

Bacillus-Cereus- Selektivnährboden (PEMBA)

Zur Isolierung und Koloniezahlbestimmung von *Bacillus cereus*. Der Nährboden entspricht der DIN 10198-1¹ und dem §35 LMBG².

Bacillus-Cereus-Agar-Basis

Art.-Nr. CM 617

Typische Zusammensetzung	(g/l)
Pepton	1,0
Mannit	10,0
Natriumchlorid	2,0
Magnesiumsulfat	0,1
Dinatriumhydrogenphosphat	2,5
Kaliumdihydrogenphosphat	0,25
Bromthymolblau	0,12
Natriumpyruvat	10,0
Agar	14,0
pH	7,2 ± 0,2

Bacillus-Cereus-Selektiv- Supplement

Art.-Nr. SR 99

Zusammensetzung je Röhrchen (1 Röhrchen je 500 ml Nährboden)	
Polymyxin B	50000 IE

Zubereitung

20,5 g Bacillus-Cereus-Agar-Basis in 475 ml Aqua dest. suspendieren und vorsichtig bis zum vollständigen Lösen erhitzen. 15 Minuten bei 121°C autoklavieren und auf 50°C abkühlen. Den Inhalt eines Röhrchens Bacillus-Cereus-Selektiv-Supplement aseptisch in 2 ml sterilem Aqua dest. lösen. Den gelösten Inhalt und 25 ml Eigelb-Emulsion (OXOID, Art.-Nr. SR 47) aseptisch zu 475 ml abgekühlter Bacillus-Cereus-Agar-Basis geben, gut mischen und Platten gießen.

Beschreibung

Bacillus-Cereus-Selektivnährboden basiert auf dem hochspezifischen diagnostischen Selektivnährboden, der in der Literatur von Holbrook und Anderson³ als PEMBA-Medium zur Isolierung und Koloniezahlbestimmung von *Bacillus cereus* beschrieben wurde. Der Nährboden ist ausreichend selektiv, um selbst kleine Anzahlen von *Bacillus cereus*-Zellen und -Sporen in Anwesenheit anderer Kon-

taminanten in Lebensmitteln nachzuweisen. Die Bedeutung von *Bacillus cereus* als "Lebensmittelvergifter" durch Toxinbildung ist besonders für kontaminierten Reis gut belegt⁴⁻⁷. Bei Augeninfektionen^{8,9} und einer Reihe anderer Erkrankungen wie Abszeßbildung, Meningitis, Septikämie und Wundinfektionen ist *B. cereus* als Erreger nachgewiesen worden. Die Beteiligung von *B. cereus* bei schwerwiegenden klinischen Erscheinungsbildern ist durch Turnbull et al.¹⁰ zusammengefaßt worden. In der Veterinärmedizin ist der Keim als Krankheitsursache insbesondere von Mastitis bei Rindern und Färsen bekannt¹¹. In der Bacillus-Cereus-Agar-Basis sorgen ein Peptonanteil von 0,1% und der Zusatz von Natriumpyruvat für verbesserte Eigelb-Präzipitation und Sporenbildung. Der pH-Indikator Bromthymolblau zeigt Mannit-Verwertung an. Der Nährboden enthält nach Zusatz von Bacillus-Cereus-Selektiv-Supplement eine Endkonzentration von 100 IE Polymyxin B je ml. Polymyxin B wurde als selektives Agens zur Isolierung von *B. cereus* von Donovan¹² und Mosse¹³ empfohlen. Wird eine große Anzahl von Schimmelpilzen im Untersuchungsmaterial erwartet, sollte sterilfiltriertes Cycloheximid (Endkonzentration 40 µg/ml) zugefügt werden.

Die typischen Kolonien von *B. cereus* sind gezackt, etwa 5 mm groß, auffällig türkis bis pfauenblau gefärbt, umgeben von einer ausgeprägten Eigelb-Präzipitation mit gleicher Färbung.

