

## Caseinpepton-Galle-Agar

Art.-Nr. CM 595

Zur schnellen Koloniezahlbestimmung von *Escherichia coli* aus Lebensmitteln.

Der Nährboden entspricht den Empfehlungen des § 35 LMBG<sup>1</sup>.

Typische Zusammensetzung	(g/l)
Caseinpepton	20,0
Gallensalze Nr. 3	1,5
Agar	15,0
pH 7,2 ± 0,2	

### Zubereitung

36,5 g Caseinpepton-Galle-Agar in 1 l Aqua dest. suspendieren und bis zum vollständigen Lösen erhitzen. 15 Minuten bei 121°C autoklavieren. Auf 50°C abkühlen und Platten gießen.

### Beschreibung

OXOID Caseinpepton-Galle-Agar wurde nach den Angaben von Anderson und Baird-Parker<sup>2</sup> zum Nachweis und zur Koloniezahlbestimmung von *E. coli* aus Lebensmitteln entwickelt. Der Nährboden weist gegenüber älteren Methoden folgende Vorteile auf:

- schnellere Auswertung;
- weniger Schwankungen;
- bessere Isolierung von Keimen aus gefrorenem Untersuchungsmaterial;
- möglicher Nachweis anaero gener und schwach Lactose-positiver Stämme.

Die 'Direct-Plating-Methode' (DPM) nach Anderson und Baird-Parker ist eine Modifikation der Methode nach Delaney et al.<sup>3</sup>; sie wurde zum Nachweis und zur Koloniezahlbestimmung von *E. coli* aus Wasser und Lebensmitteln entwickelt. Hierbei wird die Fähigkeit von *E. coli* genutzt, auf Caseinpepton-Galle-Agar bei 44°C Indol aus Tryptophan zu bilden. Den Autoren zufolge ist die Indol-Bildung sowohl für enterotoxische als auch nicht-enterotoxische *E. coli* ein zuverlässigeres Merkmal als die Lactose-Verwertung. Ewing<sup>4</sup> stellte fest, daß nur 90% der *Escherichia*-Stämme innerhalb von zwei Tagen Säure durch Lactose-Verwertung produzieren, während 99% der Stämme Indol bilden. Die International Commission of Microbiological Specifications for Foods<sup>5</sup> verglich die MPN-Methode mit der 'Direct-Plating-Methode' nach Anderson und Baird-Parker. Sie stellte fest, daß die DPM der MPN-Methode zur Koloniezahlbestimmung von *E. coli* aus rohem Fleisch vorzuziehen ist, da sie geringeren Schwankungen unterliegt, bessere Isolierung von gefrorenem Material aufweist, schneller ist und mit weniger Nährboden auskommt.

Mit der 'Direct-Plating-Methode' können die Koloniezahlen sowohl von anaerogenen als auch von solchen *E. coli*-Stämmen bestimmt werden, die spät Lactose spalten. Nach Ewing<sup>4</sup> kann dies bei bis zu 10% aller *E. coli*-Stämme auftreten. Holbrook et al.<sup>6</sup> modifizierten die 'Direct-Plating-Methode' zum Nachweis und zur Koloniezahlbestimmung subletal geschädigter *E. coli* aus gefrorenen, getrockneten, hitzekonservierten oder sauren Lebensmitteln. Bei dieser Modifikation wird das Inokulum auf eine

Celluloseacetat-Membran auf modifizierten Mineral-Glutamat-Agar (s. Wiederbelebungsverfahren) gebracht und vier Stunden bei 36°C bebrütet. Dieser Schritt fördert die Wiederbelebung gestresster Zellen, bevor die Membran auf Caseinpepton-Galle-Agar transferiert wird.

Es konnte gezeigt werden, daß bei Anwesenheit eines hohen Anteils an verwertbaren Kohlenhydraten die Synthese der Tryptophanase gehemmt wird<sup>7</sup> und somit keine Indol-Bildung erfolgt. Holbrook et al.<sup>6</sup> zeigten, daß der Wiederbelebungsprozess hohe Konzentrationen von fermentierbaren Zuckern im Inokulum so reduziert, daß die Indol-Bildung von *E. coli* auf Caseinpepton-Galle-Agar nicht beeinflusst wird. Der Wiederbelebungsprozess sollte deshalb bei der Testung von Milch, Milchprodukten und anderem Untersuchungsmaterial, die hohe Zucker-Konzentrationen (> 25%) enthalten, immer durchgeführt werden.

Dabei erwies sich das von Vracko und Sherries<sup>8</sup> beschriebene Indol-Reagenz (s.u.) als am besten zum Indol-Nachweis geeignet. Es erzeugt klar abgegrenzte und reproduzierbare Reaktionen. Alle Indol-positiven Stämme 'färben' sich nach der Behandlung mit diesem Indol-Reagenz deutlich rosa. Kolonien, die kein Indol bilden, erscheinen strohfarben. Das Wachstum anderer Indol-positiver Stämme außer *E. coli* wird durch die selektive Wirkung der Gallensalze und die höhere Bebrütungstemperatur gehemmt.

Die 'gefärbten' Membranen können mit saugfähigem Filterpapier im Tageslicht oder unter einer Niederdruck-UV-Lampe getrocknet und damit fixiert werden. Beim Trocknen wird die Intensität der Farbreaktion erhöht und die Membranen können als Referenzproben aufbewahrt werden.

