

Verpackungs-Rundschau

Literaturhinweis: Verpackungs-Rundschau 34 (1983) Nr. 11, Techn.-wiss. Beilage, Seiten 84 bis 86

Merkblätter für die Prüfung von Packmitteln

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

Merkblatt 46

Prüfung von Packstoffoberflächen auf fungistatisch wirkende Verbindungen

Herausgegeben von der Arbeitsgruppe „Mikrobiologie der Packstoffe“ — September 1983

1. Zweck und Anwendung

Das vorliegende Merkblatt dient der Bestimmung der Wirksamkeit fungistatisch wirkender Zusätze auf Prüfoberflächen durch Beobachtung der Anwachsrate verschiedener Schimmelpilze bei Verwendung unterschiedlicher Prüfmedien. Die Einstellung der verschiedenen a_w -Werte in den Nährmedien soll die unterschiedlichen a_w -Werte der Produkte simulieren.

2. Begriffe

Hoher a_w -Wert: empfindliche Produkte bezüglich Mikroorganismenverderb.
Niedriger a_w -Wert: unempfindliche Produkte bezüglich Mikroorganismenverderb.

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 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ und $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$ nach DIN 58 945 Teil 1 und 2.
- 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 eingestellt werden kann.
- 4.3. Heißluftsterilisator für eine Sterilisationstemperatur von 160°C bis 170°C .
- 4.4. Petrischalen aus Glas nach DIN 12 339 bzw. sterile Einweg-Petrischalen aus Kunststoff, Durchmesser 87 bis 89 mm.
- 4.5. Schere.
- 4.6. Pinzette.
- 4.7. Reagenzgläser, randlos für Bakteriologie 18×150 mm.
- 4.8. Zellstoffstopfen.
- 4.9. Polyethylenbeutel zur Aufnahme von Petrischalen.
- 4.10. Folienschweißgerät.

- 4.11. Abzug.
- 4.12. Laborgasbrenner.
- 4.13. pH-Meßgerät mit Glaselektrode.
- 4.14. Nährbodenflaschen, 300 ml, z. B. mit Kapsenbergkappen.
- 4.15. Sprühgerät (z. B. „Shandon Spray Gun“ oder „Air-Less“).
- 4.16. Impföse.
- 4.17. Zentimetermaß.
- 4.18. Wägegglas.

5. Testkeime

Katalog-Nr. der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen	Abbildung und Beschreibung in IVLV-Mykothek Tafel Nr.
5.1. für hohe Wasseraktivität	
Aspergillus niger DSM 1957	4
Aspergillus versicolor DSM 1943	9
Hormoconis resinae DSM 1835	35
5.2. für niedrige Wasseraktivität	
Penicillium verrucosum DSM 1836	—
Penicillium chrysogenum DSM 895	12
Aspergillus repens (Eurotium repens) DSM 62631	7

Zur Bereitstellung von Stamm- und Gebrauchskulturen siehe Merkblatt 43, Verpackungs-Rundschau 32 (1981) Nr. 11, Technisch-wissenschaftliche Beilage, Seiten 83—86.

6. Nährmedien und Nährmedienherstellung

Frisch destilliertes oder durch Ionenaustausch vollentsalztes und frisch aufgekochtes Wasser wird im folgenden Text als Wasser bezeichnet.

Reagenzien für Analyse bzw. für Bakteriologie.

6.1. Pilznährboden nach Sabouraud, modifiziert

6.1.1. Zusammensetzung:

- 5 g Pepton aus Casein, tryptisch verdaut
- 5 g Pepton aus Fleisch, tryptisch verdaut
- 40 g D(+)-Dextrose H_2O
- 10 — 15 g Agar-Agar
- 60 — 65 g

6.1.2. Bereitung:

Die angegebenen Mengen Nährstoffe werden einem Liter 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.

6.1.3. Vorbereitung der Reagenzgläser (Schrägröhrchen):

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.

