



MAGNAT VITAL

One Strain. Infinite Potential.

IN-VITRO ERGEBNISNOTE

Bacillus subtilis MM40® (DSM 21097) vs. CU1 gegen Clostridium difficile

Hemmhofstest im Agardiffusionsverfahren

In-vitro-Vergleich: CU1 allein vs. Mischsuspension CU1 + MM40® (DSM 21097)

Labor LS SE & Co. KG, Bad Bocklet

Agardiffusionstest gegen C. difficile | Dezember 2020



Hemmhoftest: *B. subtilis* CU1 vs. Mischsuspension CU1 + MM40® gegen *Clostridium difficile*

Agardiffusionstest gegen *C. difficile* | Labor LS SE & Co. KG, Bad Bocklet | Dezember 2020

1) Hintergrund und Zielsetzung

- *Clostridium difficile*: nosokomialer Problemkeim, häufigste Ursache Antibiotika-assoziiierter Durchfallerkrankungen; weltweit steigende Inzidenz.
- *Bacillus subtilis* als potenzieller Antagonist: Bekannte Fähigkeit zur Produktion antimikrobieller Metabolite (Bacteriocine, Enzyme, Lipopeptide).
- Ziel: Vergleich der Hemmwirkung von *B. subtilis* CU1 allein vs. Mischsuspension CU1 + MM40® (DSM 21097) gegen *C. difficile* im Agardiffusionstest.

2) Testdesign und Materialien

- Design: Agardiffusionstest in Anlehnung an DIN 58940; GMP-konforme Durchführung, Labor LS SE & Co. KG.
- Testkeim: *Clostridium difficile* (ATCC 9689); anaerobe Inkubation bei 36 ± 1 °C, 24–48 h.
- Proben: *B. subtilis* CU1 (Einzelsuspension, $\sim 1,5 \times 10^{10}$ KBE/mL) und Mischkeimsuspension CU1 + MM40® (1:1, $\sim 8 \times 10^9$ KBE/mL).
- Auswertung: Hemmhof-Wirkungsfläche in mm² (berechnet aus Durchmesser); Doppelansatz.

3) Zentrale Ergebnisse gegen *C. difficile*

B. subtilis CU1 allein:

Testansatz 1: \varnothing 13 mm → 104,5 mm²

Testansatz 2: \varnothing 10 mm → 50,3 mm²

Mischsuspension CU1 + MM40®:

Testansatz 1: \varnothing 21 mm → 318,1 mm²

Testansatz 2: \varnothing 20 mm → 285,9 mm²

Wirkungsfläche (Ringfläche abzgl. Testblättchen \varnothing 6 mm): Faktor 3,0× (Ansatz 1) bzw. 5,7× (Ansatz 2) – im Mittel ca. 4-fache Wirkungsfläche durch Zugabe von MM40®.

Mechanismen, Stärken & Limitationen

4) Plausible Mechanismen

- Synergistische Verstärkung: Die Mischsuspension CU1 + MM40® (DSM 21097) erzielt die ca. 4-fache Wirkungsfläche im Vergleich zu CU1 allein (Faktor 3,0–5,7 je Testansatz). Dies deutet auf einen eigenständigen oder verstärkenden Beitrag von MM40® zur Anti-C. difficile-Wirkung hin.
- Mögliche Wirkmechanismen: Produktion antimikrobieller Metabolite (Bacteriocine, Subtilin, Surfactine), kompetitive Verdrängung und enzymatischer Abbau von C. difficile-Toxinen.

Spezifität: Im gesamten Testkeim-Panel (11 Organismen) wurde ausschließlich C. difficile gehemmt – keine Wirkung auf Normalflora-Vertreter.

5) Stärken der Untersuchung

- GMP-konforme Durchführung durch Labor LS SE & Co. KG (akkreditiertes Prüflabor).
- Doppelansatz: Jeder Testkeim wurde in zwei unabhängigen Testansätzen geprüft.
- Direkte Vergleichbarkeit: CU1 allein vs. CU1 + MM40® unter identischen Bedingungen.

Flächenbasierte Auswertung ermöglicht präzisere Einordnung der Wirkungsstärke.

