

Mikrobiologie der Brotteigherstellung. Teil I, Methoden zur Erfassung und Identifizierung von Milchsäurebakterien in Brotteigen = Microbiology of dough preparation. Part I, Methods for the detection and identification of lactic acid bacteria in dough

Autor(en): Hochstrasser, R.E. / Ehret, A. / Geiges, O.

Objektyp: Article

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und
Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **84 (1993)**

Heft 3

PDF erstellt am: **30.06.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982140>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Mikrobiologie der Brotteigherstellung

I. Methoden zur Erfassung und Identifizierung von Milchsäurebakterien in Brotteigen

Microbiology of Dough Preparation

I. Methods for the Detection and Identification of Lactic Acid Bacteria in Dough

R.E. Hochstrasser¹, A. Ehret², O. Geiges³ und W. Schmidt-Lorenz⁴

Einleitung

Zu den Milchsäurebakterien werden in der Regel alle *Lactobacillus*-, *Streptococcus*-, *Pediococcus*- und *Leuconostoc*-Arten gerechnet (13). Sie sind grampositiv, unbeweglich, ohne Sporenbildung, teils aerob, teils anaerob, meist aber mikroaerophil und auf glucosehaltigen Medien katalasenegativ. Zum optimalen Wachstum sind nährstoffreiche Medien mit komplexen organischen Stickstoffverbindungen, Wachstumsfaktoren, bestimmten anorganischen Ionen und vergärbaren Kohlenhydraten notwendig. Anfänglich wurde dies erreicht durch Zugabe von Peptonmolke (23), Molkenautolysat (8) oder Tomatensaft (2–4). Die Herstellung dieser Medien ist relativ umständlich und oft nicht ausreichend reproduzierbar. Daher wurden synthetische Medien wie APT-Agar (6) und M.R.S.-Agar (5) entwickelt. Für die kulturelle Erfassung von Milchsäurebakterien aus Sauerteigen wurde von Spicher und Schroeder (18) Sorbinsäure-Agar sowie modifizierter M.R.S.-Agar verwendet und später ein Roggenkleie-Agar entwickelt (19). In einer weiteren Veröffentlichung wird angeführt, dass für eine länger andauernde Kultur von *Lactobacillus brevis lindneri* als arttypischem Vertreter der Sauerteigbakterien der Zusatz von Maischeextrakt wichtig ist (17).

Einerseits stellen Milchsäurebakterien hohe Nährstoffansprüche, andererseits ist es wünschenswert, allfällig andere in Teigen vorkommende Mikroorganismen durch geeignete Hemmstoffe zu unterdrücken. Hierzu wird häufig Thalliumacetat und/oder Sorbinsäure zugesetzt oder durch Herabsetzung des pH-Wertes die hohe Säuretoleranz der Lactobazillen ausgenützt. Von Rose (15) wird stattdessen der

¹ Obi AG, 9220 Bischofzell, ² Agrano AG, 4123 Allschwil, ³ Ingenieurschule, 8820 Wädenswil, ⁴ ETH-Zentrum, 8092 Zürich

Zusatz verschiedener Antibiotika zur Hemmung von Hefen und unerwünschten Bakterien empfohlen.

Immer wieder neue Befunde der Taxonomie und die damit verbundenen Umbenennungen und Neugruppierungen, insbesondere bei den *Lactobacillus*-Arten, erschweren eine eindeutige Identifikation. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn eine Zuordnung mit technisch und zeitlich vertretbarem Aufwand aufgrund von mit klassischen Methoden erhaltenen Resultaten erfolgen soll. Daher sind von *Kandler* und *Weiss* (11) mit Ausnahme der G+C-Gehalte der DNS nur die nach den klassischen Methoden bestimmbaren, hauptsächlich biochemischen Merkmale aufgeführt. Aufwendigere Methoden wie DNS-DNS-Hybridisierung, die Bestimmung der elektrophoretischen Beweglichkeit der Lactatdehydrogenase (LDH) und der allosterischen Regulierbarkeit der LDH sind für praxisorientierte Untersuchungen weniger geeignet (9).

Zur Identifizierung von *Lactobacillus*-, *Leuconostoc*-, *Pediococcus*- und *Streptococcus*-Arten eignen sich einfach zu bestimmende Merkmale wie Morphologie, Gasbildung, Art der Milchsäurebildung und die Verwertung einzelner Zucker und Zuckeralkohole (10, 12).

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war einerseits die vergleichende Prüfung der Eignung zahlreicher Kulturmedien zur möglichst vollständigen kulturellen Erfassung der vorhandenen Milchsäurebakterien in Brotteigen unter gleichzeitiger Hemmung der Begleitflora und andererseits die Erarbeitung eines geeigneten Verfahrens zur vereinfachten Bestimmung der Zuckervergärungsspektren von Milchsäurebakterien-Isolaten.

Material und Methoden

Herkunft und Aufbewahrung der geprüften Stämme

Species	Herkunft
<i>Lactobacillus brevis</i> 1	Stammsammlung Universität Bordeaux
<i>Lactobacillus brevis</i> 2	Stammsammlung Jowa Volketswil
<i>Lactobacillus brevis</i> 3	Isolat aus Teig Bäckerei J
<i>Lactobacillus brevis</i> 4	DSM 20054 (Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen)
<i>Lactobacillus buchneri</i> 1	Stammsammlung Jowa Volketswil
<i>Lactobacillus casei</i> 1	Stammsammlung Universität Bordeaux
<i>Lactobacillus casei</i> 2	Stammsammlung Jowa Volketswil
<i>Lactobacillus casei</i> 3	Isolat aus Teig Bäckerei A
<i>Lactobacillus casei</i> 4	DSM 20008

Lactobacillus farciminis 1	Stammsammlung Jowa Volketswil
Lactobacillus farciminis 2	DSM 20184
Lactobacillus fermentum 1	DSM 20052
Lactobacillus fructivorans 1	DSM 20205
Lactobacillus hilgardii 1	Stammsammlung Universität Bordeaux
Lactobacillus homohiochii 1	Isolat aus Teig Bäckerei J
Lactobacillus plantarum 1	Stammsammlung Universität Bordeaux
Lactobacillus plantarum 2	Stammsammlung Universität Bordeaux
Lactobacillus plantarum 3	Isolat aus Teig Bäckerei A
Lactobacillus plantarum 4	Isolat aus Starterkultur G
Lactobacillus plantarum 5	Isolat aus Teig Bäckerei J
Lactobacillus plantarum 6	DSM 20179
Lactobacillus species	Isolat aus Blätterteig
Leuconostoc mesenteroides 1	Isolat aus Teig Bäckerei B
Leuconostoc mesenteroides 2	Isolat aus Teig Bäckerei J
Pediococcus pentosaceus 1	Isolat aus Teig Bäckerei J
Escherichia coli	Stammsammlung Labor f. LM-Mikrobiologie
Staphylococcus aureus	Stammsammlung Labor f. LM-Mikrobiologie
Gluconobacter spez.	Stammsammlung Labor f. LM-Mikrobiologie
Saccaromyces cerevisiae	Stammsammlung Labor f. LM-Mikrobiologie der ETH Zürich

Aufbewahrung der Stämme

Die Isolate wurden in Röhrchen mit Schraubverschluss auf M.R.S.-Schrägagar (*E. coli* und *S. aureus* auf Brain Heart Infusion Agar) bei 4 °C aufbewahrt und alle 3 Monate nach einer Zwischenkultur in M.R.S.-Bouillon bzw. Brain Heart Infusion Bouillon auf frisches Medium überimpft.

