

Selektivmedien zum Nachweis von obligat und fakultativ heterofermentativen Laktobazillen

D. ISOLINI, M. GRAND und H. GLÄTTLI
Eidg. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft
3097 Liebefeld-Bern

Eingereicht am 28. Juni 1990

Bei der Hart- und Halbhartkäseherstellung haben heterofermentative Laktobazillen eine gewisse technologische Bedeutung. Um die Entwicklung dieser Mikroorganismen während der Käsefabrikation und -reifung zu verfolgen, wurde je ein Selektivmedium für obligat und fakultativ heterofermentative Laktobazillen entwickelt. Diese Medien sind geeignet, solche Organismen innerhalb einer gemischten Population von Mikroorganismen zu erfassen.

1. Einleitung

Obligat homofermentative Laktobazillen vergären Hexosen fast ausschliesslich zu Milchsäure über den Emden-Meyerhof-Weg. Pentosen oder Gluconat werden nicht vergoren (1). Beispiele: *Lb. delbrueckii* subsp. und *Lb. helveticus*, welche in Reifungskulturen vorkommen können. Obligat heterofermentative Laktobazillen fermentieren Hexosen zu Milchsäure, Essigsäure, Aethanol und CO₂. Pentosen werden in Milchsäure und Essigsäure umgewandelt (1). Beispiele: *Lb. fermentum*, *Lb. reuteri* und *Lb. brevis*. Diese Organismen sind unerwünscht bei der Hartkäseherstellung.

Die fakultativ heterofermentativen Laktobazillen vergären Hexosen fast ausschliesslich zu Milchsäure über den Emden-Meyerhof-Weg. Gewisse Spezies sind in der Lage, unter Glucose-Limitation Hexosen in Milchsäure, Essigsäure, Aethanol und Ameisensäure zu fermentieren. Pentosen werden durch eine induzierbare Phosphoketolase in Milchsäure und Essigsäure umgewandelt (1). Beispiele: *Lb. casei* subsp., welchen eine gewisse technologische Bedeutung bei der Fabrikation und während der Reifung von Hart- und Halbhartkäsen zugeschrieben wird.

Uns interessiert die separate Erfassung dieser Organismen während der Fabrikation und Reifung sowohl in Hartkäsen als auch in Halbhartkäsen. Für diese Zwecke standen uns bisher keine geeigneten Selektivnährmedien zur Verfügung.

2. Material und Methoden

Organismen

Reinstämme, Mischkulturen sowie Roh-

mischkulturen standen uns aus der internen Stamm- bzw. Kultursammlung zur Verfügung.

Züchtungsbedingungen für Vorkulturen

Laktobazillen, Pediokokken: 18 h, 38 °C in MRS-Medium (2)

Mischkulturen, Rohmischkulturen und Streptokokken: 18 h, 38 °C in rekonstituierter Pulvermagermilch.

Züchtungsbedingungen für die Ansätze auf den Testmedien

Die Bedingungen sind in den entsprechenden Kapiteln unter «Experimente und Resultate» dargestellt.

Untersuchungsmaterial

Die neuen Selektivmedien wurden bei Rohmilch und Käse (24stündig und reif) getestet.

Basismedium

Das MRS-Medium (2) ist ein geeignetes Nährmedium zur Züchtung von Milchsäurebakterien. Jedoch ist die Selektivität für Milchsäurebakterien nicht in jedem Falle gewährleistet. Dieses Medium musste modifiziert werden, um die gewünschte separate Erfassung der obligat und fakultativ heterofermentativen Laktobazillen zu ermöglichen.

3. Resultate und Diskussion

Selektivmedium für obligat heterofermentative Laktobazillen (OH-Medium)

Pufferung des Mediums: Um Streptokokken möglichst auszuschliessen und Bedingungen zu schaffen, welche die Laktobazillen in der Vermehrung begünstigen, musste ein geeigneter Puffer verwendet werden. Sowohl die Pufferkapazität als auch der pH-Wert des MRS-Mediums waren dazu ungeeignet. 200 ml Azetatpuffer, pH 5.4 (1M) pro Liter Medium konnten den gestellten Anforderungen genügen.