Diese Merkmale unterscheiden *Bacillus cereus* von anderen Bacillus-Spezies außer von *Bacillus thuringiensis*. Andere Keime, die auf diesem Nährboden wachsen und Eigelb verwerten können, wie z.B. *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens* und *Proteus vulgaris*, sind aufgrund ihrer Kolonieform und -farbe von *Bacillus cereus* unterscheidbar. Diese Mikroorganismen können eine eigelbaufhellende Reaktion hervorrufen, die sich von der Eigelb-Präzipitation von *Bacillus cereus* deutlich unterscheidet.

Als schnelle und bestätigende Untersuchung auf *Bacillus cereus* wird die mikroskopische Überprüfung auf die Anwesenheit von Lipidtröpfchen in den vegetativen Zellen empfohlen, die eine weitere biochemische Differenzierung ersetzt. Holbrook und Anderson³ haben bestätigt, daß von allen *Bacillus* spp. nur *Bacillus cereus* während des Wachstums auf dem Selektivnährboden Lipidtröpfchen in den vegetativen Zellen einlagern kann. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, daß *Bacillus cereus*-Stämme, die nur eine schwache oder gar keine Eigelb-Präzipitation zeigen, leicht nachgewiesen und bestätigt werden können.

Die wesentlichen diagnostischen Merkmale des Bacillus-Cereus-Selektivnährbodens sind Kolonieformen, Präzipitation von hydrolisiertem Lecithin und fehlende Mannitverwertung durch *B. cereus*. Die diagnostischen Merkmale sind so eindeutig, daß *B. cereus* schnell identifiziert und durch mikroskopische Untersuchungen bestätigt werden kann.

Kulturverfahren

1. 10 g Untersuchungsmaterial 30 Sekunden in 90 ml 0,1%igem Peptonwasser (OXOID, Art.-Nr. CM 9) oder in Kochsalz-Pepton-Lösung¹ (Maximal-Wiederbelebungslösung, OXOID Art.-Nr. CM 733) im Stomacher homogenisieren. Getrocknete Lebensmittel sollten erst eingeweicht werden: 20 g Untersuchungsmaterial in 90 ml Caseinpepton-Salz-Lösung [0,3% Caseinpepton (OXOID, Art.-Nr. LP 42) und 0,8% Natriumchlorid, pH 7,3] 30 Minuten bei Raumtemperatur einweichen. Weitere 90 ml 0,1%iges Peptonwasser zufügen, um schließlich eine 10fache Verdünnung zu erreichen. 30 Sekunden in einem Stomacher homogenisieren.
2. Homogenisiertes Material in 0,1%igem Peptonwasser weiter verdünnen.
3. Die Oberfläche des Nährbodens mit jeweils 0,1 ml der Verdünnungsstufen (10^{-1} und höher) beimpfen.
4. Platten 24 Stunden bei 36°C bebrüten.
5. Platten auf typische Kolonien von *Bacillus cereus* untersuchen.
6. Platten weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahren, um alle *Bacillus cereus*-Kolonien nachzuweisen.
7. Verdächtige *B. cereus*-Kolonien durch das Schnellfärbverfahren nach Holbrook und Anderson (s. u.) bestätigen.
8. Die Ergebnisse in Anzahlen von *Bacillus cereus*-Kolonien je Gramm Untersuchungsmaterial angeben.

Der Nährboden kann ebenso zum Nachweis von *B. cereus* aus Milch verwendet werden. Wenn nötig, sollten die dezimalen Verdünnungsstufen des Untersuchungsmaterials in 0,1%igem Peptonwasser hergestellt werden. Die Platten mit unverdünnten und verdünnten Proben direkt beimpfen und bebrüten. Eine Bebrütungstemperatur von 30°C für 18 Stunden wird als optimal empfohlen, um das Wachstum von *B. cereus* gegenüber anderer Keime zu fördern.¹²

Zur Untersuchung von klinischem Material können die Platten in der üblichen Weise beimpft werden.

Koloniemorphologie

Bacillus cereus

Gezackte, etwa 5 mm große, auffällig türkis bis pfauenblau gefärbte Kolonien, die von einer ausgeprägten Eigelb-Präzipitation der gleichen Färbung umgeben sind.

Schnellfärbverfahren nach Holbrook und Anderson³

Diese Schnellfärbemethode kombiniert die Sporenfärbung von Ashby¹⁴ mit der intrazellulären Lipidfärbung von Burdon¹⁵.

