



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 13 613 T2 2005.09.22**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 208 220 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 13 613.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/00304**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 905 554.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 01/014583**

(86) PCT-Anmeldetag: **06.01.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **01.03.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **29.05.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **08.09.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **22.09.2005**

(51) Int Cl.⁷: **C12Q 1/04**
G01N 21/80

(30) Unionspriorität:
378991 23.08.1999 US

(73) Patentinhaber:
3M Innovative Properties Co., St. Paul, Minn., US

(74) Vertreter:
derzeit kein Vertreter bestellt

(84) Benannte Vertragsstaaten:
DE, FR, GB, IT

(72) Erfinder:
ADAMS, A., Carl, Saint Paul, US; HALVERSON, J., Kurt, Saint Paul, US; KREJCAREK, E., Gary, Saint Paul, US

(54) Bezeichnung: **KULTURMEDIUM MIT AN BALLAST GEBUNDENEN PH-INDIKATOREN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Kulturmedien, Vorrichtungen und Verfahren für den Nachweis und die zahlenmäßige Bestimmung von Mikroorganismen in einer Probe, insbesondere Medien, Vorrichtungen und Verfahren, bei denen pH-Indikatoren mit Ballast verwendet werden.

[0002] Verfahren für den Nachweis von Mikroorganismenwachstum, bei denen pH-Indikatoren verwendet werden, sind seit langem bekannt. Das Vorhandensein von Mikroorganismen wird üblicherweise durch eine visuelle Farb- oder Fluoreszenzveränderung des pH-Indikators in einem die wachsende Mikroorganismenkolonie umgebenden Hof nachgewiesen, wobei diese Veränderung durch die Reaktion des Indikators mit von den wachsenden Mikroorganismen produzierter Säure verursacht wird.

[0003] Ein häufiges Problem bei der Verwendung von pH-Indikatoren besteht darin, daß die gefärbten oder fluoreszierenden Indikatorhöfe mit fortgesetzter Säureproduktion der wachsenden Mikroorganismen größtmäßig zunehmen und es vorkommen kann, daß sie mit den Indikatorhöfen der umgebenden Kolonien in der Nähe zusammenzufließen bzw. mit diesen zu überlappen beginnen. Nach einer typischen Inkubationszeit von 18 bis 24 Stunden diffundieren die nebeneinanderliegenden Indikatorhöfe typischerweise miteinander, wodurch es schwierig wird, zwischen den einzelnen Indikatorhöfen, die einzelnen Kolonien entsprechen, zu unterscheiden bzw. diese zahlenmäßig zu bestimmen.

[0004] Die deutsche Patentanmeldung DE-A-19617338 betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung für die Identifikation von Mikroorganismen, Pilzen und Kleinorganismen, wobei Indikatorperlen verwendet werden. Die Indikatoren sind dauerhaft an die Oberfläche einer Perle gebunden, und es wird behauptet, daß statt einer Anzahl von Einzelplatten eine einzelne Flüssigkultur ausreicht, um den Organismus zu identifizieren.

[0005] In jüngster Zeit wurde gezeigt, daß die Verwendung von pH-Indikatoren in sehr hohen Konzentrationen die Nachweiszeit für coliforme Bakterien in einem Kulturmedium verkürzt, ohne sich negativ auf das Bakterienwachstum auszuwirken. Hohe Koloniezahlen können jedoch trotz einer verkürzten Nachweiszeit einen Beobachter daran hindern, zwischen Kolonien, die Säure produzieren, und Kolonien, die nicht Säure produzieren, unterscheiden zu können, da die Indikatorhöfe während der Inkubation größtmäßig zunehmen und miteinander diffundieren können.

[0006] Ein weiteres mögliches Problem bei der Auswahl von pH-Indikatoren besteht darin, daß manche Indikatoren, die gute Indikations- und/oder Spektraleigenschaften aufweisen, für mikrobielles Wachstum toxisch sind.

[0007] In diesem Fachgebiet besteht ein Bedarf an Medien, die die Nachteile des bekannten Stands der Technik überwinden und die das Ausbreiten von Indikatorhöfen bei der Verwendung von pH-Indikatoren begrenzen. Insbesondere besteht ein Bedarf an Medien, Vorrichtungen und Verfahren zu ihrer Verwendung, die das Ausbreiten von Indikatorhöfen bei der Verwendung von pH-Indikatoren steuern.

[0008] Ein erster Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Kulturmedium umfassend ein Medium für die Züchtung von Mikroorganismen, einschließlich eines pH-Indikators, der chemisch an eine hydrophile Substanz mit hohem Molekulargewicht, die einen wasserlöslichen pH-Indikator mit Ballast bereitstellt, gebunden ist, wodurch das Medium zur Züchtung von Mikroorganismen ein hydratisiertes Wachstum unterstützendes Nährstoffgel bilden kann.

[0009] Das Medium weist Wachstumsnährstoffe für die Zielmikroorganismen auf, oder es werden Wachstumsnährstoffe für die Verwendung zugegeben. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Medium um ein kaltwasserlösliches Pulver. In der vorliegenden Erfindung können verschiedene pH-Indikatoren verwendet werden, darunter eventuell manche Indikatoren, die normalerweise toxisch für mikrobielles Wachstum sind. Zu den Indikatoren zählen Monoazofarbstoffe, Polyazofarbstoffe, Amino-, Hydroxy- und Aminohydroxyarylmethane, darunter Di- und Triarylmethane, modifizierte Phenolphthaleine, modifizierte Sulfonphthaleine, Anthrachinone, Xanthene, polycyclische Aromaten und Naphthofluoresceine. Zu den bevorzugten Arten von Ballast zählen Substanzen mit hohem Molekulargewicht aus der Gruppe Cellulose, modifizierte Cellulosen, Polyvinylalkohole, Dextrane, aminomodifizierte Dextrane, Guargumme, modifizierte Guargumme, Xanthangumme und Johannisbrotkerngummen sowie andere Polykohlenhydratgummen.

