

Merkblätter für die Prüfung von Packmitteln

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

Merkblatt 39

Bestimmung von Bakteriensporen in Papier, Karton, Vollpappe und Wellpappe

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

1. Zweck und Anwendung

Diese Vorschrift beschreibt ein Prüfverfahren zur Bestimmung der Anzahl von Bakteriensporen in Papier, Karton, Vollpappe und Wellpappe. Die Bestimmung aerober Sporenbildner (Bacillus-Arten) und anaerober Sporenbildner (Clostridium-Arten) wird getrennt vorgenommen.

2. Begriff

Bakteriensporen sind Dauerformen von Bakterien, die sich durch große Thermoresistenz auszeichnen und somit Erhitzungsprozesse, wie sie bei der Papierherstellung vorkommen, weitgehend unbeschadet überstehen können. Die aerobe Sporenzahl $S_{KZ} (O^+)$ gibt die Anzahl der Bacillus-Sporen, die anaerobe Sporenzahl $S_{KZ} (O^-)$ gibt die Anzahl der Clostridium-Sporen an, die nach einer Bebrütungszeit von drei Tagen bei einer Temperatur von 30 °C in 1 g der zu untersuchenden, ofentrockenen Probe gefunden wurden. Die Gesamtsporenzahl (SGKZ) ist die Summe der aeroben Sporenzahl $S_{KZ} (O^+)$ und der anaeroben Sporenzahl $S_{KZ} (O^-)$. Die Bestimmung der aeroben Sporenzahl kann auch ohne die Bestimmung der anaeroben Sporenzahl durchgeführt werden, wenn nur die Anzahl der Bacillus-Sporen interessiert. Ebenso kann auch die anaerobe Sporenzahl (Bestimmung der Clostridien) allein durchgeführt werden. Es sei darauf verwiesen, daß zur Bestimmung von Clostridien in Papier, Karton, Vollpappe und Wellpappe eine Alternativmethode existiert*.

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 in ein sterilisiertes Probenahmegefäß zu legen.

3.2. Die Probenanzahl soll pro Entnahmeeinheit mindestens zehn betragen.

4. Prüfgeräte

- 4.1. Brutschrank, regelbar auf eine Temperatur von 30 °C ± 1 K (DIN 58 945 Teil 1 und Teil 2).
- 4.2. Autoklav für einen Betriebsdruck bis 3,5 bar und eine Sterilisationstemperatur von 134 °C. Er muß so eingerichtet sein, daß eine Mindesttemperatur von 120 °C ± 2 K eingehalten werden kann.
- 4.3. Dampftopf.
- 4.4. Hitzeschrank (Heißluftsterilisator) für eine Sterilisationstemperatur von 160 bis 180 °C.
- 4.5. Kolonienzählgerät. Zur Arbeitserleichterung ist es zweckmäßig, ein Kolonienzählgerät zu verwenden, das mit einer elektrischen Zählvorrichtung und einer Lupe von acht- bis zehnfacher Vergrößerung versehen ist. Die Petrischalen sollen von unten beleuchtet werden.
- 4.6. Petrischalen aus Glas nach DIN 12 339 bzw. Einweg-Petrischalen aus Kunststoff, Durchmesser 87 bis 97 mm.
- 4.7. Schere. Gipschere oder ähnlich starke Schere aus nichtrostendem Stahl.
- 4.8. Korkbohrer. Der Korkbohrer soll einen Durchmesser von 15 mm haben.
- 4.9. Pinzetten.
- 4.10. Meßpipetten (1 ml), mit weitem Ausfluß und 0,1-ml-Graduierung.
- 4.11. Pipettenbüchse.
- 4.12. Aufschlaggerät Ultra-Turrax TP 18/2N mit auswechselbarem Schaft und Schlitzlager aus Polytetrafluoräthylen.
- 4.13. 200-ml-Babyflaschen aus Glas mit 100-ml-Markierung.

* Merkblätter für die Prüfung von Packmitteln, Merkblatt 28. Verpackungs-Rdsch. 27 (1976) Nr. 10, Techn.-wiss. Beilage, S. 82–84.

