

Leitfaden für Mikrobiologisches Qualitätsmanagement (MQM) kosmetischer Mittel

1. Einleitung

Der Leitfaden enthält Anregungen und Vorschläge, die dazu beitragen sollen, bei der Herstellung, Entwicklung und Prüfung kosmetischer Mittel eine gleichmäßige Produktqualität zu erzielen. Diese Leitlinien sollten jedoch nicht als endgültig betrachtet werden. Viele Hersteller haben möglicherweise andere, gleichermaßen wirksame Methoden entwickelt, mit denen ähnliche Ergebnisse wie mit den in diesem Leitfaden empfohlenen Methoden erzielt werden können.

Durch das mikrobiologische Qualitätsmanagement (MQM) soll erreicht werden, daß Hersteller von kosmetischen Mitteln nur solche Erzeugnisse produzieren, die vorgegebenen Spezifikationen entsprechen und daher für den Verbraucher in mikrobiologischer Hinsicht sicher sind.

Eine MQM-Strategie umfaßt sowohl Produktentwicklung zur Gewährleistung der Sicherheit der Kunden, Qualitätsmanagement bezogen auf den Lieferanten sowie die Beachtung von Kosmetik-GMP bei der Produktion. Dadurch kann der Entstehung von Problemen mikrobiologischer Art vorgebeugt werden. Eine wesentliche Voraussetzung für die Durchführung eines wirksamen MQM sind eine Erziehung zu mikrobiologischem Bewußtsein und Ausbildungsprogramme für Mitarbeiter auf allen Ebenen.

2. Produktentwicklung

2.1 Produktkonservierung

Konservierungsstoffe dienen dem Schutz des Verbrauchers und verhindern, daß das Erzeugnis bei bestimmungsgemäßem und vorhersehbarem Gebrauch verdirbt; sie sollen jedoch nicht an die Stelle einer gewissenhaften Produktionshygiene treten. Verunreinigungen durch Mikroorganismen während der Produktion werden dadurch vermieden, daß ihre Ursachen erkannt und beseitigt werden.

Es muß hervorgehoben werden, daß Konservierungsstoffe nicht nur aufgrund theoretischer Erwägungen ausgewählt werden können. Ihre Wirksamkeit muß in situ durch mikrobiologische Belastungstests während der Produktentwicklung bestimmt werden.

2.2 Entwicklung geeigneter Rezepturen

Rezepturen sollten so entwickelt werden, daß das Wachstum von Mikroorganismen nicht möglich ist. Gleichzeitig soll die Verwendung von Konservierungsstoffen auf ein Minimum beschränkt werden. Erweist sich jedoch die Verwendung von Konservierungsstoffen als notwendig, sollten sie bereits im Anfangsstadium der Produktentwicklung als integraler Bestandteil der Rezeptur behandelt werden.

Wasser ist ein wesentlicher Bestandteil für das Wachstum von Mikroorganismen; Löslichkeit und Verteilungscharakteristik der Konservierungsstoffe sollten so beschaffen sein, daß sie in der wäßrigen Phase eines Mehrphasensystems in einer wirksamen Konzentration enthalten sind.

Ein Konservierungssystem muß in der verwendeten Konzentration gegen ein breites Spektrum von Mikroorganismen sicher sein. In vielen Fällen erweist sich eine Kombination verschiedener Konservierungsstoffe als wirksamer als der einzelne Stoff. Temperatur-, Licht- und Lagerbeständigkeit sind wichtige Faktoren. Das Konservierungssystem sollte in niedrigen Konzentrationen und beim pH-Wert der Rezeptur wirksam sowie mit anderen Bestandteilen des Erzeugnisses kompatibel sein.

Die Verpackung sollte so beschaffen sein, daß sie das Eindringen von Verunreinigungen verhindert und daß sich innen in der Verpackung kein Kondenswasser bildet, da dies das Wachstum von Mikroorganismen begünstigen kann. Eine mögliche Inaktivierung des Konservierungssystems durch das Behältnis oder Diffusion durch die Gefäßwand sind dabei zu berücksichtigen.

