

MRS-Nährböden

MRS-Nährboden
MRS-Bouillon

Zur Anreicherung, Züchtung, Isolierung und Koloniezahlbestimmung aller *Lactobacillus*-Spezies aus Fleisch, Milch, Molkereiprodukten und anderem Untersuchungsmaterial.

MRS-Nährboden

(*Lactobacillus*-Agar nach de Man, Rogosa und Sharpe)

Art.-Nr. CM 361

Der Nährboden entspricht der DIN 10109¹.

Typische Zusammensetzung	(g/l)
Pepton	10,0
Fleischextrakt 'Lab-Lemco'	8,0
Hefeextrakt	4,0
Glucose	20,0
'Tween' 80	1 ml
Dikaliumhydrogenphosphat	2,0
Natriumacetat	5,0
Triammoniumcitrat	2,0
Magnesiumsulfat	0,2
Mangan(II)-sulfat	0,05
Agar	10,0
pH 6,2 ± 0,2	

MRS-Bouillon

(*Lactobacillus*-Bouillon nach de Man, Rogosa und Sharpe)

Art.-Nr. CM 359

Typische Zusammensetzung	(g/l)
Pepton	10,0
Fleischextrakt 'Lab-Lemco'	8,0
Hefeextrakt	4,0
Glucose	20,0
'Tween' 80	1 ml
Dikaliumhydrogenphosphat	2,0
Natriumacetat	5,0
Triammoniumcitrat	2,0
Magnesiumsulfat	0,2
Mangan(II)-sulfat	0,05
pH 6,2 ± 0,2	

Zubereitung

MRS-Nährboden

62 g MRS-Nährboden in 1 l Aqua dest. suspendieren und bis zum vollständigen Lösen erhitzen. 15 Minuten bei 121°C autoklavieren.

MRS-Bouillon

52 g MRS-Bouillon in 1 l Aqua dest. unter Rühren bei 60°C bis zum vollständigen Lösen erhitzen. 15 Minuten bei 121°C autoklavieren.

Beschreibung

De Man, Rogosa und Sharpe² entwickelten den MRS-Nährboden, um den in seinen Bestandteilen variablen Tomatensaft als Nährboden zu ersetzen und das Wachstum aller *Lactobacillen*, besonders der Stämme, die auf anderen Nährböden schlecht wachsen, zu fördern.

MRS-Nährboden ist leistungsfähiger als der Tomatensaft-Agar nach Briggs³ und der Fleischextrakt-Tomatensaft-Agar nach de Man. Auf MRS-Nährboden zeigen alle *Lactobacillus* spp. stärkeres Wachstum, speziell die schwer züchtbaren *L. brevis* und *L. fermentii*.

Die MRS-Nährböden fördern das Wachstum aller Bakterien, die Milchsäure in nennenswerten Mengen bilden können. Dazu gehören Bakterien folgender Gattungen: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* und *Leuconostoc*. Sie sind grampositiv, Katalase- sowie Oxidase-negativ und stellen hohe Nährstoffansprüche; ihr Wachstum wird durch mikroaerophile Bedingungen gefördert.

Eine Selektion kann über den pH-Wert erfolgen: *Lactobacillus* verträgt einen niedrigeren pH-Wert als Streptokokken (pH 5,0-6,5), während *Pediokokken* und *Leuconostoc* innerhalb dieser pH-Spanne am besten wachsen. Die Hauptgruppen der Begleitflora können durch Thalliumacetat, Natriumacetat, Sorbinsäure, Essigsäure, Natriumnitrit, Cycloheximid und Polymyxin B gehemmt werden. Diese Substanzen können in verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen eingesetzt werden; zwangsläufig ist auch hier der Kompromiß zwischen Selektivität und Wachstum der Keime zu finden⁴.

Ein MRS-Nährboden wurde auch mit Zusatz von Sorbinsäure^{4,5} beschrieben: Es wurde 0,14% (w/v) Sorbinsäure (entspricht 0,2% (w/v) Kaliumsorbat) zugefügt und der pH-Wert auf 5,7 gesenkt, was für die Verwendung nach DIN 101091 vorgeschrieben ist.

Milchsäurebakterien sind mikroaerophil und benötigen für eine aerobe Kultivierung auf festen Nährböden generell dicker gegossene Platten. Kolonien im Nährboden bzw. auf der Oberfläche können kompakt oder federig wachsen und sind klein, opak und weiß.