Um das Basismedium so zu modifizieren, dass obligat heterofermentative Laktobazillen selektiv erfasst werden, musste vorerst das Gärungsprofil unter die Lupe genommen werden.

Dabei zeigte es sich, dass Melibiose und Raffinose Schlüsselsubstrate darstellen

(Tab. 1). Wachstumsexperimente mit diesen beiden Substraten zeigten, dass von 190 verschiedenen, aus Käse isolierten, obligat heterofermentativen Laktobazillen 69% der Stämme Raffinose bzw. 97% Melibiose als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu verwenden imstande sind. Zudem können diese Organismen CO₂ aus beiden Substraten bilden. Schlussendlich wurde die in Tab. 2 dargestellte Zusammensetzung des OH-Mediums für unsere Zwecke als geeignet befunden.

Das flüssige Medium wurde in Durham-Röhrchen verwendet. Diese Methode gestattet es, die Aussagekraft der Resultate zu erhöhen, indem nur Röhrchen mit

Tabelle 1: Gärungsprofil verschiedener Spezies von Milchsäurebakterien

Organismus	Zuckerverwertung	
	Melibiose	Raffinose
<i>L. delbrueckii</i>	neg	neg
<i>L. helveticus</i>	neg	neg
<i>L. casei</i>	neg	neg
<i>s. casei</i>		
<i>s. rhamnosus</i>	neg	neg
<i>s. pseudoplantarum</i>	neg	neg
<i>L. plantarum</i>	pos	neg
<i>S. salivarius</i>	neg	neg/pos
<i>s. thermophilus</i>		
<i>E. faecium</i>	neg/pos	neg/pos
<i>E. faecalis</i>	neg	neg
<i>L. brevis</i>	pos	neg/pos
<i>L. fermentum</i>	pos	neg/pos
<i>L. reuteri</i>	pos	neg/pos
<i>L. mesenteroides</i> *	neg	neg
<i>s. cremoris</i>		
<i>L. lactis</i> *	neg/pos	neg/pos

* *Leuconostoc* spp. kommen in Hartkäse kaum vor

Tabelle 2: OH-Medium zur selektiven Bestimmung der obligat heterofermentativen Laktobazillen

Komponenten	Konzentration/1 000 ml
Proteose Pepton	10.00 g
Fleischextrakt	10.00 g
Hefeextrakt	1.00 g
Raffinose	10.00 g
Melibiose	10.00 g
MnSO ₄	0.10 g
MgSO ₄	0.10 g
Tween 80	1.00 ml
Azetatpuffer, 1M, pH 5.4	200.00 ml
Dest. Wasser	ad 1 000.00 ml
Durham Röhrchen	
Inkubation	3 Tage, 38 °C

sichtbarer Gasbildung ausgewertet werden. Zudem kann auch eine MPN-Methode (Most Probable Number-Methode) angewendet werden.

Um die Zuverlässigkeit dieses Mediums zu prüfen, wurde vorerst mit diversen Reinstämmen und polyvalenten Mischkulturen gearbeitet:

190 Stämme von obligat heterof. Laktobazillen, versch. Herkunft

30 Stämme von fakultat. heterof. Laktobazillen versch. Herkunft

20 versch. Stämme von homof. Laktobazillen und Streptokokken

10 versch. Stämme von Enterokokken

10 versch. homofermentative polyvalente Mischkulturen.

Die damit erhaltenen Resultate sind in Tab. 3 dargestellt.

Das Vorhandensein von Fremdorganismen, insbesondere Hefen und Coliforme, könnte zu falsch positiven Resultaten führen. Da bei der Käseherstellung stets eine schnelle Säuerung angestrebt wird, werden solche Fremdkeime rasch unterdrückt und können somit bei Käseanalysen vernachlässigt werden.