- 4.14. 500-ml-Erlenmeyerkolben (DIN 12 385) mit passenden Watte- oder Zellstoffstopfen.
- 4.15. Wäagegläschen. Durchmesser 3 cm, Höhe 3 cm, DIN 12 605.
- 4.16. Waage mit einer Genauigkeit von $\pm 0,0001$ g.
- 4.17. Bunsenbrenner oder Spiritusflamme.
- 4.18. Wasserbad, auf $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ K}$ genau einstellbar.
- 4.19. Begasbarer Anaerobentopf bzw. Einweg-Anaerobier-System.
- 4.20. Membranfiltrationsgerät für Membranfilter ϕ 50 mm.
- 4.21. Membranfilter aus Celluloseacetat, Porengröße $0,2\text{ }\mu\text{m}$.
- 4.22. Glastrichter.
- 4.23. Thermometer mit $0,1^{\circ}$ -Graduierung bis $180\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5. Nährmedien und Nährmedienherstellung

5.1. Bakterien-Nähragar

5.1.1. Zusammensetzung:

- 1 g Fleischextrakt
- 2 g Hefeextrakt
- 5 g Pepton aus Fleisch, tryptisch verdaut
- 5 g Natriumchlorid
- 15 g Agar-Agar
- 28 g

5.1.2. Bereitung:

Die auf der Packung angegebenen Mengen der Fertignährböden bzw. die angegebenen Mengen der aufgeführten Nährstoffe werden einem Liter frisch destilliertem oder voll entsalztem Wasser zugesetzt, im Dampftopf gekocht und in vier 500-ml-Erlenmeyerkolben über einen Trichter abgefüllt, wonach die Kolben mit Watte- oder Zellstoffstopfen verschlossen werden. Die Sterilisation der Nährböden erfolgt 15 min bei $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Autoklaven. Der pH-Wert des Bakterien-Nähragars (5.1) sollte bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ $7,4 \pm 0,2$ betragen.

5.2. Clostridien-Agar (RCM)

5.2.1. Zusammensetzung:

- 3 g Hefeextrakt
- 10 g Fleischextrakt
- 10 g Pepton aus Casein
- 5 g D(+)-Glucose
- 1 g Stärke, wasserlöslich
- 5 g Natriumchlorid
- 3 g Natriumacetat
- 0,5 g L(+)-Cysteiniumchlorid
- 12,5 g Agar-Agar
- 50 g

5.2.2. Bereitung:

Die auf der Packung angegebenen Mengen der Fertignährböden bzw. die angegebenen Mengen der aufgeführten Nährstoffe werden einem Liter frisch destilliertem oder voll entsalztem Wasser zugesetzt, im Dampftopf gekocht und in vier 500-ml-Erlenmeyerkolben über einen Trichter abgefüllt, wonach die Kolben mit Watte- oder Zellstoffstopfen verschlossen werden. Die Sterilisation der Nährböden erfolgt 15 min bei $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Autoklaven. Nach dem Abkühlen auf $48\text{ }^{\circ}\text{C}$ wird dem Nährboden zur Bestimmung der anaeroben Sporenkeimzahl (Clostridien-Agar-Medien) eine über Membranfilter sterilisierte Lysozymlösung (Muraminidase, E. C. 3.2.1.17, 20 000 bis 25 000 Einheiten/mg) zugegeben. Die Endkonzentration soll $5\text{ }\mu\text{g}$ Lysozym/ml Nähragar betragen. Es sind stets frische Lysozymlösungen einzusetzen, da die Enzymaktivität mit zunehmender Lagerzeit abnimmt. Der pH-Wert des Clostridien-Agars (5.2) sollte bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ $6,8 \pm 0,2$ betragen.

5.3. Phosphatpuffer pH 7,0

5.3.1. Zusammensetzung:

- 11,9 g di-Natriumhydrogenphosphat
- 9,0 g Kaliumdihydrogenphosphat

5.3.2. Bereitung:

Die angegebenen Chemikalienmengen werden in 1000 ml frisch destilliertem Wasser gelöst und zu jeweils 99 ml in Babyflaschen abgefüllt. Die Babyflaschen werden mit lose aufgesetzten Silicongummistopfen 15 min bei $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Autoklaven sterilisiert. Nach dem Abkühlen im Autoklaven werden die Babyflaschen mit den Stopfen dicht verschlossen.

