Rundschau

Literaturhinweis: Verpackungs-Rundschau 28 (1977) Nr. 4, Seiten 486, 488, 490 und 492

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 31

Bestimmung der „Minimalen Hemm-Konzentration“ (MHK) von Bioziden der Papierfabrikation

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

1. Zweck und Anwendung

Dieses Merkblatt beschreibt ein Prüfverfahren zur Bestimmung der „Minimalen Hemm-Konzentration“ (MHK) von Bioziden, wie sie z. B. in der Papierindustrie verwendet werden. Hierbei wird die bakterizide und fungizide bzw. bakteriostatische und fungistatische Wirkung des zu prüfenden Biozides im Reihenverdünnungstest ermittelt.

2. Begriff

Als „Minimale Hemm-Konzentration“ (MHK) wird die niedrigste Konzentration des Biozides in $\mu\text{g/ml}$ angegeben, bei der nach der vorgeschriebenen Bebrütungszeit im Reihenverdünnungstest kein Wachstum zu beobachten ist.

3. Probenahme

Die Probenahme der Biozide erfolgt nach Vereinbarung.

4. Prüfgeräte

- 4.1. Brutschrank, regelbar auf eine Temperatur von $25^\circ\text{C} \pm 1\text{ K}$ und $30^\circ\text{C} \pm 1\text{ K}$.
- 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 $\pm 2\text{ K}$ 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. Vollpipetten nach DIN 12 690, Klasse B 5 ml .
- 4.7. Meßpipette $0,1\text{ ml}$.
- 4.8. Pipettenbüchse.
- 4.9. Zentrifuge.

- 4.10. Zentrifugengläser 40 ml .
- 4.11. z. B. Elektrophotometer mit 10 mm -Küvette und Filter Hg 546.
- 4.12. Kulturkolben nach Roux, 600 ml .
- 4.13. Nährbodenflaschen, 300 ml , z. B. mit Kapsenbergkappen.
- 4.14. Rollrandflaschen, 250 ml .
- 4.15. Reagenzgläser, randlos für Bakteriologie, $18 \times 150\text{ mm}$.
- 4.16. Zellstoffstopfen.
- 4.17. Glasperlen.
- 4.18. Bunsenbrenner oder Spirituslampe.
- 4.19. Elektrisches pH-Meßgerät mit Glaselektrode.
- 4.20. Impfösen.
- 4.21. Meßkolben, 100 ml , sterilisierbar, mit Schraubverschluß (ISO R 1042/R 1115).
- 4.22. Membranfiltrationsgerät. Das Gerät besteht im wesentlichen aus:
 - 4.22.1. einem 40 oder mehr ml fassenden Filtrationsaufsatz und einem Unterteil mit einer herausnehmbaren Fritte (aus Metall, Glas oder Quarz) zur Aufnahme von Membranfiltern von 47 — 50 mm Durchmesser. Das Auslaufrohr des Unterteils muß mit einem Absperrhahn versehen sein. Beide Teile werden z. B. durch einen Bajonettverschluß zusammengehalten.
 - 4.22.2. einer Saugflasche nach DIN 12 476 und einer Saugpumpe z. B. Wasserstrahlpumpe.

5. Nährmedien, Hilfslösungen und Filter

- 5.1. Nähragar
 - 5.1.1. Zusammensetzung:

