

## Glutamat-Nährlösung

(Minerals Modified Glutamate Medium)

Zur Anreicherung und Titerbestimmung coliformer Keime aus Wasser.

Die einfach konzentrierte Lösung entspricht nach Zusatz von Agar und Casein-Hydrolysat der Empfehlung des § 35 LMBG<sup>1</sup>.

## Glutamat-Nährlösung-Basis

Art.-Nr. CM 607

Typische Zusammensetzung (einfach konzentriert)		(g/l)
Lactose		10,0
Natriumformiat		0,25
L-Cystin		0,02
L-Asparaginsäure		0,024
L-Arginin		0,02
Thiamin		0,001
Nikotinsäure		0,001
Pantothensäure		0,001
Magnesiumsulfat		0,1
Eisen(III)-ammoniumcitrat		0,01
Calciumchlorid		0,01
Dikaliumhydrogenphosphat		0,9
Bromkresolpurpur		0,01
pH 6,7 ± 0,1		

Natriumglutamat (OXOID, Art.-Nr. LP 124) wird mit der Glutamat-Nährlösung-Basis zusammen geliefert.

### Zubereitung

#### Einfach konzentrierte Lösung

2,5 g Ammoniumchlorid in 1 l Aqua dest. lösen. 11,4 g Glutamat-Nährlösung-Basis und 6,4 g Natriumglutamat (OXOID, Art.-Nr. LP 124) zur Ammoniumchlorid-Lösung geben und vollständig lösen. 10 Minuten bei 116°C autoklavieren; alternativ an drei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 30 Minuten im Dampftopf (100°C) erhitzen.

Für die Bestimmung von *E. coli* in Speiseeis nach § 35 LMBG werden vor dem Autoklavieren 1 g Casein-Hydrolysat (OXOID, Art.-Nr. LP 41) und 10-15 g Agar (OXOID, Art.-Nr. LP 11) zugesetzt. Bis zum vollständigen Lösen erhitzen und nach dem Abfüllen in Endgefäße 15 Minuten bei 121°C autoklavieren.

#### Doppelt konzentrierte Lösung

5 g Ammoniumchlorid in 1 l Aqua dest. lösen. 22,7 g Glutamat-Nährlösung-Basis und 12,7 g Natriumglutamat (OXOID, Art.-Nr. LP 124) zur Ammoniumchlorid-Lösung geben und vollständig lösen. 10 Minuten bei 116°C autoklavieren; alternativ an drei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 30 Minuten im Dampftopf (100°C) halten.

Der pH-Wert der gebrauchsfertigen Lösung ist für eine optimale Leistungsfähigkeit entscheidend. Die sterilisierte Lösung sollte einen pH von 6,7 ± 0,1 aufweisen und daraufhin überprüft werden.

## Nährböden

Unterschiede beim Erhitzen verursachen Differenzen im endgültigen pH-Wert. Falls erforderlich, sollte die Sterilisation so verändert werden, daß der endgültige pH-Wert 6,7 beträgt<sup>2</sup>.

