

## Clostridium-Agar

(RCM-Agar, Reinforced Clostridial Medium)

Art.-Nr. CM 151

Zur Kultivierung und Koloniezahlbestimmung von Clostridien und anderen Anaerobiern aus Lebensmitteln, klinischem und anderem Material.

Typische Zusammensetzung	(g/l)
Hefeextrakt	3,0
Fleischextrakt 'Lab-Lemco'	10,0
Pepton	10,0
Glucose	5,0
Lösliche Stärke	1,0
Natriumchlorid	5,0
Natriumacetat	3,0
L-Cystein	0,5
Agar	15,0
pH 6,8 ± 0,2	

### Zubereitung

52,5 g Clostridium-Agar in 1 l Aqua dest. suspendieren und bis zum vollständigen Lösen erhitzen. 15 Minuten bei 121°C autoklavieren.

### Beschreibung

Clostridium-Agar ist ein fester Nährboden, der bis auf den Agar-Gehalt der Zusammensetzung des halbfesten Clostridium-Nährbodens entspricht. Er ist zur Kultivierung und Koloniezahlbestimmung von Clostridien und anderen Anaerobiern, Lactobazillen und vielen anderen Bakterien geeignet. Die Leistungsfähigkeit des Clostridium-Agars (RCM) entspricht der des 'Pork Starch Pea Agars' nach Anderson<sup>1</sup> bei der Zählung von Anaerobiern. Der Clostridium-Agar wird zur Prüfung auf Anaerobier aus Lebensmitteln eingesetzt (siehe auch Barnes et al.<sup>2</sup> und Angelotti<sup>3</sup>). Attenborough und Scarr<sup>4</sup> verwendeten Clostridium-Agar zur Zählung von *Clostridium thermosaccharolyticum* in Zucker. Clostridium-Agar wird ebenfalls häufig zur Untersuchung der intestinalen Flora gebraucht: Perry et al.<sup>5</sup> verwendeten ihn z. B. bei der Untersuchung von Streptokokken aus dem Rumen (Pansen, Teil des Rindermagens) von Rindern, Williams Smith und Crabb<sup>6</sup> nutzten den Nährboden mit Natriumchlorid- oder Blut-Zusatz zur Koloniezahlbestimmung aus menschlichen oder tierischen Faeces und Barnes und Goldberg<sup>7</sup> setzten ihn mit Chlor-tetracyclin oder Natriumazid und Ethylviolett zur Unter-

## Nährböden

suchung von Geflügel-Faeces ein. Für den gleichen Zweck verwendeten Goldberg et al.<sup>8</sup> den Clostridium-Agar ohne Zusatz. Williams Smith<sup>9</sup> setzte den Nährboden zur Gesamtkoloniezahl- und zur Koloniezahlbestimmung von Lactobazillen aus menschlichen und tierischen Faeces ein sowie mit Blut- und Neomycin-Zusatz zur Bestimmung von *Bacteroides*, anaeroben, gramnegativen Kokken, 'Gesamt'-Streptokokken, Sporenbildnern, Hefen und 'Aktino'-Typen. Sneath<sup>10</sup> verwendete den Clostridium-Agar und andere Nährböden zur anaeroben Koloniezahlbestimmung aus über 300 Jahre alten Erdproben. Gregory et al.<sup>11</sup> bestimmten damit Anaerobier aus verschimmeltem Heu.

### Kulturverfahren

Barnes und Ingram<sup>12,13</sup> beschrieben den Clostridium-Agar zur Gesamtkoloniezahlbestimmung der lebensfähigen Clostridien unter Verwendung ihrer 'Schwarzglasstab-Technik'. Bei dieser Methode werden Röhrchen mit Stopfen mit 9 ml Clostridium-Agar, der bei 48°C flüssig gehalten wird, gefüllt und mit dem verdünnten Untersuchungsmaterial beimpft. Bevor der Agar geliert, werden die Röhrchen schnell gedreht, um den Inhalt zu mischen, und es wird in jedes Röhrchen ein steriler Schwarzglasstab eingebracht. Die Röhrchen werden danach mit jeweils 1,5 ml Clostridium-Agar, der Methylenblau (1:20.000) enthält, überschichtet. Wachstum erfolgt sehr rasch; die Kolonien sollten gezählt werden, bevor der Nährboden durch Gasbildung reißt. Die Autoren schlagen vor, die Röhrchen über Nacht bei 25°C und dann einige Stunden bei 36°C zu bebrüten. Die Kolonien sind gegen den schwarzen Hintergrund des Glasstabes klar zu sehen.

