

M 17-Agar-Basis

Art.-Nr. CM 785

Zur verbesserten Anzucht von Milchstreptokokken, Bakteriophagen-infizierten Milchstreptokokken und zur selektiven Koloniezahlbestimmung von *Streptococcus thermophilus* aus Joghurt.

Der Nährboden entspricht der International Dairy Federation¹ und der ISO/DIS 7889².

Typische Zusammensetzung	(g/l)
Caseinpepton	5,0
Sojamehlpepton	5,0
Fleischextrakt "Lab Lemco"	5,0
Hefeextrakt	2,5
Ascorbinsäure	0,5
Magnesiumsulfat	0,25
Dinatrium-β-Glycerophosphat	19,0
Agar	11,0
pH 6,9 ± 0,2	

Zubereitung

48,25 g M 17-Agar-Basis in 950 ml Aqua dest. suspendieren und bis zum vollständigen Lösen erhitzen. 15 Minuten bei 121°C autoklavieren. Auf 50°C abkühlen und aseptisch 50 ml sterile, 10%ige (w/v) Lactose-Lösung zusetzen.

Lactose-Lösung (10%, w/v)

10 g Lactose (OXOID, Art.-Nr. LP 70) in 100 ml Aqua dest. lösen. 15 Minuten bei 121°C autoklavieren oder durch Membranfiltration (Porengröße 0,2 µm) sterilisieren.

Beschreibung

M 17-Agar basiert auf der Zusammensetzung nach Terzaghi und Sandine³ und wird als verbesserter Nährboden zur Anzucht und Koloniezahlbestimmung von Milchstreptokokken und Bakteriophagen-infizierten Milchstreptokokken empfohlen.

Da M 17-Agar das Wachstum der Wirtsbakterien besser unterstützt, ist eine Darstellung solcher Phänomene möglich, wie sie normalerweise bei anderen Bakteriophagen vorkommen, aber bisher nicht für die Phagen von Milchstreptokokken beschrieben wurden. Der Nährboden ermöglicht detaillierte Studien zur Morphologie der Bakteriophagenplaques und deren Lysogenie.

Milchstreptokokken benötigen wegen ihrer hohen Nährstoffansprüche ein breites Spektrum an Substraten für ihr optimales Wachstum^{4,5}. Aufgrund der homofermentativen Säurebildung muß der Nährboden gut gepuffert sein, um während des Wachstums der Kultur einen pH-Wert von 5,7 aufrechtzuerhalten. Ein Absinken des pH-Wertes kann zu Zellschädigungen führen und den Streptokokken-Nachweis erschweren. M17-Agar enthält Dinatrium-β-Glycerophosphat, das eine ausreichende Pufferkapazität besitzt, um bei säurebildenden Kulturen einen pH-Wert

von 5,7 über 24 Stunden Bebrütung bei 30°C aufrechtzuerhalten. Diese Puffersubstanz ermöglicht die Zugabe von Calcium, ohne daß sich Präzipitationen bilden. Der Calcium-Zusatz ist für den Nachweis der Bakteriophagen von Milchstreptokokken notwendig⁴.

Nach Shankar und Davis⁶ ist der M 17-Agar zur Isolierung und Koloniezahlbestimmung von *Streptococcus thermophilus* aus Joghurt geeignet, da die hohe Konzentration an Dinatrium-β-Glycerophosphat *Lactobacillus bulgaricus* unterdrückt. Die International Dairy Federation¹ und die ISO² empfehlen M 17-Agar zur selektiven Koloniezahlbestimmung von *Streptococcus thermophilus* aus Joghurt. M 17-Agar ist außerdem zur Züchtung und Stammhaltung von Starterkulturen bei der Käse- und Joghurtherstellung geeignet, da er deren Fähigkeit zur späteren Säurebildung in Milch weder bei 30°C noch bei 22°C negativ beeinflusst³.

Mit Hilfe des M 17-Agars können weiterhin Streptokokken-Mutanten isoliert werden, die keine Lactose verwenden. Diese mutierten Lactose-negativen Stämme bilden sehr viel kleinere Kolonien als der ursprüngliche Lactose-positive Stamm.

Kulturverfahren

Bakteriophagen-Nachweis

Ausführliche Beschreibungen zur Methodik des Phagenachweises wurden von Terzaghi und Sandine³ veröffentlicht.

