

Ontwikkeling van microbiologische onderzoekmethoden voor diverse land-
bouw- en visserij produkten. Pr.nr 505.0030.

Rapport 88.54

Augustus 1988

HET AANTONEN VAN ESCHERICHIA COLI M.B.V.
DE FLUORESCENTIEMETHODE

ing. A.E.M. Vermunt

Afdeling: Microbiologie

Medewerkers: A. Peters-Groenen, A.E.M. Vermunt

Goedgekeurd door: ir. H. Stegeman

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 08370-19110

Telex 75180 RIKIL

Telefax 08370-17717

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

sectorhoofd

H. Stegeman

A. Peters-Groenen

bibliotheek

A.E.M. Vermunt

EXTERN:

Dhr. Luyck, Fa Merck Amsterdam

Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

INHOUD

SAMENVATTING

1 INLEIDING

2 MATERIAAL EN METHODEN

2.1 Voedingsbodem

2.2 Monstermateriaal

2.3 Teststammen

2.4 Identificatie

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

4 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

LITERATUURLIJST

TABEL

BIJLAGEN

1 Brila-bouillon

2 Brolacin-agar

3 Caso-agar (TSA)

4 Columbia agar

5 DEV-lactose-pepton-bouillon

6 ECD-agar

7 Laurylsulfaat-bouillon

8 Mac Conkey-agar

9 VRB-agar

10 Plate Count Agar

11 Foto's monster B op Fluorocult Plate Count Agar

SAMENVATTING

Er is een onderzoek uitgevoerd naar de bruikbaarheid van de fluorescentiemethode voor het aantonen van *Escherichia coli*. In het onderzoek is gebruik gemaakt van een aantal media, die reeds bekend zijn voor de isolatie van *Escherichia coli* en waaraan nu door de Fa. Merck het substraat 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (MUG) is toegevoegd. Deze media zijn opgenomen in de serie Fluorocult van Merck. *Escherichia coli* heeft een enzym β -D-glucuronidase wat in staat is om dit substraat te splitsen waarbij een stof gevormd wordt die zichtbaar te maken is met UV licht (golflengte 366 nm).

Op alle media is nagegaan of er groei van verdachte kolonies (mogelijk *Escherichia coli*) optrad, of de aanwezige verdachte kolonies fluoresceerden onder UV licht, en, indien mogelijk of indolvorming optrad. Gebleken is dat bij de experimenten met reincultures van *Escherichia coli* en mengcultures met o.a. *Escherichia coli*, de *Escherichia coli* kolonies duidelijk fluoresceerden.

Naast de experimenten met reincultures zijn ook 5 (van nature besmette) monsters onderzocht op de aanwezigheid van *Escherichia coli* m.b.v. deze fluorescentietechniek. Al deze monsters waren *Salmonellae* positief in 25 gram monstermateriaal. Bij het onderzoek van deze monsters deden zich een aantal problemen voor.

Bij twee monsters bleek een vals positief resultaat voor te komen (het betrof in beide gevallen een gram positieve coc). Bij één monster trad fluorescentie van de gehele bodem op die waarschijnlijk veroorzaakt is door het monster zelf; het herkennen van fluorescerende kolonies is hierdoor niet mogelijk. Bij één monster was de aanwezigheid van *Escherichia coli* bacterien duidelijk aantoonbaar met de fluorescentietechniek. In het vijfde monster was geen *Escherichia coli* aanwezig.

1 INLEIDING

De bepaling van de aanwezigheid van *Escherichia coli* bacterien kan van groot belang zijn bij de beoordeling van de hygiene en/of bij de beoordeling van de microbiologische kwaliteit van voedsel en water.

Escherichia coli is een belangrijk indicatororganisme.

Er bestaan thans een aantal genormaliseerde methoden voor de bepaling van *Escherichia coli*: ISO 7251 (MPN-bepaling) en ISO/DIS 6391 (kiemgetal-bepaling). Deze methoden zijn erg arbeidsintensief en vereisen een relatief lange analyseduur. Het aantonen van de aanwezigheid van microbiële enzymen is een aantrekkelijk alternatief voor de bestaande methoden, daar deze enzymen specifiek zijn, en de enzymatische reacties vaak snel zijn en gevoelig (Feng and Hartman, 1982).

In de literatuur is meerdere malen een methode beschreven voor het aantonen van *Escherichia coli* op basis van het enzym b-D-glucuronidase; als substraat werd hierbij 4-methylumbelliferone glucuronide (MUG) gebruikt (Koburger and Miller, 1985) (Feng and Hartman, 1982), (Singh and Hwung, 1986), (Robison 1984), (Moberg, 1985).

96-97% van de *Escherichia coli* stammen bezit het enzym b-D-glucuronidase, terwijl binnen de groep van de Enterobacteriaceae alleen nog enkele *Salmonella*, *Shigella* en *Yersinia* stammen (Singh and Hwung, 1986) dit enzym bezitten.

Het enzym b-D-glucuronidase is in staat het substraat 4-methylumbelliferyl-b-D-glucuronid (MUG) te splitsen, waarbij de stof 4-methylumbelliferon gevormd wordt. Deze stof kan zichtbaar gemaakt worden m.b.v. UV licht (366 nm), waardoor het mogelijk is de zich tussen andere kolonies bevindende *Escherichia coli* snel te identificeren of toegepast in een bouillon, deze te laten fluoresceren in de cultuur.

De Fa. Merck heeft aan een aantal voedingsbodems het substraat 4-methylumbelliferyl-b-D-glucuronid (MUG) toegevoegd. Met deze door de Fa. Merck verstrekte voedingsbodems zijn een aantal orienterende experimenten uitgevoerd op de afdeling microbiologie van het RIKILT.

2 MATERIAAL EN METHODEN

2.1 Voedingsbodems

In de experimenten zijn de volgende media van Merck opgenomen:

- Fluorocult Brila-bouillon (bijlage 1)
- Fluorocult Broilacin-agar (bijlage 2)
- Fluorocult Caso-agar (TSA) (bijlage 3)
- Fluorocult Columbia agar (bijlage 4)
- Fluorocult DEV-lactose-pepton-bouillon (bijlage 5)
- Fluorocult ECD-agar (bijlage 6)
- Fluorocult Laurylsulfaat-bouillon (bijlage 7)
- Fluorocult Mac Conkey-agar (bijlage 8)
- Fluorocult VRB-agar (bijlage 9)
- Fluorocult Plate Count Agar (bijlage 10)

Bij de vaste media is zowel de gietplaatmethode als de spatelplaatmethode toegepast.

2.2 Monstermateriaal

In de experimenten is gebruik gemaakt van 5 natuurlijk besmette monsters; deze monsters waren alle Salmonellae positief in 25 gram monstermateriaal.

Deze monsters waren:

- A : eiprodukt
- B : eipoeder
- C : gedenatureerd melkpoeder
- D : kanenmeel
- E : eiprodukt

Van deze monsters is 10 á 15 gram afgewogen in 90 ml pepton-fysiologische zoutoplossing. Hiervan is 1 ml in bewerking genomen bij de gietplaatmethode en 0.1 ml bij de spatelplaatmethode. Alle beënte media zijn gedurende 24 uur bebroed bij 37 °C (zie ook de diverse bijlagen).

2.3 Teststammen

In de experimenten zijn ook een aantal reinkultures van teststammen opgenomen. Deze teststammen zijn aanwezig in de bacteriecollectie van het RIKILT.

Dit waren: *Escherichia coli* 527
Escherichia coli 28 PR 271
Escherichia coli 877
Enterobacter agglomerans
Shigella flexneri

Bovendien is twee maal een mengcultuur, waarin o.a. *Escherichia coli* aanwezig was, getest.

Dit waren: *Escherichia coli* 877 + *Salmonella senftenberg*
Escherichia coli 527 + *Shigella dysenteriae*

Van genoemde teststammen is een troebele suspensie gemaakt in pepton-fysiologische zoutoplossing. Van deze suspensie is 1 ml in bewerking genomen bij de gietplaatmethode en 0.1 ml bij de spatelplaatmethode. Alle media zijn gedurende 24 uur bij 37°C bebroed (zie ook de diverse bijlagen).

