



Republik  
Österreich  
Patentamt

(11) Nummer: **AT 396 115 B**

(12)

# PATENTCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 664/86

(51) Int.Cl.<sup>5</sup> : **C12N 1/20**  
C12M 1/14

(22) Anmeldetag: 13. 3.1986

(42) Beginn der Patentdauer: 15.10.1992

(45) Ausgabetag: 25. 6.1993

(30) Priorität:

8. 7.1985 US 752826 beansprucht.

(73) Patentinhaber:

PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC.  
50309 DES MOINES (US).

(54) VERDÜNNUNGSLÖSUNG FÜR NORMALERWEISE TROCKENE NÄHRMEDIUMFOLIEN UND VERFAHREN ZUR ZÜCHTUNG VON MILCHSÄUREBAKTERIEN

(57) Verdünnungslösung, um eine normalerweise trockene, vollständige, gebrauchsfertige Bakteriennährmediumfolie für das selektive Wachstum von Milchsäurebakterien spezifisch zu machen, die einen Inhibitor für gram-negative Organismen, ein wasserlösliches Antimykotikum und ein wasserlösliches Nitritsalz enthält und einen pH-Wert im Bereich von 6,5 bis 7,5 aufweist.

AT 396 115 B

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Verdünnungslösung, um normalerweise trockene, vollständige, gebrauchsfertige Bakterien-Nährmediumfolien spezifisch für das selektive Wachstum von Milchsäurebakterien unter anaeroben Bedingungen zu machen.

Außerdem betrifft die Erfindung eine Kombination einer normalerweise trockenen, vollständigen, gebrauchsfertigen Bakteriennährmediumfolie mit einem derartigen Verdünnungsmittel sowie ein Verfahren zur anaeroben Züchtung von Milchsäurebakterien.

In letzter Zeit konnte die Entwicklung von Trockenmedium-Kulturplatten beobachtet werden, von denen ein typisches Beispiel die Platte ist, die von der 3M Company verkauft wird, wobei diese Produkte in der Regel aus einem trockenen, vollständigen, gebrauchsfertigen Bakterienkulturmedium bestehen, das auf eine Folienunterlage aufgezogen und mit beispielsweise einer Polyethylenfolie überzogen ist. Die Unterlage enthält Nährstoffe für die Standardmethode und ein in kaltem Wasser lösliches Quellmittel. Die Überzugsfolie ist ebenfalls mit dem Quellmittel beschichtet und enthält zusätzlich die Indikatorfarbe 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid, um die Zählung zu erleichtern. Ein auf der untersten Folie gezeichneter Raster (jedes Quadrat 1 cm x 1 cm) unterstützt ebenfalls das Zählverfahren. Das Gesamtausmaß einer derartigen Folie oder Platte beträgt 20 cm<sup>2</sup>.

Diese Trockenmedium-Kulturplatten, wie sie oben beschrieben sind, haben oft Vorteile gegenüber den üblicheren Petrischalen und Agarplatten, die meist zum Beimpfen und für das Bakterienwachstum verwendet werden. Beispielsweise erfordert die ältere, üblichere Verwendung von Petrischalen und Ager-Nährmedien einen beträchtlichen gewichtsmäßigen und räumlichen Aufwand. Dadurch wird der Transport von Organismenproben vom Feld in die Laboratoriumseinrichtungen günstigenfalls umständlich. Andererseits stellt die trockene Nährmediumfolie, auf der das Bakterienwachstum einfach durch Zusatz einer wässrigen Probe unterstützt wird, eine wirksamere Methode zur Zählung lebensfähiger Bakterien dar als die derzeit üblichen Methoden.