1 g	Fleischextrakt
2 g	Hefeextrakt
5 g	Pepton aus Fleisch, tryptisch verdaut
5 g	Natriumchlorid, reinst
<u>10—15 g</u>	Agar-Agar
23—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 geweicht. 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.
- 5.1.3. **Vorbereitung der Reagenzgläser:**
Nach Abkühlen des Nährbodens auf ca. 45 °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 °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 · 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 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 °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 (1 M) oder verdünnter Salzsäure (1 M) eingestellt.
- 5.2.3. **Vorbereitung der Reagenzgläser:**
Nach Abkühlen des Nährbodens auf ca. 45 °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 °C aufzubewahren, eine Lagerzeit von 14 Tagen darf nicht überschritten werden.
- 5.3. **Physiologische Kochsalzlösung**
- 5.3.1. **Zusammensetzung:**
8,5 g Natriumchlorid, reinst
- 5.3.2. **Bereitung:**
Die angegebene Menge 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 °C sterilisiert. Die Lösung muß bei Lagerung bei Zimmertemperatur innerhalb von acht 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 (Porengröße ca. 0,2 µm) zu sterilisieren.
- 5.4. **Steriles dest. Wasser**
Bereitung:
Frisch destilliertes oder voll entsalztes Wasser (pH 7 ± 1) wird 15 min bei 120 °C sterilisiert.
Es ist auch möglich, das dest. Wasser über Membranfilter zu sterilisieren.
- 5.5. **Nährbouillon, doppelt konzentriert**
- 5.5.1. **Zusammensetzung:**
6,0 g Fleischextrakt
10,0 g Pepton aus Fleisch, tryptisch verdaut
16,0 g
- 5.5.2. **Bereitung:**
Die angegebenen Mengen Nährstoffe werden einem Liter frisch destilliertem oder voll entsalztem Wasser zugesetzt. 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 gebrauchsfertigen Nährbodens soll bei 37 °C 7,0 bis 7,6 betragen. Ist dies nicht der Fall, muß mit verdünnter Natronlauge oder verdünnter Salzsäure eingestellt werden.
- 5.6. **Sabouraud-Glucose-Bouillon, doppelt konzentriert**
- 5.6.1. **Zusammensetzung:**
10,0 g Pepton aus Fleisch, tryptisch verdaut
10,0 g Pepton aus Casein, tryptisch verdaut
40,0 g D (+) - Glucose
60,0 g
- 5.6.2. **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 °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.
- 5.7. **Membranfilter**
- 5.7.1. Für Schimmelpilze 0,6 µm Porengröße:
Die Filter können steril bezogen oder müssen nach Vorschrift des Lieferanten sterilisiert werden.
- 5.7.2. Für Bakterien mit Gitternetz 0,45 µm Porengröße:
Die Filter können steril bezogen oder müssen nach Vorschrift des Lieferanten sterilisiert werden.
- 6. Durchführung der Prüfung**
- 6.1. **Sterilisation der Geräte**
- 6.1.1. Glaspetrischalen, Zentrifugengläser (in Aluminiumfolie verpackt), Rollrandflaschen mit Aluminiumfolienverschluß, Kulturkolben nach Roux, Reagenzgläser mit Zellstoffstopfen, Glasperlen, Meßkolben und Pipetten in Pipettenbüchsen werden im Heißluftsterilisator 2 h lang bei 160 °C sterilisiert. Die Luftlöcher der Pipettenbüchsen werden während der Sterilisation offen gehalten und danach verschlossen.
- 6.1.2. Filtrationsaufsatz und Fritte des Membranfiltergerätes werden entweder im Trockenschrank bei 160 °C oder mit eingelegtem Membranfilter im Autoklaven 15 min bei 120 °C sterilisiert. Falls eines der Verfahren nicht durchführbar ist, wird mit der Flamme des Bunsenbrenners durch zweimal 20 s langes Abflammen entkeimt. Es ist dann empfehlenswert, die Pumpe laufen zu lassen, damit die Flamme durch die Fritte gesaugt wird.
- 6.2. **Herstellung der Impfsuspensionen**
- 6.2.1. **Testorganismen:**
Als Testorganismen werden zur Prüfung des Biozides gegen Bakterien *E. coli* (oder *Ps. aeruginosa*) und gegen

