



⑫ A Terinzagelegging ⑪ 8600468

Nederland

⑲ NL

-
- ⑤4 **Verdunningsoplossing voor droge, direct-klaar bacteriële cultuurmediumfilms en combinaties van één en ander.**
- ⑤1 Int.Cl⁴: C12N 1/20.
- ⑦1 Aanvrager: Pioneer Hi-Bred International, Inc. te Des Moines, Iowa, Ver. St. v. Am.
- ⑦4 Gem.: Ir. L.W. Kooy c.s.
Octrooibureau Vriesendorp & Gaade
Dr. Kuyperstraat 6
2514 BB 's-Gravenhage.

-
- ②1 Aanvraag Nr. 8600468.
- ②2 Ingediend 25 februari 1986.
- ③2 Voorrang vanaf 8 juli 1985.
- ③3 Land van voorrang: Ver. St. v. Am. (US).
- ③1 Nummer van de voorrangsaanvraag: 752826 .
- ⑥2 --

-
- ④3 Ter inzage gelegd 2 februari 1987.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Verduunningsoplossing voor droge, direct-klaar bacteriële cultuurmediumfilms en combinaties van één en ander.

Recent is de ontwikkeling van droge cultuurmediumplaten waarvan er bijvoorbeeld één door de 3M Company (Medical Products Division, St. Paul, Minnesota 55144) onder het merk Petrifilm in de handel wordt gebracht.

5 Dergelijke produkten bestaan uit een droog, transportabel, direct-klaar bacterieel cultuurmedium dat is aangebracht op een dragerfilm en bedekt met bijvoorbeeld een polyethyleenfilm. Op de dragerfilm zijn standaardmethodevoedingsstoffen en een in koud water oplosbaar gelerings-

10 middel aangebracht. De toplaag is eveneens bekleed met het geleringsmiddel en verder met 2,3,5-trifenylnitrazoliumchloride als indicatorkleurstof om het tellen te vergemakkelijken. Om het tellen nog meer te vergemakkelijken is op de dragerfilm een rooster met hokjes van 1 x 1 cm

15 afgetekend. Het totale oppervlak van zo'n Petrifilmplaat bedraagt 20 cm².

Dergelijke droge cultuurmediumplaten hebben dikwijls voordelen boven de meer gebruikelijke Petrischalen en agarplaten zoals gewoonlijk gebruikt voor enten

20 en bacteriële groei. Zo zijn de oudere, meer gebruikelijke Petrischalen en voedingsagarmedia zeer volumineus, hebben zij een hoog gewicht en nemen zij veel ruimte in beslag. Dit bemoeilijkt het transport van monsters organismen van het veld naar het laboratorium. De droge cultuurmedium-

25 films daarentegen onderhouden de bacteriële groei door eenvoudig een waterig monster toe te voegen waardoor levensvatbare bacteriën efficiënter kunnen worden geteld.

Een bezwaar van de tot nog toe bekende droge cultuurmediumfilms is dat deze alleen een standaardmethode-

30 cultuurmedium aangebracht op de dragerfilm, bevatten. Omdat zij daarmee geschikt zijn voor het kweken van alle soorten organismen, zijn zij niet geschikt voor selectief

kweken van een bepaald microorganisme. Derhalve was men voor het selectief kweken van een bepaald microorganisme gedwongen om de praktische cultuurmediumfilms te verlaten en zijn toevlucht te nemen tot de gebruikelijke maar omslachtige agarplaten van toegesneden cultuurmedia voor het kweken van het betreffende microorganisme onder gelijktijdige remming van de groei van ongewenste microorganismen. De droge standaardmethode cultuurmediumfilms zijn dan ook meestal niet geschikt voor bacteriologen en microbiologen die een bepaald organisme hebben geïsoleerd en dit verder willen onderzoeken door selectief kweken.

De uitvinding beoogt om met een droge, transporteerbare, direct-klaar cultuurmediumfilm voor het selectief kweken van bepaalde microorganismen, in het bijzonder melkzuurbacteriën (Lactobacillaceae) onder anaerobe omstandigheden, aan de boven geschetste behoeften te moeten komen.

Daartoe wordt volgens de uitvinding een verdunningsoplossing verschaft voor toepassing bij het prepareren van monsters voor enten op droge, transporteerbare, direct-klaar cultuurmediumfilms waardoor deze specifiek worden voor melkzuurbacteriën, en de groei van ongewenste bacteriën, gisten en schimmels tegelijkertijd wordt geremd.

