

DIN EN 1104

ICS 67.250; 85.060

Einsprüche bis 2017-07-12
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN 1104:2005-11

Entwurf

**Papier und Pappe vorgesehen für den Kontakt mit Lebensmitteln –
Bestimmung des Übergangs antimikrobieller Bestandteile;
Deutsche und Englische Fassung prEN 1104:2017**

Paper and board intended to come into contact with foodstuffs –
Determination of the transfer of antimicrobial constituents;
German and English version prEN 1104:2017

Papiers et cartons destinés à entrer en contact avec les denrées alimentaires –
Détermination du transfert des constituants antimicrobiens;
Version allemande et anglaise prEN 1104:2017

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2017-05-12 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und
Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs
besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an npa@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Papier, Pappe und Faserstoff (NPa), 10772 Berlin, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten
Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 42 Seiten

DIN-Normenausschuss Papier, Pappe und Faserstoff (NPa)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 1104:2017) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 172 „Faserstoff, Papier und Pappe“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 074-02-01 AA „Chemisch-technische Prüfverfahren für Papier, Pappe, Faserstoff und Chemiezellstoff“ im DIN-Normenausschuss Papier, Pappe und Faserstoff (NPa).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Änderungen

Gegenüber DIN EN 1104:2005-11 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) die Hemmzone wurde klarer definiert;
- b) der modifizierte Sabouraud-Nährboden zur Herstellung von *Aspergillus niger*-Sporen wurde durch 4 % Sabouraud ersetzt;
- c) Richtlinien für die Interpretation der Ergebnisse in Anhang A wurden hinzugefügt, einschließlich Bildern: Diese Richtlinien sind dazu vorgesehen, die Interpretation der erhaltenen Ergebnisse im Rahmen der Anwendung nach EN 1104 für verschiedene Kontrollen und die geprüften Durchschnittsproben zu unterstützen;
- d) redaktionelle Überarbeitung.

Papier und Pappe vorgesehen für den Kontakt mit Lebensmitteln — Bestimmung des Übergangs antimikrobieller Bestandteile

Papiers et cartons destinés à entrer en contact avec les denrées alimentaires — Détermination du transfert des constituants antimicrobiens

Paper and board intended to come into contact with foodstuffs — Determination of the transfer of antimicrobial constituents

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokument-Stage: CEN-Umfrage
Dokument-Sprache: D

STD Version 2.8l

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung	5
5 Prüfeinrichtung	5
6 Reagenzien und Medien	6
6.1 Allgemeines	6
6.2 Nicht ionisiertes Netzmittel	6
6.3 Nährboden zur Herstellung von <i>Bacillus-subtilis</i> -Sporen	6
6.3.1 Zusammensetzung	6
6.3.2 Herstellung	6
6.4 Sabouraud-Nährboden zur Herstellung von <i>Aspergillus-niger</i> -Sporen	7
6.4.1 Zusammensetzung	7
6.4.2 Herstellung	7
6.5 Nährboden für den Hemmhoftest mit <i>Bacillus subtilis</i>	7
6.5.1 Zusammensetzung	7
6.5.2 Herstellung	7
6.6 Nährboden aus modifiziertem Sabouraud für den Hemmhoftest mit <i>Aspergillus niger</i>	8
6.6.1 Zusammensetzung	8
6.6.2 Herstellung	8
6.7 Kochsalz-Trypton-Lösung	8
6.7.1 Zusammensetzung	8
6.7.2 Herstellung	8
6.8 Testkeime	8
6.8.1 Allgemeines	8
6.8.2 Herstellung von Kulturen	9
6.8.3 Herstellung einer Impfsuspension von <i>Bacillus subtilis</i>	9
6.8.4 Herstellung der beimpften Sporensuspension von <i>Aspergillus niger</i>	9
6.8.5 Sporendichte für den Hemmhoftest	10
6.9 Positivkontrolle	10
6.9.1 Antibiotika	10
6.9.2 Antimykotika	10
7 Probenahme und Probenvorbereitung	10
8 Durchführung	10
8.1 Allgemeines	10
8.2 Herstellung der Nähragarplatten	11
8.2.1 Allgemeines	11
8.2.2 Prüfung mit <i>Bacillus subtilis</i>	11
8.2.3 Prüfung mit <i>Aspergillus niger</i>	11
8.3 Bebrütung	11
9 Auswertung	11
10 Prüfbericht	12