Kulturverfahren

1. Untersuchungsmaterial in 0,25%iger Ringer-Lösung (OXOID, Art.-Nr. BR 52) oder Kochsalz-Pepton-Lösung (Maximal-Wiederbelebungslösung, OXOID Art.-Nr. CM 733) verdünnen, weitere Verdünnungen in MRS-Bouillon herstellen.
2. Jeweils 1 ml der Verdünnungen in Petrischalen pipetieren und flüssigen, auf 45°C abgekühlten MRS-Nährboden zugeben. Gut mischen und erstarren lassen. Danach mit unbeimpftem MRS-Nährboden überschichten (Overlayer-Technik).
3. Platten wie unten beschrieben bebrüten. Die Oberfläche der Platten darf nicht austrocknen, da die Konzentration an Acetat dann zunimmt und das Wachstum der *Lactobacillen* hemmt.

Bebrütung

Thermophile Keime: 2 Tage bei 42°C

Mesophile Keime: 2 Tage bei 36°C

Mesophile bis

psychrophile Keime: 2 Tage bei 30°C,
1 Tag bei 22°C

Psychrophile Keime: 3 Tage bei 25°C

Unter anaeroben oder mikroaerophilen Bedingungen bebrüten.

Wurde die Overlayer-Technik nicht angewandt, sollte das OXOID CampyGen (Art.-Nr. CN 25 bzw. CN 35) für die Schaffung einer mikroaerophilen Atmosphäre (6% O₂, 14% CO₂) bzw. das OXOID AnaeroGen (Art.-Nr. AN 25 bzw. AN 35) für eine anaerobe Atmosphäre (10% CO₂) verwendet werden. Sie sind jeweils im OXOID Anaerobiertopf (Art.-Nr. AG 25 bzw. HP 11) einzusetzen.

MRS-Nährboden und -Bouillon sind selektiv für Lactobacillen; es können allerdings auch *Leuconostoc* und *Pediococcus* wachsen.

Auf MRS-Nährboden einzeln gewachsene Kolonien auswählen und mikroskopisch begutachten, um vermutliche Lactobacillus-Kolonien zu identifizieren. Diese Kolonien in MRS-Bouillon subkultivieren.

Der Vorteil von MRS-Bouillon gegenüber einer nicht-selektiven Bouillon liegt dabei darin, daß andere Keime, die zuvor durch ihre Position unter der Originalkolonie am Wachstum gehindert wurden, sich auch hier nicht vermehren können. Die MRS-Bouillon ist wie der MRS-Nährboden zu bebrüten. Danach sollte mikroskopisch begutachtet und auf MRS-Nährboden weiter subkultiviert werden, um die Keime zu bestätigen und die Spezies zu identifizieren.

In MRS-Bouillon können zur Identifizierung von Lactobacillen weitere Testungen durchgeführt werden: wie z.B. Temperaturabhängigkeit, Wachstum in 4% NaCl, Wachstum in 0,4% Teepol (siehe auch Sharpe, Fryer und Smith⁶).

Lagerung und Haltbarkeit

Trockennährboden:

Fest verschlossen, lichtgeschützt, 10-25°C.

Haltbarkeit: siehe Etikett.

Qualitätskontrolle

Positivkontrolle

Lactobacillus acidophilus ATCC 19992

Negativkontrolle

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Literatur

1. DIN 10109: "Mikrobiologische Untersuchung von Fleisch und Fleischerzeugnissen. Bestimmung von aerob wachsenden Milchsäurebakterien. Spatelverfahren (Referenzverfahren)."
2. Man, J.C., de Rogosa, M. und Sharpe, M. Elisabeth (1960) Appl. Bacteriol. 23, 130-135.
3. Briggs, M. (1953) J. Dairy Res. 20, 36-40.
4. Reuter, G. (1985) Intern. J. Food Microbiol. 2, 55-68.
5. ISO/TC 34/SC 6/WG 15, Nr. 3 und 5 (1984) "Enumeration of Lactobacteriaceae in meat and meat products".
6. Sharpe, M. Elisabeth, Fryer, T.F. und Smith, D.G. (1966) "Identification method for microbiologists Part A". Gibbs, B.M. und Skinner, F.A. (Hrsg.) Academic Press, London, S. 65-79.