

Eine verbesserte Methode zum quantitativen Nachweis von
Enterobacteriaceen

W. Ruosch

Zusammenfassung

Zur quantitativen Erfassung der Enterobacteriaceen mit Hilfe des Tropfverfahrens auf vorgegossenen und getrockneten Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar-Nährböden wird die anaerobe Bebrütung empfohlen.

Dadurch werden Fehler durch obligate Aerobier ausgeschaltet und die Beurteilung der Kulturen wird vereinfacht.

Une technique améliorée pour le dénombrement des
Enterobacteriaceae

Résumé

Pour l'analyse bactériologique quantitative des Enterobacteriaceae par la méthode dite en gouttes sur gélose "Violet red bile agar" nous conseillons la culture en atmosphère anaérobie.

Ce procédé permet d'éviter les erreurs causées par des aérobies stricts et facilite en outre la lecture et l'appréciation des cultures.

An improved quantitative determination of Enterobacteriaceae

Summary

For the enumeration of Enterobacteriaceae by the Drop Plate method on Violet-Red Bile Glucose Agar the anaerobic incubation is recommended.

Errors caused by strictly aerobic organisms are excluded. All colonies present are counted as Enterobacteriaceae.

Резюме

Улучшенная индикаторная техника для энтеробактериальных

Для количественного испытания энтеробактериальных по - средством капельной системы на готовых и сухих ВРБГ-питательных средах для микроорганизмов рекомендуется анаэробная инкубация.

Таким образом элиминируются из обязательно аэробно растущих микробов вытекающие источники ошибок и оценка культур упрощается.

Aus dem Veterinär-bakteriologischen Institut
der Universität Zürich
Direktor: Prof. Dr. E. Hess

-2-

Eine verbesserte Methode zum quantitativen Nachweis
von Enterobacteriaceen

W. Ruosch

Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Lactose-Agar für den Nachweis von coliformen, d.h. Lactose vergärenden, gramnegativen Keimen gehört seit langer Zeit zu einem der gebräuchlichsten Nährmedien im Lebensmittel-Labor (9,10).

Mossel et al. (5,6,7,8) wiesen aber darauf hin, dass in Lebensmitteln tierischer Herkunft Salmonellen auch ohne die Präsenz von Coliformen vorkommen können. Ein negativer Coliformen-Test ist somit in der Lage, ein bakteriologisch einwandfreies Lebensmittel vorzutäuschen, obwohl dieses mit Salmonellen kontaminiert ist.

Um sämtliche Enterobacteriaceen zu erfassen, empfehlen Mossel et al. (5) dem gleichen Agar 1 % Glucose zuzusetzen. Nach Hallmann und Burkhardt (3) sind aber auch andere Bakterien wie *Aeromonas*, *Vibrionen*, *Plesiomonas*, *Achromobacter* (*Acinetobacter*) und *Pseudomonas* in der Lage, diesen Zucker abzubauen. Weil gewisse Nicht-Enterobacteriaceen wie z.B. *Pseudomonas* Glucose nur langsam spalten, wurde die Bebrütungszeit auf 20 Stunden limitiert. Ausserdem werden die Gusskulturen nach dem Erstarren des Agars nochmals mit demselben Medium übergossen. Typische Kolonien von Enterobacteriaceen sind 1-2 mm gross, von roter Farbe und mit einem Hof ausgefällter Gallensäuren umgeben. Nicht-Enterobacteriaceen wachsen überhaupt nicht oder allenfalls in Form von Nadelstichkolonien ohne Hofbildung (pin points).

Mit der Einführung der Tropfmethode waren wir gezwungen, Kolonien von Enterobacteriaceen auf Oberflächen-Kulturen zu beurteilen. Es erwies sich als äusserst schwierig, Grösse der Kolonien und Hofbildung als sicheres Kriterium zu berücksichtigen. Deshalb zählten wir sämtliche roten Kolonien als Enterobacteriaceen.

Um den Grad der Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der Guss- und Tropfmethode zu prüfen, untersuchten wir eine grosse Anzahl von Hackfleisch- und Brätproben. Die Abweichungen in bezug auf die aerobe Gesamtkeimzahl waren sehr gering. Dagegen klafften die entsprechenden Werte bei den Enterobacteriaceen weit auseinander. Das geometrische Mittel (\bar{x}_G) der Tropfmethode übertraf jenes der Gussmethode um das rund Dreifache (Tab. 1).

Tabelle 1

Quantitativer Nachweis der Enterobacteriaceen mit Hilfe von Guss- und Tropfmethode

Untersuchungsverfahren	Anzahl Proben (n)	Anzahl Enterobacteriaceen pro Gramm	
		geometrisches Mittel (\bar{x}_G)	Standardabweichung (s)
Gussmethode	286	5'129	1,07
Tropfmethode	286	15'100	0,97

Es gehört zur Definition der Enterobacteriaceen (3), dass sie sich sowohl aerob wie anaerob vermehren. Andererseits sind die meisten Keime, die auf Kristallviolett-Neutralrot-Galle-

-3-

Glucose-Agar Enterobacteriaceen-Kolonien vortäuschen (z.B. *Acinetobacter anitratus* und *Pseudomonaden*) obligate Aerobier.