Kulturmedien

- Plate Count-Agar (BBL 11638)
- Brain Heart Infusion (Difco 037-01-6) (BHI)
- Brain Heart Infusion-Agar (Difco 0418-01-5)
- APT-Agar (Merck 10453)
- Rogosa-Agar (Merck 5413) pH-Wert mit Essigsäure auf 5,5 eingestellt
- Elliker-Agar (Elliker Broth Difco 000974-01-1) mit 12 g Agar l⁻¹
- Tomato Juice-Agar (Difco 0031-01)

- L-S Differential-Medium (Oxoid CM 495)
- Sorbinsäure-Agar (Merck 10451) 0,4 g Sorbinsäure l⁻¹, pH-Wert mit Essigsäure auf 5,0 eingestellt
- M.R.S.-Bouillon (M.R.S.-Broth Oxoid CM 359)
- M.R.S.-Agar (M.R.S.-Broth Oxoid CM 359) mit 12 g Agar l⁻¹
- M.R.S.-Agar modifiziert (M.R.S.-Broth Oxoid CM 359) mit 12 g Agar l⁻¹
Zusätze nach dem Autoklavieren: Polymyxin-B-Sulfat (Sigma P-1004) 100 mg l⁻¹, Pimarizin 100% (Sigma P-8144) 40 mg l⁻¹
- Roggenkleie-Agar (19): Roggenkleieextrakt (A) 810 ml, S-Konzentrat (B) 90 ml, Glucose 18 g, Pepton 9 g, Fleischextrakt, 4,5 g, Hefeextrakt 4,5 g, Agar 12 g
 - A Roggenkleieextrakt: Roggenkleie 80 g, dest. Wasser 720 ml, Extraktion unter ständigem Rühren bei 50 °C während 24 Stunden, Abfiltrieren über Watte, Abnutschen über mit Celite 345 angeschwemmte Glasfilternutsche
 - B S-Konzentrat: Natriumacetat 5,0 g, Kaliumdihydrogenphosphat 0,5 g, di-Kaliumhydrogenphosphat 0,5 g, Magnesiumphosphat 7H₂O 0,2 g, Mangansulfat 4H₂O 0,01 g, Eisensulfat 7H₂O 0,01 g, di-Ammoniumhydrogencitrat 0,5 g, Tween 80 0,5 g, dest. Wasser 100 ml
 Herstellung des Agars: Lösung aller Bestandteile ohne S-Konzentrat im Roggenkleieextrakt im Dampftopf, Sterilisation bei 121 °C für 15 Minuten und Zugabe des sterilfiltrierten S-Konzentrates zum noch heißen Agar
- Roggenkleie Agar modifiziert: Grundmedium wie Roggenkleie, Agar Zusätze nach dem Autoklavieren: Polymyxin-B-Sulfat (Sigma P-1004) 100 mg l⁻¹, Pimarizin 100% (Sigma P-8144) 40 mg l⁻¹
- Modified Chalmer Medium (24): Lactose 20 g, Glucose 20 g, Sojapepton 3 g, Fleischextrakt 3 g, Hefeextrakt 3 g, Calciumcarbonat 20 g, Neutralrotlösung 1% 5 ml, Agar 15 g, dest. Wasser 1000 ml, End-pH 6
- Verdünnungslösung: Pepton 1 g, Natriumchlorid 8,5 g, dest. Wasser 1000 ml
- Medium für Zuckervergärung mit Mikrotiterplatten (MIK): Proteose Pepton 10 g, Yeast Nitrogen Base (Difco 039-15) 7,5 g, Tween 80 1 ml, Bromkresolpurpur 0,17 g, dest. Wasser 1000 ml, pH nach Autoklavieren 6,9 – 7,0, Zugabe von 100 ml der sterilfiltrierten 10%igen Zuckerlösungen nach dem Autoklavieren und Abkühlen: L-Arabinose (Fluka 10840), D-Arabinose (Fluka 10850), Amygdalin (Fluka 10050), Aesculin (Fluka 02350), Cellobiose (Fluka 22150), Fructose (Merck 2321), Galaktose (Fluka 48260), Glucose (Fluka 49159), Gluconsäure (Fluka 49110), Lactose (Fluka 61340), Maltose (Merck 5911), Mannit (Merck 5982), Mannose (Fluka 63580), Melezitose (Senn 1146), Melibiose (Senn 1147), Raffinose (Senn 1171), Rhamnose (Senn 1173), Ribose (Senn 1174), Salicin (Fluka 84150), Sorbit (Fluka 85530), Saccharose (Merck 6751), Trehalose (Senn 1180), Xylose (Senn 1200), Sorbose (Senn 1177), steriles flüssiges Paraffin (Merck 7160)
- Testsystem API 50 CHL: api International, Genf, Nr. 5041.

Vergleichende Bestimmung der Kolonie-Zahlen und -Größen auf unterschiedlichen Kulturmedien

- Anzüchten der Teststämme in M.R.S.-Bouillon bei 30 °C 24 h
- Ansatz von dezimalen Verdünnungsreihen in Verdünnungslösung
- Beimpfung der Milchsäurebakterien-, Plate count- und BHI-Agar-Medien im Oberflächenausstrichverfahren im Doppel aus den Verdünnungsstufen von 10^{-4} bis 10^{-7}
- Bebrütung: 30 °C, aerob und/oder anaerob (Anerocult A, Merck 13829) bis maximal 110 h
- Kontrolle alle 12 bis 24 h, Koloniezählung und Bestimmung der Koloniedurchmesser, sobald auf einem der geprüften Kulturmedien Koloniedurchmesser von grösser als 1 mm erreicht waren.
- Keine Berücksichtigung von pin point-Kolonien (pp)
- Berechnung der koloniebildenden Einheiten als gewogenes arithmetisches Mittel (x_{gew})

$$x_{\text{gew}} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n_1 w_1 + n_2 w_2 + \dots}$$

$\sum_{i=1}^n x_i$ Summe der Kolonienzahlen aller Platten

n_1 Anzahl Zähl-Platten der schwächsten Verdünnung

n_2 Anzahl Zähl-Platten der nächsthöheren Verdünnung

w_1 Gewicht der schwächsten Verdünnung

w_2 Gewicht der nächsthöheren Verdünnung

- Bestimmung der Koloniedurchmesser:
 - +++ Koloniedurchmesser > 1 mm
 - ++ Koloniedurchmesser 0,5 mm – 1 mm
 - + Koloniedurchmesser < 0,5 mm

$$\text{Durchschnittlicher Koloniedurchmesser} = \frac{\text{Summe der «+»-Punkte}}{\text{Summe der Messungen}}$$

Summe der «+»-Punkte: Addition aller «+»-Punkte der 11 eingesetzten *Lactobacillus*-Stämme für je ein geprüftes Kulturmedium.

Summe der Messungen: Anzahl der Messungen, die auf einem Kulturmedium mit den Teststämmen unter aeroben und teils auch anaeroben Bedingungen durchgeführt wurden.