Tatsächlich hat sich das OH-Medium als sehr zweckmässig für Käseanalysen gezeigt. Bei der Untersuchung von Rohmilch, welche Hefen und coliforme Keime enthalten kann, muss mit Problemen gerechnet werden. Solche Probleme können jedoch durch separate Untersuchungen auf diese Keimgruppen umgangen werden. Subkulturen aus gaspositiven Durham-Röhrchen mit OH-Medium auf entsprechenden Selektivnährböden können als Alternative empfohlen werden.

Tabelle 3: Wachstum und Gasbildung verschiedener Kulturen im OH-Medium

Organismus	Wachstum	Gasbildung
<i>L. delbrückii subsp.</i>	neg	neg
<i>L. helveticus</i>	neg	neg
<i>L. casei</i>	neg	neg
<i>s. casei</i>		
<i>s. rhamnosus</i>	neg	neg
<i>s. pseudoplatantum</i>	neg	neg
<i>L. plantarum</i>	pos	neg
<i>S. salivarius</i>	neg	neg
<i>s. thermophilus</i>		
<i>E. faecium</i>	neg/pos	neg
<i>E. faecalis</i>	neg	neg
<i>L. brevis</i>	pos	pos
<i>L. fermentum</i>	pos	pos
<i>L. reuteri</i>	pos	pos
<i>L. mesenteroides</i>	neg	neg
<i>s. cremoris</i>		
<i>L. lactis</i>	neg/pos	neg/pos
polyvalente MK (homof.)	neg	neg

Um das Wachstum von Coliformen im OH-Medium auszuschliessen, wäre auch ein Zusatz eines Antibiotikums, welches gram-negative Organismen unterdrückt,

Tabelle 4: Eigenschaften von Milchsäurebakterien (und anderer Organismen)

Organismus	anaerobes Wachstum	Mannit-fermentation	Verhalten gegenüber Vancomycin
<i>L. delbrueckii, spp.</i>	pos	neg	sensitiv
<i>L. helveticus</i>	pos	neg	sensitiv
<i>L. brevis</i>	pos	neg	resistent
<i>L. fermentum</i>	pos	neg	resistent
<i>L. reuteri</i>	pos	neg	resistent
<i>S. salivarius</i>	pos	neg	
<i>s. thermophilus</i>			
<i>E. faecalis</i>	pos	pos	sensitiv
<i>E. faecium</i>	pos	pos	
<i>Lactococcus lactis</i>	pos	neg/pos	resistent
<i>P. pentosaceus</i>	pos	neg	resistent
<i>P. acidilactici</i>	pos	neg	resistent
<i>Leuconostoc lactis</i>	pos	neg	resistent
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	pos	neg/pos	resistent
<i>Micrococcus sp.</i>	neg	pos	sensitiv
<i>L. casei</i>			
<i>s. casei</i>	pos	pos	resistent
<i>s. rhamnosus</i>	pos	pos	resistent
<i>s. pseudoplatantum</i>	pos	pos	resistent
<i>L. plantarum</i>	pos	pos	resistent

denkbar. Diese Möglichkeit wird jedoch nur in Betracht gezogen, wenn eine absolute Notwendigkeit besteht, damit ein allfälliges – wenn auch äusserst geringes – Risiko für Rückstände in Glaswaren vermieden werden kann.

Zusätzliche Tests bestätigten die Eignung des neuen Selektivmediums: Proben aus gaspositiven Durham-Röhrchen von diverser Untersuchungsmaterial wurden auf festes OH-Medium (mit Agarzusatz) ausgeplattiert und rund 150 Kolonien durch das Zufallsprinzip entnommen und auf ihre Zugehörigkeit zu den obligat heterofermentativen Laktobazillen mit klassischen Methoden geprüft. Sämtliche dieser geprüften Kolonien gehörten tatsächlich zu dieser Gruppe von Mikroorganismen.