[0010] In einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung beinhaltet eine Vorrichtung für den Nachweis und/oder die zahlenmäßige Bestimmung von Mikroorganismen ein wie oben beschriebenes Kulturmedium.

Eine bevorzugte Vorrichtung umfaßt ein selbsttragendes wasserfestes Substrat, einen gegebenenfalls vorhandenen Schaum-Abstandhalter sowie einen Deckel.

[0011] Bei einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung beinhaltet ein Verfahren für den Nachweis und die zahlenmäßige Bestimmung von Mikroorganismen in einer Probe die Schritte, daß man eine Probe, von der vermutet wird, daß sie Mikroorganismen enthält, zu dem obengenannten Kulturmedium zugibt, die Mikroorganismen in Gegenwart des Kulturmediums züchtet und eine Farb- oder Fluoreszenzveränderung des pH-Indikators in dem Kulturmedium nachweist.

[0012] Mit der vorliegenden Erfindung werden Nachteile des Stands der Technik dadurch überwunden, daß man die Ausbreitung der gefärbten oder fluoreszierenden Indikatorhöfe über ein Kulturmedium steuert. Die Steuerung der gefärbten oder fluoreszierenden Indikatorhöfe wird dadurch erzielt, daß man den pH-Indikator an einen Ballast bindet. Überraschenderweise steuern diese mit Ballast versehenen pH-Indikatoren die Ausbreitung der Indikatorhöfe in dem Kulturmedium, ohne sich auf die Säureproduktionsfähigkeit der Kolonien in dem Medium negativ auszuwirken. Das Zusammenfließen von nebeneinanderliegenden Indikatorhöfen wird so reduziert oder ausgeschaltet, und die Differenzierung zwischen einzelnen Indikatorhöfen kann auch nach längerer Inkubationszeit verbessert sein.

[0013] Die vorliegende Erfindung stellt auch Medien, Vorrichtungen und Verfahren bereit, die die Verwendung von pH-Indikatoren, die normalerweise als toxisch für mikrobielles Wachstum gelten würden, gestatten. Dadurch, daß die pH-Indikatoren mit Ballast versehen werden, können die Indikatoren möglicherweise nichttoxisch auf die Mikroorganismen wirken.

[0014] [Fig. 1](#) ist eine Darstellung einer Vorrichtung mit einer Dünnschichtkulturplatte, die das erfindungsgemäße Kulturmedium, das einen mit Ballast versehenen pH-Indikator umfaßt, enthält.

[0015] Die vorliegende Erfindung stellt Medien, Vorrichtungen und Verfahren bereit, die für den Nachweis und die zahlenmäßige Bestimmung von Mikroorganismen in einer Probe verwendet werden können. Obwohl für den Nachweis und die zahlenmäßige Bestimmung von Mikroorganismen in einer Probe verschiedene Produkte und Verfahren verwendet werden können, wird mit den erfindungsgemäßen Medien, Vorrichtungen und Verfahren solch ein Nachweis und eine zahlenmäßige Bestimmung von Mikroorganismen wesentlich dadurch vereinfacht, daß man Indikatoren mit Ballast verwendet. Mit den Kulturmedien, Vorrichtungen und Verfahren können nicht nur rasch Ergebnisse bestimmt werden, sondern auch klar abgegrenzte Indikatorhöfe auch nach einer längeren Inkubationszeit aufrechterhalten werden.

[0016] Außerdem kann die vorliegende Erfindung gegebenenfalls die Verwendung von pH-Indikatoren gestatten, die über erwünschte Spektraleigenschaften und pH-Indikatoreigenschaften verfügen, jedoch für Mikroorganismen toxisch sind. Dadurch, daß diese Indikatoren mit Ballast versehen werden, kann gegebenenfalls solch eine Toxizität dadurch verringert oder ausgeschaltet werden, daß der Indikator am Eindringen in die Mikroorganismenzelle und so am Verursachen von verringerter Aktivität oder Zelltot gehindert wird.

[0017] Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung bedeutet „Ballast“ eine hydrophile Substanz mit hohem Molekulargewicht, die chemisch an einen pH-Indikator bindet, jedoch die Funktion des pH-Indikators nicht wesentlich behindert. Ein „pH-Indikator mit Ballast“ bedeutet einen pH-Indikator, an den chemisch ein Ballast gebunden ist. „Mit Ballast versehen“ bedeutet, einen Ballast an einen pH-Indikator zu binden. „Indikatorhof“ bedeutet eine typischerweise kreisrunde Region, die eine wachsende Mikroorganismenkolonie umgibt und die aufgrund der Reaktion der von der Kolonie produzierten Säure mit einem pH-Indikator eine unterschiedliche Farbe oder Fluoreszenz als das umgebende Kulturmedium aufweist. Je stärker die Diffusion oder Ausbreitung des Indikators über das Medium eingeschränkt wird, desto kleiner wird der entstandene „Indikatorhof“. Die Indikatorhöfe unterscheiden sich daher im allgemeinen visuell in ihrem Erscheinungsbild vom Rest des Kulturmediums.

[0018] Die vorliegende Erfindung beinhaltet ein wie oben definiertes Kulturmedium mit einem pH-Indikator mit Ballast. Es eignen sich verschiedene Kulturmedien für die Verwendung bei der vorliegenden Erfindung. Je nach den Zielmikroorganismen enthält das Medium verschiedene Nährstoffe, oder es werden ihm Nährstoffe zugesetzt. Ein typisches Kulturmedium umfaßt eine Kohlenstoffquelle wie ein Kohlenhydrat, eine Stickstoffquelle wie Aminosäuren oder Proteinhydrolysate, sowie Spurennährstoffe. Das Kulturmedium kann auch mindestens ein Geliemittel beinhalten. Ein bevorzugtes Medium ist ein kaltwasserlösliches Pulver, wie z.B. gemäß US-Patent Nr. 5,232,838.