2.4 Identificatie

Op de volgende media is na bebroeding een indoltest uitgevoerd: Brila-bouillon, laurylsulfaatbouillon, DEV-lactose-pepton-bouillon, Plate-Count-Agar, Caso-Agar, Columbia Agar, ECD-agar (zie de diverse bijlagen). Bij de overige media (Brolacin agar, Mc Conkey agar en VRB agar) is de indoltest niet rechtstreeks uitvoerbaar op de voedingsbodem, daar de voedingsbodem zelf gekleurd is.

Voor identificatie is verder nog gebruik gemaakt van API 20E.

3 Resultaten en discussie

In tabel 1 zijn de resultaten weergegeven van de uitgevoerde experimenten.

Bij de 3 geteste *Escherichia coli* stammen blijkt dat in alle vloeibare media fluorescentie optreedt; deze fluorescentie was toe te schrijven aan de aanwezigheid van *Escherichia coli*. Alleen in de Brila-bouillon was niet in alle experimenten indol aantoonbaar; dit hangt waarschijnlijk samen met de wijze van uitvoering van de indoltest, zoals die voorgeschreven wordt door de Fa. Merck (zie bijlage 1).

Bij de testen met *Enterobacter agglomerans* en *Shigella flexneri* blijkt dat in geen enkel medium bij beide micro-organismen duidelijke fluorescentie optreedt. *Enterobacter agglomerans* heeft op Brolacin en

Mc Conkey-agar wel het karakteristieke kolonie-uiteerlijk voor coli-achtigen, maar er treedt (zoals verwacht) geen fluorescentie op.

Bij de mengcultuur van *Escherichia coli* 877 en *Salmonella senftenberg* blijkt in de 3 vloeibare media fluorescentie op te treden die toe te schrijven is aan de aanwezigheid van *Escherichia coli*. De enige kolonie die op Brolacin agar fluoresceert blijkt het voor coli-achtigen typische kolonie-uiteerlijk te hebben; indolvorming kan niet rechtstreeks op de voedingsbodem worden uitgevoerd i.v.m. de sterke eigen kleur van de bodem. Van de kolonies die op ECD-agar fluoresceren blijkt een gedeelte ook indol positief te zijn (dus *Escherichia coli* te zijn). De kolonies die op de Mc Conkey agar het karakteristieke kolonie-uiteerlijk van coli-achtigen hebben (dus in dit geval *Escherichia coli* zijn) blijken wel te fluoresceren, terwijl de kolonies die niet het karakteristieke kolonie-uiteerlijk van coli-achtigen hebben (en dus *Salmonella senftenberg* zijn) niet fluoresceren op deze bodem. Bij de mengcultuur van *Escherichia coli* 527 en *Shigella dysenteriae* blijkt bij de 3 vloeibare media fluorescentie op te treden. Deze is bij laurylsulfaat en lactose-pepton-bouillon zeker toe te schrijven aan *Escherichia coli*. Bij Brila-bouillon was indol niet aantoonbaar; dit hangt waarschijnlijk samen met de wijze van uitvoering van de indoltest, zoals die door de Fa. Merck wordt voorgeschreven. Op de vaste media blijken de fluorescerende kolonies inderdaad *Escherichia coli* te zijn.

Bij monster A bleek in alle media (met uitzondering van Brolacin agar) fluorescentie op te treden. Bij kolonies waarvan de indoltest is uitgevoerd bleek dat de fluorescerende kolonies inderdaad *Escherichia coli* waren. Een fluorescerende kolonie vanaf de Plate Count Agar bodem bleek volgens API 20E inderdaad *Escherichia coli* te zijn.

Bij monster B trad in alle media fluorescentie op. Bij het opnieuw uitplaten van de 10^{-1} t/m 10^{-4} verdunning van het monster van de op Plate Count Agar (gietplaatmethode) bleek de gehele bodem te fluoresceren, terwijl dit bij de 10^{-5} en 10^{-6} verdunning niet optrad. Voor foto's hiervan zie bijlage 11. Vervolgens zijn 20 kolonies vanaf de bodem met de 10^{-1} t/m 10^{-4} verdunning reingestreken; alle 20 kolonies bleken niet te fluoresceren.

Bij de eerste analyse van de monsters C en D bleek dat veel niet fluorescerende kolonies aanwezig waren en slechts enkele wel fluorescerende kolonies. Van beide monsters is vervolgens de 10^{-1} verdunning t/m 10^{-6} verdunning ingezet op Plate Count Agar (gietplaatmethode). Weer bleken enkele fluorescerende kolonies voor te komen. Van beide monsters is één fluorescerende kolonie onderzocht: volgens een identificatie met API 20E bleek dit in beide gevallen geen *Escherichia coli* te zijn. Uit een microscopisch preparaat bleek dat het in beide gevallen een gram positieve coc betrof. Bij monster E trad in geen enkel medium fluorescentie op en bovendien trad in geen enkel medium groei van verdachte kolonies op.

4 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

Uit de experimenten met de reïncultures van *Escherichia coli* is gebleken dat met deze fluorescentiemethode duidelijk de aanwezigheid van *Escherichia coli* is vast te stellen.

Enterobacter agglomerans en *Shigella flexneri* bleken conform de verwachting als reïncultuur niet te fluoresceren.

Bij 2 mengcultures waarin *Escherichia coli* naast een ander micro-organisme van de *Enterobacteriaceae* groep aanwezig was (geen coli-achtige) bleek de aanwezigheid van *Escherichia coli* goed vast te stellen met de fluorescentiemethode.

Bij de 5 monsters die onderzocht zijn bleek bij monster A heel duidelijk m.b.v. de fluorescentiemethode *Escherichia coli* aantoonbaar te zijn.

Bij monster B (eipoeder) is de fluorescentie die op alle media optrad, waarschijnlijk veroorzaakt door het monster zelf: er bleek geen fluorescentie van de kolonies meer op te treden na het reinstrijken.

Bij de twee monsters C en D is een kolonie geïsoleerd die wel fluoresceerde (ook na reinstrijken nog), maar die geen *Escherichia coli* bleek te zijn maar een gram positieve coc.

Het toepassen van deze fluorescentiemethode bij het onderzoek van natuurlijke besmette monsters blijkt dus bij 1 monster geen problemen op te leveren; bij 2 monsters levert de analyse op Plate Count Agar, vergeleken met de resultaten van de bestaande methoden een vals positief resultaat op; bij 1 monster treedt fluorescentie van de

gehele Plate Count Agar bodem op, waardoor het herkennen van fluorescerende kolonies niet mogelijk is. Verder onderzoek zou kunnen uitwijzen of de genoemde problemen ook optreden bij de andere isolatiemedia.

LITERATUUR

Feng, P.C.S. and P.A. Hartman. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology vol 43 (1982) no 6, blz. 1320-1329.

Koburger, J.A. and M.L. Miller. Evaluation of a fluorogenic MPN procedure for determining *Escherichia coli* in oysters. Journal of Food Protection vol 48 (1985) no 3, blz. 244-245.

Moberg, L.J. Fluorogenic Assay for rapid detection of *Escherichia coli* in food. Applied and Environmental microbiology vol 50 (1985) no 6, blz. 1383-1387.

Robison, B.J. Evaluation of a fluorogenic assay for detection of *Escherichia coli* in food. Applied and Environmental microbiology vol 48 (1984) no 2, blz. 285-288.

Singh, D. and Hwung Hoon Hg. Evaluation of a rapid detection method for *Escherichia coli* in foods using fluorogenic assay. Food Microbiology (1986) no 3, blz. 373-377.

Tabel 1: Resultaten onderzoek Fluorocult media.