Werden biologisch leicht abbaubare Rohstoffe in einer Formulierung verwendet, ist eine Konservierung besonders wichtig, da diese Rohstoffe als Nährstoffe für zum Verderb führende Mikroorganismen dienen können.

Änderungen der Spezifikation von Inhaltsstoffen, die bei der Formulierung eines Fertigproduktes eingesetzt sind, können die Wirksamkeit der Konservierung beeinflussen. Daher sollte in diesen Fällen die Durchführung eines erneuten Belastungstests erwogen werden.

Bei der Herstellung bestimmter Erzeugnisse kann eine Vormischung erforderlich werden. Wäßrige Vormischungen sollten konserviert werden, bestimmten zeitlichen Regelungen der Lagerung unterliegen und regelmäßig überprüft werden. Die Anfälligkeit der Vormischung für mikrobielle Kontamination sollte durch Belastungstests ermittelt werden.

2.3 Belastungstests

Stellt sich heraus, daß ein Konservierungs-Belastungstest aus den unter 2.2 beschriebenen Überlegungen erforderlich ist, dann sollte die endgültige Formulierung in ihrer Originalverpackung von entsprechend qualifizierten Mitarbeitern einem Belastungstest unterzogen werden.

Die Probe wird mit verschiedenen relevanten Mikroorganismen wie Bakterien, Hefen und/oder Schimmelpilzen beimpft, von denen einige pathogen sein oder zum Verderb der Probe führen können. Anschließend wird das beimpfte Erzeugnis mehrfach und in verschiedenen Zeitabständen, so lange wie erforderlich, auf die Lebensfähigkeit der Mikroorganismen hin untersucht.

3. Rohstoffe

Rohstoffe können eine wesentliche Ursache für eine Endproduktkontamination durch Mikroorganismen sein. Daher sollte es das Ziel der Hersteller von Erzeugnissen und Rohstoffen sein, dafür zu sorgen, daß die Rohstoffe nur wenig mikrobiell belastet und frei von gesundheitsgefährdenden Mikroorganismen oder ihren Toxinen sind.

Wasser ist einer der wichtigsten Rohstoffe bei der Formulierung von kosmetischen Mitteln. Es kann unter Umständen mit einer großen Anzahl von Mikroorganismen belastet sein. Hierdurch kann die mikrobielle Stabilität der Endprodukte gefährdet werden. Daher ist zu gewährleisten, daß Wasser, welches als Bestandteil oder beim Herstellungsprozeß verwendet wird, regelmäßig überprüft und gegebenenfalls einer entsprechenden Behandlung unterzogen wird.

4. Überwachung und Bewertung von Bulk- und Endprodukten

4.1 Lagerung von Bulkware

Die Art der Lagerung richtet sich nach der Anfälligkeit des Erzeugnisses. Bulkware kann empfindlicher sein als verpackte Erzeugnisse.

4.2 Art der Probenahmen

Die Art und Weise der Probenahme sollte entsprechend der Konservierungsgüte, die durch den Belastungstest und die bisherige Erfahrung bestimmt wurde, erfolgen. Jedes neue Produkt sollte in der Anfangszeit mindestens drei Monate angemessen getestet werden, um das mikrobiologische Profil unter normalen Produktionsbedingungen zu bestimmen.

5. Gute Herstellungspraxis (GMP) - vgl. auch Seite 04/1

Gemäß der Kosmetik-Verordnung ist im Artikel 5c Absatz 1 die Herstellung gemäß Kosmetik-GMP vorgeschrieben. Der IKW hat einen Leitfadens zur Herstellung kosmetischer Mittel gemäß Kosmetik-GMP erarbeitet, der Hilfestellung bei der Einhaltung der Bestimmungen geben kann.