[0019] Bei den Ballasten der vorliegenden Erfindung handelt es sich um hydrophile Substanzen mit hohem Molekulargewicht. Diese Substanzen sind zu einer Bindung an einen pH-Indikator fähig. Vorzugsweise weisen die Ballaste mindestens eine reaktionsfähige funktionelle Gruppe, wie eine Hydroxy-, Carboxyl- oder Aminogruppe, auf, die chemisch an den pH-Indikator bindet. Vorzugsweise liegt das Molekulargewicht des Ballasts über ungefähr 5000, stärker bevorzugt liegt das Molekulargewicht über ungefähr 40 000. Zu geeigneten Arten von Ballast, die sich für die vorliegende Erfindung eignen, zählen Cellulosen, modifizierte Cellulosen, Polyvinylalkohol (PVA), Dextrane, aminomodifizierte Dextrane, modifizierte Guargummen, Guargummen, Xanthangummen und Johannisbrotkerngummen, wobei Polyvinylalkohol und aminomodifizierte Dextrane aufgrund der guten Reaktionsfähigkeit dieser Arten von Ballast mit pH-Indikatoren bevorzugt sind. Weiterhin zählen zu pH-Indikatoren mit Ballast solche mit Ballaste, die relativ leicht in verschiedene Medien eingearbeitet werden können.

[0020] Bei der vorliegenden Erfindung können verschiedene pH-Indikatoren verwendet werden. Geeignete Indikatoren verändern mit verändertem Säuregehalt des Kulturmediums ihre Farbe oder Fluoreszenz. Wenn eine Mikroorganismenkolonie heranwächst, produziert die Kolonie Säure, die mit dem pH-Indikator unter Bildung eines die Kolonie umgebenden Indikatorhofs reagiert, der eine unterschiedliche Farbe oder Fluoreszenz als der Rest des Kulturmediums aufweist. So bildet der Indikator Carboxyphenolrot beispielsweise im allgemeinen ein rotgefärbtes Kulturmedium, das sich mit steigendem Säuregehalt nach Gelb verändert. Zusätzlich zu pH-Indikatoren mit Ballast, die ihre Farbe verändern, können auch pH-Indikatoren mit Ballast, die ihre Fluoreszenz verändern, in den erfindungsgemäßen Kulturmedien, Vorrichtungen und Verfahren verwendet werden. Bei solchen mit Ballast versehenen pH-Indikatoren fluoreszieren die Indikatorhöfe in Gegenwart von größeren Säuremengen, während das Kulturmedium, das nicht in Kontakt mit erhöhten Säuremengen steht, nicht fluoresziert.

[0021] Zu geeigneten pH- oder Säure-Basen-Indikatoren, die sich für die vorliegende Erfindung eignen, zählen Indikatoren, die im allgemeinen in Monoazofarbstoffe, Polyazofarbstoffe, Amino-, Hydroxy- und Aminohydroxyarylmethane (Di- und Triarylmethane), modifizierte Phenolphthaleine und Sulfonphthaleine, Anthrachinone, Xanthene, polycyclische Aromaten und Naphthofluoresceine eingeteilt werden. Zu bevorzugten pH-Indikatoren zählen modifizierte Phenolphthaleine und Sulfonphthaleine, Naphthofluoresceine sowie die Monoazofarbstoffe. Zu repräsentativen Farbstoffen aus den aufgeführten Gruppen zählen Carboxyphenolrot und Aminophenolrot (die beide modifizierte Sulfonphthaleine sind), Methylrot, Ethylrot und 2-(2,4-Dinitrophenyl-azo)-6-[N-methyl-N-(2-hydroxysulfonyloxyethylsulfonyl)-amido]-1-naphthol-3-sulfonsäure („DNSA“) (die alle Monoazofarbstoffe sind), sowie CarboxySNARFTM und CarboxySNAFLTM (die beide Naphthofluoresceine sind). DNSA-Indikator kann wie in US-Patent Nr. 4,029,598 (Neisius et al.) hergestellt werden, und CarboxySNARFTM und CarboxySNAFLTM sind von Molecular Probes, Eugene, OR, USA, erhältlich. Besonders bevorzugte Farbstoffe sind Carboxyphenolrot, Carboxychlorphenolrot, Aminophenolrot, Aminochlorphenolrot, CarboxySNARFSTM, CarboxySNAFLSTM sowie DNSR. Verfahren für eine geeignete Modifikation von Indikatorfarbstoffen, so daß eine entsprechende funktionelle Gruppe für die anschließende kovalente Bindung an einen Ballast mit hohem Molekulargewicht verfügbar ist, sind bekannt. So beschreibt z.B. die europäische Patentanmeldung Nr. 0 519 198 A2 (Robotti) ein Verfahren für solch eine Modifikation von verschiedenen pH-Indikatorfarbstoffen des Phthaleintyps.

[0022] Im allgemeinen kann für die Bindung des Indikators an einen Ballast mit hohem Molekulargewicht ein beliebiger pH-Indikator, der seine Farbe oder Fluoreszenz in dem gewünschten pH-Bereich für den gewünschten Mikroorganismus verändert und der eine oder mehrere reaktionsfähige Gruppen besitzt, die nicht in der Säure-Base-Reaktionschemie des Indikators teilnimmt, verwendet werden. Vorzugsweise bindet der pH-Indikator kovalent an den Ballast, ohne den pKa-Wert des Indikators wesentlich negativ zu beeinflussen.

[0023] Zu besonders bevorzugten erfindungsgemäßen pH-Indikator- und Ballastkombinationen zählen aufgrund der Einfachheit der Reaktion sowie der Einarbeitung in die Medien an Polyvinylalkohol gebundener DNSA-Indikator sowie an ein aminomodifiziertes Dextran mit einem Molekulargewicht von ungefähr 40 000 oder darüber gebundenes Carboxyphenolrot.