Stam cq monster	BRILA bouillon			Laurylsulf. bouillon			Lactose pepton bouillon				VRBA gietplaat	
	gas	UV	Indol	gas	UV	Indol	gas	kleur omslag	UV	Indol	spec.kol.	UV
E. coli 527	+	(+)	(+)	+	+	+	(+)	+	(+)	+	+ ¹ kol	-
E. coli 28PR271	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	gg	
E. coli 877	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	gg	
Enterobacter(+) agglomerans	-	-	+	(+)	(+)		+	+	-	-		
Shigella flexneri	-	-	(+)	-	-	+	-	-	-	+	gg	
E. coli 877+ Salm. senftenberg	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
E. coli 527+Shig. dysenteriae	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+		
Monster A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Monster B	(+)	(+)	(+)	+	+	(+)	(+)	+	(+)	(+)	+ ² kol	-
Monster C	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	(+)	gg	
Monster D	(+)	-	(+)	(+)	-	+	-	+ ^{***}	-	-	+ ¹ kol	-
Monster E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	gg	

(+) twijfelachtig nb = niet bepaald
 * licht violet, doorzichtig zonder hof
 ** violet, zonder hof
 *** niet in durhambuisje

Vervolg tabel: 1

	VRBA		PCA				CASO-TSA				Columbia agar							
	spatelp.	spec.kol UV	gietpl. UV	spatelp. Indol	gietpl. Indol	spatelp. UV	gietpl. indol	spatelp. UV	gietpl. Indol	spatelp. UV	gietpl. Indol	spatelp. UV	gietpl. Indol					
E. coli 527	+	(+)	gg			+	+	+ ^{3kol}	nb			+ ^{2kol}	+			+	+	
E. coli 28PR271		gg		+	nb	+	+	+	nb			+	+	+	nb		+	+
E coli 877	+	+		+	nb	+	+	+	nb			+	+	+	nb		+	+
Enterobacter agglomerans		gg				-	-					-	-				-	-
Shigella flexneri	-*	-		-	nb			-	nb			-	-	-	nb		-	-
E. coli 877+ Salm. senftenberg	-**	-				-	-					(+)	(+)				-	-
E. coli 527+ Shig. dysenteriae	+	(+)		+	+							+	+				+	+
Monster A	-*	+				+	+					+	+				+	+
Monster B				+	nb			+	nb			+	nb					
Monster C				-	nb			- ^{veel} + ^{1kol}	nb nb			- ^{veel} + ^{2kol}	nb nb					
Monster D				-	nb			-	nb			- ^{veel} (+) ^{3kol}	nb nb					
Monster E				gg				- ^{1kol}	nb			gg						

(+) twijfelachtig nb = niet bepaald
 * licht violet, doorzichtig zonder hof
 ** violet, zonder hof
 *** niet in durhambuisje

Vervolg tabel: 1

	Brolacin agar				ECD				Mc Conkey agar			
	gietpl.		spatelpl.		gietpl.		spatepl.		gietpl.		spatelpl.	
	spec. UV	spec. UV	spec. UV	spec. UV	UV Indol	UV Indol	UV Indol	UV Indol	spec. UV	spec. UV	spec. UV	spec. UV
	kol	kol	kol	kol					kol	kol	kol	kol
E. coli 527	gg		+	+	gg		+	+	gg		+	(+)
E. coli 28PR271	+	+			gg				gg			gg
E. coli 877			+	+			+	(+)			+	+
	+	+			gg				gg			
Enterobacter agglomerans			+	-			-	-			+	-
Shigella flexneri	gg				gg		-	-	gg		-	-
E. coli 877+ Salm. senften berg			+	lkol	+		+	+			+	+
			-	-			-	-			-	-
E. coli 527+ Shig. dysenteriae			+	+			+	+			+	+
Monster A			+	-			+	+			+	+
Monster B	+	+			lkol	nb			+	+		
					-lkol	nb						
Monster C	(+)	-veel			gg				-	-		
		+lkol										
Monster D	-	-veel			-	nb			-lkol	-		
		+lkol										
Monster E	gg				gg				gg			

(+) twijfelachtig nb = niet bepaald
 * licht violet, doorzichtig zonder hof
 ** violet, zonder hof
 *** niet in durhambuisje

FLUOROCULT® MEDIA MERCK

12587 FLUOROCULT® BRILA-BOUILLON
 100 GRAM
 500 GRAM

WERKWIJZE:

Bovenstaande Bouillon wordt gebruikt als selectieve ophoping en als kiemgetalbepaling d.m.v. titerbepaling of volgens de MPN techniek, van Escherichia coli en andere Coliformen in water, melk en andere levensmiddelen.

De in BRILA-Bouillon aanwezige Gal en Brillantgroen remmen verreweg alle groei van ongewenste flora inclusief de lactose afbrekende Clostridia (b.v. Cl.perfringens).

De omzetting van lactose, waardoor gasvorming ontstaat, geeft een indicatie over de aanwezigheid van E.coli en andere faecale Coliformen.

Naar fluorescentie wordt gekeken m.b.v. UV licht.

SAMENSTELLING: g/l

Pepton aus Fleisch	10,0
Lactose	10,0
Ochsengalle, getr.	20,0
Brillantgrün	0,0133
L-Tryptophan	1,0
4 Methylumbelliferyl- β -D-Glucoronid	0,1

BEREIDING:

41,0 gram /liter oplossen in gedemineraliseerd water.
 Afvullen in reageerbuisjes (eventueel met Durhambuisje).
 Autoclaveren (15 min., 121°C); PH waarde: 7.2 \pm 0,1.

GEBRUIK EN AFLEZING:

Het gebruik van deze bouillon gebeurt op de voorgeschreven wijze d.w.z. De reageerbuizen worden beënt, waarbij uitgegaan wordt van 1 ml. inoculum t.o.v. minstens 10 ml. bouillon.

(Bij dubbel concentr. 10 ml. inoculum t.o.v. 10 ml. bouillon.)

Bebroeden 16-24 uur bij 37°C (of als anders aangegeven wordt)

Aflezing van buizen gebeurt bij UV licht m.b.v. UV lamp Merck art. 13203.

Als cultuur helblauw fluoriseerd, wijst dit op aanwezigheid van E.coli.

De aanwezigheid van E.coli wordt bevestigd door een gasvorming in Durhambuisjes en Indolpositieve reactie.

Dit laatste gaat als volgt: Breng op de bouillon een laagje van \pm 5 mm Kovacs Indol reagens (Merck art. 9293) aan.

Een hardrode verkleuring van deze laag, na 1-2 minuten bevestigd, de aanwezigheid van E.coli.

FLUOROCULT® MEDIA MERCK

4031 FLUOROCULT® BROLACIN-AGAR
 100 GRAM
 500 GRAM

WERKWIJZE:

De voedingsbodem wordt gebruikt voor de bepaling van het kiemgetal, isolatie en een oriënterende identificatie van microorganismen in urines.

Omdat deze bodem verschillende voedingsstoffen bevat, groeien alle, in urine voorkomende microorganismen, zeer goed. Verder bevat deze bodem lactose, waarbij, als deze afgebroken wordt, de kolonies geel gekleurd worden door omslag van het bromthymolblauw.

Als een base gevormd wordt, wordt de omslag diep blauw. Een differentiatie van E.coli is mogelijk m.b.v. UV licht, waarbij deze kolonies fluoriseren.

SAMENSTELLING:

Pepton aus Casein	4,0
Universal Pepton	4,0
Fleischextract	3,0
L-Cystin	0,128
Lactose	10,0
Bromthymolblauw	0,02
Agar Agar	12,0
4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid	0,1

BEREIDING:

33,3 gram/liter in gedemineraliseerd water oplossen door verhitting in kokend waterbad; Autoclaveren (15 min., 121°C); Platen gieten; PH waarde $7.3 \pm 0,1$.

GEBRUIK EN RESULTATEN:

Een bepaalde hoeveelheid monstermateriaal (max. 1 ml.) wordt m.b.v., b.v. Trigalski-spatel over de oppervlakte van de plaat verdeeld.

