

Zum Nachweis und zur Keimzahlbestimmung von Enterokokken nach ISO 7899-2

Wirkungsweise

Der Nachweis von Enterokokken (vormals fäkale Streptokokken) dient als Indikator für fäkale Verunreinigungen ,speziell wenn die Kontamination längere Zeit zurückliegt und die weniger resistenten coliformen Keime , einschliesslich E.coli , vor der Untersuchung bereits abgestorben sind..

Der Galle Aesculin Azid Agar entspricht der ISO7899-2 und wird als Bestätigungs- und Keimzahlbestimmungs-Nährboden in Kombination mit dem Primärzuchtsubstrat Membranfilter Enterokokken Selektiv Agar nach Slanetz und Bartley (Merck Art.Nr. 1.05262.0500 oder 1.05289.0500) eingesetzt.

Enterokokken und einige Spezies des Genus *Streptococcus* , *S. bovis* und *S. equines* wachsen ebenfalls auf diesem Nährboden.

Spaltung von Aesculin und Galletoleranz werden als zuverlässige und konstante Merkmale von Enterokokken angesehen. (FACKLAM 1971, 1973). Enterokokken hydrolysieren ausserdem das Glycosid Aesculin in Glucose und Aesculetin. Letzteres bildet mit den Eisen(III)Ionen eine oliv-grünen bis schwarzen Komplex.

Enterokokken sind Galletolerant. Zahlreiche Begleitbakterien werden durch die Gallesalze im Wachstum gehemmt. Die Konzentration von Natriumazid im Nährboden hemmt weitgehend die Gram-negative Begleitflora ohne das Wachstum der Enterokokken zu beeinflussen.

Die Verwendung von Natriumazid als selektives Reagenz zur Unterdrückung Gram-negativer Bakterien wurde publiziert in Studien von EDWARDS (1933, 1938) und HARTMANN (1936) bei der Isolierung von *Str. agalactiae*. MALLMANN (1940) und SNYDER and LICHSTEIN (1940) zeigten, dass sich Natriumazid bei der Isolierung von Enterokokken aus Wasser bewährt hat.

Typische Zusammensetzung (g/Liter)

Peptone 3.0 , Pepton aus Casein 17.0 , Hefeextrakt 5.0; Natriumchlorid 5.0; Aesculin 1.0; Ammonium-Eisen(III)Citrat 0.5; Ochsen-galle 10.0; Natriumazid 0,15; Agar-Agar 13.0.

Zubereitung

54,65 g in 1 Liter Wasser durch Erhitzen im siedenden Wasserbad vollständig lösen; autoklavieren (15 Minuten bei 121°C). Nährboden auf 50°C abkühlen; Platten giessen mit einer Schichtdicke von 3-5 mm.

pH: 7.1 ± 0.2 bei 25 °C

Die Platten sind klar und gelblich.

Haltbarkeit der gegossenen Platten bei Lagerung im Kühlschrank (+ 2- +8 °C) : bis zu 2 Wochen.

Anwendung und Auswertung

Enterokokken wachsen auf dem Membranfilter Enterokokken Selektivagar nach Slanetz und Bartley (Art.Nr. 1.05262.0500 oder 1.05289.0500) als rot oder pink gefärbte Kolonien. Zur weiteren Identifizierung wird der Membranfilter mit Hilfe einer sterilen Pinzette - ohne den Membranfilter umzudrehen - auf die Nährbodenoberfläche des Galle Aesculin Azid Agars aufgelegt. Die Platten sind vor dem Auflegen des Filters auf 44°C vorzubebürsten. Danach wird der Galle Aesculin Azid Agar bei 44 ± 0,5 °C für 2 Stunden bebrütet.

Alle Kolonien, die eine typisch braun/schwarze Farbe aufweisen sind als positive Reaktion zu werten und werden als Enterokokken gezählt.

Qualitätskontrolle

Teststämme	Wiederfindungsrate (%)	Koloniefarbe
Enterococcus faecium ATCC 882	>60	schwarz
Enterococcus faecalis ATCC 19433	>70	schwarz
Enterococcus durans ATCC 6056	>50	schwarz
Enterococcus hirae ATCC 8043	>60	schwarz
Listeria monocytogenes ATCC 19118	<0,01	farblos
Staphylococcus aureus ATCC 25923	<0,01	farblos
Escherichia coli ATCC 25922	<0,01	farblos

Literatur

ISO INTERNATIONAL STANDARDISATION ORGANISATION WATER QUALITY DETECTION AND ENUMERATION OF INTESTINAL ENTEROCOCCI PART 2 MEMBRANE FILTRATION ISO 7899-2 2000.
EDWARDS, S.J.: Studies on bovine mastitis. IX. A selective medium for the diagnosis of Streptococcus mastitis. - **J. Comp. Path. Therap.** **46**; 211-217 (1933).
EDWARDS, S.J.: The diagnosis of Streptococcus mastitis by cultural methods. - **J. Comp. Path Therap.** **51**; 250-263 (1938).
FACKLAM, R.R., a. MOODY, M.: Presumptive identification of group D streptococci: the bile-esculin test. - **Appl. Microbiol.**, **20**; 245-250 (1970).
FACKLAM, R.R.: Recognition of group D streptococcal species of human origin by biochemical and physiological test. - **Appl. Microbiol.**, **23**; 1131-1139 (1972).
FACKLAM, R.R.: Comparison of several laboratory media for presumptive identification of enterococci and group D streptococci. - **Appl. Microbiol.**, **26**; 138-145 (1973).
HARTMANN, G.: Ein Beitrag zur Reinzüchtung von Mastitisstreptokokken aus verunreinigtem Material. - **Milchw. Forsch.**, **18**; 116-122 (1936).
LITSKY, W., MALLMANN, W.L., a. FIFIELD, C.W.: A new medium for the detection of enterococci in water. - **Amer. J. Publ. Hlth.**, **43**; 873-879 (1953).
MALLMANN, W.L.: A new yardstick for measuring sewage pollution. - **Sewage Works J.**, **12**; 875-878 (1940).
SNYDER, M.L., a. LICHSTEIN, H.C.: Sodium azide as an inhibiting substance for Gram-negative bacteria. - **J. Infect. Dis.**, **67**; 113-115 (1940).
Verordnung über Trinkwasser und über Wasser für Lebensmittelbetriebe (Trinkwasserverordnung) vom 22. Mai 1986. - **Bundesgesetzblatt**, Teil I, 760-773 (1986).
SWAN, A.: The use of bile-esculin medium and of Maxted's technique of LANCEFIELD grouping in the identification of enterococci. (Group D streptococci). - **J. Clin. Pathol.**, **7**; 160-163 (1954).