- Schimmelpilze *Asp. niger* BL 89 (oder *Humicola fuscoatra*) verwendet. Die Testkeime werden auf Stammkulturen vorrätig gehalten.
- 6.2.2. Herstellung der Impfsuspension von *E. coli* bzw. *Ps. aeruginosa*.
 Von der Stammkultur werden Nähragar-Schrägröhrchen (Abschnitt 5.1.3) als Arbeitskulturen angelegt, sieben Tage bei 30 °C bebrütet und dann im Kühlschrank aufbewahrt.
 Pro Röhrchen werden die Keime mit 3 ml steriler physiologischer 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 °C werden die Keime mit 30 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt, in ein steriles Zentrifugenglas gefüllt und zentrifugiert (ca. 4000 Upm). Die überstehende Lösung wird vorsichtig abgossen und verworfen. Der Bodensatz wird mit 30 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und der Vorgang wiederholt. Nach dreimaligem Waschen wird die Bakterienmasse 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.
- 6.2.3. Herstellung der Impfsuspension von *Asp. niger* bzw. *Humicola fuscoatra*:
 Von der Stammkultur, die auf Sabouraud-Schrägröhrchen (Abschnitt 5.2.3) vorrätig gehalten wird, wird mit einer abgeflamten Impföse auf eine Petrischale mit Sabouraud-Agar umgeimpft. 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 nichtionischen Netzmittel versetzt werden.
 Vor Gebrauch muß die Suspension gut durchgeschüttelt werden. Die Impfsuspension ist, im Kühlschrank aufbewahrt, 14 Tage verwertbar.
- 6.3. Herstellung der Ausgangslösung
 0,1 g des zu prüfenden Biozides werden in den Meßkolben (4.21) genau eingewogen und mit sterilem destilliertem Wasser auf 100 ml verdünnt.
- 6.4. Herstellung der Verdünnungsreihen für Bakterien und Schimmelpilze
 Sterile Reagenzgläser werden mit jeweils 5 ml sterilem destilliertem Wasser beschickt. Für einen Reihenverdünnungstest werden neun Reagenzgläser und ein zusätzliches für die Wachstumskontrolle benötigt.
 Von der Ausgangslösung pipettiert man mit einer sterilen Pipette 5 ml in das erste Röhrchen, mischt gut durch und überträgt 5 ml dieser Mischung in das zweite Röhrchen usw. (außer Wachstumskontrolle), so daß mit jedem „Sprung“ die Konzentration halbiert wird. Nach dem „Durchziehen“ enthalten die Röhrchen folgende Konzentration: 500, 250, 125, 62,5, 31,25, ca. 16, ca. 8, ca. 4, ca. 2 und ca. 1 µg/ml.
 Pro Testkeim ist mindestens eine Parallelverdünnungsreihe herzustellen.
- 6.5. Beimpfung des Nährmediums
- 6.5.1. Bakterien:
 Die doppelt konzentrierte Nährbouillon (5.5) wird mit 0,1 ml der genau eingestellten Impfsuspension von *E. coli* (bzw. *Ps. aeruginosa* (6.2.2)) beimpft und gut verteilt.
- 6.5.2. Die doppelt konzentrierte Sabouraud-Glucose-Bouillon (5.6) wird mit 0,1 ml der genau eingestellten Impfsuspension von *Asp. niger* (bzw. *Humicola fuscoatra*) beimpft und gut verteilt.