Tatsache ist es jedoch, daß die erhältlichen trockenen Nährmediumfolien nur ein Standard-Kulturmedium auf der Folienunterlage aufgezogen enthalten. Anders gesagt ist das derzeit verwendete Kulturmedium eines, das zur Züchtung aller Arten von Organismen geeignet und nicht selektiv für das Wachstum einer speziellen Art ist. Somit mußte der Bakteriologe, der einen speziellen Organismus züchten wollte, bisher auf die Möglichkeit der Verwendung der sehr angenehmen Nährmediumfolien verzichten und auf die umständlichen üblichen Agarplatten zurückkommen, die speziell zugerichtete Kulturmedien aufweisen, von denen es bekannt ist, daß sie das Wachstum des gewünschten speziellen Organismus fördern und gleichzeitig das Wachstum der unerwünschten Arten inhibieren. Da die Bakteriologen und Mikrobiologen aber sehr oft nur einen einzigen speziellen Organismus zur weiteren Isolierung, zum Studium, zur Auswertung und zur Verwendung züchten wollen, waren daher die das Standardmedium enthaltenden trockenen Nährmediumfolien wegen ihres nichtselektiven Mediums in vielen Fällen nicht brauchbar.

Die vorliegende Erfindung stellt daher eine Verdünnungslösung zur Verfügung, um normalerweise trockene, vollständige, gebrauchsfertige Nährmediumfolien spezifisch für das selektive Wachstum von Milchsäurebakterien unter anaeroben Bedingungen zu machen, während gleichzeitig das Wachstum anderer Organismen inhibiert wird.

Erfindungsgemäß ist eine derartige Verdünnungslösung dadurch gekennzeichnet, daß sie aus einer wässrigen Lösung besteht, die enthält:

- a) einen Inhibitor für gram-negative Organismen in einer Menge von 24 Einheiten/ml bis 40 Einheiten/ml Verdünnungslösung,
- b) ein wasserlösliches antimykotisches Mittel in einer Menge von 10 µg/ml bis 250 µg/ml Verdünnungslösung und
- c) ein wasserlösliches Nitratsalz in einer Menge von 600 µg/ml bis 1800 µg/ml Verdünnungslösung, und daß
- d) diese Lösung einen pH-Wert im Bereich von 6,5 bis 7,5 hat.

Basierend auf dieser Verdünnungslösung wird ein Verfahren zur anaeroben Züchtung von Milchsäurebakterien, die bis zu ein Jahr lang lagerfähig sind, zur Verfügung gestellt, das gekennzeichnet ist durch folgende Schritte:

- a) Gewinnung einer biologischen Filmplatte, die ein Standardkulturmedium enthält,
- b) Herstellung einer wässrigen oben genannten Verdünnungslösung und Aufbringen einer geringen, doch wirksamen Menge dieser Lösung auf die genannte Filmplatte gemeinsam mit einer Milchsäureorganismen enthaltenden Probe; sowie
- c) Inkubation des Films unter anaeroben Bedingungen zur Herstellung einer lagerfähigen Kultur.

Es gibt zahlreiche Gründe, warum Bakteriologen und Mikrobiologen einen speziellen Organismus unter Ausschluß anderer Organismen züchten möchten. Die gemäß der vorliegenden Erfindung entwickelte Träger- oder Verdünnungslösung ist speziell darauf ausgerichtet, Nährmediumfolien spezifisch für Lactobacillaceae zu machen. Somit erlaubt sie die angenehme Nutzung der wünschenswerten Vorteile der Nährmediumfolien, wie die Auswärts-Probennahme, den Transport und die Untersuchung, auch wenn speziell nur der Organismus Lactobacillaceae gezüchtet wird.

Typische Milchsäureorganismen, die selektiv auf den oben beschriebenen Nährmediumfolien gezüchtet

werden können, wenn man das erfindungsgemäße Verdünnungsmittel verwendet, sind Streptococci, Pediococci, Lactobacilli und Leuconostocs.