Vergleichende Bestimmung der Koloniebildung von Hefen und Bakterien auf selektiven und nichtselektiven Milchsäurebakterien-Kulturmedien

- Anzüchten der Teststämme in M.R.S.-Bouillon oder BHI
- 3-Ösenausstrich auf modifiziertem und nicht modifiziertem M.R.S.-Agar, Roggenkleie-Agar und modifiziertem Chalmer-Agar-Medium
- Bebrütung: 30 °C, aerob
- Auswertung der Koloniegrößen nach 40 h und 110 h.

Prüfungen der Vermehrung bei 15 °C, 45 °C und 50 °C und auf Gasbildung

- Beimpfung von entsprechend vortemperierten M.R.S.-Bouillon-Röhrchen mit je 100 µl einer Stammkultur und Bebrütung bei 15 °C bis zu 7 Tagen, bei 45 °C und 50 °C bis zu 3 Tagen und Prüfung auf sichtbare Trübung.
- Zur Prüfung der Gasbildung aus Glucose Bebrütung von mit 100 µl einer Vorkultur beimpften M.R.S.-Bouillon-Röhrchen bei 30 °C während 2 Tagen. Positive Bewertung bei Bildung einer mindestens erbsengrossen Gasblase im Durham-Röhrchen.

Bestimmung der Milchsäurekonfiguration

- Bestimmung der L- und D-Milchsäure mit UV-Test-Combination (Boehringer Nr. 139 084) und D-Lactatdehydrogenase (Boehringer Nr. 106 941) in 100 µl des 1:25 verdünnten Überstandes nach Zentrifugation einer mindestens 48 bis 72 h alten (22), bei 30 °C in M.R.S.-Bouillon bebrüteten Kultur des zu testenden Stammes.

Prüfung auf Ammoniakbildung aus Arginin

- Nach Beimpfung von 10 ml des Arginin-Mediums in Schraubdeckel-Röhrchen mit 100 µl einer Vorkultur in M.R.S.-Bouillon, Bebrütung der geschlossenen Röhrchen bei 30 °C während 10 bis 14 Tagen.
- Prüfung auf Ammoniakbildung mit zwei bis drei Tropfen Nessler's Reagenz (Fluka 72190)
- Reaktion positiv bei Bildung eines orange bis gelben Niederschlages
- Medium zur Ammoniakbestimmung aus Arginin (14, 16): Pepton 5 g, Hefeextrakt 3 g, Glucose 3 g, Natriumacetat 10 g, Argininhydrochlorid 3 g, Tween 80 1 g, Di-Kaliumphosphat 2 g, Tri-Natriumcitrat 2 g, Magnesiumsulfat 0,2 g, Mangansulfat 0,05 g, pH 7,0–7,4, Sterilfiltration.

Nachweis der Bildung von meso-Diaminopimelinsäure (DAP) (2)

- Aufnahme des Zentrifugats von 10 ml einer 24-h-Vorkultur in M.R.S.-Bouillon bei 30 °C in 0,5 ml 4n HCl

- 12 h Hydrolyse bei 100 °C im Einschlussrohr
- Entfernung der HCl durch Abblasen mit Luft unter Erwärmung der Probe im Sandbad
- Aufnahme des Rückstandes in 50%igem Methanol und punktförmige Auftragung auf Chromatographiefolie (DC-Plastikfolie Cellulose ohne Fluoreszenzindikator, Merck 5577)
- Eindimensionale Auftrennung im Laufmittel Methanol : Pyridin : Wasser : 10 n Salzsäure im Verhältnis 32 : 4 : 7 : 1
- Nach 4 bis 6 h Laufzeit Trocknung des Chromatogramms und Besprühung mit Ninhydrinreagenz, Entwicklung bei 100 °C 20 Minuten
- Ninhydrinreagenz (21): Nynhydrin 0,2 g, Ethanol 100 ml.

Bestimmung des pH-Wertes nach Wachstum auf Glucose

- Messung des pH-Wertes mit Einstabelektrode in der bei 30 °C 48 h bebrüteten Kultur in M.R.S.-Bouillon.

Bestimmung des Zuckervergärungsspektrums mit Mikrotiterplatten-Testsystem (MIK)

- Vorbereitung der Mikrotiterplatten: Befüllung der Vertiefungen mit je 200 l Testmedium
- Vorbereitung des Inokulums: dreimalige Überimpfung der Teststämme in M.R.S.-Bouillon als 24stündige Zwischenkulturen; zweimalige Zentrifugation und Resuspension in 5 ml Verdünnungslösung der 3. Vorkultur
- Beimpfung: 20 µl Inokulum je Vertiefung und Überdeckung mit 100 µl sterilem flüssigem Paraffin
- Bebrütung: 30 °C, 48 h
- Auswertung: Farbumschlag nach gelb als positive Reaktion gewertet, zweifelhafte Reaktionen (+/-) nicht gewertet
- Blindwerte: Sterilitätskontrolle der Testmedien durch Bebrütung ohne Beimpfung
- Kontrolle auf Zuckerfreiheit der Testmedien durch Bebrütung nach der Beimpfung, aber ohne Zuckerzugabe zum Medium.

API-System

Durchführung nach den vom Hersteller angegebenen Vorschriften.

Resultate

Koloniezahlen und -größen auf unterschiedlichen Kulturmedien

Bei 10 der 12 geprüften Stämme lagen nach 24 h Kultur bei 30 °C in M.R.S.-Bouillon die Koloniezahlen nach Oberflächenkultur auf acht verschiedenen Milchsäurebakterien-Medien, soweit überhaupt eine Koloniebildung erfolgte, in weitgehend gleicher Größenordnung zwischen 10^8 und über 10^9 KBE ml^{-1} , im Mittel bei $3,2 \cdot 10^8$ KBE ml^{-1} .

- Von den drei geprüften Stämmen von *L. plantarum* zeigte nur einer normale Koloniebildung auch auf den beiden nichtselektiven Medien (Tabelle 1).
- *L. buchneri* hatte auf dem Elliker-Agar nur unter anaeroben Bedingungen Kolonien gebildet, *L. farciminis* dagegen weder aerob noch anaerob. Ausserdem wurden von *L. farciminis* auf dem L-S-Differential- und Tomato Juice-Agar ausschliesslich pin point-Kolonien gebildet. Auf dem Plate count-Agar zeigten

Tabelle 1. Vergleich der Koloniezahlen und -größen von drei Stämmen von *Lactobacillus plantarum* nach 42 bis 48 h aerober (anaerober) Bebrütung bei 30 °C auf 8 verschiedenen Milchsäurebakterien- und zwei nichtselektiven Agarmedien

Stamm	<i>L. plantarum</i> 1		<i>L. plantarum</i> 2		<i>L. plantarum</i> 3			
	42 aerob		48 aerob		44 aerob		44 anaerob	
	log KBE ml^{-1}	KØ	log KBE ml^{-1}	KØ	log KBE ml^{-1}	KØ	log KBE ml^{-1}	KØ
Roggenkleie-Agar	8,17	+++	9,54	+++	9,36	++	9,23	++
Rogosa-Agar	8,34	++	9,2	++	9,32	+		
APT-Agar	8,20	+++	9,04	+++				
Elliker-Agar	8,25	+	9,04	++	9,27	+		
M.R.S.-Agar	8,20	+++	8,97	+++	9,4	+++	9,25	+++
L-S-Differential-Agar	8,00	+	8,95	+	9,23	+		
Sorbinsäure-Agar	8,04	+	8,84	+	9,34	+	9,2	++
Tomato Juice-Agar					9,34	++		
Plate Count-Agar	pp	pp	pp	pp	9,20	+		
Brain Heart Inf.-Agar	pp	pp	pp	pp	9,30	+		