- 6.6. Herstellung der fertigen Verdünnungsreihen
 Bakterien:
 Jeweils 5 ml der beimpften, doppelt konzentrierten Nährbouillon (6.5.1) werden zu den Biozid-Verdünnungsstufen einschließlich Wachstumskontrolle pipettiert, mit Wattestopfen verschlossen und der Inhalt jedes Röhrchens gut durchgemischt (rollen oder Reagenzglaschüttler!).
 Schimmelpilze:
 Jeweils 5 ml der beimpften, doppelt konzentrierten Sabouraud-Glucose-Bouillon (6.5.2) werden zu den Biozid-Verdünnungsstufen einschließlich Wachstumskontrolle pipettiert, mit Wattestopfen verschlossen und der Inhalt jedes Röhrchens gut durchgemischt (rollen oder Reagenzglaschüttler!).
 Nach Herstellung der fertigen Verdünnungsreihen ergeben sich folgende Endkonzentrationen:
 250, 125, 62,5, 31,25, ca. 16, ca. 8, ca. 4, ca. 2 und ca. 1 µg/ml.
- 6.7. Bebrütung
 Die Verdünnungsreihen für den Bakterientest werden 24 und 72 h bei 37 °C ± 2 K und für den Schimmelpilztest 3 und 7 Tage bei 25 °C ± 2 K bebrütet.
- ## 7. Versuchsauswertung
- 7.1. Die Verdünnungsreihen werden nach Ablauf der Bebrütungszeiten dem Brutschrank entnommen. Es wird visuell das Röhrchen ermittelt, bei dem sich durch die auftretende Trübung Bodensatz oder Bewuchs beim Bakterientest und durch Pilzbewuchs beim Schimmelpilztest das Wachstum des Testkeims anzeigt. Das vorhergehende klare Röhrchen gibt dann die „Minimale Hemmkonzentration“ (MHK) in µg/ml an. Zeigen die Reagenzgläser mit der Wachstumskontrolle keinen Bewuchs, ist der Ansatz zu verwerfen und die Prüfung zu wiederholen.
- 7.2. Soll die biozide bzw. biostatische Wirkung nachgewiesen werden, sind die letzten zwei nicht getrübbten Röhrchen der Membranfiltration zu unterwerfen.
- 7.2.1. Membranfiltration:
- 7.2.1.1. Schimmelpilze:
 Das sterile Membranfilter (nach Abschnitt 5.7.1) wird mit Hilfe einer sterilen Pinzette auf die sterile Fritte des Unterteils des Membranfiltrationsgerätes gelegt, der Filtrationsaufsatz aufgesetzt und der Bajonettverschluß geschlossen. Der Absperrhahn des Unterteils wird geschlossen und die Saugpumpe eingestellt. Anschließend wird der Inhalt des Röhrchens auf das Filter gegeben, der Absperrhahn geöffnet und so lange abgesaugt, bis keine Flüssigkeit mehr auf dem Filter steht. Es wird mit zweimal 10 ml sterilem destilliertem Wasser nachgespült, um Reste des Hemmstoffes zu entfernen und wieder so lange abgesaugt, bis keine Flüssigkeit mehr auf dem Filter steht. Das Membranfilter wird mit einer sterilen Pinzette, mit der Unterseite nach unten, in eine Petrischale mit Sabouraud-Agar, modifiziert (nach Abschnitt 5.2) gegeben. Dabei ist darauf zu achten, daß sich keine Luftblasen zwischen Membranfilter und Nährboden bilden.
 Anschließend wird die Petrischale so in den Brutschrank gelegt, daß der Deckel der Petrischale unten liegt, um

