

### Pseudomonas- Selektivnährböden

Pseudomonas-Aeruginosa-Selektivnährboden (C-N)  
Pseudomonas-Selektivnährboden (C-F-C)

Zur selektiven Isolierung von *Pseudomonas* spp. bzw. *Pseudomonas aeruginosa* aus klinischem Material sowie aus Lebensmitteln und insbesondere aus Wasserproben. Pseudomonas-Aeruginosa-Selektivnährboden (C-N) entspricht dem Entwurf der DIN EN 12780<sup>1</sup> sowie der neuen Trinkwasserverordnung<sup>2</sup>. Pseudomonas-Selektivnährboden (C-F-C) entspricht der DIN ISO 13720<sup>3</sup>.

### Pseudomonas-Agar-Basis

Art.-Nr. CM 559

Typische Zusammensetzung	(g/l)
Gelatinepepton	16,0
Casein-Hydrolysat	10,0
Kaliumsulfat	10,0
Magnesiumchlorid	1,4
Agar	11,0
pH 7,1 ± 0,2	

### Pseudomonas-C-N-Selektiv- Supplement

Art.-Nr. SR 102

Zusammensetzung je Röhrchen (1 Röhrchen je 500 ml Nährboden)	
Cetrimid	100 mg
Nalidixinsäure	7,5 mg

### Pseudomonas-C-F-C- Selektiv-Supplement

Art.-Nr. SR 103

Zusammensetzung je Röhrchen (1 Röhrchen je 500 ml Nährboden)	
Cetrimid	5,0 mg
Fusidinsäure	5,0 mg
Cephalosporin	25 mg

#### Zubereitung

##### Pseudomonas-Agar-Basis

24,2 g Pseudomonas-Agar-Basis in 500 ml Aqua dest. suspendieren, 5 ml Glycerin zufügen und bis zum vollständigen Lösen erhitzen. 15 Minuten bei 121°C autoklavieren und auf 50°C abkühlen.

##### Pseudomonas-Aeruginosa-Selektivnährboden (C-N)

Den Inhalt eines Röhrchens Pseudomonas-C-N-Selektiv-Supplement in 2 ml einer Mischung aus Ethanol und ste-

rilem Aqua dest. (1:1) lösen und zu 500 ml steriler, abgekühlter Pseudomonas-Agar-Basis geben. Gut mischen und Platten gießen.

##### Pseudomonas-Selektivnährboden (C-F-C)

Den Inhalt eines Röhrchens Pseudomonas-C-F-C-Selektiv-Supplement in 2 ml einer Mischung aus Ethanol und sterilem Aqua dest. (1:1) lösen und zu 500 ml steriler, abgekühlter Pseudomonas-Agar-Basis geben. Gut mischen und Platten gießen.

#### Beschreibung

Der Zusatz des entsprechenden Supplements zur Pseudomonas-Agar-Basis ergibt einen Nährboden, der mit dem Zusatz von Pseudomonas-C-N-Selektiv-Supplement *Pseudomonas aeruginosa* selektiv anzüchtet oder mit dem Zusatz von Pseudomonas-C-F-C-Selektiv-Supplement allgemein für die Spezies der Pseudomonaden selektiv ist. Der Basisnährboden ist eine Modifikation des King A-Agars<sup>4</sup>, der Magnesiumchlorid und Kaliumsulfat enthält, um die Pigmentbildung von Pseudomonaden zu fördern.

Pseudomonas-C-N-Selektiv-Supplement wird zur selektiven Isolierung von *Pseudomonas aeruginosa* empfohlen. Die Zusammensetzung des Supplements wurde von Goto und Enomoto<sup>5</sup> beschrieben, die von den Untersuchungen von Lowbury und Collins<sup>6</sup> ausgingen, in denen bei der Isolierung von Pseudomonaden Cetrimid als Selektivsubstanz verwendet wurde. Goto und Enomoto zeigten, daß der Zusatz von Nalidixinsäure (15 µg/l) und die gleichzeitige Reduzierung des ursprünglichen Cetrimidgehaltes auf 200 µg/ml die Leistungsfähigkeit des Nährbodens entscheidend verbesserten. Mit diesem Nährboden konnte eine höhere Wiederbelebung von *P. aeruginosa* mit verbesserter Pigmentbildung erzielt werden, während die in konventionellen Cetrimid-Nährböden so problematischen Kontaminanten wie Klebsiella, Proteus und *Providencia* spp. fast völlig unterdrückt wurden.

Pseudomonas-C-F-C-Selektiv-Supplement wird zur Isolierung von *Pseudomonas* spp. empfohlen. Mead und Adams<sup>7</sup> zeigten, daß der auf 10 µg/ml reduzierte Gehalt an Cetrimid das Wachstum aller pigmentierten und nicht pigmentierten psychrophilen Pseudomonaden zuläßt. Zur Verbesserung der Selektivität fügten dieselben Autoren Cephaloridin (50 µg/ml) und Fusidin (10 µg/ml) zu. Diese Kombination ergab einen neuen, spezifischeren Nährboden zur Isolierung von Pseudomonaden aus Tiefkühlkost und Produktionsstätten, wobei 48 Stunden bei 25–30°C bebrütet wird.