6. Durchführung der Prüfung

6.1. Sterilisation der Geräte

Korkbohrer, Wäagegläschen, Pinzetten, Scheren, Glaspetrischalen, Pipetten und Schaft des Aufschlaggerätes sind im Heißluftsterilisator zwei Stunden lang bei $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu sterilisieren. Bei Serienanalysen können Pinzetten, Scheren, Korkbohrer und Schaft des Aufschlaggerätes auch durch Abflammen sterilisiert werden.

6.2. Probenvorbereitung

Aus den Proben werden mit einer sterilen Schere Versuchsstücke einer Größe von etwa 15×15 mm ausgeschnitten oder mit einem Korkbohrer (ϕ 15 mm) Versuchsstücke ausgestanzt. Diese Versuchsstücke dürfen nur mit sterilen Pinzetten berührt werden. Je Probe sind mindestens zehn Versuchsstücke auszuschneiden bzw. auszustanzen. 1 g des zu untersuchenden Materials wird in ein steriles Wäagegläschen eingewogen. Die Einwaage wird in eine sterile Babyflasche mit 99 ml sterilem Phosphatpuffer (siehe 5.3) gegeben. Sodann werden die Probestücke mit dem Aufschlaggerät 1 min zerfasert. Bei der Entnahme der Faserstoffsuspension mit Pipetten müssen abgesetzte Fasern neu aufgewirbelt werden. Die Fasersuspension stellt die Basissuspension für die weitere Prüfung dar.

6.3. Bestimmung der Sporenkeimzahl

6.3.1. Bestimmung der aeroben Sporenkeimzahl S_{KZ} (O^+) (Bacillus-Sporen):

Die Basissuspension wird in ein Wasserbad von $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gestellt. Sobald die Basissuspension $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ erreicht hat (Überprüfung mit sterilem Thermometer) wird diese 20 min bei dieser Temperatur belassen und danach in kaltem Wasser abgekühlt. Bei dem Erhaltungsschritt werden vegetative Bakterienzellen abgetötet, während Bakteriensporen diesen Schritt zum größten Teil überleben. Von der erhitzten Basissuspension wird eine weitere Verdünnung hergestellt, indem 1 ml der Basissuspension zu 99 ml sterilem Phosphatpuffer zugegeben werden. Von der Basissuspension und der 1 : 100 verdünnten Basissuspension werden jeweils 0,1 und 1 ml in eine Petrischale gegeben und mit 15 ml Bakterien-Nähragar (5.1) gleichmäßig durch achterförmige Bewegung der mit dem Deckel verschlossenen Petrischale vermischt; für jede Entnahmeeinheit sollte nur der Nährboden desselben Ansatzes verwendet werden. Für jede Prüfung sind zehn Basissuspensionen herzustellen.

6.3.2. Bestimmung der anaeroben Sporenkeimzahl S_{KZ} (O^-) (Clostridium-Sporen):

Zur Bestimmung der anaeroben Sporenkeimzahl wird genauso verfahren, wie unter 6.3.1 beschrieben, mit dem Unterschied, daß der Nährboden 5.2 verwendet wird. Die Lysozymzugabe (5.2.2) unterdrückt das Wachstum fakultativ anaerober Bacillus-Arten, die auch unter Luftaustausch wachsen können. Da diese Keime bereits bei der aeroben Sporenkeimzahlbestimmung erfaßt wurden, müssen sie bei der Bestimmung der anaeroben Sporenzahl unterdrückt werden.

6.4. Bebrütung

6.4.1. Die nach 6.3.1 vorbereiteten Petrischalen zur Bestimmung der aeroben Sporenzahl werden drei Tage bei 30 °C bebrütet. Die Platten sind so in den Brutschrank zu legen, daß der Deckel der Petrischale nach unten zu liegen kommt, damit ein Auftropfen von Kondenswasser auf den Agar verhindert wird.

