

## Merkblätter für die Prüfung von Packmitteln

Herausgegeben von den Arbeitsgruppen am Fraunhofer-Institut für Lebensmitteltechnologie und Verpackung,  
Institut an der Technischen Universität München

### Merkblatt 37

#### Bestimmung der Gesamtkolonienzahl, der Anzahl an Schimmelpilzen und Hefen und der Anzahl an Gesamt-Enterobakterien auf der Oberfläche vorgefertigter Hilfsmittel für die Lebensmittelindustrie, wie Holzlöffelstiele und Löffel für Eiscreme, Schaschlikspieße und dgl.

Herausgegeben von der Untergruppe „Mikrobiologie der Packstoffe“ der Arbeitsgruppe „Lebensmittelerhaltung und Mikrobiologie“ — Juli 1979

#### 1. Zweck und Anwendung

Dieses Merkblatt beschreibt ein Prüfverfahren zur Bestimmung der Gesamtkolonienzahl an Bakterien, der Anzahl an Schimmelpilzen und Hefen und der Anzahl an Gesamt-Enterobakterien auf der Oberfläche vorgefertigter Hilfsmittel für die Lebensmittelindustrie, wie Holzlöffelstiele und Löffel für Eiscreme, Schaschlikspieße usw. Diese Hilfsmittel müssen infolge der direkten Lebensmittelberührung in mikrobiologischer und hygienischer Hinsicht einwandfrei sein. Das Prüfverfahren soll nicht nur von den Herstellern dieser Hilfsmittel angewandt werden, sondern auch für Kontrolluntersuchungen beim Verwender, um feststellen zu können, ob diese Hilfsmittel während des Transportes durch ungeeignete und unzureichende Umverpackung Sekundärinfektionen ausgesetzt waren.

#### 2. Begriffe

Bei den vorgefertigten Hilfsmitteln wird die Gesamtkolonienzahl an Bakterien ( $KZ_B$ ), die Anzahl an Schimmelpilzen ( $KZ_S$ ) und Hefen ( $KZ_H$ ) und die Anzahl an Gesamt-Enterobakterien ( $KZ_E$ ) auf das jeweilige Hilfsmittel direkt, ohne Angabe der Fläche, bezogen. Hilfsmittel, die größer sind als der Durchmesser einer Normal-Petrischale (ca. 9 cm), müssen vor der Untersuchung in sterilen Polypropylenbeuteln auf die entsprechende Größe zerbrochen werden. Es sind hierbei sämtliche Einzelteile zu prüfen und die Einzelergebnisse bei der Auswertung zu addieren.

#### 3. Probenahme, Probenzahl

3.1. Die Probenahme erfolgt nach Vereinbarung.

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.

3.2. Die Probenzahl muß pro Entnahmeeinheit mindestens 30 betragen.

#### 4. Prüfgeräte

4.1. Brutschrank, regelbar auf eine Temperatur von  $25^\circ\text{C} \pm 1\text{K}$  und  $37^\circ\text{C} \pm 1\text{K}$ .

4.2. Autoklav für einen Betriebsdruck bis 3,5 bar und eine Sterilisationstemperatur bis  $134^\circ\text{C}$ . Er muß so eingerichtet sein, daß eine Mindesttemperatur zwischen  $110$  und  $120^\circ\text{C}$  auf  $\pm 2\text{K}$  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 Zählvorrichtung und einer Lupe von 8—10facher Vergrößerung versehen ist.

4.6. Petrischalen aus Glas nach DIN 12 339 bzw. sterile Einweg-Petrischalen aus Kunststoff, Durchmesser 87—89 mm.

4.7. Nährbodenflaschen, 300 ml mit Kapsenbergkappen.

4.8. Bunsenbrenner oder Spirituslampe.

4.9. Lange Pinzetten.

4.10. Elektrisches pH-Meßgerät mit Glaselektrode.

4.11. Sterile Polypropylenbeutel mit einer Mindestfoliendicke von 0,06 mm.

#### 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 geweiht. 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  $7,4 \pm 0,2$ , bezogen auf eine Meßtemperatur von  $20^\circ\text{C}$ , 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 ·  $\text{H}_2\text{O}$   
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  $120^\circ\text{C}$  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.

gen. 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 des gebrauchsfertigen Nährbodens soll bei 37 °C  $7,4 \pm 0,1$  betragen.