[0024] Als Hilfsmittel bei der Bindung des pH-Indikators an einen Ballast können Kopplungsmittel verwendet werden. So können z.B. Kopplungsmittel EDC [1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-hydrochlorid] und HOBt (1-Hydroxybenzotriazol-hydrat) die kovalente Bindung der Carboxylgruppe des Carboxyphenolrots an die Aminogruppe eines aminomodifizierten Dextrans unterstützen. Die Verwendung solcher Kopplungsmittel ist in „Advanced Organic Chemistry“ [Fortgeschrittene organische Chemie] von Jerry March, Wiley InterScience, 4. Ausgabe, 1992, S. 420–421, beschrieben.

[0025] Die erfindungsgemäßen pH-Indikatoren mit Ballast schränken das Ausbreiten der Indikatorhöfe in dem Kulturmedium ein bzw. begrenzen es. Ein gesteuertes Ausbreiten der Indikatorhöfe führt zu kleineren oder stärker abgegrenzten Indikatorhöfen, die mit geringerer Wahrscheinlichkeit miteinander diffundieren und so leichter voneinander unterschieden werden können. Ein geringeres Ausbreiten der Indikatorhöfe führt zu einem einfacheren und genaueren Nachweis bzw. einer einfacheren und genaueren zahlenmäßigen Bestimmung der wachsenden Mikroorganismenkolonien. Das Ausbreiten der Indikatorhöfe ist besonders dann ein Problem, wenn relativ viele säureproduzierende Kolonien vorliegen. Die pH-Indikatoren mit Ballast können sich auch für die bessere Unterscheidung zwischen säureproduzierenden Kolonien und denjenigen, die keine Säure produzieren, in einer Mischprobe eignen.

[0026] Die erfindungsgemäßen pH-Indikatoren mit Ballast können gegebenenfalls auch die Toxizität von pH-Indikatoren für eine wachsende Mikroorganismenkolonie verringern oder ausschalten. Der Grund dafür, daß die Toxizität verringert ist, könnte darauf zurückzuführen sein, daß der pH-Indikator mit Ballast nicht fähig ist, in die Mikroorganismenzellen einzudringen. Es wird angenommen, daß der pH-Indikator aus irgendeinem Grund, z.B. aufgrund seiner Größe, Ladung usw., nicht die Zellmembran durchdringen kann. Dadurch, daß der pH-Indikator auf diese Weise mit dem Molekül als Ballast versehen wird, kann gegebenenfalls verhindert werden, daß der pH-Indikator in die Mikroorganismenzelle eindringt und zu verringerter Zellaktivität oder zum Zelltod führt.

[0027] Für die Verwendung in der vorliegenden Erfindung eignen sich viele Vorrichtungen. Jede beliebige Vorrichtung, die die oben beschriebenen Medien beinhaltet und sich für den Nachweis und/oder die zahlenmäßige Bestimmung von Mikroorganismen eignet, kann verwendet werden. [Fig. 1](#) beschreibt eine bevorzugte erfindungsgemäße Vorrichtung. Anhand [Fig. 1](#) wird ein Dünnschichtkulturgerät dargestellt. Dünnschichtkulturgeräte sind bereits in den US-Patenten Nr. 4,565,383, 5,089,413 und 5,232,838 beschrieben worden.

[0028] Weiterhin beinhaltet anhand von [Fig. 1](#) das Dünnschichtkulturgerät **10** ein Bauteil mit einem selbsttragenden, im wesentlichen wasserfesten Substrat **12**. Bei dem Substrat **12** handelt es sich vorzugsweise um ein relativ steifes Material aus einem wasserfesten Material wie Polyester, Polypropylen oder Polystyrol, das nicht wesentlich Wasser absorbiert. Zu weiteren geeigneten wasserfesten Materialien zählen Substrate wie Papier mit einer wasserfesten Polyethylenbeschichtung.

[0029] Eine Oberfläche des Substrats **12** wird mit einer Schicht Kulturmedium **14** beschichtet, und dieses wird anschließend getrocknet, wodurch man ein trockenes Medium auf Substrat **12** erhält. Man kann jedoch auch ein Substrat **12** mit einer Klebstoffschicht (nicht dargestellt) beschichten, die dazu dient, ein Kulturmedium, das in Pulverform aufgetragen werden kann, aufzunehmen. Die Klebstoffe sind vorzugsweise im hydratisierten Zustand so durchsichtig, daß man die auf der Oberfläche des Substrats wachsenden Bakterienkolonien durch das beschichtete Substrat hindurch beobachten kann. Das Substrat wird mit dem Klebstoff so dick beschichtet, daß das Substrat im wesentlichen einheitlich mit trockenem Kulturmedium beschichtet werden kann, ohne das Medium vollständig in dem Klebstoff einzubetten.

[0030] Soll das flüssige erfindungsgemäße Kulturmedium in trockener Form oder als Trockenpulver verwendet werden, so werden die Reagenzien, Nährstoffe, Gummien, und der pH-Indikator mit Ballast in Form einer Flüssigkeit zu dem Substrat zugegeben und anschließend getrocknet. Das erfindungsgemäße Kulturmedium kann leicht dadurch getrocknet werden, daß man Flüssigmedium in einem Ofen auf ungefähr 100°C erhitzt, bis im wesentlichen alles Wasser in der Flüssigkeit verdampft ist. Wird das Medium jedoch erhitzt, nachdem das Wasser verdampft ist, so kann das Medium beginnen, sich zu zersetzen.