KØ = Koloniedurchmesser: + Koloniedurchmesser < 0,5 mm
 ++ Koloniedurchmesser 0,5–1,0 mm
 +++ Koloniedurchmesser > 1,0 mm
 pp Pin point Kolonien
 0 keine erkennbare Koloniebildung
 Leerstellen: nicht geprüft

Tabelle 2. Vergleich der Koloniezahlen und -größen von je einem Stamm von *Lactobacillus buchneri* und *Lactobacillus farciminis* nach 70 h aerober und anaerober Bebrütung bei 30 °C auf acht verschiedenen Milchsäurebakterien- und zwei nichtselektiven Agarmedien

Stamm	<i>L. buchneri</i> 1				<i>L. farciminis</i> 1			
	70 aerob		70 anaerob		70 aerob		70 anaerob	
	log KBE ml ⁻¹	KØ	log KBE ml ⁻¹	KØ	log KBE ml ⁻¹	KØ	log KBE ml ⁻¹	KØ
Roggenkleie-Agar			8,70	+++	8,70	++	8,70	++
Rogosa-Agar	8,71	+	8,71	++	8,70	++	8,70	++
APT-Agar	8,70	++	8,70	+++	8,70	++	8,70	++
Elliker-Agar	0	0	8,70	+	0	0	0	0
M.R.S.-Agar	8,71	+++	8,71	+++	8,70	++	8,70	+++
L-S-Differential-Agar	8,62	+	8,62	+	pp	pp	pp	pp
Sorbinsäure-Agar	8,77	+	8,77	++	8,77	++	8,77	++
Tomato Juice-Agar	8,71	+	8,71	++	pp	pp	pp	pp
Plate Count-Agar	0	0	0	0	0	0	0	0
Brain Heart Inf.-Agar	0	0	8,70	+	pp	pp	8,59	+

Zeichenerklärung siehe Tabelle 1

Tabelle 3. Vergleich der Koloniezahlen und -größen von zwei Stämmen von *Lactobacillus casei* und einer weiteren *Lactobacillus spec.* nach 44 bis 90 h aerober (anaerober) Bebrütung bei 30 °C auf acht verschiedenen Milchsäurebakterien- und zwei nichtselektiven Agarmedien

Stamm	<i>L. casei</i> 1		<i>L. casei</i> 2				<i>L. spec.</i>	
	66 aerob		90 aerob		90 anaerob		44 aerob	
	log KBE ml ⁻¹	KØ	log KBE ml ⁻¹	KØ	log KBE ml ⁻¹	KØ	log KBE ml ⁻¹	KØ
Roggenkleie-Agar	8,00	+++	9,14	+++	9,14	+++	8,00	+++
Rogosa-Agar	7,84	+	8,97	++	8,97	+		
APT-Agar	8,08	++	9,08	++	9,08	++		
Elliker-Agar	7,87	+	8,95	++	8,95	++		
M.R.S.-Agar	7,9	+++	9,08	++	9,08	++	8,00	+++
L-S-Differential-Agar	7,74	+	9,08	++	9,08	+		
Sorbinsäure-Agar	0	0	9,14	++			8,00	++
Tomato Juice-Agar	7,9	+	8,95	++	8,95	++		
Plate Count-Agar	7,95	+						
Brain Heart Inf.-Agar	7,84	+						

Zeichenerklärung siehe Tabelle 1

beide Stämme keine Koloniebildung, auf BHI-Agar nur unter anaeroben Bedingungen (Tabelle 2).

- *L. casei* Stamm 1 hatte im Gegensatz zu Stamm 2 auf Sorbinsäure-Agar keine Kolonien gebildet (Tabelle 3).
- Die beiden geprüften Stämme von *L. brevis* und der Stamm von *L. hilgardii* zeigten ebenfalls keine Koloniebildung auf dem Elliker-Agar sowie auf den beiden nichtselektiven Medien. Der Stamm 2 von *L. brevis* stellte im Vergleich zu Stamm 1 wesentlich höhere Nährstoffansprüche. Bei aerober Bebrütung war auf dem Rogosa- und APT-Agar keine Koloniebildung erfolgt und wurden auf dem L-S-Differential-Medium nur pin point-Kolonien gebildet. Bei anaerober Bebrütung waren auf APT-Agar um zwei Zehnerpotenzen niedrigere Koloniezahlen erreicht. Dasselbe war auch auf dem M.R.S.-Agar sowohl bei aerober als auch bei anaerober Bebrütung der Fall (Tabelle 4).

Signifikante Unterschiede waren dagegen bei der Grösse der gebildeten Kolonien auf den acht verschiedenen Milchsäurebakterien-Medien erkennbar. Die mit einem Durchmesser von 1,0 mm und mehr als gross bezeichneten Kolonien (+++ in den Tabellen 1-4) wurden vorzugsweise auf dem Roggenkleie- und M.R.S.-Agar gebildet. Auf beiden Medien hatten lediglich *L. farciminis* und *L. hilgardii* sowie die beiden Stämme 1 und 2 von *L. brevis* deutlich kleinere Kolonien mit einem Durchmesser von unter 1 mm (++) gebildet. Grosse Kolonien wurden ausserdem noch von *L. plantarum* 1 und 2 auf APT-Agar und von *L. hilgardii* auf Tomato

Tabelle 4. Vergleich der Koloniezahlen und -grössen von zwei Stämmen von *Lactobacillus brevis* und einem Stamm von *Lactobacillus hilgardii* nach 72 h aerober (anaerober) Bebrütung bei 30 °C auf acht verschiedenen Milchsäurebakterien- und zwei nichtselektiven Agarmedien

Stamm	<i>L. brevis</i> 1		<i>L. brevis</i> 2				<i>L. hilgardii</i> 1	
	72 aerob		72 aerob		72 anaerob		72 aerob	
Bebrütungszeit (h) Bebrütungsatmosphäre	log KBE ml ⁻¹	KØ	log KBE ml ⁻¹	KØ	log KBE ml ⁻¹	KØ	log KBE ml ⁻¹	KØ
Roggenkleie-Agar	7,9	++	8,54	+	8,54	++	8,3	++
Rogosa-Agar	9,94	+	0	0	pp	pp	8,53	+
APT-Agar	7,39	+	0	0	6,3	+	8,4	++
Elliker-Agar	0	0	0	0	0	0	0	0
M.R.S.-Agar	8,00	++	6,00	+	6,00	++	8,5	++
L-S-Differential-Agar	7,56	+	pp	pp	pp	pp	8,34	+
Sorbinsäure-Agar	9,34	+	8,40	+	8,40	+	8,38	+
Tomato Juice-Agar	7,88	+					8,44	+++
Plate Count-Agar	0	0					0	0
Brain Heart Inf.-Agar	0	0					0	0

Zeichenerklärung siehe Tabelle 1

Juice-Agar erreicht. Auf allen anderen Medien wurden überwiegend nur sehr kleine (+), teilweise auch mittlere (++) Kolonien gebildet.

Nicht in die Tabellen 1–4 aufgenommen wurden die Ergebnisse mit dem Modified Chalmer Medium. Einerseits war das Wachstum der Milchsäurebakterien sehr schlecht und langsam, andererseits bildete nur *L. brevis* die für diesen Agar typische rote Koloniefarbe (24).