Koloniezahlbestimmung von *Streptococcus thermophilus* aus Joghurt

1. Joghurt homogenisieren.
2. 10 ± 0,1 g Untersuchungsmaterial in einen Zentrifugenbecher aus gehärtetem Glas mit Rundboden (200 ml Fassungsvermögen) oder in einen Becher für einen mechanischen Mixer geben.
3. 0,1%ige (w/v) Pepton-Lösung (s.u.) zufügen, bis das Gewicht des Untersuchungsmaterials und der Verdünnungslösung 50 g beträgt und gründlich mischen.
4. Von der Joghurtsuspension eine geeignete dezimale Verdünnungsreihe in jeweils 9 ml steriler, 1%iger (w/v) Pepton-Lösung (s.u.) herstellen.
5. a) Jeweils zwei Platten M 17-Agar mit jeder Verdünnungsstufe so beimpfen, daß Einzelkolonien entstehen können.
b) Von jeder Verdünnungsstufe zwei Gußplatten herstellen. Dazu jeweils 1 ml Verdünnung in eine sterile Petrischale geben und 14 ml sterilen, auf 43°C abgekühlten M 17-Agar zufügen. Vorsichtig durch Schwenken mischen und erhärten lassen.
6. Alle Platten 48 Stunden bei 36°C bebrüten.
7. Platten nach 24 und 48 Stunden Bebrütung begutachten. Kolonien von *Streptococcus thermophilus* sind nach 18-24 Stunden Bebrütung sichtbar und weisen nach 48 Stunden Bebrütung 1-2 mm Durchmesser auf. Falls *Lactobacillus bulgaricus* wächst, bildet er nur winzige Kolonien.
8. Kolonien auf den Gußplatten auszählen und als Anzahl KBE je g Probe ausdrücken.

Zubereitung der 0,1%igen Pepton-Lösung²

0,5 g Caseinpepton (OXOID, Art.-Nr. LP 42) und 0,5 g Fleischpepton P (OXOID, Art.-Nr. LP 49) in 1 l Aqua dest. lösen und 15 Minuten bei 121°C autoklavieren.

Bestätigung der Kolonien

Mittels Gramfärbung und Katalase-Test können die aus Milchprodukten isolierten, verdächtigen Kolonien endgültig als *Streptococcus thermophilus* (grampositiv, Katalase-negativ) bestätigt werden.

Lagerung und Haltbarkeit

Trockennährboden und Lactose:
Fest verschlossen, lichtgeschützt, 10-25°C.
Haltbarkeit: siehe Etikett.

Qualitätskontrolle

Positivkontrolle

Streptococcus thermophilus ATCC 14486

Negativkontrolle

Lactobacillus bulgaricus ATCC 11842

Literatur

1. International Dairy Federation (1981) Joint IDF/ISO/AOAC Group E 44.
2. ISO/DIS 7889 „Joghurt - Zählung von charakteristischen Mikroorganismen - Koloniezählverfahren bei 37 °C“.
3. Terzaghi, B.E. und Sandine, W.E. (1975) Appl. Microbiol. 29, 807-813.
4. Anderson, A.W. und Elliker, P.R. (1953) J. Dairy Science 36, 161-167.
5. Reiter, B. und Oram, J.D. (1962) J. Dairy Res. 29, 63-77.
6. Shankar, P.A. und Davies, F.L. (1977) J. Soc. Dairy Technology 30, 28-30.

Lactose-Lösung (10%, w/v)

10 g Lactose (OXOID, Art.-Nr. LP 70) in 100 ml Aqua dest. lösen. 15 Minuten bei 121°C autoklavieren oder durch Membranfiltration (Porengröße 0,2 µm) sterilisieren.

Beschreibung

M 17-Bouillon-Basis wird parallel zur M 17-Agar-Basis angeboten. Ihre Verwendung in Verbindung mit dem M 17-Agar beim Bakteriophagennachweis wird von Terzaghi und Sandine³ beschrieben.

Diese Autoren schlagen M 17-Bouillon ebenfalls zur Stammhaltung von Starterkulturen vor, da M 17-Bouillon eine hohe Pufferkapazität aufweist und die Fähigkeit zur späteren Säurebildung in Milch nicht negativ beeinflusst.

Lagerung und Haltbarkeit

Trockennährboden und Lactose:
Fest verschlossen, lichtgeschützt, 10-25°C.
Haltbarkeit: siehe Etikett.

Qualitätskontrolle

Positivkontrolle

Streptococcus thermophilus ATCC 14485

Negativkontrolle

Lactobacillus bulgaricus ATCC 11842

Literatur

1. International Dairy Federation (1981) Joint IDF/ISO/AOAC Group E 44.
2. ISO/DIS 7889 7889 „Joghurt - Zählung von charakteristischen Mikroorganismen - Koloniezählverfahren bei 37 °C.“
3. Terzaghi, B.E. und Sandine, W.E. (1975) Appl. Microbiol. 29, 807-813.