Anhang A (informativ) Richtlinien für die Interpretation der Ergebnisse	13
A.1 Allgemeines	13
A.2 Negativ- und Positivkontrollen	13
A.2.1 Negativkontrollen	13
A.2.2 Positivkontrolle	14
A.3 Durchschnittsproben aus Papier und Pappe	15
A.3.1 <i>Bacillus subtilis</i>	15
A.3.2 <i>Aspergillus niger</i>	18

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 1104:2017) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 172 „Faserstoff, Papier und Pappe“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN 1104:2005 ersetzen.

Im Hinblick auf EN 1104:2005 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) die Hemmzone wurde klarer definiert;
- b) der modifizierte Sabouraud-Nährboden zur Herstellung von *Aspergillus niger*-Sporen wurde durch 4 % Sabouraud ersetzt;
- c) Richtlinien für die Interpretation der Ergebnisse in Anhang A wurden hinzugefügt, einschließlich Bildern: Diese Richtlinien sind dazu vorgesehen, die Interpretation der erhaltenen Ergebnisse im Rahmen der Anwendung nach EN 1104 für verschiedene Kontrollen und die geprüften Durchschnittsproben zu unterstützen;
- d) redaktionelle Überarbeitung.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Verfahren zur Bestimmung der Übertragung antimikrobieller Bestandteile von Materialien und Artikeln, bestehend aus Papier, Karton und Pappe fest, die für den Kontakt mit Lebensmitteln vorgesehen sind.

ANMERKUNG Die Notwendigkeit der Verwendung dieser Norm kann durch die Vorschrift für Papier und Pappe, die für den Kontakt mit Lebensmitteln vorgesehen sind, festgelegt sein.

2 Normative Verweisungen

Auf die folgenden Dokumente wird in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes normativ verwiesen, so dass sie für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich sind. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

EN ISO 186, *Papier und Pappe — Probenahme zur Bestimmung der Durchschnittsqualität*

EN ISO 7218, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Allgemeine Anforderungen und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen*

EN ISO 11133, *Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser — Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1

Hemmzone

offensichtlicher Bereich, in dem kein Wachstum vorhanden ist und der um Probestücke herum auf einem Nährboden gebildet wird, der aufgrund der Abgabe wasserlöslicher antimikrobieller Bestandteile mit einem vorausgewählten Prüfmikroorganismus geimpft wurde

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Existenz einer Hemmzone wird durch das Fehlen von Wachstum des Prüfmikroorganismus (durchsichtiger Bereich) in einem Bereich von mindestens 2 mm Breite an den Rändern der Probestücke nachgewiesen.

4 Kurzbeschreibung

Ein vorbereiteter Nährboden wird mit der entsprechenden Impfsuspension gemischt und in Petrischalen gegossen. Die Probestücke werden auf den noch halbfesten Nährboden gegeben und nach Erstarren bebrütet. Nach Beendigung der Bebrütung werden die Proben auf Bildung von Hemmzonen geprüft, wobei die Existenz einer Hemmzone ein Kriterium für die Angabe von antimikrobiellen Bestandteilen ist.

Die Prüfung wird mit einem Bakterium, *Bacillus subtilis*, und einem Pilz, *Aspergillus niger*, durchgeführt.

ANMERKUNG Das Ergebnis basiert auf einer visuellen Überprüfung.

5 Prüfeinrichtung

Sämtliche Laborausrüstung und Teile der Ausrüstung müssen wie in EN ISO 7218 beschrieben sein.

5.1 Stanzeisen.

Durchmesser = 10 mm bis 15 mm, sterilisierbar.