Selektive Kulturmedien zur Unterdrückung von Hefen und Bakterien

M.R.S.-Agar und Roggenkleie-Agar hatten sich für das Wachstum von Milchsäurebakterien als am besten geeignet erwiesen. Tabelle 5 zeigt, dass durch Zusatz von Polymyxin und Pimarizin in den beiden modifizierten Medien eine partielle Unterdrückung der Begleitflora möglich war. Auf Roggenkleie-Agar ohne Selektivzusätze wuchsen Hefen ungehemmt, während *E. coli* und *S. aureus* erst nach längerer Bebrütungszeit graue Kolonien mittlerer Grösse gebildet hatten. Auf dem modifizierten M.R.S.-Agar waren *S. aureus* und *E. coli*, auf dem Modified Chalmer Medium nur *E. coli* vollständig gehemmt. *Gluconobacter* war auf beiden Medien nur partiell gehemmt wie auch *S. aureus* auf modifiziertem M.R.S.-Agar.

Tabelle 5. Koloniedurchmesser von *S. cerevisiae*, *E. coli*, *S. aureus* und *Gluconobacter* auf selektiven und nichtselektiven Milchsäurebakterien-Kulturmedien nach 40 und 110 h aerober Bebrütung bei 30 °C

Mikroorganismen	<i>S. cerevisiae</i>		<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>Gluconobacter</i>	
	40 h	110 h	40 h	110 h	40 h	110 h	40 h	110 h
Medien								
M.R.S.-Agar	+++	+++	+	+	+	++	++	+++
M.R.S.-Agar mod.	0	0	0	0	++	++	+	++
Roggenkleie-Agar	+++	+++	+	++	+	++		
Mod. Chalmer Med.	+++	+++	0	0	+++	+++	+	++

Zeichenerklärung siehe Tabelle 1

Vergleich des MIK- und API-Systems zur Bestimmung des Zuckervergärungsvermögens von Milchsäurebakterien

In den Tabellen 6 bis 8 sind die Resultate der gleichzeitigen Prüfung des Zuckervergärungsvermögens mit dem MIK- und API-System für fünf DSM-Stämme und acht aus Teigen isolierte Milchsäurebakterien gegenübergestellt. Die meisten Abweichungen im Vergleich der beiden Systeme lagen bei *L. fermentum* (DSM 20052) mit 10 unterschiedlichen Reaktionen vor, gefolgt von *L. mesenteroides 1* mit fünf. Bei allen anderen geprüften Stämmen waren es drei und weniger. Nicht berücksichtigt wurden dabei die schwachen Reaktionen (+/-), die in fast gleichen Anteilen neunmal bei MIK und achtmal bei API, d.h. also insgesamt bei nur 2,7% aller Bestimmungen zu beobachten waren.

Table 6. Vergleichende Bestimmung der «Zuckervergärungsspektren» mit der Mikrotiterplatten-(MIK) und API-Methode bei fünf *Lactobacillus*-Arten

Stamm DSM-Nummer	<i>L. farciminis</i> 20184		<i>L. casei</i> 20008		<i>L. fermentum</i> 20052		<i>L. plantarum</i> 20179		<i>L. brevis</i> 20054	
<i>Allgemeine Merkmale</i>										
Milchsäurekonfiguration	L		DL		DL		DL		DL	
Wachstum bei 15 °C	+		+		-		+		-	
Wachstum bei 45 °C	-		+		+		-		-	
Gasbildung aus Glucose	-		-		+		-		+	
Ammoniak aus Arginin	+		-		+		-		+	
Diaminopimelinsäure	-		-		-		+		-	
<i>Zuckervergärung</i>										
	MIK	API	MIK	API	MIK	API	MIK	API	MIK	API
L-Arabinose	-	-	+	+/-	+	+	+	+	+	+
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amygdalin	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
Aesculin	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Cellobiose	+/-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galaktose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gluconsäure	+/-	-	+	+	+	+	+	+	+	+/-
Lactose	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
Maltose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannit	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Melibiose	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
Raffinose	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Ribose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	+/-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
Sorbit	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
Saccharose	+	+	+	+	+/-	+	+	+	-	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xylose	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+
Sorbose	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-

Bebrütung 48 h bei 30 °C: + Reaktion positiv
 - Reaktion negativ
 +/- Reaktion schwach

Tabelle 7. Vergleichende Bestimmung der «Zuckervergärungsspektren» mit der Mikrotiterplatten-(MIK) und API-Methode bei fünf aus Brotteigen isolierten Milchsäurebakterien-Stämmen

Stamm	<i>L. mesenteroides</i> 2		<i>P. pentosaceus</i> 1		<i>L. homohiochi</i> 1		<i>L. plantarum</i> 5		<i>L. brevis</i> 3	
Herkunft aus Bäckerei	J		J		J		J		J	
<i>Allgemeine Merkmale</i>										
Milchsäurekonfiguration	D		DL		DL		DL		DL	
Wachstum bei 15 °C	+		+		+		+		+	
Wachstum bei 45 °C	-		+		-		+		+/-	
Wachstum bei 50 °C	-		-		-		-		-	
End-pH in M.R.S.-Bouil.	4,2		3,7		3,85		3,4		3,7	
Gasbildung aus Glucose	+		-		-		-		+	
Ammoniak aus Arginin	-		+		-		-		+	
Diaminopimelinsäure	-		-		-		+		-	
<i>Zuckervergärung</i>										
	MIK	API	MIK	API	MIK	API	MIK	API	MIK	API
L-Arabinose	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
D-Arabinose	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amygdalin	+	+	+/-	+	-	-	+	+	-	-
Aesculin	+	-	+/-	+/-	+/-	-	+	+	-	-
Cellobiose	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galaktose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gluconsäure	+	+	-	-	-	-	+	+/-	+	-
Lactose	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannit	+	+/-	-	-	-	-	+	+	-	-
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Melezitose	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Melibiose	+	+	+/-	-	-	-	+	+	+	+
Raffinose	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
Sorbit	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Saccharose	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
Trehalose	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
Xylose	+	+	-	-	-	-	-	+/-	+	+
Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Zeichenerklärung siehe Tabelle 6

Tabelle 8. Vergleichende Bestimmung der «Zuckervergärungsspektren» mit der Mikrotiterplatten-(MIK) und API-Methode bei einer *Leuconostoc*-Art und zwei *Lactobacillus*-Arten

Stamm	<i>L. mesenteroides</i> 1		<i>L. casei</i> 3		<i>L. plantarum</i> 3	
Herkunft aus Bäckerei	B		A		A	
<i>Allgemeine Merkmale</i>						
Milchsäurekonfiguration	D		L		DL	
Wachstum bei 15 °C	+		+		+	
Wachstum bei 45 °C	-		+/-		+	
Gasbildung aus Glucose	+		-		-	
Ammoniak aus Arginin	-		-		-	
Diaminopimelinsäure	-		-		+	
<i>Zuckervergärung</i>	MIK	API	MIK	API	MIK	API
L-Arabinose	-	-	-	-	+	+
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-
Amygdalin	+	-	+	+	+	+
Aesculin	-	+	+	+	+	+
Cellobiose	-	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+
Galaktose	-	-	-	-	+	-
Glucose	+	+	+	+	+	+
Gluconsäure	-	-	-	-	+	+
Lactose	-	-	-	-	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+
Mannit	-	+	-	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+
Melezitose	-	-	+	+	+	+
Melibiose	+	+	-	-	+	+
Raffinose	+	+	-	-	-	+/-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-
Ribose	+	+	+	+	+	+
Salicin	-	+	+	+	+	+
Sorbit	-	-	-	-	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+
Xylose	+	+	-	-	+	+
Sorbose	-	-	-	-	-	-

Zeichenerklärung siehe Tabelle 6

Im MIK-System wurden nur neunmal vom API-System positiv abweichende Reaktionen, d.h. in 2,9% aller Prüfungen, festgestellt, während beim API-System 21mal vom MIK-System positiv abweichende Reaktionen, d.h. in 6,7% aller Prüfungen, zu verzeichnen waren. Insgesamt lag die Abweichungsquote bei 9,6%.