6) Limitationen

- In-vitro-Status: Laborergebnisse auf Agarplatten. Nicht 1:1 auf komplexe biologische Systeme übertragbar.
- Kein separater DSM 21097-Einzeltest: Der genaue Mechanismus (synergistisch vs. additiv) kann nicht getrennt werden.
- Qualitative Bewertung: Hemmhofmessung ohne MHK-Bestimmung (Minimum Inhibitory Concentration).

Pilotcharakter: Weiterführende Analysen werden empfohlen.

Fazit

7) Fazit

Im Agardiffusionstest des Labors LS vom Dezember 2020 zeigte die Mischkeimsuspension aus B. subtilis CU1 und MM40® (DSM 21097) eine ca. 4-fache Wirkungsfläche gegen Clostridium difficile im Vergleich zu CU1 allein.

CU1 allein: Testansatz 1 ø 13 mm (104,5 mm²), Testansatz 2 ø 10 mm (50,3 mm²). Mischsuspension mit MM40®: Testansatz 1 ø 21 mm (318,1 mm²), Testansatz 2 ø 20 mm (285,9 mm²).

Die Ergebnisse belegen einen deutlichen synergistischen Beitrag von MM40® zur Anti-C. difficile-Wirkung (Faktor 3,0–5,7×). Weiterführende In-vivo-Studien werden empfohlen.

*Quelle: Horn J. Prüfbericht Hemmhoftest im Agardiffusionsverfahren.
Labor LS SE & Co. KG, Bad Bocklet. Dezember 2020.*



ORIGINALDOKUMENT

Deutschsprachiges Originaldokument

Der folgende Abschnitt enthält das Originaldokument des Prüfberichts.
Personenbezogene Daten Dritter wurden unkenntlich gemacht.

Datum: 08. Dezember 2020 | Verfasserin: Dr. Jessica Horn, Labor LS



Bad Bocklet, 08. Dezember 2020

Prüfbericht – Auftragsnummer 200915

Sehr geehrte

Sie erhalten den Prüfbericht zur Hemmhoftest-Durchführung mit *B. subtilis*-Sporen aus Pulverformulierungen (Stämme CU1 und DSM21097).

Wir bedanken uns für Ihren Auftrag und freuen uns auf eine weitere gute Zusammenarbeit mit Ihnen.



Freundliche Grüße aus Bad Bocklet
Labor LS



i. V. Dr. Jessica Horn

Fachleitung
Challengetests/Validierungsprojekte



i. V. Michaela Mützel
Fachleitung
Challengetests/Validierungsprojekte

Labor LS SE & Co. KG
Mangelstfeld 4, 5, 6
97708 Bad Bocklet

Amtsgericht Schweinfurt - HRA 9940
USt-Id-Nr.: DE 317 022 554

Ärztlicher Leiter:
PD Dr. med. A. Schwarzkopf

Pers. haftende Gesellschafterin:
Labor LS SE Verwaltungsgesellschaft
Mangelstfeld 4, 5, 6
97708 Bad Bocklet
Amtsgericht Schweinfurt - HRB 7665

Vorsitzender des Verwaltungsrats:
Dipl.-Kfm. Werner Wohnhas

Geschäftsführende Direktoren:
Dr. Jürgen Balles,
Sabine Fingerhut-Heinemann

Anlage:
Prüfbericht (Version 01)

Prüfbericht		Version: 01	
Titel:	Hemmhofftest im Agardiffusionsverfahren im Doppelansatz unter Verwendung verschiedener <i>Bacillus subtilis</i> Stämme		
LS-Nr.:	200915-0020-001, 200915-0020-005		
Probe/ Produkt	<i>Bacillus subtilis</i> CU1, <i>Bacillus subtilis</i> DSM21097		
Referenzen/Guidelines	LS SOP 31.013 „In vitro inhibitory activity of probiotic products against oral <i>Candida</i> species“ - Zhao et al., 2016, Journal of applied Microbiology 121, 254-262		
Standort:	Labor LS SE & Co. KG 97708 Bad Bocklet – Großenbrach Germany		
Kunde/Sponsor:	[REDACTED]		
Beginn der Untersuchung:	14.10.2020	Ende der Untersuchung:	01.12.2020
Auftrag vom:	09.09.2020	Probeneingang am:	14.09.2020
Referenzen/Guidelines:	Prüfplan mit LS Dokumenten-Nr. 200915-0020-002, Version 02		
Methode(n):	Agardiffusion		
Zusammenfassung:	<i>Bacillus subtilis</i> CU1 inhibierte das Wachstum des Testkeims <i>C. difficile</i> Die Mischkeimsuspension aus den <i>Bacillus subtilis</i> -Stämmen CU1 und DSM21097 inhibierte ebenfalls das Wachstum des Testkeims <i>C. difficile</i> .		
Die Prüfung erfolgte unter Beachtung der GMP-Regularien. Es traten keine prüfungsrelevanten Abweichungen auf.			