Clostridium-Agar kann auch zur Koloniezahlbestimmung von Anaerobiern mit der 'Miller-Prickett-Methode' (Miller et al.<sup>14</sup>) eingesetzt werden. Mossel et al.<sup>15</sup> setzten andere Nährböden bei folgendem Verfahren ein, das jedoch auch mit dem Clostridium-Agar durchgeführt werden kann.

1. Jeweils 1 ml der dezimalen Verdünnungsstufen des zu untersuchenden Lebensmittels in drei "Miller-Prickett-Röhrchen" mit Stopfen einbringen. Den frisch zubereiteten Nährboden auf 50°C abkühlen und jedem Röhrchen 15 ml ohne Schütteln zufügen. Das Miller-Prickett-Röhrchen ist ein flaches Röhrchen (Maße 15 x 2,5 x 1,3 cm).
2. Sofort ca. 1 cm hoch mit sterilem Paraffinöl (Paraffin dickflüssig) überschichten und zum Erstarren in ein Wasserbad bei etwa 15°C stellen. Paraffinöl kann im Heißluft-Sterilisator 60 Minuten bei 160-180°C sterilisiert werden.
3. 1-10 Tage bei einer Temperatur zwischen 30-55°C bebrüten. Die Bebrütungstemperatur ist vom erwarteten Clostridien-Typ abhängig.
4. Ein unbeimpftes Röhrchen zur Sterilitätskontrolle mitführen.
5. Kolonien zählen.

### Lagerung und Haltbarkeit

Trockennährboden:

Fest verschlossen, lichtgeschützt, 10-25°C.

Haltbarkeit: siehe Etikett.

### Qualitätskontrolle

Positivkontrolle

*Clostridium perfringens* ATCC 13124

Negativkontrolle

unbeimpfter Nährboden

### Zusätzliche Hinweise

Mit den auf diesem Nährboden isolierten Mikroorganismen müssen weitere Testungen zur Identifizierung durchgeführt werden.

### Literatur

1. Anderson, A.A. (1951) J. Bacteriol. 62, 425-430.
2. Barnes, Ella M., Despaul, J.E. und Ingram, M. (1963) J. Appl. Bacteriol. 26, 415-427.
3. Angelotti, R. et al. (1962) Appl. Microbiol. 10, 193-199.
4. Attenborough Sheila J. und Scarr M. Pamela (1957) J. Appl. Bacteriol. 20, 460-466.
5. Perry, K.D. et al. (1955) J. Appl. Bacteriol. 18, 436-442.
6. Williams Smith, H. und Crabb, W.E. (1961) J. Pathol. Bacteriol. 82, 53-66.
7. Barnes, Ella M. und Goldberg, H.S. (1962) J. Appl. Bacteriol. 25, 94-106.
8. Goldberg, H.S., Barnes, Ella M. und Charles, A.B. (1964) J. Bacteriol. 87, 737-742.
9. Williams Smith, H. (1961) J. Appl. Bacteriol. 24, 235-241.
10. Sneath, P.H.A. (1962) Nature 195, 643-646.
11. Gregory, P.H. et al. (1963) J. Gen. Microbiol. 33, 147-174.
12. Barnes, Ella M. und Ingram, M. (1956) J. Appl. Bacteriol. 19, 117-128.
13. Ingram, M. und Barnes, Ella M. (1956) Lab. Practice 5, 145.
14. Miller, N.J., Garrett, O.W. und Prickett, P.S. (1939) Food Res. 4, 447-451.
15. Mossel, D.A.A. et al. (1956) J. Appl. Bacteriol. 19, 142-154.