6. Dokumentation

Für alle Vorgänge bezüglich der mikrobiologischen Untersuchungen während der Entwicklung und Herstellung jedes Produktes und für alle Kontroll-Prozesse, die während der Herstellung angewandt werden, sollten geeignete Aufzeichnungen geführt werden.

7. Empfohlene mikrobiologische Grenzwerte und Methoden für Endprodukte

7.1 Allgemeiner Überblick

Die Hersteller müssen gemäß § 24 LMBG (Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz) gewährleisten, daß ihre Erzeugnisse im Rahmen der üblichen und vorhersehbaren Verwendung sicher sind. Auch ist die Frage der Haltbarkeit des kosmetischen Mittels zu berücksichtigen. So ist in § 5 Absatz 2 der Kosmetik-Verordnung vorgeschrieben, daß ein Mindesthaltbarkeitsdatum angegeben werden muß, wenn das Produkt eine Mindesthaltbarkeit von 30 Monaten oder weniger aufweist.

Die Planung und Durchführung der MQM-Prüfverfahren und die Auswertung der Ergebnisse erfordern spezifische Kenntnisse. Stehen innerhalb des Unternehmens keine geeigneten Personen zur Verfügung, können externe Sachverständige beauftragt werden.

Mikroorganismen in kosmetischen Mitteln können zum Verderb des Erzeugnisses führen und darüber hinaus für den Verbraucher gefährlich sein. Ihre Zahl muß daher begrenzt werden durch

- Anwendung einer guten Hygiene- und Herstellungspraxis,
- ausreichende Konservierung zur Vermeidung von mikrobiellem Wachstum;
- Anwendung mikrobiologischer Grenzwerte, die die Sicherheit der Erzeugnisse gewährleisten.

Bei der Durchführung der Einzeltests hat der Hersteller zu berücksichtigen, daß die Anzahl von Mikroorganismen ansteigend, gleichbleibend oder abnehmend sein kann. Durch Konservierung kann das Wachstum von Mikroorganismen eingeschränkt werden. Bei der Verwendung sind der erwartete Nutzen (mikrobieller Schutz) und eventuell für den Anwender entstehende Nachteile (z.B. Unverträglichkeiten) sorgfältig abzuwägen.

Die Methoden und Spezifikationen, die im folgenden beschrieben werden, sollen als Referenztests eingesetzt werden. Sie können auch als normale Qualitätskontrolltests oder zur Überprüfung der Spezifikationen verwendet werden. Dies ist aber nicht generell erforderlich. Die Unternehmen können auch weiterhin ihre eigenen, internen Kontrollspezifikationen und validierten Prüfmethode in Verbindung mit einem angemessenen mikrobiologischen Qualitätsmanagement einsetzen. Die Validierung der Methoden muß sichergestellt haben, daß die in diesem Leitfadens beschriebenen Kriterien erfüllt sind.

Die Spezifikation ist für Produkte in nicht geöffneter, intakter Originalverpackung bestimmt.

Die Testergebnisse sollten dokumentiert werden, wobei die folgenden Punkte enthalten sein sollten:

- Identifizierung der Proben
 - Produktart
 - Markenname
 - Hersteller
 - Chargennummer
 - Datum und Ort der Probenahme
 - Nachweismethoden und Lagerungsbedingungen

- Prüfbedingungen
 - Datum
 - Methode
 - Neutralisierungsmedium

- Prüfergebnisse und entsprechende Bewertung
- Prüfverantwortlicher.

7.2 Empfohlene Grenzwerte

7.2.1 Quantitative Spezifikation (Mindestprüfmenge: 1 g oder 1 ml)

a. Produkte für Säuglinge und Kleinkinder oder zur Anwendung im Bereich der Augen.

Gesamtlebendkeimzahl für aerobe mesophile Mikroorganismen: nicht mehr als 10^2 koloniebildende Einheiten pro Gramm bzw. Milliliter (KBE/g bzw. ml)

b. Sonstige Produkte

Gesamtlebendkeimzahl für aerobe mesophile Mikroorganismen: nicht mehr als 10^3 KBE/g oder ml.