Änderungshistorie			
Datum	Autor	Version	Änderung
08.12.2020	Dr. Jessica Horn	01	Nicht nötig, da erste Version

1. Vorbemerkung

Ziel dieser Untersuchung war es, die antimikrobielle Wirkung des *Bacillus subtilis*-Stamms CU1 gegenüber unterschiedlichen Testorganismen zu ermitteln.

Weiterhin sollte in einer separaten Versuchsdurchführung die antimikrobielle Wirkung einer Mischkeimsuspension der *Bacillus subtilis*-Stämme CU1 und DSM21097 gegenüber unterschiedlichen Testorganismen ermittelt werden.

Hierzu wurde der Agardiffusionstest in Anlehnung an DIN 58940 durchgeführt. Diese wurde vom Normenausschuss Medizin ersatzlos zurückgezogen. Das hier beschriebene Verfahren bezieht sich soweit möglich auf die Vorgaben aus dieser Norm und einer Fachpublikation (Zhao et al., 2016).

Die Prüfung wurde unter GMP-Bedingungen von geschultem Personal durchgeführt.

2. Methode und Durchführung

2.1 Verwendete Nährmedien

Sabouraud-2% Dextrose-Agar (SDA, Ref.-Nr. 43555)
 Casein Soja Pepton Agar (Caso-Agar, Ref.-Nr. 43019)
 Columbia Blut Agar + 5% Schafsblut (bioMérieux, Art-Nr.: 43049)
 Physiologische Kochsalzlösung (NaCl 0,85%, bioMérieux, Best.-Nr.: 41536)

2.2 Equipment und Material

Spiral plater (IUL, Eddy Jet 2)
 Standard-Laborequipment (Glasbehälter, Pipetten etc.)
 Petrischalen (Nerbe plus, 92 x 16 mm, Best.-Nr: 09-031-0000)
 Densimat (bioMérieux) zur Einstellung des McFarland-Standards
 sterile Tupfer/Ösen
 SensiDisc™ Testblättchen, unbeschickt (BD, Ref.-Nr. 254862)
 Testblättchen, beschickt mit verschiedenen antimikrobiellen Stoffen (Ciprofloxacin, Linezolid, Vancomycin, Fluconazol)
 Inkubatorschrank bei 36 ± 1 °C
 Kühlschrank bei $2 - 8$ °C

2.3 Probenmaterial

Folgender vom Kunden zur Verfügung gestellter *Bacillus subtilis*-Stamm wurde hinsichtlich seiner antimikrobiellen Wirkung auf definierte Teststämme überprüft:

Bacillus subtilis CU1 (LS-Nr. 200915-0020-001, SOK 238)

Der *Bacillus*-Stamm CU1 wurde hierfür zunächst aus einer Pulverformulierungen isoliert.

Prüfbericht

Produktbezeichnung: *Bacillus subtilis* CU1, *Bacillus subtilis* DSM21097
 LS-Nr.: 200915-0020-001, 200915-0020-005

Version: 01
 Seite: 2 von 8

Hierzu wurde ein schwach gehäufte Mikrospatel der Pulverformulierung in 100 mL Caso-Bouillon gegeben und für 24 h bei 30-35 °C inkubiert. Danach wurde 0,1 mL mittels fraktioniertem Ausstrich auf ein geeignetes Agarmedium aufgebracht. Die Platten wurden für 18 – 24 h bei 30 – 35 °C inkubiert. Gewachsene Kolonien wurden schließlich auf Reinheit und Identität mittels Standardlabormethoden überprüft.