Daarna wordt 18-24 uur bebroed bij 37 °C.

Uit het aantal kolonies per plaat wordt het kiemgetal per monster berekend.

Lactose positieve kolonies zijn geel.

Lactose negatieve kolonies zijn blauw.

Aflezings bij UV licht m.b.v. UV lamp Merck (art. 13203):

Helblauwe fluoriserende kolonies zijn E. coli.

FLUOROCULT® MEDIA MERCK

4034 FLUOROCULT® CASO-AGAR (TSA-AGAR)
 100 GRAM
 500 GRAM

WERKWIJZE:

Deze remstof- en indicatorvrije universele voedingsbodem is voor een groot aantal doelen te gebruiken, maar wordt hoofdzakelijk gebruikt voor kiemgetal bepalingen en voor de kweek van verschillende microorganismen.

Omdat deze bodem erg rijk is aan voedingsstoffen is deze ook zeer geschikt voor de kweek van zeer gevoelige microorganismen.

Het aantonen van de E. coli is mogelijk m.b.v. UV lamp, waarbij kolonies fluoricerend oplichten.

SAMENSTELLING:

Pepton aus Casein	16,0
Pepton aus Sojamehl	5,0
Natrium, Chloride	6,0
Agar Agar	13,0
Tryptophan	1,0
4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid	0,07

BEREIDING:

41,1 gram/liter gedemineraliseerd water oplossen door verhitting in kokend waterbad; Autoclaveren (15 min., 121°C);

PH waarde 7.3 \pm 0,1.

GEBRUIK EN RESULTATEN:

Het gebruik van deze bodem is afhankelijk van het doel waarvoor men deze wil gebruiken.

CASO-Agar wordt gebruikt voor zowel meng- als oppervlakte plaat techniek.

De aflezing van E.coli gebeurt bij UV licht m.b.v. UV lamp Merck (art. 13203). Kleur van de kolonies, fel blauw fluoriserend.

Ter bevestiging van E.coli, kan op de betreffende kolonies nog 10-20 μ l Kovacs Indolreagens Merck (art. 9293) gedruppeld worden.

Roodkleuring na de 2-10 sec. geeft een positieve Indol reactie aan.

FLUOROCULT® MEDIA MERCK

4035 FLUOROCULT® COLUMBIA AGAR
 100 GRAM
 500 GRAM

WERKWIJZE:

Deze hoogwaardige, zeer rijke voedingsbodem is uitermate geschikt voor het kweken van, in het bijzonder, veeleisenden microorganismen.

Het aantonen van de E.coli kolonies is mogelijk m.b.v. UV lamp, waarbij kolonies fluoriserend oplichten.

SAMENSTELLING: g/l

Spezial-Nährsubstrat	23,0
Stärke	1,0
Natriumchlorid	5,0
Agar Agar	13,0
Tryptophan	1,0
4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid	0,07

BEREIDING:

43,1 gram/liter in gedemineraliseerd water oplossen door verhitting in kokend water; Autoclaveren (15 min., 121°C); PH-waarde 7,3 \pm 0,1.

GEBRUIK EN RESULTATEN:

Het gebruik van deze bodem is afhankelijk van het doel waarvoor men deze wil gebruiken.

De aflezing van E.coli gebeurt bij UV-licht m.b.v. UV lamp Merck (art. 13203). Kleur van de kolonies, fel blauw- fluoricerend.

Ter bevestiging van E.coli kan op de betreffende kolonies nog 10-20 μ l Kovacs Indol reagens Merck (art. 9293) gedruppeld worden. Roodkleuring na 2-10 sec. geeft een positieve Indolreactie aan.

FLUOROCULT® MEDIA MERCK

4037 FLUOROCULT® DEV-LACTOSE-PEPTON-BOUILLON

100 GRAM

500 GRAM

WERKWIJZE:

Bovenstaande Bouillon wordt gebruikt in het bijzonder als ophopingsmedium en ten behoeve van de titerbepaling van coliforme bacteriën. Dit alles in het kader van het bacteriologisch onderzoek van water (volgens DEV.d.i. Deutsche Einheits Verfahren).

SAMENSTELLING: g/l

Pepton aus Fleisch	10,0
Lactose	10,0
Natriumchloride	5,0
Bromkresolpurpur	0,01
Tryptophan	1,0
4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid	0,1

BEREIDING:

26,1 gram/liter oplossen in gedemineraliseerd water;
Afvullen in reageerbuisen, waarin zich reeds Durham-
buisjes bevinden; Autoclaveren (20 min., 115°C);
PH waarde: 7.0 \pm 0,2

GEBRUIK EN AFLEZING:

De vorming van gas in de Durham-buisjes, na bebroeden van 16-48 uur bij 37°C \pm 1°C wijst op aanwezigheid van E.coli en/of andere coliforme bacteriën.

De aflezing van fluorescentie wordt gedaan m.b.v. UV lamp Merck (art. 13203). Als de cultuur helblauw fluoriseerd wijst dit op aanwezigheid van E.coli

Om dit te bevestigen wordt op de cultuur een 5 mm dikke laag van Kovacs Indol reagens Merck (art 9293) gebracht.

Een hardrode verkleuring van deze laag, na 1 - 2 minuten bevestigt de aanwezigheid van E.coli.

FLUOROCULT® MEDIA MERCK

4038 FLUOROCULT® ECD-AGAR
 100 GRAM
 500 GRAM

WERKWIJZE

De galzouten in deze bodem remmen verreweg de niet obligaat in de darmflora voorkomende begeleidende flora. Door middel van fluorisentie in UV-licht en een positieve Indolreactie kunnen onder de gegroeide kolonies de aanwezige E.coli kolonies geïdentificeerd worden.

SAMENSTELLING: g/l

Pepton aus Casein	20,0
Lactose	5,0
Natriumchloride	5,0
Gallesalzmisschung	1,5
Dikaliumpydrogenphosphat	4,0
Kaliumpydrogenphosphat	1,5
Agar-Agar	15,0
Tryptophan	1,0
4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid	0,07

BEREIDING:

53,1 gram/liter in gedemineraliseerd water oplossen door verhitting in kokend water; Autoclaveren (15 min., 121°C.); Platen gieten; PH waarde: 7,0 \pm 0,1.

GEBRUIK EN RESULTATEN:

Een bepaalde hoeveelheid monstermateriaal (max 1 ml) wordt m.b.v., b.v. Drigalski-spatel over het oppervlakte van de plaat verdeeld.

Daarna wordt 18-24 uur bebroed bij 37 °C.

De aflezing van E.coli gebeurt bij UV licht m.b.v. UV lamp Merck (art. 13203).

Kleur van de kolonies: fel blauw- fluoricerend.

Ter bevestiging van E. coli kunnen op de betreffende kolonies nog 10-20 μ Kovacs Indol Reagens Merck (art. 9293) gedruppeld worden. Roodkleuring na 2-10 sec. geeft een positieve Indol reactie aan.

FLUOROCULT® MEDIA MERCK

12588 FLUOROCULT® LAURYL SULFAT-BOUILLON
 100 GRAM
 500 GRAM

WERKWIJZE:

Laurylsulfaat-Bouillon wordt gebruikt als oriënterende voortest op Coliforme en als selectieve ophoping van diezelfde groep bij onderzoek van water, melkproducten en voedingsmiddelen. Het gehalte aan Laurylsulfaat in deze bouillon remt verreweg alle ongewenste begeleidende flora.

Doordat deze bouillon erg rijk is aan voedingsstoffen en fosfaatbuffers verloopt de groei van microorganismen en ook de gasvorming sneller.

Ook bij die Coliforme, die lactose langzaam omzetten, is de groei sneller.

Gasvorming kan worden aangetoond door aanbrengen van Durhambuisje in reageerbuis.

Fluorisence meting m.b.v. UV lamp Merck art. 13203.