[0031] Ein optionaler Schaum-Abstandhalter **16** mit einer Öffnung in dem Schaum wird auf die mit Medium beschichtete Oberfläche des Substrats **12** fixiert. Der Schaum-Abstandhalter, der im wesentlichen die Umgebung des Substrats **12** bedeckt, definiert diejenige Fläche, die mit einer Probe zu inokulieren ist und dient dazu, die Probe vom Substrat abzuhalten. In einer anderen Ausführungsform kann eine Vorrichtung keine Schaumschicht beinhalten, und die Probenmenge wird auf dem Substrat nur durch die Komponenten des Mediums gehalten.

[0032] An eine Kante der Oberfläche des Schaum-Abstandhalters **16** kann eine Abdeckung **20** befestigt sein. [Fig. 1](#) zeigt ein Abdeckblatt **20**, das vorzugsweise aus einem durchsichtigen Film- oder Folienmaterial besteht, um das Auszählen von auf dem Substrat befindlichen Bakterienkolonien zu erleichtern. Außerdem ist das Abdeckblatt **20** vorzugsweise für Bakterien und Wasserdampf undurchlässig, um die Gefahr zu vermeiden, daß die Bestandteile kontaminiert werden und verderben. Ein bevorzugtes Material für ein Abdeckblatt **20** ist biaxial orientiertes Polypropylen. Das Abdeckblatt wird gegebenenfalls mit zusätzlichen Gummien und mit einem zwei-

ten Indikator, wie Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC), beschichtet.

[0033] Bei den erfindungsgemäßen Verfahren wird die Probe zu einem wie oben beschriebenen Medium zugegeben. Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird die Probe zu einer Vorrichtung, wie der in [Fig. 1](#) dargestellten Vorrichtung, die ein erfindungsgemäßes Medium beinhaltet, gegeben. Das Inokulum kann über das Substrat **12** ausgestrichen werden, und eine Abdeckung kann über das Substrat **12** gelegt werden. Ein Verfahren für das Ausstreichen des Inokulums beinhaltet die Verwendung eines beschwerten Werkzeugs, das sich über die Abdeckung bewegt und das Inokulum ausstreicht. Bei trockenen Medien hydratisiert das Medium beim Kontaktieren des Inokulums und seiner Ausbreitung auf dem Substrat **12** und bildet so ein Wachstum unterstützendes Nährstoffgel. Die inokulierte Vorrichtung wird dann über einen vorbestimmten Zeitraum inkubiert, wonach die Anzahl der Kolonien oder Mikroorganismen, die auf dem Substrat wachsen, gezählt werden kann.

[0034] Obwohl die Verwendung des Kulturmediums, das pH-Indikatoren mit Ballast auf einer Dünnschichtvorrichtung enthält, oben beschrieben ist, wird dem Durchschnittsfachmann klar, daß das Kulturmedium, das pH-Indikatoren mit Ballast enthält, in anderen fachbekannten Kulturvorrichtungen verwendet werden kann. So kann das Kulturmedium z.B. als Bouillon verwendet werden und für die Züchtung von Bakterien in Suspension verwendet werden, oder das Kulturmedium kann für die Züchtung von Bakterien auf Agarplatten verwendet werden.

BEISPIELE

[0035] Die folgenden Beispiele werden zum besseren Verständnis der vorliegenden Erfindung bereitgestellt und sollen deren Schutzzumfang nicht einschränken. Falls nicht anders angegeben, sind alle Teile und Prozente Gewichtsteile bzw. Gewichtsprozente.

Beispiel 1

Herstellung eines pH-Indikators mit Ballast (DNSA-Indikator/Polyvinylalkohol)

[0036] Polyvinylalkohol (100 g, Molekulargewicht 31 000-50 000, Aldrich Chemicals, Milwaukee, WI, USA) wurde durch Rühren bei ungefähr 80°C in entionisiertem Wasser (800 ml) gelöst. In einem anderen Becher wurden DNSA-pH-Indikator [2-(2,4-Dinitrophenylazo)-6-(N-methyl-N-(2-hydroxysulfonyloxyethylsulfon)amido)-1-naphthol-3-sulfonsäure] (2 g, 3,1 Millimol, E. Merck, Darmstadt, wie in US-Patent Nr. 4,029,598 beschrieben) und Na₂CO₃ (32 g, 300 Millimol, J. T. Baker Company, Phillipsburg, NJ, USA) durch Rühren bei Raumtemperatur in entionisiertem Wasser (150 ml) gelöst. Zu der Polyvinylalkohollösung wurde eine 32%ige Natronlauge (20 ml) gegeben und das Ganze wurde durch Rühren auf einer Magnetrührerplatte gemischt. Die DNSA-Lösung wurde dann in 2-ml-Portionen zugegeben, wobei zwischen den Portionen gewartet wurde, bis die zugegebene Portion vollständig mit der Polyvinylalkohollösung vermischt war. Der Ansatz wurde 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das entstandene DNSA-Polyvinylalkohol-Gemisch wurde in 4 Portionen dadurch gefällt, daß man 250 ml des Ansatzes tropfenweise unter starkem Rühren mit einem über dem Becher angeordneten propellerartigen Rührblatt mit 21 Methanol versetzte. Das gefällte Polymer wurde dadurch isoliert, daß man die Mischung durch ein 80-Mesh Drahtsieb goß. Der Niederschlag wurde anschließend 3mal mit Methanol gewaschen (ungefähr 500 ml pro Waschschrift), bis keine blaue Farbe mehr eluierte. Anschließend an das Waschen mit Methanol wurde 3mal mit Ether gewaschen (ungefähr 500 ml pro Waschschrift). Das gewaschene Polymer wurde anschließend über Nacht in einer großen unbedeckten Folienschale an der Luft getrocknet.

[0037] Das getrocknete Polymer wurde anschließend durch Rühren bei ungefähr 80°C in entionisiertem Wasser (800 ml) gelöst und nochmals wie oben umrissen gefällt, isoliert und gewaschen. Das gewaschene Polymer wurde über Nacht an der Luft und anschließend bei Raumtemperatur im Vakuum getrocknet. Die gewichtsmäßige Ausbeute an pH-Indikator mit DNSA-Polyvinylalkohol-Ballast betrug 80 g.