### Beschreibung

Ein auf Glutamat basierender, chemisch definierter Nährboden wurde erstmalig von Folpmers<sup>3</sup> zur Koloniezahlabstimmung coliformer Keime aus Wasser vorgeschlagen. Der PHLS<sup>4</sup> schloß aus einer durchgeführten Studie, daß Glutamat-Nährböden mit Glucose zu viele falsch-positive Ergebnisse in 48 Stunden lieferten. Gray<sup>5</sup> modifizierte einen Glutamat-Nährboden mit Lactose und veröffentlichte später eine Zusammensetzung für einen Formiat-Lactose-Glutamat-Nährboden<sup>6</sup>. Der Nährboden wurde in eine Studie durch PHLS<sup>7</sup> miteinbezogen, in der drei Glutamat-Nährböden mit Teepol-Lösung<sup>8</sup> und MacConkey-Lösung verglichen wurden. Der verbesserte Formiat-Lactose-Glutamat-Nährboden nach Gray lieferte dabei bessere Ergebnisse. In der Veröffentlichung wurde der Gehalt an Mineralsalzen kritisch beurteilt und es wurde festgestellt, daß eine Verbesserung durch Modifizierung des Mineralsalz-Gehaltes erzielt werden konnte. Durch kooperative Forschung der Metropolitan Water Board Laboratories und den OXOID-Laboratorien wurde eine Glutamat-Nährlösung mit modifiziertem Mineralsalz-Gehalt entwickelt. Die Glutamat-Nährlösung wurde in weiteren Studien der PHLS<sup>5</sup> eingesetzt; die Ergebnisse mit dem Nährboden bestätigten die schon vorher festgestellte Leistungsfähigkeit der Glutamat-Nährböden<sup>7</sup>. Die erhöhte Leistungsfähigkeit der Glutamat-Nährlösung gegenüber MacConkey-Lösung besteht hauptsächlich im verbesserten Nachweis von *Escherichia coli*. Die folgende Tabelle (angelehnt an PHLS<sup>9</sup>) verdeutlicht die Ergebnisse der Studie.

Sie zeigt, daß bei gechlortem Wasser eine Bebrütung der Glutamat-Nährböden von mehr als 18 Stunden notwendig ist, um deren gute Leistungsfähigkeit zu demonstrieren. Der Nährboden und das Kulturverfahren sind vollständig im HMSO Report Nr. 71<sup>2</sup> beschrieben.

Weitere kürzlich durchgeführte Untersuchungen zeigten, daß Glutamat-Nährlösung der Nährboden der Wahl zum Nachweis von *Escherichia coli* aus gechlortem Wasser ist, besonders wenn die Keimzahlen des betreffenden Bakteriums gering sind.

Glutamat-Nährlösung wurde auch erfolgreich im Ver-

gleich mit Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon zum Nachweis von kleineren Keimzahlen an *E. coli* aus anderem Wasser eingesetzt, obwohl die letztere schnellere Ergebnisse zeigt (18-24 Stunden verglichen mit 48 Stunden bei Glutamat-Nährlösung).

Papadakis<sup>11</sup> untersuchte die Isolierung von *E. coli* aus Meerwasser und bewertete die Glutamat-Nährlösung besser als MacConkey-Lösungen. Zur Vermeidung hoher Salzkonzentrationen in der Lösung empfahl er, nur 1 ml Meerwasser zu 10 ml einfachkonzentrierter Glutamat-Nährlösung zuzufügen. Größere Volumina Meerwasser müssen mit Glutamat-Nährlösung im Verhältnis 1:10 verdünnt werden.

### Kulturverfahren

Glutamat-Nährlösung kann mit dem als Multiple Tube-Methode, Verdünnungsmethode oder Most Propable Number (MPN)-Methode bekanntem Verfahren eingesetzt werden. Eine vergleichende Studie zwischen Membranfiltration und der MPN-Methode zeigte, daß die Glutamat-Nährlösung bei Verwendung von Membranen zur Koloniezahlabstimmung coliformer Keime aus Wasser weniger geeignet ist<sup>12</sup>.

1. Bei Wasserproben mit erwarteter guter Qualität Glutamat-Nährlösung mit einem 50 ml-Volumen und fünf 10 ml-Volumen beimpfen. Bei Wasserproben mit erwarteter schlechterer Qualität zu den 50 ml- und 10 ml-Volumina zusätzlich mit fünf 1 ml-Volumina beimpfen. Bei stark kontaminiertem Wasser können Verdünnungen im 1 ml-Volumen erforderlich sein, das 50 ml-Volumen kann in diesem Fall ausgelassen werden. Größere Wasservolumina (10 ml und 50 ml) zu einem gleichen Volumen doppeltkonzentrierter Glutamat-Nährlösung zufügen, 1 ml-Volumina (oder Verdünnungen derselben) zu 5 ml einfachkonzentrierter Glutamat-Nährlösung geben.
2. Die Röhrchen bei 36°C bebrüten und nach 18-24 Stunden begutachten.
3. Alle Röhrchen, die Säurebildung (Gelbfärbung der Lösung) und Gas im Durham-Röhrchen anzeigen, als 'vermutlich positiv' betrachten, einschließlich derer, bei denen Gas erst nach Beklopfen des Röhrchens erscheint. Das Röhrchen kann nach dem Klopfen auch nur eine kleine Gasblase enthalten.
4. Die restlichen Röhrchen erneut bebrüten und nach weiteren 24 Stunden begutachten. Alle weiteren Röhr-