SAMENSTELLING: g/l

Tryptose	20,0
Lactose	5,0
Natriumchlorid	5,0
Laurylsulfat-Natriumsalz	0,1
Dikaliumhydrogenfosfaat	2,75
Kaliumdihydrogenfosfaat	2,75
L - Tryptophan	1,0
4 - Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid	0,1

BEREIDING:

36,5 gram /liter in gedemineraliseerd water oplossen, afvullen in reageerbuizen (eventueel voorzien van Durhambuisjes);

Autoclaveren (15 min., 121 °C); PH waarde 6.8 \pm 0,1.

GEBRUIK EN AFLEZING:

Het gebruik van deze bouillon gebeurt op de voorgeschreven wijze d.w.z. De reageerbuizen worden beënt, waarbij uitgegaan wordt van 1 ml. inoculum t.o.v. minstens 10 ml. bouillon.

(Bij dubbel concentr. 10 ml. inoculum t.o.v. 10 ml. bouillon).

Bebroeden 16-24 uur bij 37°C (of als anders aangegeven wordt).

Aflezings van buizen gebeurt bij UV licht m.b.v. UV lamp Merck art. 13203.

Als cultuur helblauw fluoriseerd, wijst dit op aanwezigheid van E.coli.

De aanwezigheid van E.coli wordt bevestigd door een gasvorming in Durhambuisjes en Indolpositieve reactie.

Dit laatste gaat als volgt: breng op de bouillon een laagje van \pm 5 mm Kovacs Indol reagens aan.

Een hardrode verkleuring van deze laag, na 1-2 minuten bevestigd, de aanwezigheid van E.coli.

FLUOROCULT® MEDIA MERCK

4029 FLUOROCULT® MACCONKEY-AGAR
 100 GRAM
 500 GRAM

WERKWIJZE:

Bovenstaand medium wordt gebruikt bij isolatie van Salmonella, Shigella en Coliforme bacteriën, in het bijzonder Escherichia coli, uit allerlei materiaal.

De in dit medium aanwezige galzouten en kristalviolet remmen verreweg alle grampositieve flora.

De Lactose positieve kolonies worden met behulp van de aanwezige Lactose en de PH-indicator neutraal rood, gevormd.

Door middel van fluorisentie in UV licht, kunnen onder de gegroeide kolonies, de aanwezige E.coli kolonies geïdentificeerd worden.

SAMENSTELLING: g/l

Pepton aus Casein	17,0
Pepton aus Fleisch	3,0
Natriumchloride	5,0
Lactose	10,0
Gallesalzmischung	1,5
Neutralrot	0,03
Kristallviolett	0,001
Agar Agar	13,5
4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid	0,1

BEREIDING:

50,1 gram/liter in gedemineraliseerd water oplossen door verhitting in kokend water; Autoclaveren (15 min., 121°C); Platen gieten; PH waarde: 7,1 \pm 0,1.

GEBRUIK EN RESULTATEN:

De platen worden op de gebruikelijke wijze beënt (Entnaald, öse of Drigalskispatel) en 18-24 uur bij 37 °C bebroed.

Lactosenegatieve kolonies zijn kleurloos.

Lactosepositieve kolonies zijn rood, met vaak een troebel hof van neergeslagen galzouten.

De aflezing van E.coli gebeurt bij UV licht m.b.v. UV lamp Merck (Artikel 13203).

Kleur van deze kolonies. Fel blauw-fluoricerend.

FLUOROCULT® MEDIA MERCK

4030 FLUOROCULT® VRB - AGAR
 100 GRAM
 500 GRAM

WERKWIJZE:

Deze selectieve bodem wordt gebruikt voor de kiemgetalbepaling van coliforme bacteriën in het algemeen en de Escherichia-coli in het bijzonder.

De in het medium aanwezige galzouten en kristalviolet zorgen voor de remming van gram positieve begeleidende flora.

Lactose positieve kolonies zijn rood gekleurd i.v.m. kleuromslag PH-indicator (neutraal rood).

Met behulp van UV-licht (360 nm) zijn de dan fluoricerende E.coli kolonies makkelijk tussen de andere kolonies te herkennen.

SAMENSTELLING: g/l

Pepton aus Fleisch	7,0
Hefeextract	3,0
Natriumchloride	5,0
Lactose	10,0
Neutralrot	0,03
Gallesalzmischung	1,5
Kristallviolett	0,002
Agar Agar	13,0
4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid	0,1

BEREIDING:

39.6 gram/liter in gedemineraliseerd water oplossen en door verhitting in kokend waterbad steriliseren (30 min.) Niet Autoclaveren ! PH waarde: $7,4 \pm 0,1$.

GEBRUIK EN RESULTATEN

De voedingsbodem op de gebruikelijke manier beënten en daarna 18 tot 24 uur bij 37°C bebroeden.

Lactose negatieve Enterobacteriaceae zijn kleurloos.

Lactose positieve Enterobacteriaceae zijn rood, met meestal een roodachtige precipitaat-hof.

Aflezings bij UV licht m.b.v. UV lamp Merck (art 13203): Helblauwe-fluoriserende kolonies zijn E.coli.

FLUOROCULT® MEDIA MERCK

4033 FLUOROCULT® PLATE-COUNT-AGAR
 100 GRAM
 500 GRAM

WERKWIJZE:

Deze voedingsbodem die geen remstoffen of indicatoren bevat, wordt gebruikt voor het bepalen van het totale kiemgetal in melk en melkprodukten, water en diverse andere materialen. Het aantonen van de fluoricerende E.coli kolonies gebeurt m.b.v. UV lamp.

SAMENSTELLING: g/l

Pepton aus Casein	5,0
D (+) -Glucose	1,0
Hefeextract	2,5
Agar Agar	14,0
Tryptophan	1,0
4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid	0,07

BEREIDING:

23,6 gram/liter in gedemineraliseerd water oplossen door verhitting in kokend waterbad; Autoclaveren (15 min., 121°C); PH-waarde: 7.0 \pm 0.1.

GEBRUIK- EN RESULTATEN:

Het gebruik van deze bodem is afhankelijk van het doel waarvoor men deze wil gebruiken.

PLATE-COUNT-AGAR wordt gebruikt voor zowel meng als oppervlakte plaat techniek, maar ook gebruikt als agar worst of Rodac plaatjes bij afdruk techniek. (Hygiëne monsters)

De aflezing van E.coli gebeurt bij UV licht m.b.v. UV lamp Merck (art. 13203). Kleur van kolonies helblauw-fluoriserend.

Ter bevestiging van E.coli kan op de betreffende kolonies nog 10-20 μ l Kovacs Indolreagens Merck (art. 9293), gedruppeld worden. Roodkleuring na 2-10 seconden geeft een positieve Indolreactie aan.

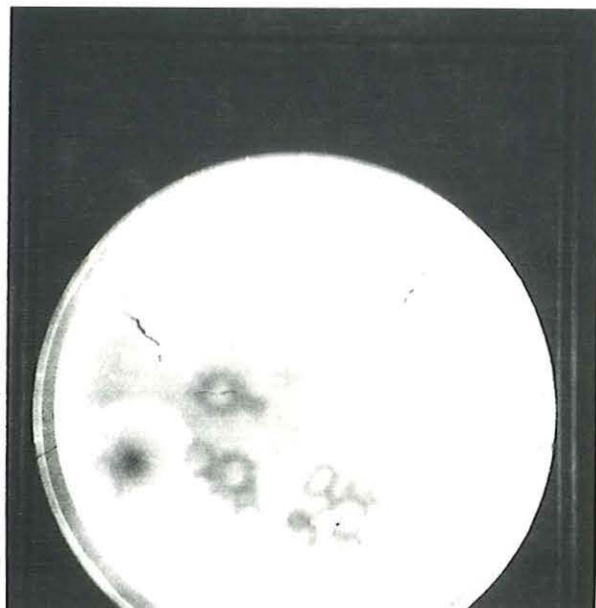
Foto's monster B op Fluorocult Plate Count Agar

1. Eschericichia coli reincultuur
2. 10^{-3} verdunning monster B
3. 10^{-4} verdunning monster B
4. 4 kolonies van 10^{-3} verdunning monster B, reingestroken.