Volgens de uitvinding worden normaal droge, transporteerbare, direct-klaar bacteriële cultuurmediumfilms voor selectieve groei van melkzuurbacteriën onder anaerobe omstandigheden geschikt gemaakt met een op water gebaseerd verdunningsmiddel of gebaseerde verdunningsoplossing die een Gramnegatieve inhibitor bevat, in combinatie met een wateroplosbaar antifungisch middel en een wateroplosbaar nitrietzout. Het nitrietzout is bij voorkeur natriumnitriet. De pH van de oplossing bedraagt ongeveer 6,5-7,5 en is bij voorkeur neutraal. Wanneer de oplossing als verdunningsmiddel of drager voor bacterieel enten wordt toegevoegd aan het standaardmethodecultuurmedium waarmee de dragerfilm is bekleed, wordt dit specifiek voor

Lactobacillaceae.

De achtergrond van de volgens de uitvinding ontwikkelde verdunningsoplossing is de volgende. Droge cultuurmediumfilms met een standaardmethodecultuurmedium op de dragerfilm onderhouden de bacteriële groei wanneer een waterig monster is toegevoegd. Volgens de uitvinding is gevonden dat wanneer voor het enten van het waterig monster op de cultuurmediumfilm gebruik wordt gemaakt van een speciale oplossing zoals hieronder nader omschreven, dan en alleen dan de cultuurmediumfilm specifiek wordt voor Lactobacillaceae. Daarmee kan een normaal droge, standaardmethodecultuurmediumfilm toch worden gebruikt voor monstername buiten, transport en onderzoek van Lactobacillaceae microorganismen.

Voorbeelden van melkzuurbacteriën die op de met de verdunningsoplossing volgens de uitvinding selectief gemaakte standaardmethodecultuurmediumfilms gekweekt kunnen worden, zijn Streptococci, Pediococci, Lactobacilli en Leuconostocs.

Het verdunningsmiddel volgens de uitvinding is een driecomponenten systeem dat op water is gebaseerd. De oplossing bevat in combinatie een Gramnegatieve inhibitor, een antifungisch middel of fungicide, en een wateroplosbaar nitrietzout. De pH van de oplossing bedraagt ongeveer 6,5-7,5 en is bij voorkeur neutraal. Wanneer aan deze voorwaarden is voldaan wordt bij opbrengen van de verdunningsoplossing op een standaardmethode cultuurmediumfilm deze specifiek voor Lactobacillaceae.

De Gramnegatieve inhibitor kan een Polymixine antibioticum zijn. De concentratie in de verdunningsoplossing bedraagt 24-40 U/ml. Een voorkeursinhibitor is Polymixine B sulfaat dat in een concentratie van 24 U/ml kan worden toegepast.

De concentratie wateroplosbaar fungistatisch middel in de verdunningsoplossing bedraagt ongeveer 10-250 en bij voorkeur ongeveer 10-20 µg/ml. Een voorkeurs-

fungicide is cycloheximide. Andere geschikte fungiciden zijn kaliumsorbaat, gebutyleerd hydroxyanisool (BHA) en gebutyleerd hydroxytolueen (BHT).

5 De concentratie wateroplosbaar nitrietzout in de verdunningsoplossing of drageroplossing bedraagt ongeveer 600-1800 µg/ml. De aard van het wateroplosbare nitrietzout is niet kritisch maar de voorkeur gaat uit naar een nitrietzout van een metaal uit de groep I in het Periodiek Systeem, in het bijzonder natrium en kalium. 10 Kaliumnitraat heeft de meeste voorkeur. Gebleken is dat wanneer het nitrietzout binnen de boven aangegeven concentratiegrenzen wordt toegepast, de groei van andere microorganismen dan melkzuurbacteriën wordt geremd.

15 De pH van de drageroplossing of verdunningsoplossing moet ongeveer 6,5-7,5 bedragen, en bedraagt bij voorkeur ongeveer 6,5-7,0. Een neutrale verdunningsoplossing verdient bijzondere voorkeur. Gebleken is dat de pH van de verdunningsoplossing kritisch is om aan de cultuurmediumfilm specificiteit voor Lactobacillaceae te ver- 20 lenen en dat dit wordt bereikt met een pH van ongeveer 6,5-7,5, dus ongeveer neutraal. Dit hangt hiermee samen dat in de handel verkrijgbare films zoals de door de 3M Company in de handel gebrachte Petrifilm, een tetrazoliumkleurstof bevatten waardoor de gekweekte bacteriën rood worden zodat 25 zij makkelijker kunnen worden geteld. De tetrazoliumkleurstof wordt echter bij meer zure pH, bijvoorbeeld ongeveer 5,5, toxisch voor alle microorganismen. Vandaar dat de pH van de drageroplossing of verdunningsoplossing volgens de uitvinding ongeveer 6,5-7,5 moet bedragen.

