

Kristallviolett-Galle-Lactose-Agar

(VRB-Agar; Violet Red Bile Agar)

Art.-Nr. CM 107

Zum Nachweis und zur Koloniezahlbestimmung von Bakterien der 'Coli-Aerogenes-Gruppe' aus Wasser, Lebensmitteln und Molkereiprodukten.

Der Nährboden entspricht den Empfehlungen des Internationalen Milchwirtschaftsverbandes FIL-IDF^{1,2}, des Instituts für Lebensmitteltechnologie und Verpackung der TU München³ und der Euroglace^{4,5} sowie dem § 35 LMBG⁶ und der DIN 10172-3⁷.

Nach Zugabe von Glucose (10 g/l) entspricht der Nährboden dem Agarmedium F (Agarmedium mit Galle, Kristallviolett, Neutralrot und Glucose) des Europäischen Arzneibuches⁸.

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

Zubereitung

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

Beschreibung

Kristallviolett-Galle-Lactose-Agar ist ein selektiver Nährboden zum Nachweis und zur Koloniezahlbestimmung coliformer Keime. Er ist zum Nachweis der Anzahl von Keimen der 'Coli-Aerogenes-Gruppe' aus Wasser, Milch und anderen Molkereiprodukten, Molkereianlagen sowie anderen Lebensmitteln (z.B. Speiseeis) empfohlen bzw. vorgeschrieben worden¹⁻⁷.

Mikroorganismen, die Lactose schnell verwerten, bilden auf diesem Nährboden violette Kolonien mit gleichfarbigen Höfen. Bakterien, die Lactose nicht oder spät verwerten, bilden blasse Kolonien mit grünlichen Höfen. Andere verwandte, gramnegative Bakterien könnten wachsen, können aber durch eine Bebrütung bei >42°C oder unter anaeroben Bedingungen unterdrückt werden. Druce et al.⁹ beurteilten den Kristallviolett-Galle-Lactose-Agar im Vergleich zur der MacConkey-Bouillon als besseren Indikator Nährboden für die 'Coli-Aerogenes-Gruppe' aus Milch und als geeignet zur Koloniezahlbestimmung der gleichen Gruppe aus Milch.

Kulturverfahren

Koloniezahlbestimmung der 'Coli-Aerogenes-Gruppe' aus Rohmilch

Druce et al.⁹ empfahlen folgendes Kulturverfahren: Zur Routinebestimmung Gußplatten mit 1,0; 0,1 und 0,01 ml Untersuchungsmaterial herstellen. 20-24 Stunden bei 36°C bebrüten.

Koloniezahlbestimmung der 'Coli-Aerogenes-Gruppe' aus pasteurisierter Milch

Vier Gußplatten einsetzen, jeweils 10 ml Untersuchungsmaterial auf drei Platten und 1 ml auf die vierte Platte verteilen. 20-24 Stunden bei 30°C bebrüten.

Spülflüssigkeiten und Abstriche von Molkereianlagen gleichermaßen untersuchen.

Nach § 35 LMBG wird für den Nachweis coliformer Keime in Milch und Milchprodukten 20-24 Stunden bei 30°C mit dem Deckel nach unten bebrütet.

Coliforme Keime bilden dunkelrote Kolonien, Ø 1-2 mm, meist von einem rötlichen Hof umgeben. Gelegentlich bilden Bakterien der 'Coli-Aerogenes-Gruppe' erheblich kleinere Kolonien (Ø 0,5 mm).

Die Overlayer-Technik verbessert die Spezifität des Nährbodens⁶. Dazu den Basisnährboden beimpfen und mit abgekühltem Nährboden dünn überschichten. Vor der Bebrütung erstarren lassen. Der optimalen Temperatur der zu erwartenden Mikroorganismen entsprechend 18 Stunden bei >42°C, 24-48 Stunden bei 32°C oder 10 Tage bei 4°C bebrüten. Speziell für *Escherichia coli* wird eine Bebrütungstemperatur von 44°C ± 1°C empfohlen¹⁰.

Koloniemorphologie

Lactose-positive Keime

Runde, purpurrote Kolonien, Ø 0,5-2 mm, können von purpurroten Höfen umgeben sein.

Lactose-negative Keime

Blasse Kolonien, können von grünlichen Höfen umgeben sein.

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-Lactose-Agar ist nicht ausschließlich für *Enterobacteriaceae* selektiv; andere Keime, z.B. *Aeromonas* und *Yersinia* spp. können ähnliche Reaktionen zeigen.

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

Die Selektivität des Nährbodens verringert sich nach 24 Stunden Bebrütung; vorher unterdrückte Mikroorganismen können dann wachsen.

Literatur

1. Internationaler Milchwirtschaftsverband (1966) "Standard-Routinemethode für die Zählung coliformer Bakterien in Rohmilch". Internationaler Standard FIL-IDF 39.
2. Internationaler Milchwirtschaftsverband (1974) "Zählung coliformer Bakterien in Milch und Milchprodukten". Internationaler Standard FIL-IDF 73.

3. Institut für Lebensmitteltechnologie und Verpackung der TU München (1974) "Merkblatt 19: Bestimmung der Gesamtkoloniezahl, der Anzahl an Schimmelpilzen und Hefen und der Anzahl an coliformen Keimen in Flaschen und vergleichbaren enghalsigen Behältern". *Milchwiss.*, 29, 602-606.
4. Klose, J., (1968) "Harmonisierung des Speiseeisrechtes in der EWG". *Süßwaren* 14, 778-780.
5. Klose, J., (1968) "Entwurf einer Richtlinie zur Angleichung der Rechtsvorschriften für Speiseeis in den Mitgliedsstaaten der EWG. Neufassung des Anhangs III zum Entwurf vom 19.12.1966". *Süßwaren* 14, 780-782.
6. BGA: "Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG." L 00.00-21: "Bestätigung von *Escherichia coli* durch zusätzliche Identifizierungsreaktionen". und L 01.00-3: "Bestimmung der coliformen Keime in Milch, Milchprodukten, Butter, Käse und Speiseeis".
7. DIN 10172-3: "Mikrobiologische Milchuntersuchung – Bestimmung der coliformen Keime. Teil 3: Verfahren mit festem Nährboden".
8. 2.6.13. Mikrobiologische Prüfung nicht steriler Produkte in: Europäisches Arzneibuch Nachtrag 2001.
9. Druce, R.G. et al. (1957) *J. Appl. Bacteriol.* 20, 1-10.
10. Mossel, D.A.A. und Vega, C.L. (1973) *HLth. Lab. Sci.* 11, 303-307.