[0038] Im Vergleich dazu wurde eine DNSA/Ethanol-Probe auf gleiche Art und Weise hergestellt, nur daß die Reaktion in 50% (v/v) Ethanol als Lösungsmittel durchgeführt wurde.

Beispiel 2

Menge des an Polyvinylalkohol gebundenen DNSA-Indikators

[0039] Das Ziel dieses Beispiels bestand darin, die Menge an DNSA-Indikator, die an den in Beispiel 1 hergestellten pH-Indikator mit DNSA/Polyvinylalkohol-Ballast gebunden war, zu bestimmen.

[0040] Der Extinktionskoeffizient des DNSA-pH-Indikators in 0,1 M Natronlauge wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge mit einer Maximaextinktion von 589 Nanometern (nm) als 23 220 L/mol cm bestimmt.

[0041] Mit diesem Extinktionskoeffizienten wurde die Menge an DNSA-Indikator in einer Lösung von DNSA/Polyvinylalkohol in 0,1 M NaOH bestimmt. Die Spektren des freien DNSA in Lösung und des DNSA mit Ballast in Lösung sind visuell identisch und es wurde daher angenommen, daß der Extinktionskoeffizient von gebundener DNSA und von DNSA in Lösung gleich ist. Die Menge an DNSA, die an den Polyvinylalkohol gebunden ist, wurde durch Vergleichen der Extinktion einer Lösung von DNSA mit Ballast und einer DNSA-Lösung mit einer bekannten Konzentration bei 589 nm als ungefähr 5 mg DNSA pro g Polyvinylalkohol bestimmt. Theoretisch werden daher pro 100 g in dem obengenannten Verfahren verwendeten Polyvinylalkohol 500 mg DNSA an den Polyvinylalkohol gebunden.

Beispiel 3

Herstellung der den DNSA-Indikator/Polyvinylalkohol enthaltenden Dünnschichttrockenkulturvorrichtung

[0042] Der in Beispiel 1 hergestellte pH-Indikator mit DNSA/Polyvinylalkoholballast (6 g) wurde durch 30minütiges Rühren bei 80–90°C in entionisiertem Wasser (100 ml) gelöst. Die erhaltene dunkelblaue Lösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, und anschließend wurden Nährstoffe und Gallensalze zugegeben, wodurch man zu einem EB-Kulturmedium gelangte (das EB-Kulturmedium ist das gleiche wie Difco VRBA ohne Indikatorfarbstoff und mit 5% Glukose statt Lactose; siehe S. 1053 des 1984 herausgegebenen „Difco Manual“, Difco Labs, Detroit, MI, USA). Diese Mischung wurde anschließend auf 50°C erwärmt und mit MI50 Guargummi (1 g, Rhone-Poulenc, Kreuzlingen, Schweiz) versetzt. Die erhaltene warme viskose Mischung wurde in einer Dicke von 20 mil auf einen 7-mil-Polyestersubstratfilm (Imperial Chem. Industries, Wilmington, DE, USA) aufgetragen und dann 20 Minuten lang bei ungefähr 143°C getrocknet. Anschließend wurde eine Dünnschichtkulturvorrichtung, die den pH-Indikator mit DNSA/Polyvinylalkoholballast enthielt, mit einem mit Guargummi beschichteten Polypropylen-Abdeckblatt und einen Styrofoam-Abstandhalter, wie in Beispiel 1 von US-Patent Nr. 5,723,308 beschrieben, konstruiert. Vergleichsvorrichtungen wurden auf gleiche Art und Weise hergestellt, nur daß der pH-Indikator mit DNSA/Polyvinylalkoholballast durch äquivalente molare Mengen an entweder DNSA-Indikator alleine oder DNSA/Ethanolindikator (aus Beispiel 1) ersetzt wurde.

[0043] Die relativen Mengen an diesen Indikatoren wurden durch Messungen der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 589 nm bestimmt, wobei angenommen wurde, daß der DNSA-Indikator und seine Addukte wie in Beispiel 2 beschrieben den gleichen Extinktionskoeffizienten aufwiesen.

Beispiel 4

Nachweis von Bakterienwachstum

[0044] Sowohl E. Coli 149 (ATCC 55535) als auch C1 (*Serratia liquifaciens*) wurden nach dem in Beispiel 1 von US-Patent Nr. 5,723,308 beschriebenen Verfahren 24 Stunden lang bei 37°C auf den in Beispiel 3 beschriebenen Dünnschichtkulturvorrichtungen gezüchtet. Die Durchmesser der entstandenen gefärbten Höfe wurden bestimmt, und die Ergebnisse der Vorrichtung, die pH-Indikator mit DNSA/Polyvinylalkohol (PVA)-Ballast enthielt, wurden mit den Ergebnissen der Vorrichtungen, die entweder den freien DNSA-Indikator oder DNSA/Ethanol-Indikator enthielten, verglichen. Die Bakterienarten E. coli 149 und C1 wurden deshalb gewählt, weil sie den Gesamtbereich der säureproduzierenden Bakterien von sehr niedriger Säureproduktion (C1) bis zu sehr hoher Säureproduktion (E. coli 149) umfassen.