Seit Einführung dieser Methode wurden bereits über tausend Käseproben analysiert. Ein erheblicher Teil dieser Käse wurde mit Zugabe von obligat heterofermentativen Laktobazillen zur Säuerungskultur fabriziert. Die Methode erwies sich als sehr geeignet für Routineuntersuchungen. Die Wiederfindungsrate kann als ausgezeichnet beurteilt werden.

Selektivmedium für fakultativ heterofermentative Laktobazillen (FH-Medium)

Auch hier diente wiederum das MRS-Medium (2) als Basis zur Entwicklung des FH-Mediums. Im weiteren wurde das neue FH-Medium ebenfalls mit Azetat gepuffert. Die in Tab. 4 dargestellten Eigenschaften von Milchsäurebakterien (und anderen Organismen) prägten die Zusammensetzung des FH-Mediums. Eine Arbeit von SIMPSON et al., 1988 (3) weist darauf hin, dass alle fakultativ heterofermentativen Laktobazillen sich als resi-

stent gegenüber dem Antibiotikum Vancomycin erweisen (Tab. 5). Andere Milchsäurebakterien und insbesondere Fremdkeime wie z.B. Mikrokokken sind hingegen Vancomycin-sensitiv. Weitere Organismen, welche Vancomycin-resistent sind, können entweder Mannit nicht vergären oder sind bei der Halbhart- bzw. Hartkäsefabrikation ohne Bedeutung. Umfangreiche Voruntersuchungen führten schlussendlich zur in Tab. 6 dargestellten Zusammensetzung des neuen OH-Mediums für die selektive Erfassung der fakultativ heterofermentativen Laktobazillen.

Die Auswertung erfolgt nach folgenden Gesichtspunkten:

- Zählung der typischen weissen, glänzenden, runden, konkaven Kolonien (von den atypischen in der Regel gut unterscheidbar).
- Atypische Kolonien, welche flach, grau, durchsichtig oder matt erscheinen, werden nicht gezählt.
- In unsicheren Fällen werden die Kolonien ausgestrichen und mikroskopiert. Fakultativ heterofermentative Laktoba-

Tabelle 5: Verhalten einiger wichtiger Organismen gegenüber Vancomycin

Vancomycin sensitiv	Vancomycin resistent
<i>L. delbrueckii, spp.</i>	<i>L. casei s. casei</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>L. casei s. rhamnosus</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>L. casei s. alactosus</i>
<i>M. luteus</i>	<i>L. coryneformis</i>
<i>M. roseus</i>	<i>L. curvatus</i>
<i>M. flavus</i>	<i>L. plantarum</i>
<i>M. varians</i>	<i>L. brevis</i> (Mannit neg)
<i>M. lysodeiktitikus</i>	<i>L. fermentum</i> (Mannit neg)
<i>M. kristinae</i>	<i>P. pentosaceus</i> (Mannit neg)
<i>M. spp.</i>	<i>P. acidilactici</i> (Mannit neg)
<i>S. aureus</i>	<i>L. lactis</i> (nicht rel.)
<i>S. epidermidis</i>	<i>L. mesenteroides</i> (nicht rel.)
<i>S. saprophyticus</i>	
<i>Staphylococcus spp.</i>	
<i>S. cremoris</i>	
<i>E. durans</i>	
<i>Streptococcus spp.</i>	

Tabelle 6: FH-Medium zur selektiven Erfassung der fakultativ heterofermentativen Laktobazillen

Komponenten	Konzentration/1 000 ml
Proteose Pepton	10.00 g
Fleischextrakt	10.00 g
Hefeextrakt	1.00 g
Mannit	20.00 g
MnSO ₄	0.10 g
MgSO ₄	0.10 g
Tween 80	1.00 ml
Azetatpuffer, 1M, pH 5.4	200.00 ml
Vancomycin (Sigma)	0.05 g
Agar	15.00 g
Dest. Wasser	ad 1 000.00 ml
Oberflächen-Ausstrich	3 Tage, 38 °C,
Inkubation	anaerob

Tabelle 7: Koloniebildungsvermögen der geprüften Mikroorganismen auf dem FH-Medium