5.2 Anpress-Vorrichtung. Geeignet zum Anpressen der Probenstücke auf die Nährbodenfläche (z. B. Drigalskispatel).

5.3 Zonenablesegerät (fakultativ). Erlaubt die Messung des Durchmessers der Hemmzone.

ANMERKUNG Die Messung des Durchmessers der Hemmzone ist nicht zwingend vorgeschrieben.

6 Reagenzien und Medien

6.1 Allgemeines

Wenn in einer Formel Wasser erwähnt wird, ist destilliertes oder gereinigtes Wasser zu verwenden, wie in EN ISO 11133 beschrieben.

Allgemeine Anforderungen für die Herstellung von Kulturen sind in EN ISO 11133 beschrieben. Kulturen müssen wie folgt oder aus im Handel erhältlichen Trockenmedien nach den Angaben des Herstellers hergestellt werden. Gebrauchsfertige Medien dürfen verwendet werden, wenn ihre Zusammensetzung und/oder ihr Wachstumsvermögen mit denen der hiernach folgenden Formel vergleichbar ist. (nach EN ISO 11133).

6.2 Nicht ionisiertes Netzmittel

Zum Beispiel Polyoxyethylensorbitanmonooleat.

6.3 Nährboden zur Herstellung von *Bacillus-subtilis*-Sporen

6.3.1 Zusammensetzung

— Rindfleischextrakt	3,0 g
— Pepton aus Casein, Trypton	5,0 g
— Natriumchlorid, rein	5,0 g
— Agar-agar	12,0 g
— Wasser	1 000,0 ml

ANMERKUNG Durch Zufügen von 10 mg/l MnSO_4 zum Nährboden für *Bacillus subtilis* wird die Sporenbildung unterstützt.

6.3.2 Herstellung

Die Bestandteile oder das vollständige Trockenmedium werden unter leichtem Aufkochen im Wasser gelöst.

Der Nährboden wird in zwei Teile geteilt:

- Es wird ein Teil in Mengen von 300,0 ml in einen sterilen Kolben mit 600,0 ml Fassungsvermögen, wie zum Beispiel Kulturkolben nach Roux, eingefüllt und mit Filter-Schraubkappen verschlossen.
- Der andere Teil des Nährbodens wird zur Herstellung von Kulturen in Reagenzgläsern verwendet: Es werden Mengen von 10,0 ml in 15 bis 20 Reagenzgläser gefüllt, die mit Kappen verschlossen werden, zum Beispiel Zellstoffstopfen.

Die Kolben und Reagenzgläser werden in Autoklaven 15 min bei 121 °C sterilisiert. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert $7,2 \pm 0,2$ bei 45 °C entsprechen. Vor dem Erstarren sind die Reagenzgläser so zu positionieren, dass der Nährboden mit schräger Oberfläche erstarrt.

Das Medium darf nach EN ISO 11133 aufbewahrt werden.

6.4 Sabouraud-Nährboden zur Herstellung von *Aspergillus-niger*-Sporen

6.4.1 Zusammensetzung

— Pepton aus Casein, Trypton	5,0 g
— Fleischpepton	5,0 g
— D(+)-Glukose $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$ (Dextrose)	40,0 g
— Agar-agar	10,0 g bis 15,0 g
— Wasser	1 000,0 ml

6.4.2 Herstellung

Die Bestandteile oder das vollständige Trockenmedium werden unter leichtem Aufkochen im Wasser gelöst.

Wie in 6.3 beschrieben vorgehen und das Medium in sterile Kolben oder Roux-Kolben und Reagenzgläser einfüllen.

In einer Autoklave für 15 min bei 121 °C sterilisieren. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert $5,6 \pm 0,2$ bei 25 °C entsprechen.

6.5 Nährboden für den Hemmhoftest mit *Bacillus subtilis*

6.5.1 Zusammensetzung

— Pepton aus Casein, Trypton	3,45 g
— Fleischpepton	3,45 g
— Natriumchlorid, rein	5,1 g
— Agar-agar	13,0 g
— Wasser	1 000,0 ml

6.5.2 Herstellung

Die Bestandteile oder das vollständige Trockenmedium werden unter leichtem Aufkochen im Wasser gelöst.

Das Medium wird in sterile Kolben eingefüllt und diese mit Filter-Schraubkappen verschlossen.