Diskussion

Geeignete Kulturmedien für die Isolation und Identifikation von Milchsäurebakterien

Die vergleichenden Untersuchungen bei 11 verschiedenen Milchsäurebakterien-Stämmen hatten gezeigt, dass mit Ausnahme des Elliker-Mediums, teilweise auch des L-S-Differential-Agars, auf allen anderen sechs Medien vergleichbare Koloniezahlen gebildet wurden. Signifikante Unterschiede waren dagegen hinsichtlich der Grösse der gebildeten Kolonien zu verzeichnen. Wie die Zusammenfassung in Tabelle 9 zeigt, war eine eindeutige Rangfolge für die Verwendbarkeit als Medien zur Isolierung und Identifikation von Milchsäurebakterien zu berechnen. Die durchschnittlich grössten Kolonien wurden auf M.R.S.-Agar und Roggenkleie-Agar gebildet. Ungeeignet waren die beiden nichtselektiven Medien Plate Count-Agar und Brain Heart Infusion-Agar, aber auch die spezifischen Lactobacillus-Medien Elliker-Agar und L-S-Differential-Medium. Durch den Zusatz von Polymyxin und Pimarizin zu den am besten geeigneten M.R.S.-Agar und Roggenkleie-Agar konnte eine weitgehende Unterdrückung der Hefeflora und der gramnegativen Begleitflora erreicht werden, ohne dass das Wachstum der Milchsäurebakterien wesentlich beeinflusst wurde.

Spicher und *Schroeder* (18) haben des öfteren zusätzlich noch den Sorbinsäure-Agar angewandt. Dieser hatte sich auch in den eigenen Untersuchungen bewährt. Die starke Selektivität dieses Mediums hatte eine unterschiedliche Vermehrungsgeschwindigkeit der verschiedenen Milchsäurebakterienstämme zur Folge. Daher konnten bestimmte Arten bereits aufgrund der unterschiedlichen Koloniegrössen auf den Agarplatten unterschieden werden. Mit der kombinierten Anwendung von gleichzeitig zwei bis drei verschiedenen Medien war somit eine weitgehend vollständige Erfassung aller vorhandenen Milchsäurebakterien möglich.

Nicht den Erwartungen entsprach das Modified Chalmer Medium (24). Die für alle Milchsäurebakterien postulierten roten Kolonien wurden nur von *L. brevis* gebildet. Dieses Medium wurde daher bei den weiteren Untersuchungen von Brotteigen nicht mehr verwendet.

Tabelle 9. Durchschnittliche Koloniedurchmesser der 11 untersuchten *Lactobacillus*-Stämme auf den acht geprüften Milchsäurebakterien- und den zwei nichtselektiven Medien und die Rangfolge der Medien

Kulturmedium	Anzahl + Punkte	Anzahl Messungen	+ Punkte im Durchschnitt	Rangfolge
Roggenkleie-Agar	36	15	2,40	2
Rogosa-Agar	18	14	1,29	6
APT-Agar	25	13	1,92	3
Elliker-Agar	10	14	0,71	8
M.R.S.-Agar	40	16	2,50	1
L-S Diff.-Medium	11	14	0,79	7
Sorbinsäure-Agar	20	15	1,33	5
Tomato Juice-Agar	14	10	1,40	4
Plate Count-Agar	2	10	0,20	10
Brain Heart Inf.-Agar	4	10	0,40	9

Vergleich des MIK- und API-Systemes zur Bestimmung des Zuckervergärungsvermögens von Milchsäurebakterien

Dem Vorteil der einfachen Handhabung des API-Systems stehen zwei Nachteile in der routinemässigen Anwendung gegenüber: der relativ hohe Preis und das Fehlen eines umfangreichen Schlüssels, wie er zum Beispiel für das API 20E vorliegt. Somit müssen für die Auswertung die Angaben von *Kandler* und *Weiss* (11) herangezogen werden. Da dort aber nur für 22 Zucker Angaben gemacht werden, ist das API-System mit seinen 50 Testsubstanzen zu umfangreich. Aus diesem Grund wurde in Anlehnung an die Arbeitsanweisung von API für die von *Kandler* und *Weiss* (11) angegebenen Zucker und Zuckeralkohole ein Mikrotiterplatten-System entwickelt. Beide benutzen als Grundmedium eine abgeänderte M.R.S.-Bouillon. Als Indikator werden Bromkresolpurpur oder Phenolrot zugesetzt. Vorversuche hatten aber gezeigt, dass das Grundmedium keine Stoffe enthalten darf, die von den Milchsäurebakterien zu Säuren abgebaut werden können und somit zu einem Farbumschlag führen würden. Nach Überprüfung der Rohstoffe für die eigene Herstellung des Grundmediums nach API hatte sich gezeigt, dass alle verfügbaren Hefeextrakte Stoffe enthielten, die eine Säuerung bewirkten. Daher wurde das Grundmedium von API abgeändert und das in «Kulturmedien» beschriebene Grundmedium entwickelt, wobei der Hefeextrakt durch Yeast Nitrogen Base ersetzt wurde.

Dies machte einen Vergleichstest mit dem API-System erforderlich (Tabellen 6 bis 8). Für die Beurteilung sind allerdings nicht nur die Abweichungen der beiden Systeme voneinander wichtig, sondern auch ein Vergleich der Resultate der einzelnen Systeme mit den von *Kandler* und *Weiss* (11) für den betreffenden Stamm-Typ gemachten Angaben. Aus Tabelle 10 geht hervor, dass bei einem Vergleich MIK –

Tabelle 10. Unterschiedliche Reaktionen beim Zuckervergärungsvermögen von 13 Milchsäurebakterien-Stämmen bei der Anwendung des API- und MIK-Systems

Untersuchte Stämme	Referenzstämme nach Kandler und Weiss (11)	Anzahl zur Vergleichsmethode positiv (+) abweichende Reaktionen	
		MIK	API
<i>L. farciminis</i> DSM 20184	DSM 20184	0	3
<i>L. casei pseudoplantarum</i> DSM 20008	ATCC 25598	2	0
<i>L. fermentum</i> DSM 20052	ATCC 14931	0	10
<i>L. plantarum</i> DSM 20179	ATCC 14917	1	0
<i>L. brevis</i> DSM 20054	ATCC 14869	1	3
<i>L. mesenteroides 1</i>		1	4
<i>L. mesenteroides 2</i>		1	0
<i>L. plantarum 5</i>		1	0
<i>L. plantarum 3</i>		0	0
<i>L. casei 3</i>		0	1
<i>L. homohiochii 1</i>		0	0
<i>L. brevis 3</i>		2	0
<i>P. pentosaceus 1</i>		0	0
Summe		9	21

Anzahl geprüfter Zucker: 312 (24 Zucker pro Stamm)
 Anzahl geprüfter Zucker, die mit MIK- und API-System unterschiedliche Reaktionen ergaben: 30
 Unterschiedliche Reaktionen in %: 9,6

API bei insgesamt 30 Abweichungen das MIK-System neunmal und das API-System 21mal positiv abweichende Reaktionen aufwies.