6.4.2. Die nach 6.3.2 vorbereiteten Petrischalen zur Bestimmung der anaeroben Sporenzahl werden in evakuier- und gasbare Anaerobiotöpfe bzw. Einweg-Anaerobier-Systeme gegeben und drei Tage unter anaeroben Bedingungen bei 30 °C bebrütet. Es empfiehlt sich, Methylblau-Indikatoren zur Überprüfung der sauerstofffreien Verhältnisse zuzugeben.

6.5. 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.

7. Versuchsauswertung

Die Petrischalen werden nach dreitägiger Bebrütung dem Brutschrank entnommen. Mit dem Keimzählgerät wird die Anzahl der Kolonien, getrennt nach den Nährböden, ausgezählt. Bei der Auswertung ist zu beachten, daß nicht versehentlich Fasern mitgezählt werden. Eine Kontrollbeobachtung unter dem Binokular (40- bis 70fache Vergrößerung) läßt im Zweifelsfalle Fasern leicht von Bakterienkolonien unterscheiden. Das Ergebnis der Auszählung von zehn Platten gleicher Verdünnungsstufe, auf denen sich nach Möglichkeit 30 bis 300 Kolonien befinden, wird addiert und das arithmetische Mittel gebildet. Unter Berücksichtigung des Trockengehaltes wird der Mittelwert auf 1 g ofentrockenes Untersuchungsmaterial umgerechnet.

8. Prüfbericht

Im Prüfbericht sind anzuführen:

- Art der untersuchten Probe,
- Ort, Datum und Zeit der Probenahme,
- Trockengehalt der Probe nach DIN 53 103,
- Bebrütungszeit und -temperatur,
- aerobe Sporenzahl $S_{KZ} (O^+)$ pro g ofentrockene Probe,
- anaerobe Sporenzahl $S_{KZ} (O^-)$ pro g ofentrockene Probe,

— Gesamtsporenzahl $S_{GKZ} = S_{KZ} (O^+) + S_{KZ} (O^-)$ pro g ofentrockene Probe,

— gegebenenfalls Abweichungen von dieser Vorschrift.

9. Anmerkungen

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

9.2. Zur Vermeidung von Fremdinfectionen ist in einem vor Luftzug geschützten Raum, nach Möglichkeit in einer sterilen Werkbank, zu arbeiten. Die Arbeitsfläche soll eine halbe Stunde vor Arbeitsbeginn mit einer Desinfektionslösung abgewaschen werden.

9.3. Bei dieser Methode werden nicht alle vorhandenen Bakteriensporen erfaßt, sondern vornehmlich Sporen von Arten, welche bei der gewählten Bebrütungstemperatur (30 °C) gut wachsen. Thermophile Bacillus-Sporen (z. B. B. stearothermophilus) oder Clostridium-Sporen (z. B. Cl. thermoaceticum) werden hierbei nicht erfaßt.

9.4. Um zu verläßlichen Ergebnissen zu kommen, sollten Ungeübte die aufgeführten Arbeitsschritte genau durcharbeiten.

9.5. Anaerobier-Systeme können von der Fa. Becton u. Dickinson (unter der Bezeichnung Gas-Pak) und von der Fa. OXOID (unter der Bezeichnung Gas-Kit) bezogen werden.

9.6. Die Nährmedien können auch aus Trocken-Nährböden hergestellt werden. Trocken-Nährböden werden nach der Vorschrift des Herstellers aufgelöst, gekocht und sterilisiert. Die Herstellercodes sind wie folgt:

für Bakterien-Nähragar (ähnliche Formulierung wie 5.1.1):

BBL 11476

OXOID CM 3

Merck 7883

DIFCO B 69

für Clostridien-Agar:

BBL 11564

OXOID CM 151

Merck 5410

9.7. Lysozym kann von den Firmen Serva, Boehringer oder Merck bezogen werden. Angebrochene Packungen sollten rasch aufgebraucht oder mit Stickstoff begast werden, um Enzyminaktivierung durch Oxidationsreaktionen zu vermeiden.