In einer Autoklave für 15 min bei 121 °C sterilisieren. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert $6 \pm 0,2$ bei 45 °C entsprechen.

Zur Vorbereitung der einzustellenden Beimpfung des Nährmediums (8.2.2) sind die Kolben auf unter 60 °C bis zum Verdichten abzukühlen.

Das Medium darf nach EN ISO 11133 aufbewahrt werden.

6.6 Nährboden aus modifiziertem Sabouraud für den Hemmhoftest mit *Aspergillus niger*

6.6.1 Zusammensetzung

— Pepton aus Casein, Trypton	5,0 g
— Fleischpepton	5,0 g
— D(+)-Glukose $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$ (Dextrose)	10,0 g
— Maltose $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$	10,0 g
— Agar-agar	10,0 g bis 15,0 g
— Wasser	1 000,0 ml

6.6.2 Herstellung

Die Bestandteile oder das vollständige Trockenmedium werden unter leichtem Aufkochen im Wasser gelöst.

Das Medium wird in sterile Kolben eingefüllt und diese mit Filter-Schraubkappen verschlossen.

In einer Autoklave für 15 min bei 121 °C sterilisieren. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert $5,4 \pm 0,2$ bei 45 °C entsprechen.

6.7 Kochsalz-Trypton-Lösung

6.7.1 Zusammensetzung

— Pepton aus Casein, Trypton	1,0 g
— Natriumchlorid, rein	8,5 g
— Wasser	1 000,0 ml

6.7.2 Herstellung

Die Bestandteile werden unter leichtem Aufkochen im Wasser gelöst.

In Kolben oder Reagenzgläser füllen. In einer Autoklave für 15 min bei 121 °C sterilisieren. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert $7,0 \pm 0,2$ bei Raumtemperatur entsprechen.

6.8 Testkeime

6.8.1 Allgemeines

Es werden folgende Testkeime angewendet:

Bacillus subtilis DSM 347 (ATCC 6633) und *Aspergillus niger* DSM 1957 (ATCC 6275) oder andere entsprechende Testkeime.

6.8.2 Herstellung von Kulturen

Stammkulturen von *Bacillus subtilis* werden durch Beimpfung der Reagenzgläser (6.3.2) und 7-tägiger Bebrütung bei $30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ erhalten. Nach der Bebrütung sind die Reagenzgläser bei 2 °C bis 8 °C aufzubewahren.

Stammkulturen von *Aspergillus niger* erhält man durch Beimpfung der Reagenzgläser (6.4.2) und 5-tägiger Bebrütung bei $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Nach der Bebrütung sind die Reagenzgläser bei 2 °C bis 8 °C aufzubewahren.

6.8.3 Herstellung einer Impfsuspension von *Bacillus subtilis*

15 ml des flüssigen Nährmediums (6.3) werden in zehn sterile Petrischalen ($d = 90\text{ mm}$) übergeführt und bei etwa 45 °C bis zum Verdichten abgekühlt.

Die Kolonien des *Bacillus subtilis* (6.8.2) sind mit 2,0 ml bis 3,0 ml steriler Kochsalz-Pepton-Lösung (6.7) auszuschwemmen. Diese wird über die Oberfläche von zehn Petrischalen (jede Petrischale wird auf einem anderen Reagenzglas beimpft) oder der Kulturkolben nach Roux verteilt.

Nach 7-tägiger Bebrütung bei 30 °C werden die Kolonien mit 3,0 ml steriler Kochsalz-Pepton-Lösung (6.7) aus den Petrischalen oder mit 30,0 ml steriler Kochsalz-Pepton-Lösung (6.7) aus den Kulturkolben ausgeschwemmt. Die Lösung wird in einen sterilen Kolben übergeführt.

Zur Abtötung vegetativer Formen wird die Lösung 30 min im Wasserbad bei 85 °C unter gelegentlichem Schütteln erhitzt. Nach der Erhitzung wird die Sporensuspension in ein steriles 40,0-ml-Zentrifugenglas übergeführt und 10 min bei 10 000 g zentrifugiert. Rückstände werden mit 30,0 ml steriler Kochsalz-Pepton-Lösung (6.7) ausgewaschen und erneut zentrifugiert.