Das erfindungsgemäß zu verwendende Verdünnungsmittel ist ein Dreikomponentensystem und basiert auf Wasser. Die Lösung enthält eine Kombination eines Inhibitors für gram-negative Organismen, ein antimykotisches Mittel und ein wasserlösliches Nitritsalz. Die Lösung muß auch einen pH-Wert innerhalb des Bereiches von etwa 6,5 bis etwa 7,4, also vorzugsweise neutral, haben. Wenn diese Bedingungen eingehalten werden, ergibt sich ein Verdünnungsmittel, das beim Aufbringen auf eine trockene Nährmediumfolie die Folie organismenspezifisch für Lactobacillaceae macht.

Der Inhibitor für die gram-negativen Organismen kann ein Polymixin-Antibiotikum sein und besteht vorzugsweise aus Polymixin B-Sulfat.

Die Impflösung enthält auch ein wasserlösliches antimykotisches Mittel in einer Konzentration innerhalb des Bereiches von 10 µg/ml bis etwa 250 µg/ml, wobei etwa 10 µg/ml bis etwa 20 µg/ml bevorzugt sind. Ein bevorzugtes antimykotisches Mittel ist Cycloheximid. Man kann jedoch außer Cycloheximid andere antimykotische Mittel und Konservierungsmittel, wie Kaliumsorbat, butyliertes Hydroxyanisol (BHA) und butyliertes Hydroxytoluol (BHT) verwenden.

Die dritte Komponente der Träger- oder Verdünnungslösung ist das wasserlösliche Nitritsalz. Dieses kann jedes wasserlösliche Metallnitritsalz sein, ist vorzugsweise jedoch ein Nitritsalz eines Metalles der Gruppe I des Periodensystems und ist insbesondere entweder Natriumnitrit oder Kaliumnitrit. Kaliumnitrit ist das am meisten bevorzugte. Ein Nitritsalz, das innerhalb dieses Konzentrationsbereichs verwendet wird, zeigte eine Wachstumsinhibierung für Organismen mit Ausnahme von Milchsäurebakterien.

Die Trägerlösung muß einen pH-Wert innerhalb des Bereiches von 6,5 bis etwa 7,5 vorzugsweise von etwa 6,5 bis etwa 7,0 haben. Ideal ist es, wenn die Verdünnungslösung neutral ist. Es hat sich als wichtig herausgestellt, daß, wenn man die Nährmediumfolie Lactobacillaceae-spezifisch macht, der pH-Wert im allgemeinen innerhalb des Neutralbereichs, d. h. zwischen etwa 6,5 bis etwa 7,5 bleibt. Das hat seinen Grund darin, daß die handelsüblichen Folien eine Tetrazolium-Farbe zur Rotfärbung der gezüchteten Bakterien zur Erleichterung der Farbzählung enthalten. Die Tetrazolium-Farbe wird jedoch für alle wachsenden Organismen giftig, wenn der pH-Wert saurer wird, beispielsweise in einen Bereich von 5,5 kommt. Daher muß die erfindungsgemäße Trägerlösung einen pH-Wert innerhalb des genannten Bereichs haben, der die nachteilige Reaktion mit der Tetrazolium-Farbe verhindert.

Um den Inhibitionseffekt für das Wachstum der anderen Organismen so groß als möglich zu halten, ist es für die vorliegende Erfindung auch wichtig, daß die beimpfte Folie unter anaeroben Bedingungen inkubiert wird. Anders gesagt ist die Verdünnungslösung nur unter anaeroben Bedingungen für Lactobacillaceae organismenspezifisch. Diese anaerobe Umgebung kann man durch viele bekannte Möglichkeiten, wie die Verwendung von Anaerob-Generatoren, die von BBL Microbiology Systems in Cokesville, Maryland, hergestellt werden, erzeugen.

