

Kristallviolett-Galle-Glucose-Agar

(VRBD-Agar, Violet Red Bile Dextrose Agar)

Art.-Nr. CM 485

Zum Nachweis und zur Koloniezahlbestimmung von *Enterobacteriaceae* aus Lebensmitteln.

Der Nährboden entspricht den Empfehlungen der ISO¹, dem § 35 LMBG², der DIN 10164³ sowie dem Agarmedium F gemäß Europäischem Arzneibuch⁴.

Typische Zusammensetzung	(g/l)
Hefeextrakt	3,0
Pepton	7,0
Natriumchlorid	5,0
Gallensalze Nr. 3	1,5
Glucose	10,0
Neutralrot	0,03
Kristallviolett	0,002
Agar	12,0
pH 7,4 ± 0,2	

Zubereitung

38,5 g Kristallviolett-Galle-Glucose-Agar in 1 l Aqua dest. suspendieren und bis zum vollständigen Lösen vorsichtig unter Rühren erhitzen. NICHT AUTOKLAVIEREN! Vor dem Gießen gut mischen.

Beschreibung

Bei der Untersuchung nicht verarbeiteter Lebensmittel haben die Ergebnisse von Wasseruntersuchungen, bei denen die 'Coli-Aerogenes-Gruppe' als möglicher Indikator einer fäkalen Kontamination nachgewiesen wurde, keine hohe Signifikanz. Für die Untersuchung von Lebensmitteln wird der Nachweis einer genauer definierten Gruppe empfohlen: *Enterobacteriaceae*, die Säure und/oder Gas bilden^{5,6}. Außer den coliformen Keimen umfaßt diese Gruppe Salmonellen und Shigellen, die keine Lactose verwerten, und *Escherichia coli*, die Enterotoxine bilden können. Dazu zählen ebenfalls Bakterien wie Klebsiella und Citrobacter, die stärker gegen Hitze resistent sind als coliforme Keime. *Enterobacteriaceae* gelten als bessere Mängelindikatoren bei Verfahren mit geringer Hitze. Die Schwierigkeiten bei der Erfassung der Gesamtkeimzahl von *Enterobacteriaceae* aus Lebensmitteln wurden von Mossel et al.⁷ untersucht, der mit seinen Co-Autoren nachwies, daß der Zusatz von Glucose die Leistungsfähigkeit des Nährbodens zum Nachweis von Coliformen verbessert. Sie fügten dem üblichen Kristallviolett-Galle-Lactose-Agar (OXOID, Art.-Nr. CM 107) Glucose (10 g/l) zu und nannten die modifizierte Zusammensetzung MacConkey-Glucose-Agar. Weitere Arbeiten von Mossel et al.^{8,9} zeigten, daß Lactose aus der Rezeptur entfernt werden konnte; so entstand der Kristallviolett-Galle-Glucose-Agar (OXOID, Art.-Nr. CM 485). Das weitere Beibehalten von Lactose im Nährboden führt nicht zu besseren Ergebnissen. Durch das Entfernen der Lactose wurde der Nährboden zudem ökonomischer, da sich die Einwaage verringerte.

Nährböden, die Gallensalze enthalten, wirken toxisch auf *Enterobacteriaceae*, auch wenn die Zellen nicht gestreßt sind¹⁰⁻¹⁵.

In einem Vergleich von sechs kommerziell erhältlichen Zubereitungen von Kristallviolett-Galle-Lactose-Agar^{8,9} wurden in Bezug auf die Ausbeute an *Enterobacteriaceae*¹⁶ und der Intensität ihres Stoffwechsels beträchtliche Unterschiede festgestellt.

Die einzelnen Komponenten des Nährbodens wurden in Zusammenarbeit mit OXOID überprüft. Mossel entwarf folgende Spezifikation:

- Die Nährböden sollten klar sein und Kolonien angemessener Größe gewährleisten. Die Anzahl typischer Kolonien von *Enterobacteriaceae* sollte reproduzierbar sein.
- Bei der Bestimmung der Toxizität der Gallensalze durch den anaeroben Metaboliten-Test¹⁷ mit einem Stamm von *Yersinia enterocolitica* Serotyp O3 als sensitivem Indikator müssen die Nährböden angemessenes Wachstum, Säurebildung und, falls erforderlich, ausreichende Gasbildung zeigen.
- Die Bestätigungsrate an typischen Kolonien muß angemessen sein. Die Bestätigungsrate ist die Anzahl an Kolonien, die als *Enterobacteriaceae* bestätigt wurden, geteilt durch die Anzahl der getesteten Kolonien.

Der OXOID Kristallviolett-Galle-Glucose-Agar wurde entwickelt, um diesen Ansprüchen zu genügen.