Die Ergebnisse sind wie folgt zu interpretieren:

- i) 10^2 - höchstzulässiger Grenzwert ist 5×10^2
- ii) 10^3 - höchstzulässiger Grenzwert ist 5×10^3 .

7.2.2 Qualitative Spezifikation

Die gesundheitliche Sicherheit kosmetischer Mittel kann durch eine Vielzahl pathogener Erreger gefährdet werden. Zur orientierenden Beurteilung können die im folgenden beschriebenen Indikatorkeime gelten. Fallweise ist bei hinreichendem Verdacht auch auf weitere Pathogene zu prüfen.

Die folgenden spezifischen Mikroorganismen dürfen in einer Produktprobe von 0,1 g oder 0,1 ml nicht nachweisbar sein

- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Staphylococcus aureus*
- *Candida albicans*
- *Escherichia coli*.

7.2.3 Akzeptanzkriterien

Alle Proben müssen den Anforderungen der quantitativen und qualitativen Spezifikationen entsprechen.

7.3 Empfohlene Methoden zur mikrobiologischen Prüfung von kosmetischen Mitteln

Die Ermittlung der Gesamtlebendkeimzahl für mesophile Mikroorganismen sollte auf der Grundlage der folgenden Faktoren durchgeführt werden:

- Es sollte verhindert werden, daß das Produkt im Verlauf der Prüfung mit Mikroorganismen kontaminiert wird, die zu falsch-positiven Ergebnissen führen;
- die Aufhebung von antimikrobiellen Eigenschaften des Produkts im Rahmen der Analyse sollte durch Verdünnung, Neutralisierung oder Filtrierung erfolgen;
- die Bewertung der Gesamtlebendkeimzahl aerober mesophiler Mikroorganismen wird mit Hilfe der Gußplattentechnik, der Oberflächenplattentechnik oder der Filtrierung durchgeführt. Anreicherungsverfahren sind nicht erforderlich.
- Die Ermittlung spezifischer Mikroorganismen erfolgt durch Verwendung selektiver Kulturverfahren.

7.3.1 Materialien und Reagenzien

a. Kulturmedien und Reagenzien

Siehe Anhang

b. Probenvorbereitung

Die mikrobiologische Untersuchung sollte mit einer Probe von mindestens 1 g oder 1 ml durchgeführt werden.

Bei Produkten, deren Gewicht weniger als 1 g beträgt, sollen mehrere Proben zusammengetragen werden, um 1 g oder 1 ml zu erhalten.

1 g oder 1 ml des Produkts sind in einem validierten Neutralisierungsverdünnungsmittel aufzulösen oder zu verdünnen, um ein Verdünnungsverhältnis von 1 zu 10 zu erhalten. Bei schlecht benetzbaren Stoffen kann ein geeignetes Tensid, wie etwa 0,1% m/V (Masse/Volumen) Polysorbat 80 zugegeben werden.

Falls erforderlich, können nachfolgend Dezimalverdünnungen aus der Stammlösung hergestellt werden, unter Verwendung des gleichen Verdünnungsmittels, um das Zählen zu erleichtern (optimale Koloniezahl zwischen 10 und 100).

7.3.2 Bewertung der Gesamtlebendkeimzahl aerober mesophiler Mikroorganismen

a. Membranfiltration

Es werden Filtermembranen mit einer Porengröße von weniger als 0,45 µm mit erwiesenermaßen wirkungsvollem Rückhaltevermögen verwendet (gegebenenfalls Lösungsmittelbeständigkeit prüfen). Die weiter unten beschriebene Methode geht davon aus, daß Membranen mit einem Durchmesser von etwa 50 mm verwendet werden.