Die obige Beschreibung erfolgte im Zusammenhang mit der Verwendung von Polymixin-Antibiotika als Inhibitor für gram-negative Organismen. Eine weitere Formulierung wurde entwickelt, die für viele Zwecke geeignet ist und in manchen Fällen sogar besser arbeitet als die oben beschriebene Zusammensetzung. Sie beruht auf der Verwendung von 2-Phenylethanol als Inhibitor für die gram-negativen Organismen. Wenn 2-Phenylethanol verwendet wird, so ist eine bevorzugte Zusammensetzung eine gemäß der folgenden Beschreibung. Die Konzentration des 2-Phenylethanol sollte im Bereich von etwa 1 mg/ml bis etwa 4 mg/ml liegen. Die Konzentration des antimykotischen Mittels sollte im Bereich von etwa 10 Mikrogramm/ml bis etwa 250 Mikrogramm/ml liegen und die Konzentration des wasserlöslichen Nitritsalzes sollte bei etwa 600 Mikrogramm/ml bis etwa 800 Mikrogramm/ml liegen. Der pH-Wert wird im Bereich von etwa 6,5 bis etwa 7,5, vorzugsweise von etwa 6,5 bis etwa 7,0 liegen.

Die Anwendung der mit Trockenmedium beschichteten Folien im Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen Verdünnungslösungen erfolgt nach einem üblichen, für Mikrobiologen und Bakteriologen bekannten Verfahren. Prinzipiell besteht das Verfahren aus Folgendem: Die Folie wird auf eine glatte Oberfläche aufgelegt, die transparente obere Folie wird angehoben, sodaß eine 1 ml-Probe des den Organismus enthaltenden Verdünnungsmittels auf die untere Folie aufgebracht werden kann. Die obere Folie wird dann sorgfältig wieder auf die untere Folie aufgelegt. Ein Probenausbreiter aus Kunststoff wird dann leicht auf die obere Folie gepreßt, um die Trägerlösung über die untere, das Medium enthaltende Folie auszubereiten. Daraufhin wird die Folie etwa 1 min ruhen gelassen, damit sie quellen kann. Dann wird die Folie in horizontaler Lage mit der klaren Folienseite nach oben 48h bei 32 °C inkubiert. Die Organismen reduzieren die Tetrazolium-Indikatorfarbe in der unteren Folie, sodaß die Organismenkolonien auf der Folie als rote Flecken erscheinen, die gezählt werden können.

Die folgenden Beispiele werden zur weiteren Erläuterung, jedoch nicht zur Einschränkung des Verfahrens, der Technik und der Produktzusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung angeboten.

#### Beispiele

Bei jedem der im folgenden gezeigten Beispiele bestand die trockene Nährmediumfolie aus der von der 3M-Company (Abteilung Medizinische Produkte, St. Paul, Minnesota 55144) entwickelten Platte. Diese Platte bestand aus einem trockenen, vollständigen, gebrauchsfertigen Bakterienkulturmedium, das auf einer Folienunterlage aufgebracht und mit einer Polyethylenfolie überzogen war. Die Unterlage enthielt Nährstoffe für die Stan-

dardmethode und ein kaltwasserlösliches Quellmittel. Die Überzugsfolie, die ebenfalls mit einem Quellmittel beschichtet war, enthielt auch 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid-Indikatorfarbe, um die Zählung der Organismen zu erleichtern. Ein Raster mit Quadraten von 1 cm x 1 cm war in der Unterlagsfolie vorgesehen und unterstützte auch den Zählvorgang. Die Gesamtdimensionen der Petrifilm™-Platte betragen 20 cm<sup>2</sup>.

Zum Grundverfahren gehört die Herstellung von Vorratslösungen des Verdünnungsmittels, die Inokulierung der Nährmedium-Platte mit anschließender Inkubation bei 32 °C während 48 h unter anaeroben Bedingungen und schließlich die Auszählung der Organismen (cfu/ml). Eine Bodenprobe aus einem Glashauss wurde als Testkultur verwendet und eine andere, mit S/80 bezeichnete Probe, von der bekannt war, daß sie eine Lactobacillus-Kultur war, wurde als Vergleich herangezogen. Die Bodenprobe enthielt bekanntermaßen neben dem Lactobacillus noch viele andere Organismen.