Die in Tabelle 11 erfolgte Aufschlüsselung nach der Abweichungshäufigkeit zeigt, dass die Abweichungen nicht bei bestimmten einzelnen Zuckern häufiger vorkamen, sondern ziemlich gleichmässig verteilt bei insgesamt 70% der geprüften Zucker aufgetreten waren.

In einer Vergleichsuntersuchung des API-Systems mit Milchsäurebakterien von Hofer (7) hatten sich ähnliche Probleme ergeben. Einerseits konnten bei mehrfachen Wiederholungen nicht immer die gleichen Resultate erzielt werden, anderer-

Tabelle 11. Häufigkeit unterschiedlicher Resultate bei der Vergärung von 24 verschiedenen Zuckern und Zuckeralkoholen durch 13 verschiedene Milchsäurebakterien mit dem MIK- und API-System

Zucker	Positiv abweichende Reaktionen bei:		Zucker	Positiv abweichende Reaktionen bei:	
	MIK	API		MIK	API
L-Arabinose			Mannose		
D-Arabinose			Melezitose		1
Amygdalin	1	2	Melibiose		1
Aesculin	3	1	Raffinose		1
Cellobiose	1	2	Rhamnose		1
Fructose			Ribose		1
Galaktose	1		Salicin		2
Glucose			Sorbit		1
Gluconsäure	1		Saccharose		1
Lactose		2	Trehalose		
Maltose		1	Xylose	1	1
Mannit	1	3	Sorbose		

Tabelle 12. Abweichende Reaktionen des Zuckervergärungsvermögens beim MIK- und API-System von fünf *Lactobacillus*-Typstämmen nach Kandler und Weiss (11)

Untersuchte Stämme	Referenzstämme nach Kandler und Weiss (11)	Anzahl positiv (+) bzw. negativ (-) abweichender Reaktionen beim MIK- und API-System			
		MIK		API	
		+	-	+	-
<i>L. farciminis</i> DSM 20184	DSM 20184	0	3	2	3
<i>L. casei pseudoplantarum</i> DSM 20008	ATCC 25598	4	0	2	1
<i>L. fermentum</i> DSM 20052	ATCC 14931	1	3	7	0
<i>L. plantarum</i> DSM 20179	ATCC 14917	0	0	0	1
<i>L. brevis</i> DSM 20054	ATCC 14869	4	1	6	1
Insgesamt positiv bzw. negativ abweichende Reaktionen		9	7	17	6

seits wurden bei parallel in Reagenzgläsern durchgeführten Versuchen mit dem von *Kandler* und *Weiss* (11) vorgeschlagenen Medium unterschiedliche Resultate erreicht. Insbesondere betraf dies die Substanzen Aesculin, Cellobiose, Fructose, Galaktose, Lactose, Raffinose und Salicin. Eine Erklärung hierfür konnte nicht gegeben werden.

Bei den eigenen Versuchen traten Abweichungen innerhalb eines Stammes auch bei mehrfachen Wiederholungen nur sehr selten auf. Dagegen bestätigen die unter-

Tabelle 13. Gegenüberstellung der Angaben verschiedener Autoren zum Zucker-
vergärungsvermögen von *Lactobacillus casei*

Geprüfter Stamm	<i>L. casei</i>						
	MIK	API	K + W	Sp	Ab		
					I	II	III
Vergärung von							
L-Arabinose	+	+/-	-	-	-	-	-
Amygdalin	+	+	+				
Aesculin	+	-	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+	+		
Fructose	+	+	+	+			
Galaktose	+	+	+	+			
Glucose	+	+	+	+			
Gluconsäure	+	+	+				
Lactose	+	+	+/-	+	+	+	-
Maltose	+	+	+/-	+	+	+	+
Mannit	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+			
Melezitose	+	+	+	+			
Melibiose	+	+	-	-	-	-	-
Raffinose	+	+	-	-	-	-	+
Rhamnose	-	-	-	-			
Ribose	+	+	+	+			
Salicin	+	+	+	+	+	+	+
Sorbit	+	+	+	+	+	-	+
Saccharose	+	+	+/-	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+			
Xylose	+	-	-	+			

Legende: + Reaktion positiv K + W *Kandler* und *Weiss* (11)
 - Reaktion negativ Sp *Spicher* (20)
 +/- Reaktion schwach Ab *Abo Elnaga* (1)

schiedlichen Resultate mit den MIK- und API-Systemen die von *Hofer* (7) gemachten Erfahrungen.

In Tabelle 12 sind die positiven und negativen Abweichungen bei fünf mit dem MIK- und API-System untersuchten *Lactobacillus*-Arten gegenüber den Angaben von *Kandler* und *Weiss* (11) für diese Typstämme aufgeführt. Während bei dem MIK-System nur neun positive und sieben negative Abweichungen vorlagen, waren es beim API-System 17 positiv abweichende und nur sechs negativ abweichende Reaktionen. Damit hatte das API-System mit insgesamt 23 Abweichungen gegenüber 16 des MIK-Systems eine höhere Anzahl insbesondere positiver Abweichungen.

Die in Tabelle 13 zusammengestellten Literaturangaben zum Zuckervergärungsspektrum eines ausgewählten *Lactobacillus*-Stammes (*L. casei*) im Vergleich mit den eigenen Resultaten zeigen die unterschiedlichen Resultate bei einer Reihe von Substraten. *Abo Elnaga* (1) unterteilt *L. casei* in Subspecies (I, II, III) unterschiedlicher Herkunft. Ein weiteres Beispiel ist die von *Kandler* und *Weiss* (11) als *L. sanfrancisco*, von *Spicher* und *Stephan* (20) als *L. brevis lindneri* bezeichnete gleiche Art, für die *Kandler* und *Weiss* (11) angeben, dass Fructose nicht, wohl aber Galaktose und Gluconsäure vergoren werden, während von *Spicher* und *Stephan* die umgekehrten Angaben vorliegen (20). Für die gleiche Art hat *Spicher* beobachtet (mündl. Mitt.), dass nach einem Gefriertrocknungs-Prozess das Zuckervergärungsvermögen um einige Zucker erweitert war.

Zusammenfassend lässt sich für die Verwendung des MIK-Systems zur Bestimmung des Zuckervergärungsvermögens aussagen:

1. Das Mikrotiterplatten-System eignet sich zur Erfassung des Zuckervergärungsspektrums von Milchsäurebakterien.
2. Der Farbumschlag beim MIK-System ist deutlicher, da hier im Gegensatz zum API-System keine Zwischenphase mit grüner Farbe auftritt.
3. Bei der Bestimmung des Zuckervergärungsspektrums muss mit Abweichungen gegenüber den Referenzstämmen von bis zu 20% gerechnet werden.