Das Auswaschen ist 3-mal zu wiederholen. Nach dreimaligem Waschen werden die Sporen in 20,0 ml der Kochsalz-Pepton-Lösung (6.7) suspensiert.

Die Sporensuspension darf bei 2 °C bis 8 °C nicht länger als vier Wochen aufbewahrt werden.

ANMERKUNG Die Sporensuspension ist im Handel erhältlich.

6.8.4 Herstellung der beimpften Sporensuspension von *Aspergillus niger*

15 ml des flüssigen modifizierten Sabouraud-Mediums (6.4) werden in fünf sterile Petrischalen ($d = 90\text{ mm}$) übergeführt und bei etwa 45 °C bis zum Verdichten abgekühlt.

Mittels einer Impfspirale wird der *Aspergillus-niger*-Stamm aus den Stammkulturen (6.8.2) auf die Petrischale geimpft. Jede Petrischale wird aus einem anderen Reagenzglas geimpft. Der Kulturkolben nach Roux wird aus mindestens fünf Reagenzgläsern bebrütet.

Nach 8- bis 10-tägiger Bebrütung bei $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ werden die Kolonien mittels einer mit Kochsalz-Pepton-Lösung (6.7) befeuchteten Impföse in ein Reagenzglas mit 10,0 ml Kochsalz-Pepton-Lösung (6.7) übergeführt, mit 0,01 ml eines nicht ionisierten Netzmittels (6.2) gemischt und mit einem sterilen Stopfen verschlossen.

Vor Gebrauch muss die Suspension gut durchgeschüttelt werden. Die Impfsuspension darf bei 2 °C bis 8 °C nicht länger als vier Wochen aufbewahrt werden.

ANMERKUNG Die Sporensuspension ist im Handel erhältlich.

6.8.5 Sporendichte für den Hemmhofstest

Die Sporensuspension ist so zu verdünnen, dass sie folgender Sporendichte des Testagars entspricht:

- *Bacillus subtilis*: 10^4 Sporen je ml Testagar;
- *Aspergillus niger*: 10^5 Konidien je ml Testagar.

Die Sporendichte der Impfsuspensionen des *Bacillus subtilis* (6.8.3) und des *Aspergillus niger* (6.8.4) sind nach dem Verfahren für die Zählung auf festem Medium (EN ISO 7218) und mittels des in 6.5 und 6.6 beschriebenen Nährbodens zu bemessen.

6.9 Positivkontrolle

6.9.1 Antibiotika

Penicillin G 0,03 Einheiten (im Handel erhältlich).

6.9.2 Antimykotika

Nutzung:

- Mixtur aus 5-Chlor-2-Methyl-4-Isothiazolin-3-on und 2-Methyl-4-Isothiazolin-3-on mit einer Konzentration von 2,5 % aktiver Substanzen (verdünnt 1 : 100).

oder

- Eine Lösung aus 20 µg Amphotericin B.

ANMERKUNG Diese Lösung ist im Handel erhältlich.

7 Probenahme und Probenvorbereitung

Die Durchschnittsprobenahme wird nach EN ISO 186 durchgeführt. Es dürfen nur die Kanten der Durchschnittsproben berührt werden. Die Durchschnittsproben müssen unmittelbar in einem sterilen Probenbehälter übereinander gelegt oder in Aluminiumfolie eingewickelt werden (keine lackierte Oberfläche in Kontakt mit der Durchschnittsprobe).

Es sind mindestens zehn Durchschnittsproben je Einheit zu entnehmen. Aus den Durchschnittsproben sind 20 runde Plättchen für jeden Mikroorganismus mit einem sterilen Stanzeisen (5.1) anzufertigen. Ist die Durchschnittsprobe nicht homogen, ist ein Hemmhofstest zu planen, der für jeden Bereich repräsentativ ist.

Die Probestücke sind unmittelbar in einen sterilen Behälter zu übertragen. Die Probestücke dürfen nur mit sterilen Pinzetten oder Zangen berührt werden.