Die Vorratslösungen des Verdünners wurden mit folgenden Gehalten an Natriumnitrit in Gew.-%/Volumen hergestellt: 1 Gew.-%/Volumen, 6 Gew.-%/Volumen, 12 Gew.-%/Volumen und 18 Gew.-% Volumen. Cycloheximid wurde mit Gehalten von 0,1, 0,5, 1 und 2,5 Gew.-%/Volumen eingesetzt. Da bei dieser ersten Serie von Beispielen die Konzentrationsänderungen von Natriumnitrit und Cycloheximid untersucht werden sollten, wurde Polymixin B mit einem konstanten Wert von 0,03 Gew.-%/Volumen eingesetzt.

Die Vorratslösungen wurden filtersterilisiert und der endgültige Verdünner wurde unter Verwendung von 97 ml sterilisiertem destilliertem Wasser und Zusatz von jeweils 1 ml pro 100 ml Wasser jeder der drei Komponenten, d. h. Natriumnitrit, Cycloheximid und Polymixin B, alle innerhalb der oben genannten Bereiche, hergestellt. Sterile Mischungen wurden dann aseptisch in Teströhrchen in einer Menge von 9 ml/Röhrchen eingebracht. Die folgenden Mischungen wurden hergestellt:

#### Endkonzentration der Bestandteile

	Vergleich	Butterfield-Puffer* plus 0,1 % Tween 80	
25	Variation 1	100 µg/ml 10 µg/ml 24 Einheiten/ml	Nitrit Cycloheximid Polymixin B
30	Variation 2	600 µg/ml 10 µg/ml 24 Einheiten/ml	Nitrit Cycloheximid Polymixin B
35	Variation 3	1200 µl/ml 10 µg/ml 24 Einheiten	Nitrit Cycloheximid Polymixin B
40	Variation 4	1800 µg/ml 10 µg/ml 24 Einheiten/ml	Nitrit Cycloheximid Polymixin B.
45	Variation 5	600 µg/ml 50 µg/ml 24 Einheiten/ml	Nitrit Cycloheximid Polymixin B
	Variation 6	600 µg/ml 100 µg/ml 24 Einheiten/ml	Citrit Nycloheximid Polymixin B
50	Variation 7	600 µg/ml 250 µg/ml 24 Einheiten/ml	Nitrit Cycloheximid Polymixin B

\* Butterfield-Puffer ist eine in der Lebensmittel-Mikrobiologie übliche Kaliumphosphat-Pufferlösung.

Gemäß den standardisierten Petrifilm™-Verdünnungsmethoden wurde der S/80 Vergleich bearbeitet, insbesondere wurde 1 ml einer Übernacht-Kultur unter Verwendung der Testlösung serienmäßig verdünnt und Volumina von 1 ml wurden auf die Platten aufgebracht. Eine Probe von 11 g aus der Glashauserde wurde ursprünglich in 100 ml Butterfield-Puffer verdünnt. Diese Zubereitung wurde dann unter Verwendung der Testlösung serienmäßig verdünnt.

Volumina von 1,0 ml der  $10^{-6}$ -,  $10^{-7}$ - und  $10^{-8}$ -Verdünnungen von S/80 wurden auf das Petrifilm™-Beschichtungsmedium aufgebracht. Volumina von 1,0 ml der  $10^{-4}$ -,  $10^{-5}$ - und  $10^{-6}$ -Verdünnungen der Bodenprobe wurden auf das Petrifilm™-Schichtmedium aufgebracht. Die aufgestrichenen Proben wurden unter anaeroben Bedingungen in Behältern mit Gas Pack®-Generatoren (BBL) inkubiert. Sie wurden 48 h bei 32 °C inkubiert.

Die folgende Tabelle I zeigt die Auszählung der entstandenen Organismen bei Verwendung der oben spezifizierten Verdünnungslösung.