Kulturverfahren

1. Verdünnungsstufen des Untersuchungsmaterials so herstellen, daß in mindestens einer Verdünnungsstufe 100-200 Kolonien je ml zu erwarten sind.
2. 1 ml jeder Verdünnung in Petrischalen (Ø 9 cm) pipettieren, je Verdünnungsstufe zwei Platten anlegen.
3. Je Petrischale 15 ml flüssigen, auf 47°C abgekühlten Kristallviolett-Galle-Glucose-Agar zugeben. Wie üblich mischen und erstarren lassen.
4. Mit 4-5 ml des gleichen Nährbodens überschichten und erstarren lassen (Overlay-Technik).
5. Mit dem Deckel nach unten je nach gesuchter *Enterobacteriaceae*-Gruppe¹⁸ 18 Stunden bei > 42°C, 24-48 Stunden bei 32°C oder 10 Tage bei 4°C bebrüten.

Die Überschichtung sichert anaerobe Bedingungen, die das Wachstum nicht-fermentativer, gramnegativer Bakterien unterdrücken und die Fermentation von Glucose anregen. Es werden dann deutliche, violette Kolonien gebildet, die von einem gleichfarbigen Hof umgeben sind.

Koloniemorphologie

Enterobacteriaceae u.a.

Runde, violette Kolonien, Ø 1-2 mm, von einem violetten Hof umgeben. Die Identität dieser Kolonien muß bestätigt werden.

Keine *Enterobacteriaceae*
Farblose Kolonien.

Lagerung und Haltbarkeit

Trockennährboden:

Fest verschlossen, lichtgeschützt, 10-25°C.

Haltbarkeit: siehe Etikett.

Qualitätskontrolle

Positivkontrolle

Escherichia coli ATCC 25922

Negativkontrolle

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Zusätzliche Hinweise

Kristallviolett-Galle-Glucose-Agar ist nicht ausschließlich für *Enterobacteriaceae* selektiv; andere Keime wie z.B. *Aeromonas* und *Yersinia* spp. können gleichfalls wachsen. Die Selektivität des Nährbodens verringert sich nach 24 Stunden Bebrütung; vorher unterdrückte Mikroorganismen können dann Wachstum zeigen.

Bei der Gußplattenmethode sollte der Nährboden nur frisch zubereitet, auf 47°C abgekühlt und innerhalb von drei Stunden verwendet werden.

Literatur

1. ISO 5552 (1997) "Fleisch und Fleischerzeugnisse - Nachweis und Zählung von Enterobacteriaceae ohne Wiederbelebung - MPN-Verfahren und Koloniezählung "
2. BGA: "Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMVG". L 05.00-5: "Bestimmung von Enterobacteriaceae in Eiern, Eiprodukten, Mayonnaisen, emulgierten Soßen und kalten Fertigsoßen". und L 06.00-24: "Bestimmung von Enterobacteriaceae in Fleisch".
3. DIN 10164: "Mikrobiologische Untersuchung von Fleisch und Fleischerzeugnissen. Bestimmung von Enterobacteriaceae."
4. 2.6.13. Mikrobiologische Prüfung nicht steriler Produkte in: Europäisches Arzneibuch, Nachtrag 2001.
5. WHO Technical Report Series Nr. 598, 1976, Genf, 51.
6. Mossel, D.A.A. (1958) Zbl. Bakt. I. Ref. 166, 421-432.
7. Mossel, D.A.A., Mengerink, W.H.J. und Scholts, H.H. (1962) J. Bacteriol. 84, 381.
8. Mossel, D.A.A. et al. (1978) Lab. Practice 27 Nr. 12, 1049-1050.
9. Mossel, D.A.A. et al. (1979) J. Food Protect. 42, 470-475.
10. Mossel, D.A.A. (1978) Food Techn. Austral. 30, 212-219.
11. Kroninger, D.L. und Banwart, G.J. (1978) J. Food Sci. 43, 1328-1329.
12. Bridson, E.Y. (1978-79) in: "Van Monster tot Resultaat". Nederland Society for Microbiology, Wageningen, 58-67.
13. Burman, N.P. (1955) Proc. Soc. Water Treatmt. Exam. 4, 10-20.
14. Mossel, D.A.A. und Harrewijn, G.A. (1972) Alimenta 11, 29-30.
15. Mossel, D.A.A., Harrewijn, G.A. und Nesselrooy-van Zadelhoff, C.F.M. (1974) Health Lab. Sci. 11, 260-267.
16. Mossel, D.A.A. (1971) Miscell. Papers Agricult. Universität Wageningen, Niederlande, 9, 29-39.
17. Mossel, D.A.A., Eelderink, I. und Sutherland, J.P. (1977) Zbl. Bakt. I., Orig. A238, 66-79.
18. Mossel, D.A.A. et al. (1986) J. Appl. Bacteriol. 60, 289-295.