30 Om de groei van alle andere microorganismen dan melkzuurbacteriën zo veel mogelijk te remmen, is het van belang dat de geënte cultuurmediumfilm onder anaerobe omstandigheden wordt geïncubeerd. De verdunningsoplossing is dus alleen onder anaerobe omstandigheden specifiek voor 35 Lactobacillaceae. Anaerobe omstandigheden kunnen op gebruikelijke wijzen worden ingesteld, bijvoorbeeld met Gas Pack

anaerobe generatoren van BBL Microbiology Systems of Cokeysville, Maryland.

Het voorgaande heeft betrekking op de toepassing van Polymixine antibiotica als Gramnegatieve inhibitoren.

Gevonden is dat 2-fenylethanol eveneens een geschikte Gramnegatieve inhibitor is waarmee in bepaalde gevallen zelfs betere resultaten worden bereikt.

De concentratie 2-fenylethanol in de verdunningsoplossing volgens de uitvinding bedraagt ongeveer 1-4 mg/ml. De concentratie fungicide bedraagt ongeveer 10-250 µg/ml en de concentratie wateroplosbaar nitriet-zout ongeveer 600-800 µg/ml. De pH bedraagt ongeveer 6,5-7,5 en bij voorkeur ongeveer 6,5-7,0.

De toepassing van de drageroplossing of verdunningsoplossing op droge cultuurmediumfilms vereist geen speciale techniek. De film wordt op een plat oppervlak gelegd en de transparante toplaag wordt opgelicht om een 1 ml monster verdunningsoplossing van microorganisme op de dragerfilm te kunnen opbrengen. Hierna wordt de toplaag weer voorzichtig op de dragerfilm gelegd. Op de toplaag wordt dan een lichte druk uitgeoefend, bijvoorbeeld met een drukorgaan uit kunststof, om de oplossing over het medium op de dragerfilm uit te spreiden. Hierna wordt de film ongeveer 1 minuut met rust gelaten om te kunnen geleren.

Vervolgens wordt de film horizontaal en met de heldere toplaag naar boven tot ongeveer 48 uren geïncubeerd bij 32°C. De tetrazoliumindicatorkleurstof op de dragerfilm wordt door de microorganismen gereduceerd waardoor de kolonies als rode puntjes op de film verschijnen zodat zij gemakkelijk kunnen worden geteld.

Voorbeelden

De in alle voorbeelden gebruikte droge cultuurmediumfilm was de Petrifilm van de 3M Company. Deze bestaat uit een direct-klaar bacterieel cultuurmedium aan-

gebracht op een dragerfilm en bedekt met een polyethyleen-
film. Het cultuurmedium bestaat uit standaardmethodevoedings-
stoffen en bevat verder een in koud water oplosbaar gele-
ringsmiddel. De eveneens met een geleringsmiddel beklede
5 top laag bevat verder 2,3,5-trifenyltetrazoliumchloride-
indicatorkleurstof om het tellen van de kolonies te ver-
gemakkelijken. Op de dragerfilm is een rooster met hok-
jes van 1 x 1 cm afgetekend om het tellen nog meer te
vergemakkelijken. Het totale oppervlak van de Petrifilm
10 bedraagt 20 cm².

De gevolgde procedure bestond uit het
bereiden van voorraadoplossingen-verdunningsmiddel,
enten van de Petrifilms, 48 uren incuberen bij 32°C onder
anaerobe omstandigheden, en tellen van de opgekomen
15 kolonies (aantal per ml). Als testcultuur werd een
grondmonster uit een kas gebruikt en ter vergelijking
een met S/80 aangeduid monster van een Lactobacillus
cultuur. Het grondmonster bevatte behalve Lactobacillus
een groot aantal andere microorganismen.