Tabelle I

	Probe	Koloniebildende Einheiten/ml (cfu/ml)
10	Erde:	Vergleich
		$5 \times 10^7$
		Variation 1
		$3,3 \times 10^6$
		Variation 2
		$2,3 \times 10^7$
15		Variation 3
		$5 \times 10^4$
		Variation 4
		$0 \times 10^4$
		Variation 5
		$7,0 \times 10^6$
		Variation 6
		$7,1 \times 10^7$
		Variation 7
		$4,0 \times 10^7$
20	S/80:	Vergleich
		$2,4 \times 10^9$
		Variation 1
		$7,5 \times 10^8$
		Variation 2
		$1,3 \times 10^9$
		Variation 3
		$1,3 \times 10^9$
25		Variation 4
		$1,3 \times 10^9$
		Variation 5
		$9,6 \times 10^8$
		Variation 6
		$1,2 \times 10^9$
		Variation 7
		$1,0 \times 10^9$

Man sieht, daß hier ein signifikanter Anstieg des Inhibitionseffektes des Verdünners auf die Bodenmikroorganismen zu beobachten ist, wenn die Nitritkonzentration von 600 µg/ml auf 1200 µg/ml gesteigert wird. Die Vergleichsprobe S/80 blieb unberührt von den Änderungen der Nitrit- und Cycloheximidkonzentrationen in den Bereichen von 100 µg/ml bis 1800 µg/ml bzw. 10 µg/ml bis 250 µg/ml. Man sieht auch, daß der Verdünner bewirkte, daß die Nährmedienfolie organismenspezifisch für den Organismus Lactobacillus war und das Wachstum anderer Organismen inhibierte. Ähnliche Versuche wie die für die Variationen 1 - 7 zeigten wurden unter Veränderung der Polymixin B-Konzentration vorgenommen, von der sich herausstellte, daß sie keine Wirkung auf den S/80-Organismus in einem Bereich von 24 - 40 Einheiten/ml hatte. Bei den Bodenorganismen sank der Inhibitionseffekt bei Gehalten von unter 24 Einheiten Polymixin B/ml.

#### Beispiele, die den Austausch des Polymixin B-Sulfates durch 2-Phenylethanol zeigen.

2-Phenylethanol (PEA), im Handel erhältlich von Sigma Scientific in Form einer Flüssigkeit (1 ml = 1,02 g) wurde in dem Verdünner verwendet. Das PEA wurde zur Herstellung der unten genannten Konzentrationen zu einem gegebenen Volumen Wasser zugesetzt und autoklaviert. Filtersterilisierte Natriumnitritlösung mit 6 Gew.-%/Volumen und Cycloheximid-Lösungen mit 0,1 Gew.-%/Volumen wurden zur Vervollständigung der unten aufgezählten Mischungen verwendet, wobei 1 ml pro 100 ml zubereitetem Verdünner zugesetzt wurden.

Tabelle II

Hergestellte Mischungen	Gew.-%/Vol.	
8	600 µg/ml 10 µg/ml 0.05 %	Nitrit Cycloheximid PEA

## (Fortsetzung Tabelle II)

	<u>Hergestellte Mischungen</u>	<u>Gew.-%/Vol.</u>	
5	9	600 µg/ml 10 µg/ml 0.10 %	Nitrit Cycloheximid PEA
10	10	600 µg/ml 10 µg/ml 0.20 %	Nitrit Cycloheximid PEA
15	11	600 µg/ml 10 µg/ml 0.4 %	Nitrit Cycloheximid PEA

Die Beimpfung und das Verfahren erfolgten wie in den oben beschriebenen Beispielen. Eine Lösung von S/80 und eine Erdprobe waren die untersuchten Proben. S/80 wurde aus einer Übernacht-Kultur serienmäßig mit den Verdünnungsmischungen verdünnt und mit  $10^7$  und  $10^8$  auf Petrifilm™ aufgebracht. Die Erdprobe wurde ursprünglich 1 : 1ß mit 99 ml Butterfield-Puffer verdünnt und dann in dem gegebenen Verdünnser serienmäßig verdünnt. Die  $10^{-4}$ -,  $10^{-5}$  und  $10^{-6}$ -Verdünnungen der Bodenprobe wurden auf Petrifilm aufgebracht. Die Folien wurden anaerob unter Verwendung von BBL Gas Packs® 48 h bei 32 °C inkubiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle III gezeigt.

