

Kanamycin-Äsculin-Azid-Selektivnährboden

Zur Isolierung, Differenzierung und Koloniezahlbestimmung von Enterokokken aus Lebensmitteln, Wasser und anderem Untersuchungsmaterial.

Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar-Basis

Art.-Nr. CM 591

Typische Zusammensetzung	(g/l)
Caseinpepton	20,0
Hefeextrakt	5,0
Natriumchlorid	5,0
Natriumcitrat	1,0
Äsculin	1,0
Eisen(III)-ammoniumcitrat	0,5
Natriumazid	0,15
Agar	10,0
pH 7,0 ± 0,2	

Kanamycin-Selektiv-Supplement

Art.-Nr. SR 92

Zusammensetzung je Röhrchen (1 Röhrchen je 500 ml)	
Kanamycin	10 mg

Zubereitung

21,3 g Kanamycin-Äsculin-Agar-Basis in 500 ml Aqua dest. suspendieren.

Zu einem Röhrchen Kanamycin-Selektiv-Supplement 2 ml Aqua dest. geben und den Inhalt vollständig lösen. Den gelösten Inhalt eines Röhrchens Kanamycin-Selektiv-Supplement zu 500 ml Kanamycin-Äsculin-Agar-Basis geben und den Nährboden bis zum vollständigen Lösen erhitzen. 15 Minuten bei 121°C autoklavieren.

Beschreibung

Kanamycin-Äsculin-Azid-Selektivnährboden wurde von Mossel et al.^{1,2} zum Nachweis von Enterokokken aus Lebensmitteln entwickelt. Er enthält zur Selektion die hemmenden Substanzen Kanamycin und Natriumazid. Durch ein doppeltes Indikatorsystem wird das Wachstum Äsculin-hydrolysierender Streptokokken angezeigt; es bilden sich schwarze Höfe um die Kolonien. Diese Höfe bestehen aus schwarzen Eisen-Phenol-Komponenten, die wiederum aus den Produkten der Äsculin-Hydrolyse und den Eisen-Ionen entstehen.

Die Bebrütung erfolgt 18-24 Stunden aerob bei 36°C oder 42°C ± 0,3°C. Die höhere Bebrütungstemperatur verstärkt die Selektivität.

Nach Mossel et al.³ eignet sich der Kanamycin-Äsculin-Azid-Selektivnährboden ebenfalls für die 'Dip Slide'-Technik zur Überprüfung von Lebensmitteln.

Kulturverfahren

0,1 ml des verdünnten Untersuchungsmaterials im Oberflächenausstrich auf Kanamycin-Äsculin-Azid-Selektivnährboden aufbringen.

Das folgende Kulturverfahren wurde von Mossel, Harwijn und Elzebroek⁴ zur Untersuchung von Lebensmitteln beschrieben:

1. Röhrchen mit je 9 ml sterilem Caseinpeptonwasser (OXOID, Art.-Nr. CM 87) 18 Stunden auf 0-5°C vor-kühlen.
2. 1 g oder 1 ml gut gemischter Lebensmittelprobe in ein Röhrchen mit 9 ml vorgekühltem Caseinpeptonwasser als Verdünnungslösung geben (Verdünnung 10⁻¹). 30 Sekunden gut schütteln. Davon 1 ml in ein neues Röhrchen mit Verdünnungslösung geben und gut schütteln. Diese Schritte jeweils mit sterilen Pipetten bis zu einer Verdünnung wiederholen, bei der etwa 100 Kolonien pro ml erwartet werden können. Wenn die dezimalen Verdünnungsstufen nicht sofort weiter bearbeitet werden, sollten sie höchstens drei Stunden im Kühlschrank aufbewahrt werden.
3. Jeweils als Doppelansatz 1 ml der geeigneten Verdünnungsstufen in Röhrchen mit 9 ml Kanamycin-Äsculin-Azid-Lösung geben und 16-24 Stunden bei 36°C bebrüten. Tritt keine Schwärzung der Kanamycin-Äsculin-Azid-Lösung auf, ist das Ergebnis als negativ anzusehen. Bei Schwärzung der Lösung Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar beimpfen und 16-24 Stunden bei 36°C bebrüten. Wenn die gewachsenen Kolonien von einem schwarzen Hof umgeben sind, kann das Ergebnis als positiv bewertet werden.
4. Bestätigende Testungen durchführen, z.B. Katalase-Test, Glucose-Verwertung, Wachstum bei 45°C ± 1°C, Morphologie (kettenbildende, grampositive Kokken).

Koloniemorphologie

Präsumtive Enterokokken

Runde, weiße oder graue Kolonien, Ø mind. 2 mm, umgeben von schwarzen Höfen, Ø mind. 1 cm.

Lagerung und Haltbarkeit

Trockennährboden:

Fest verschlossen, lichtgeschützt, 10-25°C.

Supplement: 2-8°C.

Haltbarkeit: siehe Etikett.

Qualitätskontrolle

Positivkontrolle

Enterococcus faecium ATCC 19434

Enterococcus bovis ATCC 27960

Negativkontrolle

Bacillus subtilis ATCC 6633

Escherichia coli ATCC 25922

Zusätzliche Hinweise

Dieses Produkt enthält weniger als 0,05 % Azid und weist eine geringe Toxizität auf; siehe auch 'Allgemeine Richtlinien zur Verwendung von OXOID Trockennährböden'. Es sollte beachtet werden, daß auf keinem Nährboden universell alle Enterokokken-Stämme isoliert werden können⁵.

Nach der Keimzählung sollte die Identität aller Isolate mit weiteren Testungen bestätigt werden.

Literatur

1. Mossel, D.A.A., Bijker, P.G.H. und Eelderink, I. (1978) Arch. Lebensmittel-hyg. 29, 121-127.
2. Mossel, D.A.A. et al. (1978) In: "Streptococci". Skinner, F.A. und Quesnel, L.B. (Eds.) SAB Symposium Series Nr. 7, Academic Press, London.
3. Mossel, D.A.A. et al. (1976) Lab. Practice 25, 393-395.
4. Mossel, D.A.A., Harrewijn, G.A. und Elzebroek, B.J.M. (1973) UNICEF, Genf.
5. Reuter, G. (1985) Int. J. Food Microbiol. 2, 103-114.