Mikroorganismen	Kolonien
Fakultativ heterofermentative Laktobazillen	39 typische Kolonien, leicht erkennbar 2 Kolonien erst nach genauer Betrachtung als typisch erkennbar
Obligat heterofermentative Laktobazillen	Atypische Kolonien bzw. kein Wachstum
Homofermentative Laktobazillen	Kein Wachstum
Polyvalente homofermentative Mischkulturen	Kein Wachstum

zillen zeigen dabei in der Regel die typischen Kurzstäbchen, teilweise in Ketten angeordnet (Streptobakterien). Nur in seltenen Fällen ist die Prüfung der Gasbildung über Subkulturen in Glucose- und Gluconat-Bouillons (auf MRS-Basis) notwendig. Fakultativ heterofermentative Laktobazillen bilden CO₂ nur aus Gluconat, während obligat Heterofermentative aus beiden Substraten Gas produzieren.

Die Zuverlässigkeit des neuen FH-Mediums wurde vorerst mit diversen Stämmen bzw. Kulturen geprüft:

- 41 Stämme verschiedener fakultativ heterofermentativer Laktobazillen
- 4 Stämme verschiedener obligat heterofermentativer Laktobazillen
- 5 Stämme verschiedener homofermentativer Laktobazillen
- 6 verschiedene homofermentative polyvalente thermophile Mischkulturen, je be-

stehend aus verschiedenen Streptokokken- und Laktobazillen-Stämmen.

Die erhaltenen Resultate waren ermutigend. Sie sind in Tab. 7 dargestellt.

Bei anschliessenden 73 Käse- und 16 Rohmilchanalysen wurden nach dem Zufallsprinzip rund 300 Kolonien vom FH-Medium subkultiviert und differenziert. Sämtliche Kolonien (100%) erwiesen sich als fakultativ heterofermentative Laktobazillen.

Wiederfindungsexperimente mit Rohmilchen, die zuvor mit fakultativ heterofermentativen Laktobazillen beimpft wurden, führten zu ausgezeichneten Resultaten.

Das FH-Medium eignet sich für Routineuntersuchungen. Mehr als 2 000 Käse- und Milchproben wurden bisher mit diesem Medium analysiert, und verwertbare Resultate wurden erhalten.

4. Literatur

- 1 SNEATH, P.H.A., MAIR, N.S., M.E. SHARPE: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, (1986).
- 2 MAN, J.D. DE, ROGOSA, M. and M.E. SHARPE: A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bact.*, **23**, 130-138 (1960).
- 3 SIMPSON, W.J., HAMMOND, J.R.M., R.B. MILLER: Avoparcin and vancomycin: useful antibiotics for the isolation of brewery lactic acid bacteria. *J. Appl. Bact.* **64**, 299-309 (1988).

Résumé

D. ISOLINI, M. GRAND et H. GLÄTTLI
Milieux sélectifs pour le dénombrement des lactobacilles hétérofermentaires obligés et facultatifs.

Schweiz. Milchw. Forschung **19** (3), 57-59 (1990)

Les lactobacilles hétérofermentaires jouent un rôle non négligeable dans la fabrication des fromages à pâte dure et mi-dure. Afin de suivre l'évolution de ces micro-organismes durant la maturation, nous avons développé 2 milieux sélectifs; l'un pour les lactobacilles hétérofermentaires obligés, l'autre pour les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs.

Ces milieux permettent le dénombrement de ces bactéries au sein d'une flore microbienne hétérogène.

Summary

D. ISOLINI, M. GRAND and H. GLÄTTLI
Selective media for the enumeration of obligately and facultatively heterofermentative lactobacilli
Schweiz. Milchw. Forschung **19** (3), 57-59 (1990)

Heterofermentative lactobacilli are of some technological importance in hard and semi-hard cheese. In order to follow the development of these organisms during cheese manufacturing and ripening selective media for their enumeration have been developed. These media are suitable to detect such organisms separately within a mixed population of microorganisms.