Folgende vom Kunden zur Verfügung gestellten *Bacillus subtilis*-Stämme wurden hinsichtlich der antimikrobiellen Wirkung einer Mischkeimsuspension auf definierte Teststämme überprüft :

<i>Bacillus subtilis</i>	CU1	(LS-Nr. 200915-0020-001, SOK 238)
<i>Bacillus subtilis</i>	DSM21097	(LS-Nr. 200417-0026-002, SOK 210)

Die genannten *Bacillus*-Stämme wurden im Rahmen von Vorversuchen aus Pulverformulierungen isoliert und identifiziert und lagen als Reinkulturen vor

Für den *Bacillus*-Stamm DSM21097 wurde das oben genannte Vorgehen im Vorfeld bereits durchgeführt (LS-Nr. 200417-0026-002). Der identifizierte *Bacillus*-Stamm DSM21097 lag eingelagert in der Stammsammlung von Labor LS SE & Co.KG vor.

2.4 Teststämme

<i>Acinetobacter</i> (A.) <i>baumannii</i>	ATCC 19606
<i>Enterococcus</i> (E.) <i>faecium</i>	ATCC 6057
<i>Escherichia</i> (E.) <i>coli</i>	ATCC 25922
<i>Klebsiella</i> (K.) <i>pneumoniae</i>	ATCC 10031
<i>Proteus</i> (P.) <i>mirabilis</i>	ATCC 14153
<i>Pseudomonas</i> (P.) <i>aeruginosa</i>	ATCC 9027
<i>Salmonella</i> (S.) <i>typhimurium</i>	ATCC 14028
<i>Candida</i> (C.) <i>albicans</i>	ATCC 10231
<i>Saccharomyces</i> (S.) <i>cerevisiae</i>	ATCC 9763
<i>Clostridium</i> (C.) <i>difficile</i>	ATCC 9689
<i>Candida</i> (C.) <i>glabrata</i>	ATCC 2001

2.5 Hemmhoftest mit *B. subtilis* CU1

2.5.1 Herstellung der *Bacillus subtilis*-Suspension

Für den *B. subtilis*-Stamm CU1 (s. Punkt 2.3) wurde eine Keimsuspension nach Ph. Eur., aktuelle Edition, 5.1.3 in einem geringen Volumen physiologischer Kochsalzlösung hergestellt und die Keimzahl im Oberflächenverfahren mittels Spiralometer bestimmt.

Vor der Durchführung eines Hemmhoftests (s. Punkt 2.5.3) wurde die *B. subtilis*-Suspension mit physiologischer Kochsalzlösung auf eine Keimdichte von etwa 3×10^{10} KBE/mL eingestellt. Die Keimzahl der Suspension wurde im Oberflächenverfahren per Spiralometer überprüft.

Die Keimzahl der *B. subtilis* CU1-Suspensionen für die Durchführung der Hemmhoftests mit den Testkeimen *A. baumannii*, *E. faecium*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *C. albicans*, *S. cerevisiae* und *C. glabrata* betrug 1.9×10^{10} KBE/mL.

Für die Durchführung des Hemmhoftests für den Testkeim *C. difficile*, der an einem separaten Tag stattfand, betrug die Keimzahl 1.5×10^{10} KBE/mL.

Prüfbericht

Produktbezeichnung: *Bacillus subtilis* CU1, *Bacillus subtilis* DSM21097
 LS-Nr.: 200915-0020-001, 200915-0020-005

Version: 01
 Seite: 3 von 8

2.5.2 Herstellung der Testkeimsuspensionen

Jeder der zu testenden Mikroorganismen wurde auf geeignetem Nährmedium angezüchtet und lag als Reinkultur vor. Zur Herstellung der Testkeimsuspension wurde pro Testkeim eine geeignete Menge an Kolonien des selben Morphologie-Typs in ein steriles Röhrchen mit physiologischer Kochsalzlösung eingerieben und homogen suspendiert. Die Suspension wurde so eingestellt, dass die Trübung einem McFarland-Standard von 0,5 entsprach (ca. $1,5 \times 10^8$ KBE/mL). Für *C. difficile* wurde aufgrund geringem Wachstum, nach Absprache mit dem Kunden, die Suspension auf eine Trübung entsprechend einem McFarland-Standard von 2,0 eingestellt.