20 Verschillende voorraadverdunningsoplos-
singen werden bereid met de volgende concentraties na-
triumnitriet: 1, 6, 12 en 18 gew./vol.%, en met de
volgende concentraties cycloheximide: 0,1, 0,5, 1 en
2,5 gew./vol.%. De Gramnegatieve inhibitor was
25 Polymixine B dat in de eerste zeven voorbeelden steeds
in een concentratie van 0,03 gew./vol.% werd gebruikt
om de invloed van de variaties in concentratie natrium-
nitriet en cycloheximide te onderzoeken.

De voorraadoplossingen werden door fil-
30 treren gesteriliseerd en de uiteindelijke verdunnings-
oplossing werd bereid door aan 97 ml gesteriliseerd
gedestilleerd water 1 ml per 100 ml water van elk van
de drie componenten in de aangegeven concentraties toe
te voegen. Tenslotte werden de steriele mengsels overge-
35 bracht in testbuizen in een hoeveelheid van 9 ml/buis.

De samenstelling van de mengsels was als volgt:

<u>Mengsel</u>	<u>Samenstelling</u>	
vergelijking	Butterfield's* buffer met 0,1 % Tween 80	
mengsel 1	100 µg/ml 10 µg/ml 24 U/ml	nitriet cycloheximide Polymixine B
mengsel 2	600 µg/ml 10 µg/ml 24 U/ml	nitriet cycloheximide Polymixine B
mengsel 3	1200 µg/ml 10 µg/ml 24 U/ml	nitriet cycloheximide Polymixine B
mengsel 4	1800 µg/ml 10 µg/ml 24 U/ml	nitriet cycloheximide Polymixine B
mengsel 5	600 µg/ml 50 µg/ml 24 U/ml	nitriet cycloheximide Polymixine B
mengsel 6	600 µg/ml 100 µg/ml 24 U/ml	nitriet cycloheximide Polymixine B
mengsel 7	600 µg/ml 250 µg/ml 24 U/ml	nitriet cycloheximide Polymixine B

* Butterfield's buffer is een gebruikelijke kaliumfosfaat-buffer in de voedingsmicrobiologie.

Van de S/80 vergelijkingscultuur, die een nacht was gekweekt, werd 1 ml volgens de reeks-methode verdund met de testoplossing en van de verdunningen werd 1 ml op de Petrifilm opgebracht. Het grondmonster werd in een hoeveelheid van 11 g eerst verdund in 100 ml

Butterfield's-buffer en daarna volgens de reeksmethode verdund met de testoplossing.

Van de vergelijkingscultuur S/80 werden 1,0 ml 10^{-6} , 10^{-7} en 10^{-8} verdunningen op de Petrifilm opgebracht; en van het grondmonster 1,0 ml 10^{-4} , 10^{-5} en 10^{-6} verdunningen. De geënte Petrifilms werden 48 uren geïncubeerd bij 32°C onder anaerobe omstandigheden in flessen met Gas Pack ontwikkelaars (BBL). Na afloop werd het aantal opgekomen kolonies geteld. De resultaten zijn in onderstaande tabel A vermeld.

10

Tabel A

	<u>Mengsel</u>	<u>Aantal kolonies/ml</u>
	grond- monster	vergelijking
		5 x 10 ⁷
	1	3,3 x 10 ⁶
	2	2,3 x 10 ⁷
15	3	5 x 10 ⁴
	4	0 x 10 ⁴
	5	7,0 x 10 ⁶
	6	7,1 x 10 ⁷
	7	4,0 x 10 ⁷
20	S/80	vergelijking
		2,4 x 10 ⁹
	1	7,5 x 10 ⁸
	2	1,3 x 10 ⁹
	3	1,3 x 10 ⁹
25	4	1,3 x 10 ⁹
	5	9,6 x 10 ⁸
	6	1,2 x 10 ⁹
	7	1,0 x 10 ⁹

30

Uit de resultaten blijkt dat de remmende invloed van het verdunningsmiddel op grondmicroorganismen aanmerkelijk toeneemt bij stijgende nitrietconcentraties van 600 tot 1200 µg/ml. Op S/80 had de variatie in nitrietconcentratie tussen 100 en 1800 µg/ml noch de

35

variatie in cycloheximideconcentratie tussen 10 en 250 µg/ml praktisch geen invloed. Verder blijkt dat door be-

handelen met de verdunningsoplossing de cultuurmedium-film specifiek voor de groei van Lactobacillus is geworden.

5 Uit soortgelijke proeven met verschillende concentraties Polymixine B bleek dat de S/80 cultuur niet werd beïnvloed bij concentraties van 24-40 U/ml. Voor de grondcultuur nam de remmende invloed van Polymixine B af bij concentraties lager dan 24 U/ml.