Die Menge, die 0,1 g des zu prüfenden Produktes entspricht, wird auf jeder Membran aufgegeben und unverzüglich filtriert. Ein nachfolgendes Spülen mit einer sterilen Waschlösung kann von Vorteil sein, um die Organismen gleichmäßig zu verteilen.

Anschließend werden die Membranen auf die Oberfläche der geeigneten Agarmedien aufgebracht. Im Falle der Überprüfung auf Bakterien wird bei 30°C bis 35°C während drei Tagen inkubiert, zum Nachweis von Pilzen bei 20°C bis 25°C während 5 Tagen, es sei denn, daß eine zuverlässigere Zahl innerhalb einer kürzeren Zeit erreicht werden kann.

Die Anzahl der sich bildenden Kolonien wird ausgezählt und die Anzahl der Mikroorganismen pro Gramm oder pro Milliliter des zu untersuchenden Produkts berechnet.

b. Plattenzählmethode

In zwei Petrischalen mit einem Durchmesser von 9 bis 10 cm werden je 1 ml der vorbereiteten Probe, die 0,1 g des Produkts entspricht, und etwa 15 ml eines geeigneten geschmolzenen Agarmediums bei nicht mehr als 45°C aufgegeben. Die Probe wird gemischt und auf einer kühlen horizontalen Fläche bis zur Verfestigung aufbewahrt.

Alternativ kann das verdünnte Produkt (in der Regel 0,1 ml pro Platte, d.h. 0,01 g des Produkts) auf der Oberfläche der geeigneten verfestigten Medien in einer Petrischale mit einem Durchmesser von 9 bis 10 cm verteilt werden.

Die Platte zur Bestimmung von Bakterien wird bei 30 bis 35°C inkubiert, die Platte zur Bestimmung von Pilzen wird bei 20 bis 25°C 5 Tage lang inkubiert, es sei denn, daß eine zuverlässigere Zahl innerhalb eines kürzeren Zeitraums erhalten werden kann.

Die Anzahl der sich bildenden Kolonien wird ausgezählt, wobei das Ergebnis unter Verwendung von Platten mit den höchsten Koloniezahlen, aber nicht mehr als 300 Kolonien bei Bakterien und 100 Kolonien bei Pilzen, ermittelt wird.

c. Darstellung der Ergebnisse

Die Zahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) wird für jede Platte ermittelt und notiert. Die Gesamtzahl der KBE pro Platte wird berechnet und mit der Verdünnungsrate multipliziert, um das Ergebnis in KBE pro g oder ml des Produktes zu erhalten.

7.3.3 Nachweis spezifischer Organismen

a. Spezifische Mikroorganismen

- *Pseudomonas aeruginosa*

Auf Cetrimidmedium (siehe Anhang Nr. 4.) sind die typischen Kolonien von *Pseudomonas aeruginosa* flach, transparent und können ein gelbgrünes bis blaues Aussehen haben.

Mindestens die folgenden Bestätigungstests sollten durchgeführt werden:

- Gram-Färbung
- Oxidasetest
- Motilität
- Wachstum bei 42°C

Pseudomonas aeruginosa ist ein gramnegatives Stäbchen, beweglich, Oxidase (+) und wächst bei 42°C.

Hinweis: Weitere relevante Tests sollten zur Bestätigung der Identifizierungen verwendet werden.

Staphylococcus aureus

Auf Baird-Parker-Medium (siehe Anhang Nr. 5.) erscheinen typische Kolonien von *Staphylococcus aureus* schwarz, glänzend, konvex und müssen von einer klaren Zone umgeben sein, die aber teilweise trübe Bereiche aufweisen sein kann.

Mindestens die folgenden Bestätigungstests sind durchzuführen:

- Gram-Färbung
- Katalase-Test
- Koagulase-Test

Grampositive Kokken, Katalase (+), Koagulase (+) können als *Staphylococcus aureus* betrachtet werden.

Hinweis: Weitere relevante Tests sollten durchgeführt werden, um die Identifizierungen zu bestätigen.