6.1.4. Vorbereitung der Petrischalen:

Nach Abkühlen des Nährbodens auf ca. 45 °C sind jeweils 15 ml des flüssigen sterilen Nährbodens in sterile Petrischalen unter sterilen Bedingungen zu gießen. Nach Erstarren des Nährbodens werden die Platten 1 h bei 44 °C getrocknet. Die getrockneten Platten sind sofort für den Versuch einzusetzen.

6.2. Pilznährboden nach Sabouraud, modifiziert, a_w -Wert 0,95

6.2.1. Zusammensetzung:

5 g Pepton aus Casein, tryptisch verdaut
5 g Pepton aus Fleisch, tryptisch verdaut
40 g D(+)-Dextrose H_2O
169 g Glycerin
10 — 15 g Agar-Agar
234 — 229 g

6.2.2. Bereitung:

wie 6.1.2.

6.2.3. Vorbereitung der Reagenzgläser (Schrägröhrchen):

wie 6.1.3.

6.2.4. Vorbereitung der Petrischalen:

wie 6.1.4.

6.3. Schimmel(Mildew)-Test-Agar (MTA)

6.3.1. Zusammensetzung:

3 g Natriumnitrat ($NaNO_3$)
1 g di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)
0,5 g Magnesiumsulfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
0,5 g Natriumchlorid ($NaCl$)
10 — 15 g Agar-Agar
15 — 20 g

6.3.2. Bereitung:

wie 6.1.2., pH-Wert jedoch $6,8 \pm 0,1$.

6.3.3. Vorbereitung der Petrischalen:

wie 6.1.4.

6.4. Ringerlösung

6.4.1. Zusammensetzung:

2,25 g Natriumchlorid
0,105 g Kaliumchlorid
0,12 g Calciumchlorid
0,05 g Natriumbicarbonat

6.4.2. Bereitung:

Die angegebene Menge Salze wird einem Liter Wasser zugesetzt, gelöst und 15 min bei 120 °C im Autoklaven sterilisiert. pH $7,0 \pm 0,1$ bei 20 °C.

Anmerkung:

Die Nährmedien können auch aus Trockennährböden hergestellt oder fertig zubereitet (Fertigplatte, Einwegröhrchen) in den Zusammensetzungen, wie beschrieben, bezogen werden. Trockennährmedien werden nach der Vorschrift des Herstellers aufgelöst, gekocht und sterilisiert.

Das Nährmedium nach Abschnitt 6.1 entspricht in seiner Zusammensetzung den Trockennährböden Merck Nr. 5438, BBL Nr. 11584 oder OXOID CM 41.

Das Nährmedium nach Abschnitt 6.3 entspricht in seiner Zusammensetzung dem Trockennährmedium Difco B 428.

7. Durchführung der Prüfung

7.1. Sterilisation der Geräte

Pinzette und Schere (in Aluminiumfolie verpackt), Glaspetrischalen, Reagenzgläser mit Zellstoffstopfen und Kulturflaschen mit Kapsenbergkappen werden im Heißluftsterilisator 2 h lang bei 160 °C sterilisiert.

7.2. Herstellung der Impfsuspensionen

7.2.1. Suspensionen für hohe Wasseraktivität — Suspension I

Von den Stammkulturen 5.1 werden auf Pilznährböden nach Sabouraud (6.1) Arbeitskulturen auf Schrägröhrchen (6.1.3) angelegt und 7 Tage bei 25 °C bebrütet. Zu jedem Schimmel-Schrägröhrchen werden 5 ml Ringerlösung (6.4) gegeben und die Oberfläche mit Hilfe einer sterilen Öse abgeschwemmt. Die Suspensionen werden zusammengeführt (gepoolt).

7.2.2. Suspensionen für niedrige Wasseraktivität — Suspension II

Von den Stammkulturen 5.2 werden auf Pilznährböden nach Sabouraud (6.2) Arbeitskulturen auf Schrägröhrchen (6.2.3) angelegt und 7 Tage bei 25 °C bebrütet. Zu jedem Schimmel-Schrägröhrchen werden 5 ml Ringerlösung (6.4) gegeben und die Oberfläche mit Hilfe einer sterilen Öse abgeschwemmt. Die Suspensionen werden zusammengeführt (gepoolt).