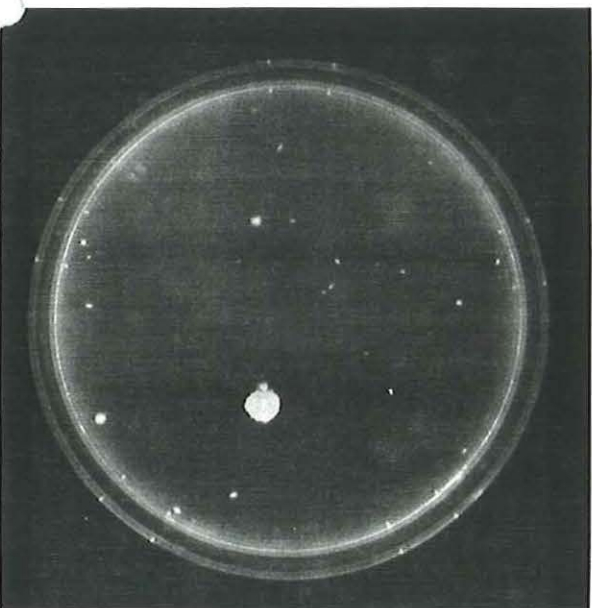
Positieve
kontrolle

①



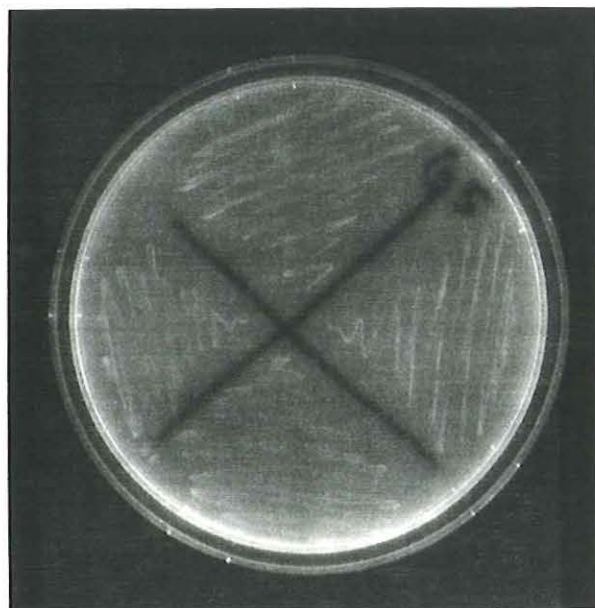
10^{-3} verdunning B
Hele bodem u.v.+

②



10^{-4} verdunning B
geen u.v.-oplichting

③



4 u.d. 20 kolonies
van de 10^{-3} verd B
Bij reinstrijken u.v.+

④

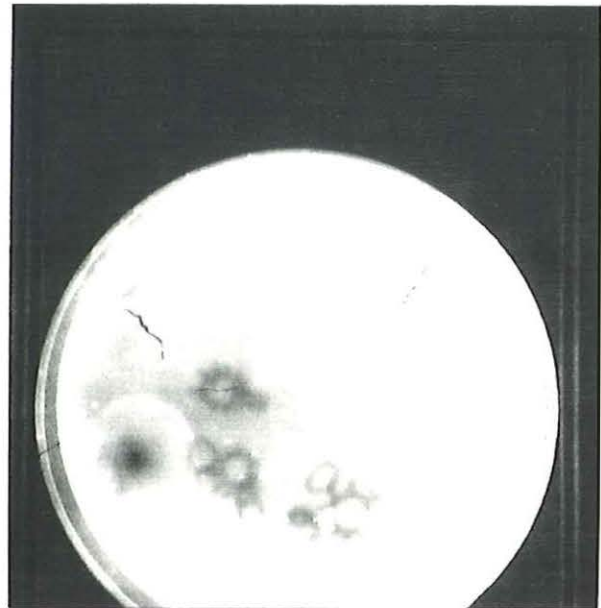
Foto's monster B op Fluorocult Plate Count Agar

1. Eschericichia coli reincultuur
2. 10^{-3} verdunning monster B
3. 10^{-4} verdunning monster B
4. 4 kolonies van 10^{-3} verdunning monster B, reingestreven.



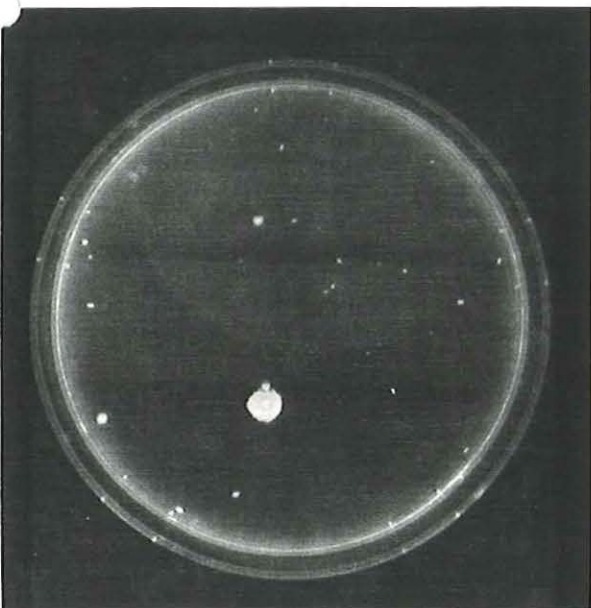
Positieve
kontrolle

①



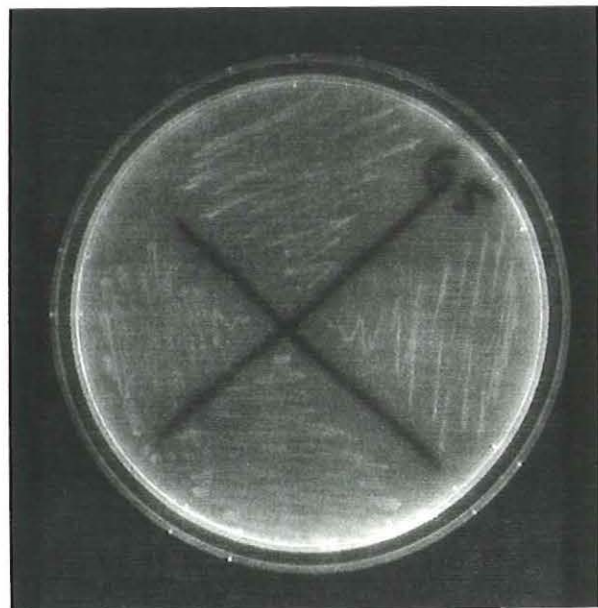
10^{-3} verdunning B
Hele bodem uv+

②



10^{-4} verdunning B
geen uv-oplichting

③



4 u.d. 20 kolonies
van de 10^{-3} verd. B
Bij reinstrijken uv-

④

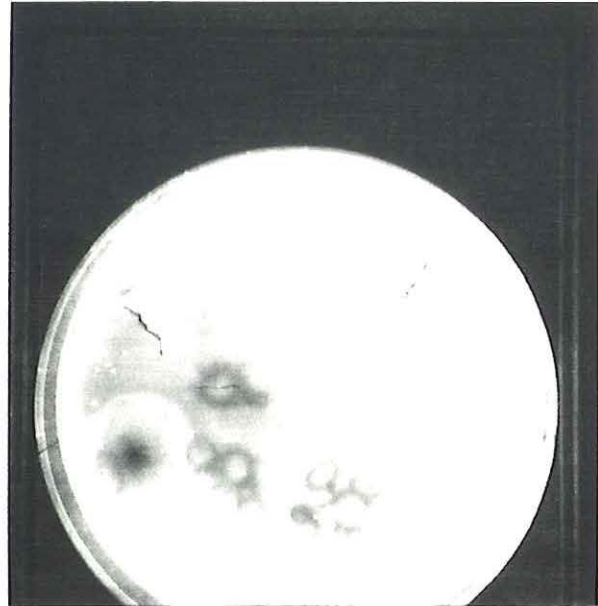
Foto's monster B op Fluorocult Plate Count Agar

1. Escherichia coli reincultuur
2. 10^{-3} verdunning monster B
3. 10^{-4} verdunning monster B
4. 4 kolonies van 10^{-3} verdunning monster B, reingestroken.