In letzter Zeit wurde besonders der Isolierung und dem Nachweis von *Burkholderia cepacia* aus Wassersystemen, die für die Herstellung von Pharmazeutika und Kosmetika verwendet werden, viel Aufmerksamkeit gewidmet<sup>8</sup>.

#### Kulturverfahren

##### Untersuchung von klinischem Untersuchungsmaterial auf *Pseudomonas aeruginosa*

1. Pseudomonas-Aeruginosa-Selektivnährboden (C-N) nach Vorschrift herstellen.
2. Platten gießen und Oberfläche trocknen.
3. Die Hälfte der Platte mit einem Tupfer kräftig beimpfen.
4. Das Inokulum mittels Impföse über die andere Hälfte austreichen, so daß Einzelkolonien entstehen können.

- Bei 35°C bebrüten. Nach 24 und 48 Stunden sowohl unter weißem als auch unter UV-Licht begutachten.

## Untersuchung von Lebensmitteln, Wasser und Umweltmaterial auf *Pseudomonas* spp.

- Pseudomonas-Aeruginosa-Selektivnährboden (C-F-C) nach Vorschrift herstellen.
- Platten gießen und Oberfläche trocknen.
- Lebensmittelproben 1:5 oder 1:10 in 1%igem (w/v) Peptonwasser (OXOID, Art.-Nr. CM 9) oder Kochsalz-Pepton-Lösung (Maximal-Wiederbelebungslösung, OXOID Art.-Nr. CM 733) verdünnen und im Stomacher oder Labormixer homogenisieren.
- 0,5 oder 1 ml des Homogenisats mit einem Glasspatel auf der Platte ausstreichen. Wasser oder Abstrichproben direkt auf der Platte ausstreichen.
- Bei 25°C bebrüten und nach 24 und 48 Stunden sowohl unter weißem als auch unter UV-Licht ablesen.
- Kolonien mit Hilfe weiterer Testungen bestätigen.

## Koloniemorphologie

Jegliches Wachstum auf Pseudomonas-Aeruginosa-Selektivnährboden (C-N) oder Pseudomonas-Selektivnährboden (C-F-C) läßt auf vorhandene *Pseudomonas* spp. schließen. Blaugrüne oder braune Pigmentierung bzw. Fluoreszenz können als Hinweis auf *Pseudomonas aeruginosa* gelten.

## Lagerung und Haltbarkeit

Trockennährboden:  
Fest verschlossen, lichtgeschützt, 10–25°C.  
Supplemente: 2–8°C.  
Haltbarkeit: siehe Etikett.

## Qualitätskontrolle

### Pseudomonas-Aeruginosa-Selektivnährboden (C-N)

Positivkontrolle  
*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853  
Negativkontrolle  
*Proteus vulgaris* ATCC 13315

### Pseudomonas-Selektivnährboden (C-F-C)

Positivkontrolle  
*Burkholderia cepacia* NCTC 10661  
Negativkontrolle  
*Staphylococcus aureus* ATCC 25923

## Zusätzliche Hinweise

Der Nährboden sollte bei Bedarf frisch zubereitet werden und nicht länger als 4 Stunden flüssig gehalten werden. Erstarrter Nährboden sollte nicht wieder verflüssigt werden.

Wenn schwärmende Kolonien von *Proteus* spp. bei Lebensmittelproben zu Problemen führen, sollte die Bebrütungstemperatur für 3–5 Tage auf 20°C gesenkt werden.

In Tiefkühlkost kann eine breite Spanne an Pseudomonaden enthalten sein. Falls Pseudomonas-Selektivnährboden (C-F-C) bei niedrigen Temperaturen bebrütet wird, können *P. fluorescens*, *P. putida* oder auch *P. aeruginosa* auftreten. *Alteromonas* spp. können als rosa bis braune Kolonien vorkommen, besonders wenn Fischprodukte untersucht werden.

## Literatur

- Entwurf DIN EN 12780 „Wasserbeschaffenheit – Nachweis und Zählung von *Pseudomonas aeruginosa* durch Membranfiltration.“
- Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung – TrinkwV 2001) vom 21. Mai 2001. BGBl. I Nr. 24, Seite 959-980.
- DIN ISO 13720 „Fleisch und Fleischerzeugnisse – Zählung für *Pseudomonas* spp.“
- King, E.O., Ward, M.K. und Raney, D.E. (1954) J. Lab. & Clin. Med. 44, 301-307.
- Goto, S. und Enomoto, S. (1970) Jpn. J. Microbiol. 14, 65-72.
- Lowbury, E.J. und Collins, A.G. (1955) J. Clin. Pathol. 8, 47-48.
- Mead, G.C. und Adams, B.W. (1977) Br. Poult. Sci. 18, 661-667.
- Geftic, S.G., Heymann, H. und Adair, F.W. (1970) Appl. & Environmental Microbiol. 37, 505-510.

## Wachstumscharakteristika auf Pseudomonas-Selektivnährböden

Spezies	Wachstum auf Pseudomonas-Agar-Basis mit Zusatz von	
	C-N-Selektiv-Supplement	C-F-C-Selektiv-Supplement
<i>B. cepacia</i> NCTC 10661	±	+++
<i>B. cepacia</i> ATCC 25416	+	+++
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+++	+++
<i>P. putida</i> ATCC 12633	++	+++
<i>P. fluorescens</i> ATCC 13525	+++	+++

Die Ablesung erfolgte nach 18stündiger Bebrütung bei 30°C.