- *Candida albicans*

Auf Sabouraud-Dextrose-Medium (siehe Anhang Nr. 3.) sehen typische Kolonien von *Candida albicans* weiß bis beige, cremefarben und konvex aus.

Mindestens die folgenden Bestätigungstests sind durchzuführen:

- Mikroskopische Untersuchung (Pseudomycel)
- Prüfung auf Bildung von Keimschläuchen
- Chlamydosporen-Bildung

Hefe, die einen Keimschlauch (+) aufweist und Chlamydosporen bildet, kann als *Candida albicans* betrachtet werden.

Hinweis: Weitere relevante Tests sollten durchgeführt werden, um die Identifizierungen zu bestätigen.

Escherichia Coli

Typische Kolonien von *Escherichia Coli* sind auf MacConkey Agar (Anhang Nr. 6.1) ziegel-rot (u.U. mit einem Hof ausgefallenen Gallensalzes) und auf EMB Agar (Anhang Nr. 6.2) metallisch glänzend (unter reflektierendem Licht) bzw. blau-schwarz (unter durchscheinendem Licht).

Als Bestätigungstests sollten mindestens die folgenden Prüfungen durchgeführt werden:

- Gram-Färbung
- Oxidase-Test
- Fermentation in EC Medium (Anhang Nr. 6.3) bei 45.5°C.
- Wachstum bei 42°C auf CASO-Agar (Anhang 2).

Escherichia Coli ist ein gramnegatives Stäbchen, Oxidase (-) und bei erhöhten Temperaturen wachsend (CASO-Agar).

Gasbildung im Fermentationstest.

b. Darstellung der Ergebnisse

Die Ergebnisse werden im Prüfbericht als Vorhandensein oder Nichtvorhandensein spezifischer Mikroorganismen (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* und *Escherichia Coli*) notiert.

ANHANG

Die folgenden Lösungen und Kulturmedien sollten für die Zwecke eingesetzt werden, für die sie vorgeschrieben sind.

1. Verdünnungsmittel

Gepufferte Natriumchloridpeptonlösung, pH-Wert 7.0.

Kaliumdihydrogenphosphat	3,56 g -> entspricht 0,067 M
Dinatriumhydrogenphosphatdehydrat	7,23 g
Natriumchlorid	4,30 g
Pepton (Fleisch oder Casein)	1,0 g
Demineralisiertes Wasser	1000 ml

Die Bestandteile in Wasser lösen, autoklavieren (15 Min. bei 121°C). Geeignete Neutralisierungsmittel können ggf. zugegeben werden, z.B. Polysorbat 20 oder 80, Lecithin, Thiosulfat.

2. Medium zum Nachweis der Bakterienzahl

Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar (CASO-Agar).

Pepton aus Casein	15,0 g/Liter
Pepton aus Sojamehl	5,0 g/Liter
Natriumchlorid	5,0 g/Liter
Agar-Agar	15,0 g/Liter
Demineralisiertes Wasser	ad 1.000 ml.

40 g/Liter CASO-Agar lösen, autoklavieren (15 Min. bei 121°C). Den pH-Wert so einstellen, daß er nach Sterilisation $7,3 \pm 0,2$ bei 25°C beträgt.

Beide Nährböden sind nach gebrauchsfertiger Zubereitung klar und gelblich.

3. Medium für den Nachweis der Pilzzahl im allgemeinen und den Nachweis von *Candida Albicans*

Sabouraud 4%-Dextrose-Agar.

Peptone	10,0 g/Liter
D(+)-Glucose	40,0 g/Liter
Agar-Agar	15,0 g/Liter
Demineralisiertes Wasser	ad 1.000 ml.

65 g/Liter lösen, autoklavieren (15 Min. bei 121°C). Nicht überhitzen. Den pH-Wert so einstellen, daß er nach Sterilisation $5,6 \pm 0,2$ bei 25°C beträgt.

Die Nährbodenplatten sind klar und gelblich bzw. gelblich braun.