### Kulturverfahren

#### 'Direct-Plating-Methode' (DPM)

1. Caseinpepton-Galle-Agar zubereiten und Oberfläche trocknen.
2. Celluloseacetat-Membran (Ø 85 mm, Porengröße 0,45 µm), die nicht sterilisiert sein muß, auf die Oberfläche des Nährbodens legen. Luftblasen vorsichtig mit einem sterilen Spatel austreichen.
3. Untersuchungsmaterial 1:5 oder 1:10 z.B. in 0,1% igem (w/v), sterilem Peptonwasser (OXOID, Art.-Nr. CM 9) verdünnen und in einem Stomacher oder Labormixer homogenisieren<sup>9</sup>.
4. 0,5 oder 1,0 ml Homogenisat auf die Membran pipettieren und mit einem sterilen Glasspatel auf der Oberfläche austreichen.
5. Homogenisat einsickern lassen und nicht mehr als drei Platten übereinander mit dem Deckel nach oben 18-24 Stunden bei 44 ± 0,1°C bebrüten. Die Temperatur ist genau einzuhalten.
6. Nach der Bebrütung 1-2 ml Indol-Reagenz in die Deckelinnenseite pipettieren. (Der Deckel sollte beschriftet sein)
7. Membran mit Pinzetten von der Platte in das Reagenz bringen.
8. Die gefärbten Membranen 5-10 Minuten im Tageslicht oder unter einer Niederdruck-UV-Lampe trocknen und fixieren. Indol-positive Kolonien sind rosa gefärbt.
9. Die Zahl der rosa gefärbten Kolonien mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren und das Ergebnis als Anzahl *E. coli* je Gramm Lebensmittel ausdrücken.

10. Die gefärbten und fixierten Membranen können als Referenzproben dienen.

### Wiederbelebungsverfahren

1. Zubereitung des modifizierten Mineral-Glutamat-Agars:  
2,5 g Ammoniumchlorid in 1 l Aqua dest. lösen. 22,7 g Glutamat-Nährlösung (OXOID, Art.-Nr. CM 607), 12,7 g Natriumglutamat (OXOID, Art.-Nr. LP 124) und 12 g Agar Nr. 1 (OXOID, Art.-Nr. LP 11) zufügen. 10 Minuten bei 116°C autoklavieren. Auf 50°C abkühlen und mit jeweils 12-15 ml Platten gießen.
2. Auf der gut getrockneten Oberfläche des Nährbodens eine Celluloseacetat-Membran plazieren. Luftblasen vorsichtig mit einem sterilen Spatel austreichen.
3. Untersuchungsmaterial 1:5 oder 1:10 z.B. 1% igem (w/v), sterilem Peptonwasser (OXOID, Art.-Nr. CM 9) verdünnen und in einem Stomacher oder Labormixer homogenisieren.
4. 0,5 oder 1,0 ml Homogenisat auf die Membran pipettieren und mit einem sterilen Glasspatel auf der Oberfläche austreichen.
5. Homogenisat einsickern lassen und nicht mehr als drei Platten übereinander mit dem Deckel nach oben 4 Stunden bei 36°C bebrüten.
6. Mit sterilen Pinzetten die Membran auf die getrocknete Oberfläche von Caseinpepton-Galle-Agar bringen.
7. Platten wie unter der 'Direct-Plating-Methode' beschrieben bebrüten, färben und die Zahl der Indol-positiven (rosaroten) Kolonien feststellen.

Falls der Indol-Test erst am nächsten Tag durchgeführt werden soll, können die ungefärbten Platten im Kühlschrank aufbewahrt werden.

### Indol-Reagenz nach Vracko und Sherries<sup>8</sup>

5% p-Dimethylaminobenzaldehyd in 1 N Salzsäure.

Es ist lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert bis zu drei Monaten verwendbar.

### Lagerung und Haltbarkeit

Trockennährboden:

Fest verschlossen, lichtgeschützt, 10-25°C.

Haltbarkeit: siehe Etikett.

### Qualitätskontrolle

(mit dem Indol-Reagenz gefärbte Kolonien auf Membranen)

Positivkontrolle

*Escherichia coli* ATCC 25922 (rosarot)

Negativkontrolle

*Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 (strohfarben)

### Literatur

1. BGA: "Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMVG". L 42.00-11: "Bestimmung von *Escherichia coli* in Speiseeis".
2. Anderson, J.M. und Baird-Parker, A.C. (1975) J. Appl. Bacteriol. 39, 111-117.
3. Delaney, J.E., McCarthy J.A. und Grasso R.J. (1962) Wat. Sewage Works 109, 289.
4. Ewing, W.H. (1972) COC Atlanta, US Dept. of Health, Education & Welfare.
5. International Commission of Microbiological Specifications for Foods (1979) Can. J. Microbiol. 25, 1321-1327.

6. Holbrook, R., Anderson J.M. und Baird-Parker, A.C. (1980) Food Technol. in Aust. 32, 78-83.
7. Clarke, P.H. und Cowen, S.T. (1952) J. Gen. Microbiol. 6, 187-197.
8. Vracko, R. und Sherris, J.C. (1963) Am. J. Clin. Pathol. 39, 429-432.
9. Sharpe, A.N. und Jackson, A.K. (1972) Appl. Microbiol. 24, 175-178.