1. Vom Zentrum einer eintägigen Kolonie oder vom Rand einer zweitägigen Kolonie Objektträgerpräparate herstellen.
2. Präparate lufttrocknen und hitzefixieren.
3. Objektträger über kochendes Wasser halten und mit 5%iger (w/v) Malachitgrün-Lösung überschwemmen.
4. Nach 2 Minuten abwaschen und den Objektträger mit Löschpapier trocknen.
5. 15 Minuten mit 0,3%iger (w/v) Sudanschwarz-Lösung in 70%igem Ethanol färben.
6. Objektträger 5 Sekunden mit Xylol waschen und anschließend mit Löschpapier trocknen.
7. Mit 0,5%iger (w/v) Safranin-Lösung 20 Sekunden lang gegenfärben.
8. Waschen und unter dem Mikroskop betrachten.

Charakteristisches Erscheinungsbild vegetativer Zellen von *Bacillus cereus* nach der Färbung

Die Zellen sind rechteckig, ca. 4-5 µm lang und 1-1,5 µm breit, die Ecken leicht abgerundet.

Die Sporen sind schwach- bis mittelgrün gefärbt und zentral oder parazentral angeordnet, ohne daß sie das Sporangium ausdehnen.

Die Lipidtröpfchen sind schwarz und das vegetative Zytoplasma ist rot gefärbt.

Dieses Erscheinungsbild zusammen mit der typischen Kolonieform bestätigt die Identifizierung von *B. cereus*.

Lagerung und Haltbarkeit

Trockennährboden:

Fest verschlossen, lichtgeschützt, 10-25°C.

Selektiv-Supplement: 2-8°C.

Eigelb-Emulsion: -20° bis +8°C.

Haltbarkeit: siehe Etikett.

Qualitätskontrolle

Positivkontrolle

Bacillus cereus ATCC 10876

Bacillus subtilis ATCC 6633

Negativkontrolle

Bacillus coagulans ATCC 7050

Zusätzliche Hinweise

Auf diesem Nährboden ist *Bacillus cereus* nicht von *Bacillus thuringiensis* zu unterscheiden.

Bacillus cereus sollte durch Kolonieform und -farbe sowie Eigelb-Hydrolyse identifiziert und durch Zell- und Sporenmorphologie bestätigt werden¹⁶.

Gelegentlich zeigen *Bacillus cereus*-Stämme schwache oder gar keine Lecithinase-Reaktion, d. h. schwache oder gar keine Eigelb-Präzipitation.

Literatur

1. DIN 10198-1: "Mikrobiologische Milchuntersuchung. Bestimmung präsumtiver *Bacillus cereus*".
2. BGA: „Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG“. L 00.00-25: "Bestimmung präsumtiver *Bacillus cereus* in Lebensmitteln. Koloniezählverfahren".
3. Holbrook R. und Anderson J.M. (1980) *Can. J. Microbiol.* 26 (7), 753-759.
4. *Brit. Med. J.*, 15. Jan. 1972, 189.
5. *Brit. Med. J.*, 22. Sept. 1973, 647.
6. Mortimer P.R. und McCann G., 25. Mai 1974, *Lancet* 104, 3.
7. DGHM (Lieferung 3, 1985) "Verfahrensrichtlinien für die Mikrobiologische Diagnostik". Kap. 1.3, S. 8-9.
8. Davenport R. und Smith C. (1952) *Brit. J. Ophthal.* 36, 39.
9. Bouza E. et al. (1979) *Arch. Ophthalmol.* 97, 498-499.
10. Turnbull P.C. et al. (1979) *J. Clin. Pathol.* 32, 289-293.
11. Wohlgemuth K. et al. (1972) *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 161, 1691-1695.
12. Donovan K.O. (1958) *J. Appl. Bacteriol.* 21(1), 100-103.
13. Mossel D.A.A., Koopman, M.J. und Jongerius, E. (1967) *J. Appl. Microbiol.* 15(3), 630-653.
14. Ashby G.K. (1938) *Science* 87, 433-435.
15. Burdon K.L. (1946) *J. Bacteriol.* 52, 665-678.
16. Deák T. und Timár E. (1988) *Int. J. Food Microbiology* 6, 115-125.