Tabelle III  
Ergebnisse

	<u>Impflösungen</u>	<u>cfu/ml</u>
30	Erde:	
	Variation 8	$6,2 \times 10^5$
	Variation 9	$5 \times 10^3$
	Variation 10	$0 \times 10^3$
35	Variation 11	$0 \times 10^3$
	S/80:	
	Variation 11	$9,4 \times 10^8$

Wie man sieht, bewirkt der Ersatz des Polymixin B - Sulfat-Antibiotikums durch Phenylethylalkohol sehr wohl die Inhibierung der Bodenmikroorganismen.

Die folgenden Beispiele zeigen verschiedene Änderungen in der Formulierung bei Verwendung von Phenylethylalkohol (PEA) als Inhibitor für die gram-negativen Organismen.

Tabelle IV - Formulierungen

	<u>Hergestellte Mischungen</u>	<u>Natriumnitrat-Konzentration</u>	<u>Cycloheximid-Konzentration</u>	<u>Phenylethylalkohol-Konzentration</u>
45	Vergleich	(Butterfield-Puffer)		
50	12	800 µg/ml	10 µg/ml	0,1 %
	13	800 µg/ml	10 µg/ml	0,2 %
	14	600 µg/ml	10 µg/ml	0,1 %
55	15	600 µg/ml	10 µg/ml	0,2 %
	16*	800 µg/ml	10 µg/ml	0,1 %
	17*	600 µg/ml	10 µg/ml	0,1 %

\* enthält Polymixin B in einer Menge von 24 Einheiten/ml

Die Testproben bestanden aus S/80 und Erde. Die S/80-Verdünnungen wurden mit  $10^{-7}$  und  $10^{-8}$  aufgebracht. Die Erde wurde ursprünglich mit 99 ml (1 : 10) modifizierten Butterfield-Puffer verdünnt und mit  $10^{-3}$  oder bis  $10^{-6}$  aufgebracht. Die Petrifilme wurden anaerob unter Verwendung von BBL Gas Packs™ 48 h bei 32 °C inkubiert, wie es ähnlich auch bei den früheren Beispielen beschrieben wurde. Die Resultate sind im Folgenden angegeben:

Tabelle V - Resultate

	<u>Probe</u>	<u>Mischung</u>	<u>cfu/ml</u>
10	Vergleich	Vergleich	$9,8 \times 10^8$
	S/80	12	$8,7 \times 10^8$
		13	$8,5 \times 10^8$
15		14	$8,7 \times 10^8$
		15	$1,0 \times 10^9$
		16	$7,4 \times 10^8$
		17	$1,1 \times 10^9$
20	Vergleich:	--	$2,7 \times 10^7$
	Erde:	12	$1,8 \times 10^4$
		13	$3,0 \times 10^2$
		14	$3,4 \times 10^6$
25		15	$3,3 \times 10^4$
		16	$4,2 \times 10^4$
		17	$9,0 \times 10^4$

Wie man sieht, ergab die Lösung Nr. 13 die besten Inhibitionswirkungen für die Erde, ohne das Wachstum von S/80 nachteilig zu beeinflussen.

Man sieht aus jedem der obigen in den verschiedenen Tabellen dargestellten Beispiele, daß wirksame Verdünnungszusammensetzungen Nährmediumfolien spezifisch für Milchsäurebakterien machen können und daher ihre Brauchbarkeit wirksam ergänzen.