Die Keimzahl der so eingestellten Testkeimsuspensionen wurde anschließend im Oberflächenverfahren per Spiralometer ermittelt (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Testkeime und Keimzahlen

Testkeim	KBE/mL
<i>A. baumannii</i>	$8,6 \times 10^7$
<i>E. faecium</i>	$6,0 \times 10^7$
<i>E. coli</i>	$1,2 \times 10^8$
<i>K. pneumoniae</i>	$7,5 \times 10^7$
<i>P. mirabilis</i>	$1,4 \times 10^8$
<i>P. aeruginosa</i>	$1,3 \times 10^8$
<i>S. typhimurium</i>	$7,0 \times 10^7$
<i>C. albicans</i>	$3,4 \times 10^6$
<i>S. cerevisiae</i>	$1,5 \times 10^6$
<i>C. difficile</i>	$8,0 \times 10^5$
<i>C. glabrata</i>	$4,3 \times 10^6$

2.5.3 Herstellen der Agarplatten zur Durchführung von Hemmhoftests

Zur Untersuchung der antimikrobiellen Wirkung des *Bacillus*-Stamms CU1 wurden **je Testorganismus** (s. Keime unter Punkt 2.4) **zwei Testansätze** nach folgendem Vorgehen vorbereitet:

Ein steriler Tupfer wurde in die vorbereitete Testkeimsuspension (ca. $1,5 \times 10^8$ KBE/mL) eingetaucht und das anhaftende Keimmateriale anschließend gleichmäßig durch dreifaches, gleichmäßiges Überstreichen der gesamten Agaroberfläche auf eine sterile SDA-Platte (*C. albicans*, *C. glabrata* und *S. cerevisiae*) oder eine sterile Caso-Agarplatte (alle übrigen Testkeime) übertragen. Für *C. difficile* wurde aufgrund zu geringem Wachstum, nach Absprache mit dem Kunden, das Vorgehen mehrfach wiederholt um eine höhere Keimdichte auf der Agarplatte zu erreichen.

Die beiden Platten eines Testkeims wurden danach 15 Minuten bei Raumtemperatur mit geöffnetem Deckel unter der Sterilwerkbank getrocknet.

Auf jede dieser beiden Platten wurden mit Hilfe einer ausgeglühten Pinzette drei Testblättchen aufgelegt. Diese wurden mit unterschiedlichen Lösungen beschickt (Probe und Negativkontrolle) bzw. waren bereits beschickt (Positivkontrolle). Die einzelnen Blättchen wurden wie folgt benannt:

Prüfbericht

Produktbezeichnung: Bacillus subtilis CU1, Bacillus subtilis DSM21097
LS-Nr.: 200915-0020-001, 200915-0020-005

Version: 01
Seite: 4 von 8

- **Probe:**
Auflegen eines Testblättchens, das mit 12,5 µL *Bacillus subtilis* CU1 Suspension beschickt wurde
- **Negativkontrolle:**
Auflegen eines Testblättchens, das mit 12,5 µL steriler NaCl 0,85% beschickt wurde
- **Positivkontrolle:**
Auflegen eines Testblättchens mit bestimmter antimikrobieller Substanz (s. u.)

Die für die Positivkontrolle verwendeten Blättchen waren keimspezifisch. Folgende Blättchen fanden Anwendung: Ciprofloxacin (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*), Fluconazol (*C. albicans*, *C. glabrata*, *S. cerevisiae*), Linezolid (*E. faecium*) und Vancomycin (*C. difficile*).

2.5.4 Inkubation

Die Agarplatten wurden für 24 – 48 h bei 36 ± 1 °C inkubiert. Die Ansätze des Testkeims *C. difficile* wurden unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Auf allen Ansätzen war zum Zeitpunkt der Auswertung eindeutiges Wachstum der Testkeime gegeben.