Somit könnte eine anaerobe Bebrütung der Tropfkulturen möglicherweise zu einer Hemmung der störenden Keimflora führen, ohne indessen das Wachstum der Enterobacteriaceen zu beeinträchtigen.

Wir prüften deshalb 126 Proben (Brühwurstbrät, Hackfleisch usw.) parallel einerseits mit der Gussmethode und andererseits mit Tropfkulturen, die anaerob bebrütet wurden.

Bei 126 untersuchten Proben betrug das geometrische Mittel mit der Gussmethode 8'868 Enterobacteriaceen pro Gramm und mit der Tropfmethode im Anaeroben-Topf 9'509 pro Gramm (Tab. 2). Die Übereinstimmung von Guss- und Tropfmethode war somit wesentlich besser als bei der aeroben Bebrütung.

Tabelle 2

Quantitativer Nachweis der Enterobacteriaceen mit Hilfe von Gussmethode und Tropfverfahren im Anaeroben-Topf

Untersuchungsverfahren	Anzahl Proben (n)	Anzahl Enterobacteriaceen pro Gramm	
		geometrisches Mittel (\bar{x}_G)	Standardabweichung (s)
Gussmethode	126	8'868	1,07
Tropfverfahren mit anaerober Bebrütung	126	9'509	1,06

Die Beurteilung der anaerob bebrüteten Enterobacteriaceen-Kolonien ist denkbar einfach. Sie sind alle rot und kleiner als bei

-4-

aerober Bebrütung, wodurch das Auszählen erleichtert wird. Die anaerobe Bebrütung verursacht auch bei Serien-Untersuchungen keine besonderen Schwierigkeiten, wenn grosse 36 Petrischalen fassende Anaeroben-Töpfe verwendet werden (BBL).

Zur Abklärung der Frage, ob gewisse Enterobacteriaceen durch die anaerobe Bebrütung gehemmt werden, führten wir 1332 Keimzahlungen mit 37 verschiedenen Stämmen von Enterobacteriaceen durch. 7 stammten aus der Diagnostik, 9 aus der eigenen Stammsammlung, 16 aus dem Institut für Bakteriologie und Histologie der Bundesanstalt für Fleischforschung in Kulmbach¹⁾ und 5 aus der National Collection of Type Cultures in London. Darunter befanden sich *E.coli*, enteropathogene *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella paratyphi B*, verschiedene Serotypen von *Salmonellen*, *Salmonella arizonae*, *Serratia marcescens*, *Shigella sonnei*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter liquefaciens*, *Enterobacter hafniae*, *Citrobacter ballerupensis* und *Edwardsiella tarda*.

Jeder Stamm wurde in 100 ml Kochsalz-Pepton-Lösung aufgeschwemmt und im Stomacher²⁾ homogenisiert. Mit Hilfe eines Verdünnungs- und Dosierapparates²⁾ wurden dekadische Verdünnungen angelegt und vorgetrocknete Platten von Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar mit Tropfen von 0,05 ml der jeweiligen Ver-

1) Herrn Prof. Dr. L. Leistner danke ich für die freundliche Überlassung der Stämme.
2) Hergestellt von A.J. Seward, UAC House, Blackfriars Road, London SE 1 9 UG und vertreten in der Schweiz durch Müller und Krempel AG, 8180 Bülach, Schützenmattstrasse

dünnungsstufe beimpft. Je eine Hälfte der 36 Petrischalen wurde aerob bzw. anaerob bebrütet. In keinem Falle wichen die beiden ermittelten Keimzahlen aus der jeweiligen Bakteriensuspension wesentlich voneinander ab. Bei 20 Stämmen war die durch aerobe Kultur festgestellte Keimzahl geringgradig grösser als jene, die durch Bebrütung im Anaeroben-Topf zustandekam und bei 17 Stämmen wurde die umgekehrte Situation beobachtet.

Die anaerobe Bebrütung verursachte somit keine Wachstumshemmung bei den untersuchten Enterobacteriaceen-Stämmen. In den meisten Fällen waren die Kolonien im Anaeroben-Topf jedoch kleiner als die aerob kultivierten. Ausserdem fehlte in der Regel ein durch die Ausfällung der Gallensäuren verursachter Hof um die roten Kolonien.

Auf gleiche Weise untersuchten wir auch 9 Stämme gramnegativer Keime, die nicht zu den Enterobacteriaceen gehören. Darunter befanden sich *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas shigelloides*, *Aeromonas hydrophila*, *Acinetobacter anitratus* und *Vibrio parahaemolyticus*.