## PATENTANSPRÜCHE

1. Verdünnungslösung, um normalerweise trockene, vollständige, gebrauchsfertige Bakterien-Nährmediumfolien spezifisch für das selektive Wachstum von Milchsäurebakterien unter anaeroben Bedingungen zu machen, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus einer wässrigen Lösung besteht, die enthält:

- einen Inhibitor für gram-negative Organismen in einer Menge von 24 Einheiten/ml bis 40 Einheiten/ml Verdünnungslösung,
- ein wasserlösliches antimykotisches Mittel in einer Menge von 10 µg/ml bis 250 µg/ml Verdünnungslösung und
- ein wasserlösliches Nitritsalz in einer Menge von 600 µg/ml bis 1800 µg/ml Verdünnungslösung, und daß
- diese Lösung einen pH-Wert im Bereich von 6,5 bis 7,5 hat.

2. Verdünnungslösung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Inhibitor für die gram-negativen Organismen ein Polymixin-Antibiotikum ist.

3. Verdünnungslösung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Polymixin-Antibiotikum ein Polymixin-B-Sulfat ist.

4. Verdünnungslösung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das antimykotische Mittel ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Cycloheximid, Kaliumsorbat, butyliertem Hydroxytoluol (BHT) und butyliertem Hydroxyanisol (BHA).
- 5 5. Verdünnungslösung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Nitrit ein Nitrit der Metalle der Gruppe I des Periodensystems ist.
6. Verdünnungslösung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Nitrit Natriumnitrit ist.
- 10 7. Verdünnungslösung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Wert bei 6,5 bis 7,0 liegt.
8. Verdünnungslösung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus einer wäßrigen Lösung besteht, die enthält:
- 15 a) 2-Phenylethanol in einer Konzentration von 1,0 mg/ml bis 4,0 mg/ml Verdünnungslösung,  
 b) ein wasserlösliches antimykotisches Mittel in einer Konzentration von 10 µg/ml bis 250 µg/ml Verdünnungslösung und  
 c) ein wasserlösliches Nitratsalz in einer Konzentration von 600 µg/ml bis 800 µg/ml Verdünnungslösung, und daß
- 20 d) diese Lösung einen pH-Wert im Bereich von 6,5 bis 7,5 hat.
9. Verdünnungslösung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das antimykotische Mittel ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Cycloheximid, Kaliumsorbat, butyliertem Hydroxytoluol (BHT) und butyliertem Hydroxyanisol (BHA).
- 25 10. Verdünnungslösung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Wert zwischen 6,5 und 7,0 liegt.
11. Verdünnungslösung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Nitrit ein Nitrit eines Metalls der Gruppe I des Periodensystems ist.
- 30 12. Verdünnungslösung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Nitrit Natriumnitrit ist.
13. Kombination einer normalerweise trockenen, vollständigen, gebrauchsfertigen Bakteriennährmedienfolie und eines Verdünners nach einem der Ansprüche 1 bis 12.
- 35 14. Kombination nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die normalerweise trockene, vollständige, gebrauchsfertige Bakteriennährmedienfolie enthält:
- 40 a) ein auf einer Folienunterlage aufgebrachtes Bakteriennährmedium und eine darüber geschichtete transparente Folie, wobei  
 b) diese Folienunterlage Nährstoffe für Standardmethoden sowie ein kaltwasserlösliches Quellmittel enthält; und  
 c) die Überzugsschicht mit einem Quellmittel beschichtet ist und eine 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid-Indikatorfarbe zur Erleichterung der Keimzählung enthält.
- 45 15. Verfahren zur anaeroben Züchtung von Milchsäurebakterien, die bis zu einem Jahr lang lagerfähig sind, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:
- 50 a) Gewinnung einer biologischen Filmplatte, die ein Standardkulturmedium enthält,  
 b) Herstellung einer wässrigen Verdünnungslösung nach einem der Ansprüche 1 bis 12 und Aufbringen einer geringen, doch wirksamen Menge dieser Lösung auf die genannte Filmplatte gemeinsam mit einer Milchsäureorganismen enthaltenden Probe; sowie  
 c) Inkubation des Films unter anaeroben Bedingungen zur Herstellung einer lagerfähigen Kultur.

55