Voorbeelden met 2-fenylethanol als Gram-negatieve inhibitor.

10 Verdunningsoplossingen werden bereid met vloeibaar 2-fenylethanol van Sigma Scientific (1 ml = 1,02 g) in de in onderstaande tabel B aangegeven concentraties. Daartoe werd 2-fenylethanol aan een bepaald volume gedestilleerd water toegevoegd en geautoclaveerd.

15 Een door filtreren gesteriliseerde 6 gew./vol.-%-ige natriumnitrietoplossing en 0,1 gew./vol.-%-ige cycloheximide-oplossing werden toegevoegd in een hoeveelheid van 1 ml per 100 ml bereide verdunning.

Tabel B

	<u>Mengsel</u>	<u>Samenstelling</u>	
	8	600 µg/ml 10 µg/ml 0,05 gew/vol.-%	nitriet cycloheximide 2-fenylethanol
25	9	600 µg/ml 10 µg/ml 0,10 gew/vol.-%	nitriet cycloheximide 2-fenylethanol
	10	600 µg/ml 10 µg/ml 0,20 gew/vol.-%	nitriet cycloheximide 2-fenylethanol
30	11	600 µg/ml 10 µg/ml 0,4 gew/vol.-%	nitriet cycloheximide 2-fenylethanol

35 Een 's-nachts gekweekte S/80 cultuur werd volgens de reeksmethode met de verschillende mengsels verdund en 1,0 ml 10^{-7} en 1 ml 10^{-8} verdunningen werden op de Petrifilm opgebracht. Het grondmonster werd eerst 1:10 verdund in 99 ml gemodificeerde Butterfield's buffer en

daarna volgens de reeksmethode verdund. 1 ml 10^{-4} ,
 1 ml 10^{-5} en 1 ml 10^{-6} verdunningen werden op de Petri-
 film opgebracht. De films werden 48 uren bij 32°C ge-
 incubeerd onder anaerobe omstandigheden in flessen met
 5 BBL Gas Pack. Na afloop werd het aantal opgekomen kolonies
 geteld. De resultaten zijn vermeld in onderstaande tabel C.

Tabel C

	<u>Mengsel- samenstelling</u>	<u>Aantal kolonies/ml</u>
10	grond- monster	$6,2 \times 10^5$
	8	
	9	5×10^3
	10	0×10^3
	11	0×10^3
	S/80	$9,4 \times 10^8$
	11	

15 Uit de resultaten in tabel C blijkt dat
 fenylethanol de groei van bodemmicroorganismen doeltreffend
 remt.

Om de groeiremmende werking van fenyl-
 ethanol in verschillende concentraties te onderzoeken wer-
 20 den de in onderstaande tabel D aangegeven mengsels bereid.

Tabel D

	<u>Samenstelling</u>		
	<u>Mengsel</u>	<u>natrium- nitriet, concentratie, µg/ml)</u>	<u>cycloheximide concentratie, µg/ml</u>
			<u>2-fenylethanol, concentratie</u>
			<u>gew./vol.%</u>
25	Vergelijking	(Butterfield's buffer)	
30	12	800	10
	13	800	10
	14	600	10
	15	600	10
	16*	800	10
35	17*	600	10

* bevat Polymixine B in een concentratie van 24 U/ml.

Van de S/80 cultuur werden 1 ml 10^{-7} en 1 ml 10^{-8} verdunningen op de Petrifilm opgebracht. De grondcultuur werd eerst 1:10 verdund in 99 ml gemodificeerde Butterfield's buffer waarna 1 ml 10^{-3} en 1 ml 10^{-6} verdunningen werden opgebracht. De Petrifilms werden 48 uren bij 32°C geïncubeerd onder anaerobe omstandigheden in flessen met BBL Gas Pack. Na afloop werd het aantal opgekomen kolonies geteld. De resultaten zijn in onderstaande tabel E vermeld.