Erwartungsgemäss unterblieb bei *Pseudomonas* und *Acinetobacter* jegliches Wachstum im Anaeroben-Topf. Bei *Aeromonas* und *Vibrio* wurde bei aerober und anaerober Bebrütung kein zahlenmässiger Unterschied festgestellt.

Um die Treffsicherheit der Methode für die Praxis zu testen, kultivierten wir die Keimflora von Fleischwaren auf Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar. Mit Hilfe von Bestätigungsreaktionen überprüften wir den prozentualen Anteil an Enterobacteriaceen-Kolonien.

Zu diesen Bestätigungs-Reaktionen zählen der Oxidations- und Fermentations-Test (OF-Test) nach Hugh und Leifson (4), der

Durch die anaerobe Bebrütung wird die Selektion der Enterobacteriaceen also wesentlich verbessert. Vollkommen ist sie aber trotzdem nicht, denn 9,1 % der auf Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar isolierten Kolonien gehörten nicht zu den Enterobacteriaceen. Sie verhielten sich im OF- und Nitrat-Test wohl wie Enterobacteriaceen, wiesen aber eine positive Oxidase-Reaktion auf. Nach dem Schema von Costin (2) handelt es sich dabei um Aeromonaden oder Vibrionen (Pasteurellen wären auf dem verwendeten Nährboden nicht gewachsen).

Literaturverzeichnis:

1. BUCHANAN, R.E. und N.E. GIBBONS: *Bergey's Manual of DETERMINATIVE BACTERIOLOGY*, 8. Auflage, The Williams and Wilkins Company, Baltimore 1974
2. COSTIN, I.D.: An outline for the biochemical identification of aerobic and facultatively anaerobic gram negative rods of medical interest. *Proc. 5th International Congress of Chemotherapy*, Vienna 1967, B 2/I, 73-76
3. HALLMANN, L. und F. BURKHARDT: *Klinische Mikrobiologie*. Georg Thieme, Stuttgart 1974
4. HUGH, R. und E. LEIFSON: The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. *J.Bact.* **66**, 24-26 (1953)
5. MOSSEL, D.A.A., MENDERINK, W.H.J. and SCHOLTS, H.H.: Use of a modified MacConkey agar medium for the selective growth and enumeration of Enterobacteriaceae. *J.Bact.* **84**, 381 (1962)
6. MOSSEL, D.A.A., J. BECHET et R. LAMBION: La prévention des infections et des toxi-infections alimentaires. Bruxelles 1962. Coopérative d'Édition pour les Industries Alimentaires 1, Avenue E. Gryson, Bruxelles 7

Nitrat-Reduktions-Test und der Oxidase-Nachweis. Enterobacteriaceen oxidieren und vergären Glucose, reduzieren Nitrat und besitzen eine negative Oxidase-Reaktion.

Wir untersuchten 232 Proben von Fleischwaren parallel bei aerober und anaerober Bebrütung quantitativ auf Enterobacteriaceen. 27 Proben, bei denen die Zahl der roten Kolonien bei aerober Bebrütung jene der anaerob kultivierten wesentlich überstieg, wurden näher untersucht. Von jeder Platte impften wir bis zu 10 Kolonien ab. Den Anweisungen von Thatcher und Clark (10) folgend, legten wir davon fraktionierte Ausstriche auf Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar an und überimpften am folgenden Tag auf Schrägagar. Mit den so gewonnenen Reinkulturen wurden drei verschiedene Nährböden (Glucose-Agar mit und ohne Paraffinüberschichtung sowie Nitrat-Brühe) beimpft und der Oxidase-Test durchgeführt.

Im Gesamten wurden 476 Kolonien auf ihre Zugehörigkeit zu den Enterobacteriaceen überprüft. Von 244 aerob gewachsenen Kolonien gehörten nur 41,4 % zu den Enterobacteriaceen, von den im Anaeroben-Topf bebrüteten aber 90,9 % (Tab. 3).

Tabelle 3

Prüfung der auf Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar gewachsenen Kolonien auf ihre Zugehörigkeit zur Gruppe der Enterobacteriaceen

Art der Bebrütung	Anzahl untersuchte Kolonien	davon Enterobacteriaceen	
		Anzahl Kolonien	in %
aerob	244	101	41,4
anaerob	232	211	90,9

7. MOSSEL, D.A.A. und CORNELISSEN, A.M.R.: The examination of foods for enterobacteriaceae using a test of the type generally adopted for the detection of Salmonellae. *J.appl. Bact.* **26**, 444-452 (1963)
8. MOSSEL, D.A.A.: Eine mit dem Salmonella-Nachweis kommensurable Untersuchung von Lebens- und Futtermitteln auf Enterobacteriaceae. *Arch.Lebensmittelhyg.* **15**, 169-171 (1964)
9. Schweizerisches Lebensmittelbuch Kapitel 56: Mikrobiologie und Hygiene. Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1969
10. THATCHER, F.S. and D.S. CLARK: *Microorganisms in foods: their significance and methods of enumeration*. University of Toronto Press 1968