### Vergleich der positiven Röhrchen bei Glutamat-Nährlösung und MacConkey-Lösung

	Anzahl der Röhrchen								
	Falsch-positive			Coliforme Keime			<i>E. coli</i>		
	Reaktionen nach			nach			nach		
	18	24	48 Std.	18	24	48 Std.	18	24	48 Std.
<b>Ungechlornte Proben</b>									
MacConkey-Lösung	17	37	100	625	806	1060	467	528	582
Glutamat-Nährlösung	2	20	97	557	858	1175	503	707	764
<b>Gechlornte Proben</b>									
MacConkey-Lösung	4	19	49	125	216	315	77	121	128
Glutamat-Nährlösung	0	1	37	59	223	395	39	144	203

chen, die 'positiv' werden, als 'vermutlich positiv' betrachten.

5. Jedes 'vermutlich positive' Röhrchen in Brillantgrün-Galle-Lactose-Lösung (OXOID, Art.-Nr. CM 31) subkultivieren und 24 Stunden bei 44°C bebrüten.
6. Zur gleichen Zeit ein Röhrchen mit 1%igem Caseinpeptonwasser (OXOID, Art.-Nr. CM 87) beimpfen und 24 Stunden bei 44°C bebrüten. Danach auf Indolbildung untersuchen.

Gasbildung aus Lactose bei 44°C und Indolbildung bei 44°C gelten als Bestätigung von *Escherichia coli*.

Bei gechlorten Wasserproben, die 'vermutlich positive' Röhrchen ergeben, muß weiter getestet werden, um falsch-positive Ergebnisse durch aerobe oder anaerobe Sporenbildner, die Gas bilden können, auszuschließen. Subkulturen in Brillantgrün-Galle-Lactose-Lösung (OXOID, Art.-Nr. CM 31) anlegen und 48 Stunden bei 36°C bebrüten.

Gasbildung innerhalb von 48 Stunden gilt als ausreichende Bestätigung für das Vorhandensein coliformer Keime. Wenn die Röhrchen zur gleichen Zeit auf MacConkey-Agar (OXOID, Art.-Nr. CM 7) subkultiviert werden, können leicht weitere Differenzierungstests durchgeführt werden.

Eine weitere Studie in mehreren Laboratorien zeigte die Effizienz der Lauryl-Tryptose-Mannit-Bouillon als Bestätigungstest für *E. coli* in einem Röhrchen<sup>13</sup>.

Die Most Probable Number (MPN) der Mikroorganismen kann nach den Tabellen des § 35 LMBG<sup>14</sup> oder des HMSO Reports Nr. 71<sup>2</sup> berechnet werden.

### Koloniezahlbestimmung von *E. coli* aus Lebensmitteln

Eine Direktplatten-Methode (DPM) wurde zur schnellen Koloniezahlbestimmung von *E. coli* aus Lebensmitteln beschrieben<sup>15</sup>. Diese Methode wurde durch einen Wiederbelebungs-schritt auf Glutamat-Agar modifiziert<sup>16</sup>. In der modifizierten Methode werden 15 g Agar je l Glutamat-Nährlösung zugefügt. Mit diesem Wiederbelebungs-schritt konnten die Autoren geschädigte Zellen aus gefrorenen, getrockneten und hitzebehandelten Lebensmitteln und aus solchen mit niedrigem pH-Wert anzüchten.