4. Medium für den Nachweis von Pseudomonas Aeruginosa

Cetrimid-Agar (Pseudomonas-Selektivagar).

Pepton aus Gelatine	20,0 g/Liter
Magnesiumchlorid	1,4 g/Liter
Kaliumsulfat	10,0 g/Liter
N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid (Cetrimid)	0,3 g/Liter
Agar-Agar	13,0 g/Liter
Demineralisiertes Wasser	ad 1.000 ml
zusätzlich:	
Glycerin	10 ml.

44,5 g/Liter lösen, 10 ml/Liter Glycerin zugeben, autoklavieren (15 Min. bei 121°C), Platten gießen. Den pH-Wert so einstellen, daß er nach Sterilisation $7,2 \pm 0,2$ bei 25°C beträgt.

Die Nährbodenplatten sind trübe und hellgelb.

5. Medium für den Nachweis von Staphylococcus Aureus

Baird-Parker Agar.

Pepton aus Casein	10,0 g/Liter
Fleischextrakt	5,0 g/Liter
Hefeextrakt	1,0 g/Liter
Natriumpyruvat	10,0 g/Liter
Glycin	12,0 g/Liter
Lithiumchlorid	5,0 g/Liter
Agar-Agar	15,0 g/Liter
Demineralisiertes Wasser	ad 1.000 ml
zusätzlich:	
Eigelb-Tellurit-Emulsion	50 ml.

58 g in 0,95 Liter lösen, autoklavieren (15 Min. bei 121°C), auf 50-45°C abkühlen, 50 ml Eigelb-Tellurit-Emulsion einmischen. Platten gießen. Den pH-Wert so einstellen, daß er nach Sterilisation $6,8 \pm 0,2$ bei 25°C beträgt.

Die Nährbodenplatten weisen eine gleichmäßige weißliche Trübung auf.

6. Medien für den Nachweis von Escherichia Coli

6.1 MacConkey Agar

Pepton aus Casein	17,0 g/Liter
Pepton aus Fleisch	3,0 g/Liter
Natriumchlorid	5,0 g/Liter
Lactose	10,0 g/Liter
Gallesalzmischung	1,5 g/Liter
Neutralrot	0,03 g/Liter
Kristallviolett	0,001 g/Liter
Agar-Agar	13,5 g/Liter
Demineralisiertes Wasser	ad 1.000 ml

50 g/Liter lösen, autoklavieren (15 Min. bei 121°C). Den pH-Wert so einstellen, daß er nach Sterilisation $7,1 \pm 0,2$ bei 25°C beträgt.

Die Nährbodenplatten sind klar und rotbraun.

6.2 EMB Agar (Eosin-Methylenblau-Lactose-Saccharose Agar)

Peptone	10 g/Liter
Dikaliumhydrogenphosphat	2,0 g/Liter
Lactose	5,0 g/Liter
Saccharose	5,0 g/Liter
Eosin gelblich	0,4 g/Liter
Methylenblau	0,07 g/Liter
Agar-Agar	13,5 g/Liter
Demineralisiertes Wasser	ad 1.000 ml

36 g/Liter lösen, autoklavieren (15 Min. bei 121°C). Den pH-Wert so einstellen, daß er nach Sterilisation $7,1 \pm 0,2$ bei 25°C beträgt.

Die Nährbodenplatten sind klar und gelblich.

6.3 EC-Bouillon

Pepton aus Casein	20,0 g/Liter
Lactose	5,0 g/Liter
Gallesatzmischung	1,5 g/Liter
Natriumchlorid	5,0 g/Liter
Dikaliumhydrogenphosphat	4,0 g/Liter
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g/Liter

37 g/Liter lösen, autoklavieren (15 Min. bei 121°C). Den pH-Wert so einstellen, daß er nach Sterilisation $6,9 \pm 0,2$ bei 25°C beträgt.

Die Bouillon ist klar und gelblich.