ANMERKUNG Für teilweise gedruckte Durchschnittsproben ist zum Beispiel eine repräsentative Anzahl gedruckter Probenstücke anzufertigen.

8 Durchführung

8.1 Allgemeines

Die Durchführung muss unter aseptischen Bedingungen mit steriler Prüfeinrichtung und Ausrüstung erfolgen.

8.2 Herstellung der Nähragarplatten

8.2.1 Allgemeines

Es sind mindestens drei Petrischalen für jede Bestimmung vorzubereiten.

Die Probenseite, die mit dem Lebensmittel in Berührung kommen soll, sollte nach unten liegen. Im Zweifelsfall müssen beide Seiten geprüft werden.

8.2.2 Prüfung mit *Bacillus subtilis*

Verflüssigter steriler Testagar (6.5). Auf unter 60 °C abkühlen. Eine berechnete Menge der Impfsuspension (6.8.3) wird zugegeben, um eine Einsaatdichte von 10^4 Sporen je ml Testagar zu erhalten.

Die Suspension wird durch sorgfältiges Schütteln gleichmäßig verteilt. Ungefähr 15 ml des Aliquots werden ohne Verzögerung in jede Petrischale ($d = 90$ mm) gefüllt. Drei Probestücke werden mit sterilen Pinzetten oder Zangen auf das noch halb feste Nährmedium gelegt. Die Probestücke sind mit einem geeigneten sterilen Gerät (5.2) leicht anzupressen, dabei ist sicherzustellen, dass sich beim Auflegen der Probestücke keine Lufteinschlüsse bilden. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt, um drei Petrischalen mit je drei Probestücken zu erhalten (insgesamt neun Probestücke).

Für jede Analyse ist eine Negativ-Kontroll-Nährmediumagarplatte (leer) ohne Proben anzufertigen.

Es ist eine Platte mit drei Scheiben sterilem Papier anzufertigen, das mit der antibiotischen Lösung imprägniert wurde (Penicillin G 0,03 Einheiten) (6.8.1).

8.2.3 Prüfung mit *Aspergillus niger*

Die Platten werden entsprechend 8.2.2 nur unter Verwendung von modifiziertem Sabouraud-Agar (6.6) hergestellt. Die Lösung sollte als Testagar und als Impfsuspension des *Aspergillus niger* (6.8.4) verwendet werden. Eine Einsaatdichte von 10^5 Kolonien je ml Testagar sollte erreicht werden. Es sind drei Petrischalen mit je drei Probestücken anzufertigen (insgesamt neun Probestücke).

Für jede Analyse ist eine Negativ-Kontroll-Nährmediumagarplatte (leer) ohne Proben anzufertigen.

Es ist eine Platte mit drei Scheiben sterilem Papier anzufertigen, das mit Antimykotika imprägniert wurde (Amphotericin B oder Isothiazolinon-Lösung) (6.8.2).

8.3 Bebrütung

Die nach 8.2.2 und 8.2.3 vorbereiteten Petrischalen werden 2 h im Kühlschrank bei $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ für eine Vordiffusion aufbewahrt.

Die nach 8.2.2 und 8.2.3 vorbereiteten Petrischalen werden anschließend drei Tage bei $30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ und fünf Tage bei $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ bebrütet. Die Schalen werden in den Brutschrank gestellt, sodass der Deckel der Petrischalen nach unten zu liegen kommt, um das Abtropfen von Kondenswasser auf die Durchschnittsproben zu verhindern.

Nach der Bebrütung sollten die Platten umgehend untersucht werden, wenn möglich. Anderenfalls können sie in einem Kühlschrank bei $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ für höchstens 2 Tage aufbewahrt werden.

9 Auswertung

Die endgültige Auswertung der Bestimmung der Bakterien und Schimmelpilze erfolgt nach drei Tagen bzw. fünf Tagen. Außerdem sind die Positiv- und Negativkontrollen auszuwerten. Zu diesem Zweck sind die Richtlinien für die Interpretation der Ergebnisse in Anhang A zu verwenden.