[0045] Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt. Diese Ergebnisse zeigen die Unterschiede bezüglich der Durchmesser der gefärbten Höfe, die sowohl auf die Veränderungen der pKa-Werte als auch die Veränderungen durch die Ballastierung des DNSA-pH-Indikators zurückzuführen sind. So war der Durchmesser der gefärbten Höfe durch Umsteigen von der Vorrichtung mit dem freien DNSA-Indikator (pKa-Wert = 7,6) auf die Vorrichtung mit DNSA/Ethanol (pKa-Wert = 6,9) signifikant verringert. Der Durchmesser des gefärbten Hofes wurde weiterhin dadurch signifikant verringert, daß man von der Vorrichtung mit DNSA/Ethanol (pKa-Wert = 6,9) auf die Vorrichtung mit DNSA/Polyvinylalkohol (pKa-Wert = 6,9) umstieg. Diese zuletzt genannten Ergebnisse zeigen deutlich die Auswirkung, wie der Durchmesser des gefärbten Hofes verringert wird, wenn man einen Ballast mit hohem Molekulargewicht, wie Polyvinylalkohol, statt einer Verbindung mit niedrigem Molekulargewicht, wie Ethanol, verwendet. Die Ergebnisse legen nahe, daß der Nachweis von durch wachsende Bakterien verursachten gefärbten Höfen dadurch unterstützt werden kann, daß man eine Dünnschichtkulturvorrichtung, die DNSA/Polyvinylalkohol enthält, verwendet, da die Durchmesser der gefärbten Höfe verringert wären und mit

geringerer Wahrscheinlichkeit während der Inkubationsdauer miteinander diffundieren würden.

Tabelle 1			
Bakterienart	Durchmesser (mm) der gefärbten Höfe auf Dünnschichtkulturvorrichtungen Mittel $\pm$ Standardfehler (Kolonienzahl)		
	Freie DNSA (pKa = 7,6)	DNSA/Ethanol (pKa = 6,9)	DNSA/PVA (pKa = 6,9)
E. Coli 149	8,0 $\pm$ 1,1 (10)	6,9 $\pm$ 0,3 (10)	3,49 $\pm$ 1,1 (16)
C1	6,1 $\pm$ 1,1 (13)	5,3 $\pm$ 0,8 (13)	$\leq$ 1,0

BEISPIEL 5

Herstellung von pH-Indikatoren mit Ballast (an aminomodifizierte Dextrane gebundener Carboxyphenolrot-pH-Indikator)

[0046] Für die kovalente Bindung von Carboxyphenolrot-pH-Indikator an aminomodifizierte Dextrane mit unterschiedlichem Molekulargewicht ging man folgendermaßen vor.

[0047] Aminomodifiziertes Dextran (0,5 g, MG = 10 000, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) wurde durch Rühren in Dimethylformamid (DMF, 20 ml, Aldrich Chemical) suspendiert. Carboxyphenolrot (CPR, Curtis Laboratories, Philadelphia PA, USA)-Indikator (120 mg) wurde in DMF (20 ml) gelöst, und anschließend wurden die Kopplungsmittel EDC [1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-hydrochlorid] (178 mg, Aldrich Chemical) und HOBt (1-Hydroxybenzotriazol-hydrat) (81 mg, Aldrich Chemicals) zugegeben. Dann wurde die Indikator/EDC/HOBt-Überstandslösung zu der Dextranlösung gegeben und der Ansatz wurde 3 Tage lang gerührt. Die entstandene Aufschlämmung wurde anschließend mit einem Buchner-Trichter an einem Vakuumkolben über Whatman Nr. 4 Filterpapier filtriert. Der erhaltene Filterkuchen wurde anschließend in 4 ml 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 8,0) gelöst. Ungelöste Substanzen wurden absetzen gelassen, und der klare Überstand wurde in einen Dialysebeutel mit einer molekularen Ausschußgrenze von 6000–8000 Dalton übergeführt. Nach 24stündiger Dialyse gegen 4 l destilliertes Wasser (mit 4maligem Wasserwechsel) wurden die Dialysebeutel auf eine Glasplatte gegeben und 4–6 Stunden mit festem Ficoll (MG = 40 000, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) bedeckt, bis das Volumen der Dextran-CPR-Konjugatlösung um mindestens 50% reduziert war. Diese Lösung wurde bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt. Ein pH-Indikator mit CPR-Dextran (MG = 40K)-Ballast wurde wie oben beschrieben hergestellt, nur daß das aminomodifizierte Dextran ein Molekulargewicht von 40 000 aufwies.

Beispiel 6

Herstellung einer Dünnschichtkulturvorrichtung, die CPR-Dextran-Indikatoren enthält

[0048] Die Menge an CPR-Chromatophor, die in jedem der wie in Beispiel 5 beschriebenen hergestellten pH-Indikatoren mit CPR-Dextran-Ballast vorlag, wurde analog dem in Beispiel 2 beschriebenen Verfahren spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 560 nm bestimmt. Wäßrige Lösungen von CPR-Dextran-Indikatoren wurden einzeln mit EB-Kulturmedium wie in Beispiel 3 beschrieben vermischt, wodurch man zu Medien, die 0,2 mg CPR/ml enthielten, gelangte. Mit den entstandenen Kulturmedien wurden anschließend Dünnschichtkulturvorrichtungen wie in Beispiel 3 beschrieben hergestellt. Eine Vergleichsvorrichtung wurde auf die gleiche Art und Weise hergestellt, nur daß man den pH-Indikator mit CPR-Dextran (MG = 10K bzw. 40K)-Ballast durch eine äquivalente molare Menge an CPR-Indikator allein ersetzte.

Beispiel 7

Nachweis von Bakterienwachstum

[0049] Sowohl E. Coli 149 (ATCC 55535) und C1 (Serratia liquifaciens) wurden 24 Stunden bei 37°C auf den in Beispiel 6 beschriebenen Dünnschichtkulturvorrichtungen gezüchtet. Die Durchmesser der entstandenen gefärbten Höfe und die Ergebnisse der Vorrichtungen, die die pH-Indikatoren mit CPR-Dextran-Ballast enthiel-

ten, wurden mit den Ergebnissen der Vorrichtung, die den freien CPR-Indikator enthielt, verglichen. Die Durchmesser der gefärbten Höfe wurden auf der Vorrichtung an so vielen Kolonien wie möglich bestimmt. Kolonien, die sehr knapp an der Kante der Schaumeindämmung oder weniger als 2 mm von einer anderen Kolonie entfernt wuchsen, wurden nicht bestimmt. Eine visuelle Überprüfung der Leichtigkeit, mit der abgegrenzte gefärbte Höfe gezählt werden konnten, wurde ebenfalls notiert.