## 6. Durchführung der Prüfung

### 6.1. Sterilisation der Geräte

Glaspetrischalen und Pinzetten sind mindestens 2 h lang bei 160 °C im Heißluftsterilisator zu sterilisieren. Bei Serienanalysen können die Pinzetten auch durch Abflammen sterilisiert werden.

### 6.2. Probenvorbereitung

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

6.2.2. Proben, die größer sind als der Durchmesser einer Normal-Petrischale (ca. 9 cm), müssen vor der Weiterverarbeitung in kleinere Stücke zerbrochen werden. Dies geschieht, indem man die Probe mit Hilfe einer sterilen Pinzette in einen sterilen Polypropylenbeutel (4.11) gibt. Nach Verschließen des Beutels wird die Probe auf das gewünschte Maß gebrochen. Der Beutel wird beschriftet und sämtliche Einzelteile der Probe bis zur Weiterverarbeitung in dem Beutel belassen.

Es sind mindestens 10 Proben mit jedem der Nährböden zu prüfen.

### 6.3. Herstellung der fertigen Proben

In jede Petrischale sind jeweils etwa 10 ml des verflüssigten Nährbodens unter sterilen Bedingungen einzugießen, wobei mindestens 10 Petrischalen von jedem der drei Nährböden (5.1, 5.2, 5.3) herzustellen sind. Nach dem Erstarren werden die Proben auf die noch feuchten Nährbodenoberflächen aufgelegt und mit einer sterilen Pinzette angedrückt. Für die Einzelstücke einer Probe, die nach Abschnitt 6.2.2 vorbereitet wurde, ist jeweils eine neue Petrischale zu verwenden. Anschließend werden die Proben gleichmäßig 2 mm hoch durch Eingießen von etwa 7,5 bis 10 ml des jeweiligen Nährbodens mit einer Temperatur von höchstens 45 °C vom Rand her übergossen. Nach dem

Erstarren werden die Platten derart in den Brutschrank gelegt, daß der Deckel der Petrischale unten liegt, um das Auftropfen von Kondenswasser auf die Probe zu verhindern.

### 6.4. Bebrütung

Die 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.

## 7. Versuchsauswertung

Die Petrischalen werden nach Ablauf der Brutzeit dem Brutschrank entnommen. Alle auf dem Nährmedium nach Abschnitt 5.1 gebildeten Kolonien werden gezählt.

Die auf dem Nährmedium nach Abschnitt 5.2 gewachsenen Hefe- und Schimmelpilz-Kolonien werden getrennt gezählt, gegebenenfalls unter Zuhilfenahme eines Mikroskopes. Nach Möglichkeit sollte angegeben werden, welche Bakteriengruppen bzw. -arten bei dem Nährmedium nach Abschnitt 5.1 und welche Schimmelpilzarten bei dem Nährmedium nach Abschnitt 5.2 Kolonien dominieren.

Die auf dem Nährmedium nach Abschnitt 5.3 rot gefärbten Kolonien werden als Gesamt-Enterobakterien gezählt.

Das Ergebnis der Auszählung von je 10 Einheiten pro Probe wird addiert und das arithmetische Mittel gebildet.

Bei den nach Abschnitt 6.2.2 vorbereiteten Proben werden die Ergebnisse der Einzelteile addiert und als Gesamtwert angegeben. Bewuchs an den Bruchflächen der Proben wird gesondert aufgeführt.

## 8. Prüfbericht

Im Prüfbericht sind unter Hinweis auf dieses Merkblatt anzugeben:

- Art der zu untersuchenden Probe mit genauer Beschreibung und Angabe des Rohstoffes, z. B. Holz, Kunststoff usw., und Hinweis auf Probenvorbereitung;
- Ort, Datum und Zeit der Probenahme;
- Gesamtkeimzahl  $KZ_B$ , Einzelwerte und Mittelwert;
- Anzahl an Schimmelpilzen  $KZ_S$  und Hefen  $KZ_H$ , Einzelwerte und Mittelwerte;
- Anzahl der Gesamt-Enterobakterien  $KZ_E$ , Einzelwert und Mittelwert;
- gegebenenfalls Abweichungen von diesem Merkblatt;
- Prüfdatum.

## 9. Anmerkung

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

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

Die Herstellercodes sind wie folgt:

für Nähragar:

Merck 5450, DIFCO B 1, BBL 11 472;

für Pilznährboden nach Sabouraud:

Merck 7662;

für Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Agar:

BBL 11807, DIFCO B 12, Oxoid CM 107, Merck 1406.