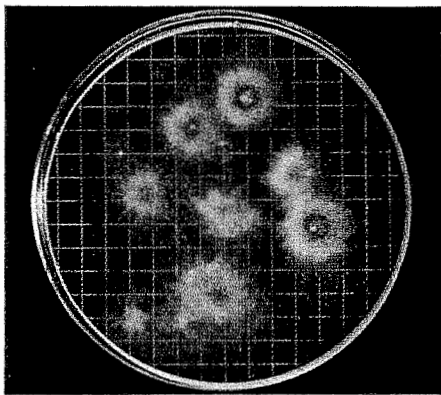


Bild 1: *Aspergillus niger* auf Sartorius Membranfilter SM 13005.

das Auftropfen von Kondenswasser auf das Membranfilter zu verhindern.

Die Membranfiltration ist mit dem Inhalt des zweiten Röhrchens zu wiederholen.

7.2.1.2. Bakterien:

Die Bestimmung erfolgt nach Abschnitt 7.2.1.1. Anstelle des Membranfilters nach Abschnitt 5.7.1 wird das Membranfilter mit Gitternetz (Abschnitt 5.7.2) und Nähragar (Abschnitt 5.1) verwendet.

7.2.2. Bebrütung:

Die nach dem Abschnitt 7.2.1.1 vorbereiteten Petrischalen werden 72 h bei 25 °C und die nach dem Abschnitt 7.2.1.2 vorbereiteten Petrischalen 72 h bei 30 °C bebrütet.

7.2.3. Auswertung:

Bei Bewuchs der Membranfilter handelt es sich um ein Biostatikum; ist kein Bewuchs festzustellen, zeigt das geprüfte Präparat biozide Wirkung.

Bild 1 zeigt ein von *Asp. niger*, Bild 2 ein von *E. coli* bewachsenes Membranfilter.

8. Prüfbericht

Im Prüfbericht sind unter Hinweis auf dieses Merkblatt anzuführen:

- Genaue Bezeichnung des geprüften Präparates;
- Hersteller;
- Lösungsmittel;
- Bakterientest:
MHK nach 24 h in $\mu\text{g/ml}$
MHK nach 72 h in $\mu\text{g/ml}$
Testkeim;

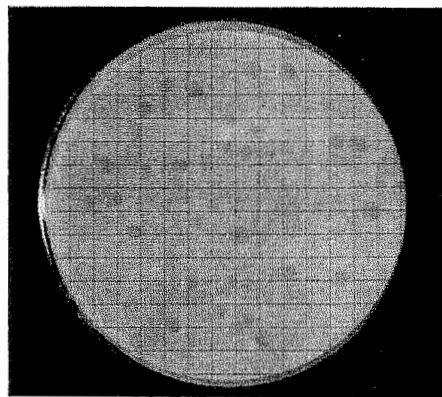


Bild 2: *Escherichia coli* auf Sartorius Membranfilter SM 13906.

— Schimmelpilztest:

MHK nach 3 Tagen in $\mu\text{g/ml}$

MHK nach 7 Tagen in $\mu\text{g/ml}$

Testkeim;

- Angabe, ob biostatische oder biozide Wirkung vorhanden ist;
- gegebenenfalls Abweichungen von dieser Vorschrift.

9. Anmerkungen

- 9.1. Das Prüfverfahren kann gleichzeitig auf die Mikroorganismen (Gesamtflora) im Kreislaufwasser von Papierfabriken angewendet werden, um Anhaltspunkte für einen späteren Einsatz des Biozides zu ermitteln. Hierbei werden zur Herstellung der Verdünnungsreihe die Reagenzgläser statt mit sterilem destilliertem Wasser mit jeweils 5 ml Kreislaufwasser beschickt. Der pH-Wert des Kreislaufwassers wird ermittelt und die Nährbouillon bzw. Sabouraud-Glucose-Bouillon mit verdünnter Natronlauge bzw. verdünnter Schwefelsäure auf den pH-Wert des Kreislaufwassers eingestellt. Eine weitere Beimpfung der Bouillon erfolgt nicht. Von dem Kreislaufwasser wird die Kolonienzahl an Bakterien und Schimmelpilzen bestimmt.
- 9.2. Wird statt dest. Wasser ein anderes Lösungsmittel für die Ausgangsverdünnung eingesetzt, z. B. Methanol usw., muß in einem Blindversuch geprüft werden, ob diese Lösungsmittel in der vorliegenden Konzentration nicht selbst hemmend oder abtötend wirken.
- 9.3. Das Bundesseuchengesetz ist zu beachten. Vgl. auch: „Richtlinien zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel für die Veterinärmedizin“, Lieferung vom 3. 3. 1976 der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e. V., Gießen, Frankfurter Straße 87, sowie Prüfungsrichtlinien der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), G. Fischer Verlag, Stuttgart 1972.