Die "Direct-Plating-Methode" mit dem Wiederbelebungs-schritt nach § 35 LMBG (L 42.00-11: Bestimmung von *Escherichia coli* in Speiseeis") ist im Kulturverfahren des Caseinpepton-Galle-Agars (OXOID, Art.-Nr. CM 595) einschließlich des Indolnachweises detailliert beschrieben. Die Glutamat-Nährlösung entspricht dem dort beschriebenen Glutamat-Agar, wenn ihr Agar sowie Caseinhydrolysat zugefügt werden.

Abbiss et al.<sup>17</sup> führten eine vergleichende Beurteilung der Leistungsfähigkeit von Glutamat-Nährlösung gegen drei andere Anreicherungs-Lösungen bei der Koloniezahlbestimmung coliformer Keime aus Weichkäse, gekochtem Fleisch und Pastete durch. Glutamat-Nährlösung erwies sich als leistungsfähiger im Vergleich mit Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon, MacConkey-Lösung und Brillantgrün-Galle-Lactose-Lösung.

### Lagerung und Haltbarkeit

Trockennährboden und Natriumglutamat:  
Fest verschlossen, lichtgeschützt, 10-25°C.  
Haltbarkeit: siehe Etikett.

### Qualitätskontrolle

Positivkontrolle

(Säure- und Gas-Bildung)

*Escherichia coli* ATCC 25922

Negativkontrolle

(nur Gas-Bildung)

*Enterobacter aerogenes* ATCC 13048

### Zusätzliche Hinweise

Zur Verlängerung der Haltbarkeit des Trockennährbodens wird Natriumglutamat getrennt geliefert und ist der Glutamat-Nährlösung-Basis zuzusetzen.

Vermutlich positive Röhrchen müssen in Laurylsulfat-Tryptose-Mannit-Lösung (OXOID, Art.-Nr. CM 831) subkultiviert und bei 44°C bebrütet werden, um die Indolbildung bei dieser Temperatur nachzuweisen, bevor die Identifizierung von *Escherichia coli* durchgeführt werden kann.

### Literatur

1. BGA: "Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG". L 42.00-11: "Bestimmung von *Escherichia coli* in Speiseeis".
2. Departments of the Environment, Health & Social Security and PHLS (1982) "The Bacteriological examination of drinking water supplies". Report on Public Health and Medical Subjects Nr. 71, HMSO, London.
3. Folpmers, T. (1948) Ant. v. Leeuwenhoek, J. Microbiol. Ser. 14, 58-64.
4. PHLS Water Sub-Committee (1958) J. Hyg. Camb. 56, 377-388.
5. Gray, R.D. (1959) J. Hyg. Camb. 57, 249-265.
6. Gray, R.D. (1964) J. Hyg. Camb. 62, 495-508.
7. PHLS Standing Committee on Bacteriological Examination of Water Supplies (1968) J. Hyg. Camb. 66, 67-82.
8. Jameson, J.E. und Emberly, N.W. (1956) J. Gen. Microbiol. 15, 198-204.
9. PHLS Standing Committee on the bacteriological Examination of Water Supplies (1969) J. Hyg. Camb. 67, 367-374.
10. Joint Committee of the PHLS and Standing Committee of Analysts (1980) J. Hyg. Camb. 85, 35-48.
11. Papadakis, J.A. (1982) 6th Workshop on Marine Pollution of the Mediterranean, Cannes.
12. PHLS Standing Committee on the Bacteriological Examination of Water Supplies (1972) J. Hyg. Camb. 70, 691-705.
13. Joint Committee of the PHLS and Standing Committee of Analysts (1980) J. Hyg. Camb. 15, 51-57.
14. BGA: "Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG". L 01.00-2: "Bestimmung der coliformen Keime in Milch, Milchprodukten, Butter, Käse und Speiseeis".
15. Anderson, J.M. und Baird-Parker, A.C. (1975) J. Appl. Bacteriol. 39, 111-117.
16. Holbrook, R., Anderson, J.M. und Baird-Parker, A.C. (1980) Food Technology in Australia, 32, 78-83.
17. Abbiss, J.S. et al. (1981) J. Appl. Bacteriol. 51, 121-127.