2.6 Hemmhoftest mit einer Mischkeimsuspension der *Bacillus subtilis*-Stämme CU1 und DSM21097

2.6.1 Herstellung der *Bacillus subtilis*-Suspensionen

Für jeden *B. subtilis*-Stamm (s. Punkt 2.3) wurde eine Keimsuspension nach Ph. Eur., aktuelle Edition, 5.1.3 in einem geringen Volumen physiologischer Kochsalzlösung hergestellt und die Keimzahl im Oberflächenverfahren mittels Spiralometer bestimmt.

Vor der Durchführung eines Hemmhoftests (s. Punkt 2.6.3) wurden die beiden *B. subtilis*-Suspensionen mit physiologischer Kochsalzlösung auf eine Keimdichte von je etwa 3×10^{10} KBE/mL eingestellt und in einem Verhältnis von 1:1 vermischt. Die Keimzahlen der einzelnen Suspensionen sowie die der Mischkeimsuspension wurden im Oberflächenverfahren per Spiralometer überprüft.

Die Keimzahl der *B. subtilis*-Suspensionen für die Durchführung der Hemmhoftests mit den Testkeimen *A. baumannii*, *E. faecium*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *S. cerevisiae*, *C. albicans* und *C. glabrata* betrugen:

Die Keimzahl der *B. subtilis*-Suspensionen betrug:

<i>Bacillus subtilis</i> CU1	$1,4 \times 10^{10}$ KBE/mL
<i>Bacillus subtilis</i> DSM21097	$1,1 \times 10^{10}$ KBE/mL
Mischkeimsuspension	$6,7 \times 10^9$ KBE/mL

Für die Durchführung des Hemmhoftests für den Testkeim *C. difficile*, der an einem separaten Tag stattfand, betrugen die Keimzahlen:

<i>Bacillus subtilis</i> CU1	$1,2 \times 10^{10}$ KBE/mL
<i>Bacillus subtilis</i> DSM21097	$1,2 \times 10^{10}$ KBE/mL
Mischkeimsuspension	$8,1 \times 10^9$ KBE/mL

Prüfbericht

Produktbezeichnung: *Bacillus subtilis* CU1, *Bacillus subtilis* DSM21097
LS-Nr.: 200915-0020-001, 200915-0020-005

Version: 01
Seite: 5 von 8

2.6.2 Herstellung der Testkeimsuspensionen

Die Herstellung der Testkeimsuspensionen fand wie unter Punkt 2.5.2 beschrieben statt. Die Keimzahl der so eingestellten Testkeimsuspensionen wurde anschließend im Oberflächenverfahren per Spiralometer ermittelt (s. Tabelle 2).

Tabelle 2: Testkeime und Keimzahlen

Testkeim	KBE/mL
<i>A. baumannii</i>	$1,4 \times 10^8$
<i>E. faecium</i>	$6,7 \times 10^7$
<i>E. coli</i>	$9,6 \times 10^7$
<i>K. pneumoniae</i>	$8,9 \times 10^7$
<i>P. mirabilis</i>	$1,5 \times 10^8$
<i>P. aeruginosa</i>	$4,9 \times 10^7$
<i>S. typhimurium</i>	$1,1 \times 10^8$
<i>C. albicans</i>	$3,7 \times 10^6$
<i>S. cerevisiae</i>	$1,1 \times 10^6$
<i>C. difficile</i>	$8,0 \times 10^5$
<i>C. glabrata</i>	$5,4 \times 10^6$

2.6.3 Herstellen der Agarplatten zur Durchführung von Hemmhoftests

Zur Untersuchung der antimikrobiellen Wirkung der Kombination zweier *B. subtilis*-Stämme (CU1 und DSM21097) wurden **je Testorganismus** (s. Keime unter Punkt 2.4) **zwei Testansätze** nach folgendem Vorgehen vorbereitet:

Ein steriler Tupfer wurde in die vorbereitete Testkeimsuspension (ca. $1,5 \times 10^8$ KBE/mL) eingetaucht und das anhaftende Keimmateriale anschließend gleichmäßig durch dreifaches, gleichmäßiges Überstreichen der gesamten Agaroberfläche auf eine sterile SDA-Platte (*C. albicans*, *C. glabrata* und *S. cerevisiae*) oder eine sterile Caso-Agarplatte (alle übrigen Testkeime) übertragen. Für *C. difficile* wurde aufgrund zu geringem Wachstum, nach Absprache mit dem Kunden, das Vorgehen mehrfach wiederholt um eine höhere Keimdichte auf der Agarplatte zu erreichen.