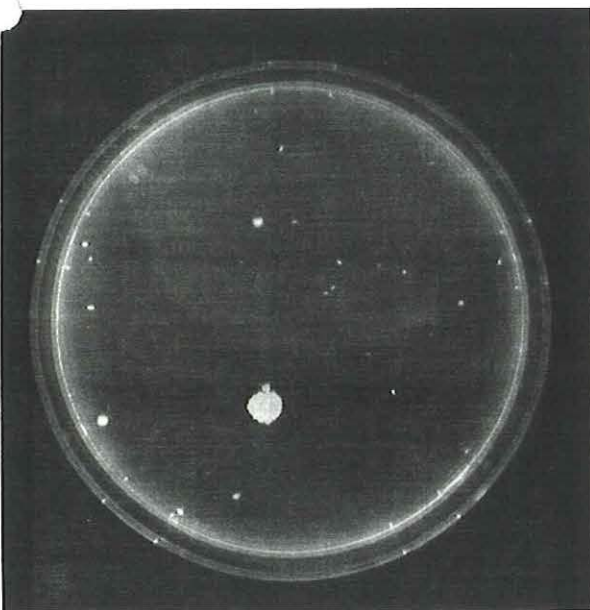
Positieve
kontrolle

①



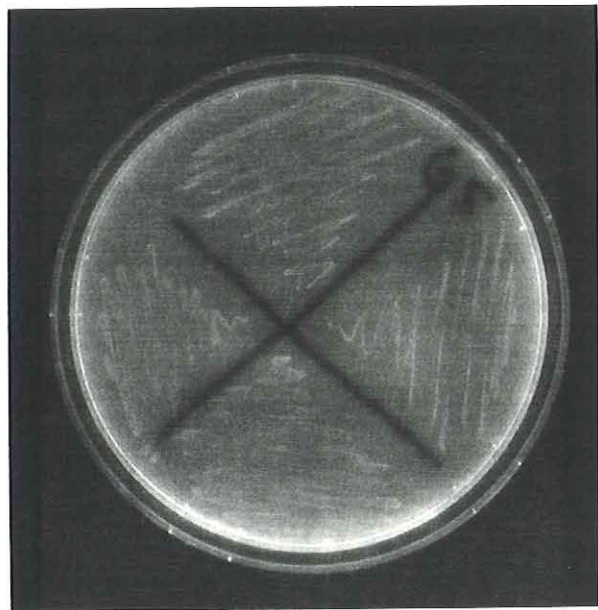
10^{-3} verdunning B
Hele bodem uv+

②



10^{-4} verdunning B
geen uv-oplichting

③



4 u.d. 20 kolonies
van de 10^{-3} verd. B
Bij reindringen uv-

④

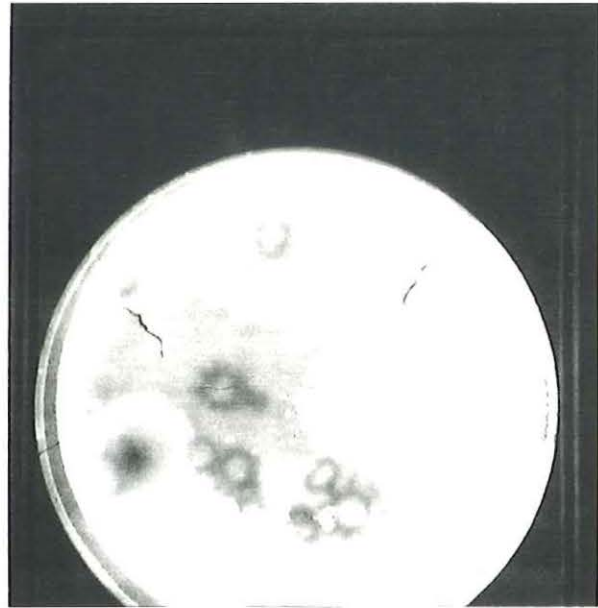
Foto's monster B op Fluorocult Plate Count Agar

1. Escherichia coli reïncultuur
2. 10^{-3} verdunning monster B
3. 10^{-4} verdunning monster B
4. 4 kolonies van 10^{-3} verdunning monster B, reïngestroken.



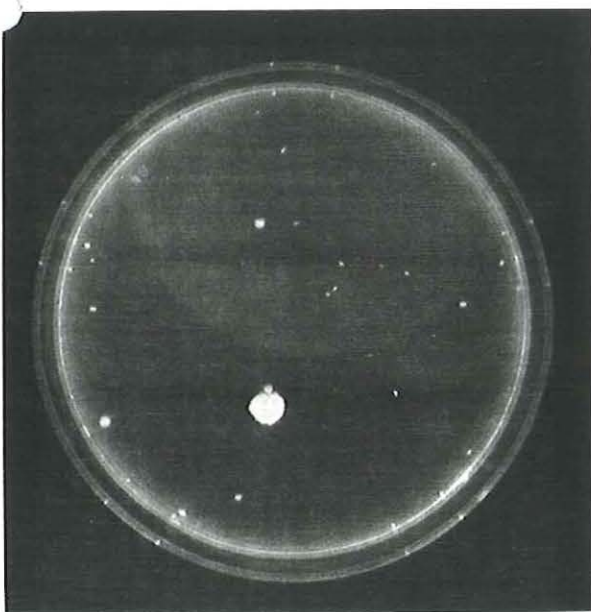
Positieve
kontrolle

①



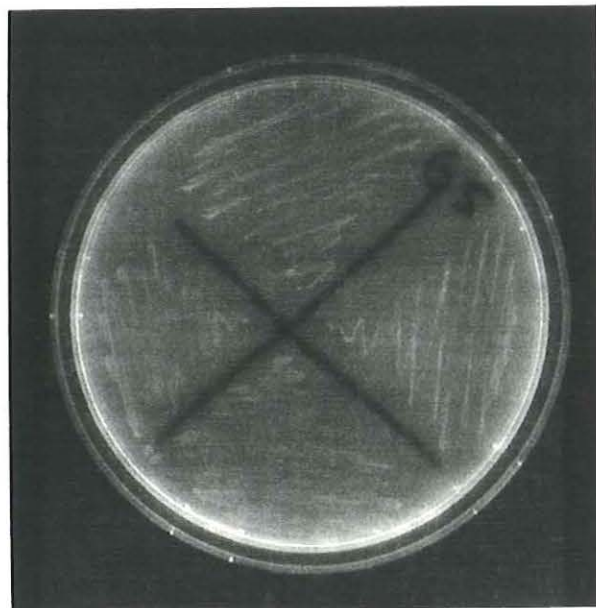
10^{-3} verdunning B
Hele bodem uv+

②



10^{-4} verdunning B
geen uv-oplichting

③



4 u.d. 20 kolonies
van de 10^{-3} verd. B
Bij reïnstrijken uv-

④

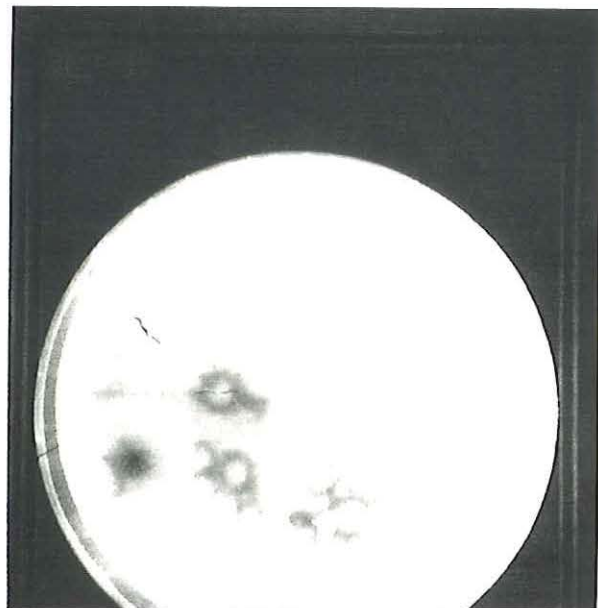
Foto's monster B op Fluorocult Plate Count Agar

1. Escherichia coli reïncultuur
2. 10^{-3} verdunning monster B
3. 10^{-4} verdunning monster B
4. 4 kolonies van 10^{-3} verdunning monster B, reïngestroken.