7.3. Probenvorbereitung

Aus den zu untersuchenden Proben werden mit einer sterilen Schere Prüfblättchen von 4 cm² ausgeschnitten und sofort in ein steriles Wägegglas gegeben. Die Versuchsstücke dürfen nur mit steriler Pinzette, nicht aber mit den Fingern berührt werden. Es sind mindestens 60 Versuchsblättchen auszuscheiden.

7.4. Herstellung der fertigen Proben

7.4.1. Hohe Wasseraktivität

Je 20 Petrischalen mit Nähragar Sabouraud-Dextrose-Agar (6.1) bzw. Schimmel-Test-Agar (6.3) werden mit je einem der zu prüfenden Prüfblättchen unter sterilen Bedingungen belegt. 20 der Prüfblättchen werden mit der Oberseite (z. B. bedruckte Seite) und 20 der Prüfblättchen mit der Unterseite (z. B. unbedruckte Seite) auf den getrockneten Platten aufgebracht.

Abschließend werden unter dem Abzug die mit Prüfblättchen belegten Petrischalen gleichmäßig mit der Impfsuspension I (7.2.1) besprüht. Danach schließt man die Deckel, packt die Petrischalen in Polyethylenbeutel und siegelt sie zu. Dabei ist zu beachten, daß je zwei Stapel getrennt verpackt werden.

7.4.2. Niedrige Wasseraktivität

Je 20 Petrischalen mit Nähragar nach Sabouraud modifiziert, a_w -Wert 0,95 (6.2) werden mit je einem der zu prüfenden Prüfblättchen unter sterilen Bedingungen belegt. 10 der Prüfblättchen werden mit der Oberseite (z. B. bedruckte Seite) und 10 der Prüfblättchen mit der Unterseite (z. B. unbedruckte Seite) auf den getrockneten Platten aufgebracht.

Abschließend werden unter dem Abzug die mit Prüfblättchen belegten Petrischalen gleichmäßig mit der Impfsuspension II (7.2.2) besprüht. Danach schließt man die Deckel, packt die Petrischalen in Polyethylenbeutel und siegelt sie zu. Dabei ist zu beachten, daß je zwei Stapel getrennt verpackt werden.

7.5. Bebrütung

Die eine Hälfte der nach Abschnitt 7.4.1 bzw. 7.4.2 hergestellten Proben wird bei 25 °C, die andere Hälfte bei 35 °C bebrütet.

Die Sabouraud-Dextrose-Agar- und die Mildew-Platten werden 6 Wochen, der Sabouraud-Dextrose-Glycerin-Agar 3 Wochen bebrütet.

8. Versuchsauswertung

Das Schimmelwachstum jeder Petrischale wird wie folgt bewertet:

- 0 Kein Wachstum auf den Proben und Hemmhofbildung um die Proben,
- 10 Wachstumshemmung ohne Hemmhofbildung um die Proben,
- 20 sichtbares ungleichmäßiges Wachstum,
- 30 mäßiges Wachstum auf der ganzen Probe,
- 40 starkes Wachstum auf der ganzen Probe,
- 50 vollkommen überwachsen.

9. Prüfbericht

Im Prüfbericht sind unter Hinweis auf dieses Merkblatt anzugeben:

- Art des untersuchten Materials,
- Ort, Datum und Zeit der Probenahme,
- Beurteilung der Widerstandsfähigkeit gegen Schimmel bei hoher Wasseraktivität,
- Beurteilung der Widerstandsfähigkeit gegen Schimmel bei niedriger Wasseraktivität,
- gegebenenfalls Abweichungen von dieser Vorschrift,
- Beilagen von Aufnahmen empfehlenswert.

10. Hinweise

Bei der Durchführung der Prüfung nach diesem Merkblatt sind die Richtlinien der Berufsgenossenschaft für Gesundheitsdienst und Wohlfahrtspflege zu beachten (Medizinische Laboratoriumsarbeiten VGB 114, 1956).

Die in Abschnitt 5 erwähnte Mykothek kann beim Fraunhofer-Institut für Lebensmitteltechnologie und Verpackung, Schragenhofstraße 35, D-8000 München 50, zum Preis von DM 25,- bezogen werden.