[0050] Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt. Bei der Prüfung mit dem starken Säureproduzenten *E. coli* 149 zeigen die Ergebnisse, daß die Durchmesser der gefärbten Höfe durch Ballastierung des CPR-pH-Indikators mit aminomodifiziertem Dextran tendenzmäßig kleiner waren, und die Werte geben an, daß die Auswirkung auf die Reduktion des Hofdurchmessers bei dem Dextran mit dem höheren Molekulargewicht größer war. Bei der Prüfung mit dem schwachen Säureproduzenten C1 waren die Durchmesser der gefärbten Höfe nicht signifikant unterschiedlich. Es wurde jedoch die visuelle Beobachtung gemacht, daß die Bakterienkolonien der Vorrichtung mit dem CPR-Dextran(MG = 40K)-Indikator deutlicher ausgeprägte Grenzen aufwiesen und in bezug auf fusionierte Höfe leichter zu bestimmen waren, als die Bakterienkolonien auf der Vorrichtung mit dem freien CPR-Indikator.

Tabelle 2			
Bakterienart	Durchmesser (mm) der gefärbten Höfe auf Dünnschichtkulturvorrichtungen Mittel ± Standardfehler (Kolonienzahl)		
	Freie CPR	CPR-Dextran (MG = 10K)	CPR-Dextran (MG = 40K)
E. Coli 149	5,4±0,6 (42)	5,1±0,52 (72)	4,42±0,51 (52)
C1	4,0±0,5 (57)	3,8±0,5 (43)	3,8±0,5 (38)

Patentansprüche

1. Kulturmedium für den Nachweis und die zahlenmäßige Bestimmung von Mikroorganismen, umfassend ein Medium für die Züchtung von Mikroorganismen, einschließlich eines pH-Indikators, der chemisch an eine hydrophile Substanz mit hohem Molekulargewicht, die einen wasserlöslichen pH-Indikator mit Ballast bereitstellt, gebunden ist, wodurch das Medium zur Züchtung von Mikroorganismen ein hydratisiertes Wachstum unterstützendes Nährstoffgel bilden kann.

2. Kulturmedium nach Anspruch 1, wobei der pH-Indikator aus der Gruppe der Monoazofarbstoffe, Polyzazofarbstoffe, Amino-, Hydroxy- und Aminohydroxyarylmethane(Di- und Triarylmethane, modifizierten), Phenolphthaleine, modifizierten Sulfonphthaleine, Anthrachinone, Xanthene, polycyclischen Aromaten und Naphthofluoresceine ausgewählt ist.

3. Kulturmedium nach Anspruch 1, wobei der pH-Indikator 2-(2,4-Dinitrophenylazo)-6-[N-methyl-N-(2-hydroxysulfonyloxyethylsulfonyl)amido]-1-naphthol-3-sulfonsäure umfasst.

4. Kulturmedium nach Anspruch 1, wobei der pH-Indikator Carboxyphenolrot umfasst.

5. Kulturmedium nach Anspruch 1, wobei die hydrophile Substanz mit hohem Molekulargewicht aus der Gruppe Cellulose, modifizierte Cellulosen, Polyvinylalkohole, Dextrane, aminomodifizierte Dextrane, modifizierte Guargumme, Guargumme, Xanthangumme und Johannisbrotkerngumme ausgewählt ist.

6. Verfahren für den Nachweis und die zahlenmäßige Bestimmung von Mikroorganismen in einer Probe, das die folgenden Schritte umfasst:

- (a) Zugabe der Probe zu einem Kulturmedium nach einem der Ansprüche 1–5; sowie
- (b) Nachweisen einer Farb- oder Fluoreszenzveränderung des pH-Indikators in dem Kulturmedium.

7. Kulturmediumvorrichtung, die folgendes umfasst: ein Kulturmedium nach einem der Ansprüche 1–5.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

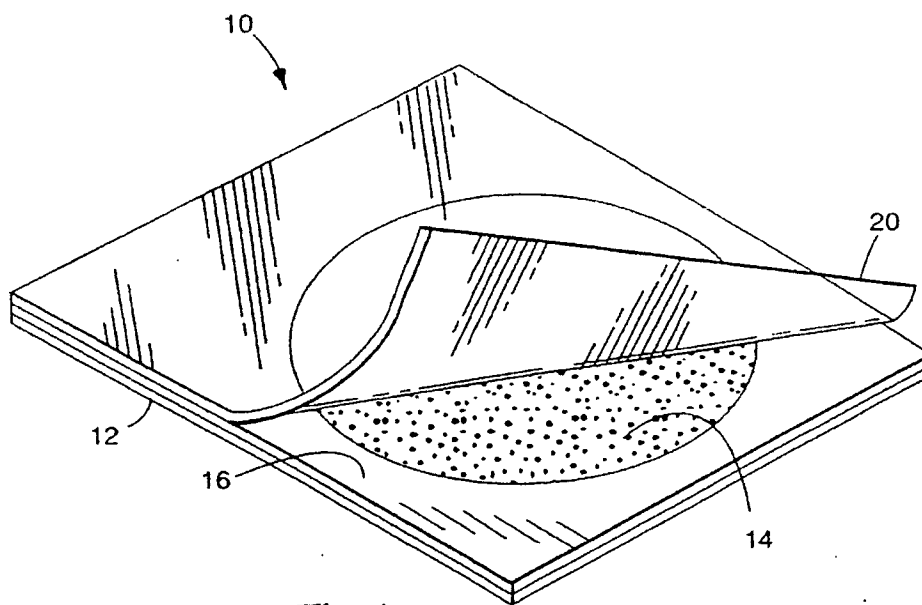


Fig.1