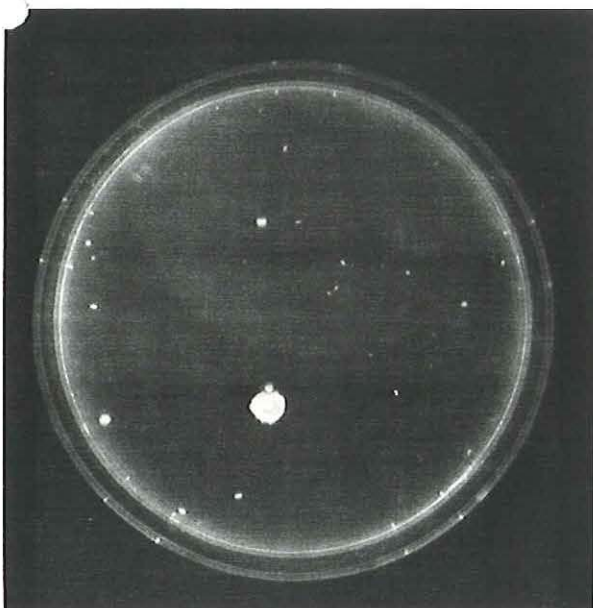
Positieve
kontrolle

①



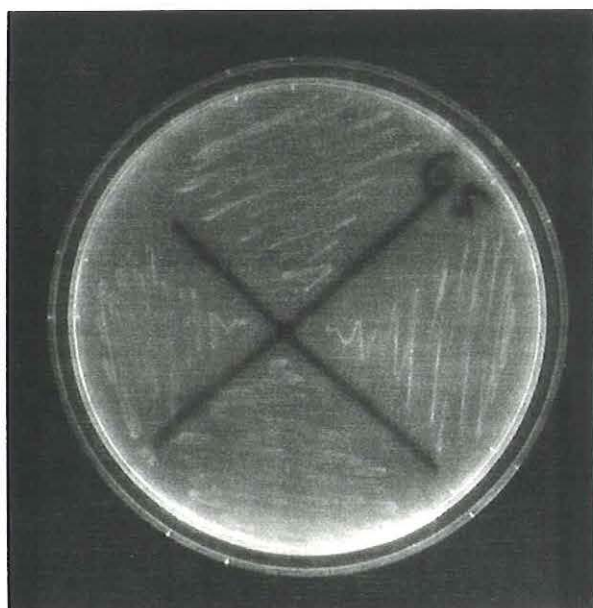
10^{-3} verdunning B
Hele bodem uv+

②



10^{-4} verdunning B
geen uv-oplichting

③



4 v.d. 20 kolonies
van de 10^{-3} verd B
Bij reïnstrijken w-

④

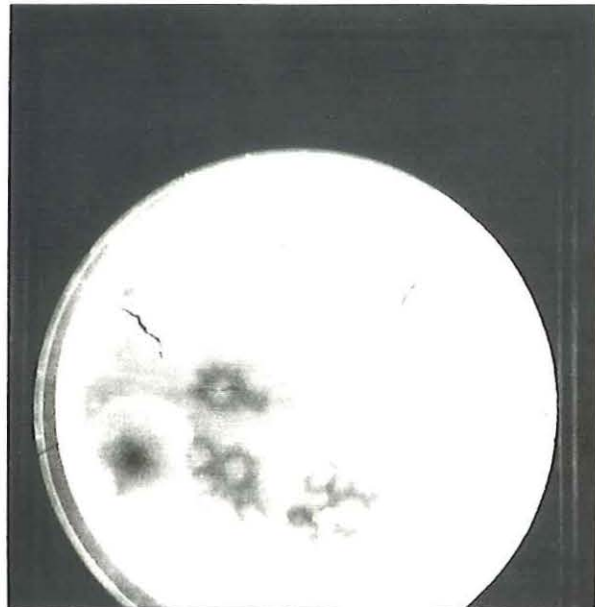
Foto's monster B op Fluorocult Plate Count Agar

1. Escherichia coli reïncultuur
2. 10^{-3} verdunning monster B
3. 10^{-4} verdunning monster B
4. 4 kolonies van 10^{-3} verdunning monster B, reïngestreven.



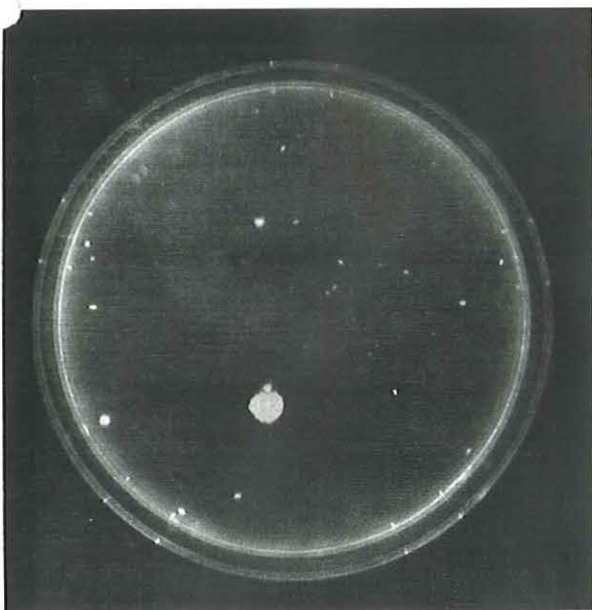
Positieve
kontrolle

①



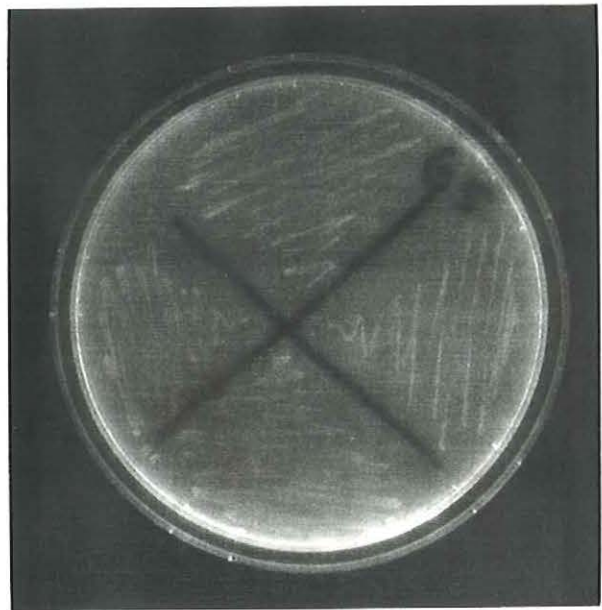
10^{-3} verdunning B
Hele bodem uwt

②



10^{-4} verdunning B
geen u.v.-oplichting

③



4 u.d. 20 kolonies
van de 10^{-3} verd. B
Bij reïnstrijken w-

④

Foto's monster B op Fluorocult Plate Count Agar

1. Eschericichia coli reincultuur
2. 10^{-3} verdunning monster B
3. 10^{-4} verdunning monster B
4. 4 kolonies van 10^{-3} verdunning monster B, reingestreven.