	<u>Mengsel</u>	<u>Tabel E</u>	<u>Aantal kolonies/ml</u>
		Vergelijking	$9,8 \times 10^8$
	S/80	12	$8,7 \times 10^8$
		13	$8,5 \times 10^8$
		14	$8,7 \times 10^8$
		15	$1,0 \times 10^9$
		16	$7,4 \times 10^8$
		17	$1,1 \times 10^9$
		Vergelijking	$2,7 \times 10^7$
	Grondmonster	12	$1,8 \times 10^4$
		13	$3,0 \times 10^2$
		14	$3,4 \times 10^6$
		15	$3,3 \times 10^4$
		16	$4,2 \times 10^4$
		17	$9,0 \times 10^4$

Uit de resultaten in tabel E blijkt dat de oplossing van mengsel 13 de groei van ongewenste microorganismen in het grondmonster het meest remt zonder die van de S/80 cultuur ongunstig te beïnvloeden.

Met de bovenstaande voorbeelden is aangetoond dat door behandelen met de verdunningsoplossingen volgens de uitvinding droge standaardmethodecultuurmediumfilms selectief voor de groei van melkzuurbacteriën kunnen worden gemaakt.

C o n c l u s i e s

1. Verdunningsoplossing om aan droge, transporteerbare, direct-klaar bacteriële cultuurmedium-
5 films selectiviteit voor de groei van melkzuurbacteriën onder anaerobe omstandigheden te verlenen, met het kenmerk, dat de verdunningsoplossing ongeveer 1,0-4,0 mg/ml 2-fenylethanol, ongeveer 10-250 µg/ml wateroplosbaar anti-
10 fungisch middel, en ongeveer 600-800 µg/ml wateroplosbaar nitrietzout bevat, en een pH van ongeveer 6,5-7,5 bezit.
2. Verdunningsoplossing volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het antifungisch middel cycloheximide, kaliumsorbaat, gebutyleerd hydroxytolueen of gebutyleerd hydroxyanisool is.
- 15 3. Verdunningsoplossing volgens conclusie 2, met het kenmerk, dat het antifungisch middel cycloheximide is.
4. Verdunningsoplossing volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat de pH van de oplossing ongeveer 6,5-
20 7,0 bedraagt.
5. Verdunningsoplossing volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het nitriet een nitriet van een metaal uit de groep 1 uit het Periodiek Systeem is.
6. Verdunningsoplossing volgens conclusie 5, met het kenmerk, dat het nitriet natriumnitriet is.
- 25 7. Droge, transporteerbare, direct-klaar bacteriële cultuurmediumfilm, met het kenmerk, dat de film is gecombineerd met een verdunningsoplossing om daaraan selectiviteit voor de groei van melkzuurbacteriën onder
30 anaerobe omstandigheden te verlenen.
8. Combinatie volgens conclusie 7 waarin de droge, transporteerbare, direct-klaar bacteriële cultuur-
mediumfilm bestaat uit een bacterieel cultuurmedium aan-
gebracht op een dragerfilm en bedekt met een transparante
35 film, welke dragerfilm standaardmethodevoedingsstoffen en een in koud water oplosbaar geleringsmiddel draagt, en

welke deklaag is bekleed met een geleringsmiddel en een 2,3,5-trifenyltetrazoliumchloride-kleurstofindicator om het tellen van opgekomen kolonies te vergemakkelijken.

5 9. Combinatie volgens conclusie 7, met het kenmerk, dat de verdunningsoplossing een waterige oplossing is van ongeveer 24-40 U/ml Polymixine antibioticum, ongeveer 10-250 µg/ml wateroplosbaar antifungisch middel, en ongeveer 600-1800 µg/ml nitrietzout, en een pH van ongeveer 6,5-7,0 bezit.

10 10. Combinatie volgens conclusie 7, met het kenmerk, dat de verdunningsoplossing een oplossing is van ongeveer 1,0-4,0 mg/ml 2-fenylethanol, ongeveer 10-250 µg/ml cycloheximide en ongeveer 600-800 µg/ml natriumnitriet.

15 11. Werkwijze voor het anaeroob kweken van melkzuurbacteriën op een droge, transporteerbare, direct-klaar bacteriële cultuurmediumfilm, met het kenmerk, dat op de film een monster van het microorganisme wordt opgebracht samen met een doeltreffende hoeveelheid van een waterige verdunningsoplossing van ongeveer 24-40 U/ml
20 Gramnegatieve inhibitor, ongeveer 10-250 µg/ml wateroplosbaar antifungisch middel en ongeveer 600-1800 µg/ml wateroplosbaar nitrietzout, en met een pH van ongeveer 6,5-7,5, waarna de film onder anaerobe omstandigheden wordt geïncubeerd.

25 12. Oplossingen, mengsels, preparaten en werkwijzen zoals beschreven in de beschrijving en voorbeelden.