Die beiden Platten eines Testkeims wurden danach 15 Minuten bei Raumtemperatur mit geöffnetem Deckel unter der Sterilwerkbank getrocknet.

Auf jede dieser beiden Platten wurden mit Hilfe einer ausgeglühten Pinzette drei Testblättchen aufgelegt. Diese wurden mit unterschiedlichen Lösungen beschickt (Probe und Negativkontrolle) bzw. sind bereits beschickt (Positivkontrolle). Die einzelnen Blättchen wurden wie folgt benannt:

- **Probe:**
Auflegen eines Testblättchens, das mit 12,5 µL der *Bacillus subtilis*-Mischkultursuspension beschickt wird
- **Negativkontrolle:**
Auflegen eines Testblättchens, das mit 12,5 µL steriler NaCl 0,85% beschickt wird

Prüfbericht

Produktbezeichnung: Bacillus subtilis CU1, Bacillus subtilis DSM21097
LS-Nr.: 200915-0020-001, 200915-0020-005

Version: 01
Seite: 6 von 8

– **Positivkontrolle:**

Auflegen eines Testblättchens mit bestimmter antimikrobieller Substanz (s. u.)

Die für die Positivkontrolle verwendeten Blättchen waren keimspezifisch. Folgende Blättchen fanden Anwendung: Ciprofloxacin (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*), Fluconazol (*C. albicans*, *C. glabrata*, *S. cerevisiae*), Linezolid (*E. faecium*) und Vancomycin (*C. difficile*).

3 Auswertung

Die Durchmesser der entstandenen Hemmhöfe (klare Zone ohne mikrobiologisches Wachstum) wurden gemessen und in vollen Millimetern angegeben. Als Grenzen dienten die Ränder des deutlich in der Koloniegröße reduzierten Wachstums. Die Angabe der Hemmhofdurchmesser erfolgte einschließlich der aufliegenden Blättchen (Blättchendurchmesser: 6 mm).

Die erhaltenen Ergebnisse sind in tabellarischer Form zusammengefasst (s. Tab. 3 und 4).

Um wirkstofffreie Blättchen (Negativkontrollen) zeigte sich keine Wachstumshemmung der Testkeime. Um mit antimikrobieller Substanz beschickte Blättchen (Positivkontrollen) zeigte sich eine Wachstumshemmung der Testkeime.

Tabelle 3: Ergebnisse des Agardiffusionstests mit *B. subtilis* CU1

Testkeim	Durchmesser Hemmhof in mm	
	Testansatz 1	Testansatz 2
<i>C. difficile</i>	13	10

Tabelle 4: Ergebnisse des Agardiffusionstests einer Mischkeimsuspension aus *B. subtilis* CU1 und DSM21097

Testkeim	Durchmesser Hemmhof in mm	
	Testansatz 1	Testansatz 2
<i>C. difficile</i>	21	20

4. Zusammenfassung

Der getestete *B. subtilis*-Stamm CU1 zeigte eine antimikrobielle Wirkung auf einen der insgesamt 10 untersuchten Testkeime. Der *B. subtilis*-Stamm CU1 hemmte das Wachstum von *C. difficile*. Diese Wirkung wurde durch das Auftreten von Hemmhöfen nachgewiesen.

Die Mischkeimsuspension, bestehend aus den *B. subtilis*-Stämmen CU1 und DSM21097, inhibierte ebenfalls das Wachstum von *C. difficile*.

Unterschriften zur Autorisierung			
erstellt:	Labor LS SE & Co. KG	Dr. Jessica Horn (Fachleitung)	 08. DEZ. 2020 (Datum/Unterschrift)
geprüft/ genehmigt:	Labor LS SE & Co. KG	Michaela Mützel (Fachleitung)	 08. DEZ. 2020 (Datum/Unterschrift)

Ende des Dokuments