Zusammenfassung

Mit 11 *Lactobacillus*-Stämmen wurden 8 Milchsäurebakterien-Selektivmedien und zwei nichtselektive Agarmedien nach aerober und teils anaerober Bebrütung bei 30 °C auf ihre Eignung zur Koloniezählung von aus Brotteigen isolierten Milchsäurebakterien vergleichend geprüft. Mit Ausnahme von *L. brevis* erreichten alle anderen Stämme ähnliche Koloniezahlen. Signifikante Unterschiede waren bei der Grösse der Kolonien zu verzeichnen.

Als Hemmstoffe zur Unterdrückung des Wachstums von Hefen und gramnegativen Bakterien waren Pimarizin und Polymyxin gut geeignet.

Zur Identifizierung der aus Weizenbrotteigen isolierten Milchsäurebakterien wurde ein Mikrotiterplatten-Verfahren zur Bestimmung des Zuckervergärungsvermögens entwickelt und mit dem api-System verglichen.

Résumé

8 milieux sélectifs pour les bactéries lactiques et 2 milieux non sélectifs ont été testés avec 11 souches de *Lactobacillus sp.* sous des conditions aérobies et anaérobies. Le but était de trouver le milieu le plus apte au dénombrement des bactéries lactiques dans les pâtes et les levains.

A l'exception de *L. brevis*, toutes les souches ont montré des nombres de colonies comparables, tandis que le diamètre de colonies différait nettement selon le milieu utilisé, les milieux les plus efficaces étant la gélose au son de seigle et le M.R.S. agar.

Les levures et les bactéries Gram négatives pouvaient être supprimées complètement à l'aide de pimarinic et de polymyxine.

Pour l'identification des souches de bactéries lactiques isolées des pâtes de blé, un système à base de plaques microtitres a été développé. Les résultats de l'identification ont été comparés aux ceux du système api.

Summary

Eight media selective for lactic acid bacteria and two non-selective media have been tested under aerobic and anaerobic conditions for their suitability as media for the detection and enumeration of lactic acid bacteria in doughs. The tests were carried out with eleven different strains of lactobacilli. All strains except *L. brevis* showed similar counts. Clear differences in colony diameter were detected between the media tested, rye-bran agar and M.R.S. agar showing best results. Growth of yeasts and Gram negative bacteria was successfully suppressed by means of pimarinic and polymyxin.

For the identification of lactic acid bacteria isolated from wheat doughs an accurate system using microtiter plates has been developed. The results of the identification have been compared to those of the api-system.

Literatur

1. Abo Elnaga, J.G.: Zur Taxonomie der Gattung *Lactobacillus Beijerinck*. Zbl. Bakt. Hyg. Abt. B, **119**, 1–36 (1965).
2. Brigg, M.: An improved medium for lactobacilli. J. Dairy Res. **20**, 36–40 (1953).
3. Cox, C.P. and Briggs, M.: Experiments on growth media for lactobacilli. J. Appl. Bact. **17**, 18–26 (1954).
4. Davis, G.H.: The classification of lactobacilli from the human mouth. J. Gen. Microbiol. **13**, 481–493 (1955).
5. De Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M.E.: Medium for the cultivation of lactobacilli. J. Appl. Bact. **23**, 130–138 (1960).
6. Evans, J.B. and Niven, C.F.: Nutrition of the heterofermentative lactobacilli that cause greening of cured meat products. J. Appl. Bacteriol. **62**, 599–603 (1951).
7. Hofer, F.: Identifizierung von Milchsäurebakterien mit Hilfe des API-Systems. Schw. Milch. Forschung **5**, 17–22 (1976).
8. Jörgensen, A. und Hansen, A.: Mikroorganismen der Gärungsindustrie. Verlag H. Carl, Nürnberg 1956.

9. *Kagermeier, A.*: Taxonomie und Vorkommen von Milchsäurebakterien in Fleischprodukten. Diss. Univ. München 1981.
10. *Kandler, O.*: Mikrobiologie fermentierter Gemüse. SGLH-Schriftenreihe, Heft 11, S. 3–19 (1981).
11. *Kandler, O.* and *Weiss, N.*: Section 14, Regular nonsporing grampositive rods in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. Holt, J.G. (ed.). Verlag Williams & Wilkins, Baltimore 1986.
12. *Lönner, C., Welander, T., Molin, N., Dostalek, M.* and *Blickstad, E.*: The microflora in a sour dough started spontaneously on typical Swedish rye meal. *Food Microbiol.* **3**, 3–12 (1985).
13. *Reuter, G.*: Elective and selective media for lactic acid bacteria. *J. Food Microbiol.* **3**, 55–68 (1985).
14. *Röcken, W.*: Mikroökologische Studien zur Milchsäurebakterienflora der Melassebrenne-
reien. *Branntweinwirtschaft* **116**, Sonderbeilage zu Heft 8, S. 1–11 (1976).
15. *Rose, S.A.*: A note on yeast growth in media used for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* **59**, 153–156 (1985).
16. *Spicher, G.*: Die Mikroflora des Sauerteiges. I. Mitt. Untersuchungen über die Art der in
Sauerteigen anzutreffenden stäbchenförmigen Milchsäurebakterien (Genus *Lactobacillus*
Beijerinck). *Zbl. Bakt. Hyg. II. Abt.* **113**, 80–106 (1959).
17. *Spicher, G.*: Die Mikroflora des Sauerteiges im Licht neuerer Untersuchungen. *Forum
Mikrobiologie* **4**, 74–79 (1981).
18. *Spicher, G.* und *Schröder, R.*: Die Mikroflora des Sauerteiges. IV. Mitt. Untersuchungen
über die Art der in Reinzuchtsauern auftretenden stäbchenförmigen Milchsäurebakte-
rien. *Z. Lebensm. Unters. -Forsch.* **167**, 342–354 (1978).
19. *Spicher, G.* und *Schröder, R.*: Die Mikroflora des Sauerteiges. IX. Mitt. Vergleichende
Untersuchungen über die Säuerungsleistungen der in Reinzuchtsauern auftretenden
Milchsäurebakterien. *Z. Lebensm. Unters. -Forsch.* **170**, 262–266 (1980).
20. *Spicher, G.* und *Stephan, H.*: Handbuch Sauerteig. 2. Auflage. Verlag BBV Wirtschaftsin-
formationen GmbH, Hamburg 1984.
21. *Stahl, E.* (ed.): Dünnschichtchromatographie. Springer Verlag, Berlin 1967.
22. *Stettler, K.* und *Kandler, O.*: Die Regulation des Verhältnisses der beiden Isomeren der
Milchsäure bei Laktobazillen. 3. Symposium Tech. Mikrobiol. Verlag Versuchs- und
Lehranstalt für Spiritusfabrikation und Fermentationstechnologie am Institut für Gä-
rungsgewerbe und Biotechnologie. Herausgeber, H. Dellweg, Berlin 1973.
23. *Todoroff, A.*: Methoden und Technik zur Untersuchung der echten Milchsäurebakterien.
Verlag H. Carl, Nürnberg 1947.
24. *Vanos, V.* and *Cox, L.*: Rapid routine method for the detection of lactic acid bacteria among
competitive flora. *Food Microbiol.* **3**, 223–234 (1986).
25. *Weiss, N.*: Beiträge zur Taxonomie des Genus *Lactobacillus* Beijerinck. Diss. Universität
München 1967.

Dr. O. Geiges
Ingenieurschule
CH-8820 Wädenswil