

Bismutsulfit-Agar, modifiziert

(Wismutsulfit-Agar nach Wilson-Blair, Wilson & Blair-Nährboden)

Art.-Nr. CM 201

Zur Isolierung und Identifizierung von Salmonellen einschließlich *S. typhi*.

Typische Zusammensetzung	(g/l)
Pepton	5,0
Fleischextrakt 'Lab-Lemco'	5,0
Glucose	5,0
Dinatriumhydrogenphosphat	4,0
Eisen(II)-sulfat	0,3
Natriumsulfit	3,0
Bismutsulfitammoniumcitrat	5,0
Brillantgrün	0,016
Agar	12,7
pH 7,6 ± 0,2	

Zubereitung

20 g Bismutsulfit-Agar, mod. in 500 ml Aqua dest. in einem Literkolben suspendieren. NICHT ÜBERHITZEN UND NICHT AUTOKLAVIEREN! Vorsichtig unter Rühren bis zum Siedepunkt erhitzen und ca. 30 Sekunden leicht kochen, bis der Agar gelöst ist. Auf 50°C abkühlen, gut mischen und dabei das entstandene Bismutsulfit homogen verteilen. Platten in dicker Schicht (ca. 20 ml) gießen und mit offenem Deckel erstarren lassen. Bei zu heiß gegossenen Platten kann sich der Niederschlag während des Erstarrens absetzen. Während des Lösens und Erhitzens bildet sich aus Natriumsulfit und Bismutammoniumcitrat das Präzipitat Bismutsulfit, auf dem u. a. die Selektivität des Nährbodens beruht. Platten vor Gebrauch trocknen; dabei aber zu starke Trocknung vermeiden. Der Nährboden sollte leicht trüb und strohfarben bis blaßgrün sein. Größere Volumina können zubereitet werden, wobei ein Überhitzen unbedingt zu vermeiden ist.

Beschreibung

Bismutsulfit-Agar ist eine Modifikation des ursprünglichen Selektivnährbodens von Wilson und Blair¹ zur Isolierung und vorläufigen Identifizierung von *Salmonella typhi* und anderen Salmonellen. Das Untersuchungsmaterial kann entweder klinischer Provenienz sein oder aber aus Abwasser, Wasser aus Wasserreservoirs, Lebensmitteln und anderem Untersuchungsmaterial bestehen. In diesem Nährboden wirkt frisch präzipitiertes Bismutsulfit zusammen mit Brillantgrün als selektives Agens, indem es das Wachstum coliformer Keime unterdrückt, aber gleichzeitig das Wachstum von Salmonellen zuläßt. Die im Nährboden enthaltenen Schwefelkomponenten dienen als Substrat für die H₂S-Bildung. Bei Bildung von H₂S kommt es durch die im Nährboden enthaltenen Metallsalze zu einer schwarzen oder braunen Färbung der Kolonien und des umgebenden Nährbodens.

Atypische Kolonien können entstehen, wenn der Nährboden zu kräftig mit einer Probe, die viel organisches Material enthält, beimpft wird. Dies kann vermieden werden, indem die Probe in steriler, physiologischer Kochsalz-Lösung suspendiert wird und nur der Überstand zur Beimpfung eingesetzt wird. Auch der frisch zubereitete

Nährboden hat eine ausgeprägt hemmende Wirkung² und ist daher für stärker kontaminiertes Untersuchungsmaterial geeignet. Werden im Untersuchungsmaterial nur kleine Anzahlen an Salmonellen erwartet, sollte vorher angereichert werden. Besonders zur Isolierung von *S. typhi* sollte Bismutsulfit-Agar, mod. nur frisch zubereitet eingesetzt werden.

Bei Lagerung des zubereiteten Bismutsulfit-Agars baut sich der Bismutsulfit-Komplex ab, der Nährboden wird im Hinblick auf die Begleitkeime weniger selektiv. Allerdings oxidiert der Farbstoff Brillantgrün gleichzeitig, wodurch die Grünfärbung des Nährbodens intensiviert wird. Diese Oxidationsprodukte wirken auf bestimmte Salmonellen, besonders auf Salmonellen aus dem Geflügelbereich, stark hemmend; sie können dann nicht mehr isoliert werden.

Kulturverfahren

Der stark selektive Bismutsulfit-Agar, mod. sollte zur Isolierung von Salmonellen möglichst in Kombination mit anderen, weniger selektiven Nährböden eingesetzt werden. Es kann direkt oder aus einer Anreicherung beimpft werden³. Man kann dabei nach folgendem Schema vorgehen. Bismutsulfit-Agar, mod. und einen oder mehrere der folgenden Nährböden direkt beimpfen:

- Desoxycholat-Agar nach Hynes (OXOID, Art.-Nr. CM 227) oder Desoxycholat-Citrat-Lactose-Saccharose-Agar (DCLS-Agar, OXOID, Art.-Nr. CM 393);
- XLD-Agar (OXOID, Art.-Nr. CM 469);
- Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar, mod. (OXOID, Art.-Nr. CM 329);
- MacConkey-Nährboden Nr. 3 (OXOID, Art.-Nr. CM 115).

Zugleich einen Anreicherungs-nährboden beimpfen, z. B.:

- Selenit-Lactose-Lösung (OXOID, Art.-Nr. CM 395 + LP 121);
- Tetrathionat-Lösung, mod. (Muller-Kauffmann-Lösung) (OXOID, Art.-Nr. CM 343).

Die Anreicherungskultur nach 12-18 Stunden Bebrütung auf Bismutsulfit-Agar, mod. und auf einem oder mehreren der oben genannten Nährböden subkultivieren. Platten nach 18 Stunden Bebrütung begutachten und verdächtige Kolonien auf Nährböden zur Identifizierung (z. B. Kligler-Eisen-Nährboden, OXOID Art.-Nr. CM 33) subkultivieren.

Alle negativen Platten sollten 48 Stunden bebrütet werden.

Koloniemorphologie

Salmonella typhi

Schwarze "Kaninchenaugen"- bzw. "Fischaugen"-Kolonien, nach 18 Stunden Bebrütung um die Kolonien Bildung eines schwarzen Niederschlags mit metallischem Glanz um die Kolonien. Nach 48 Stunden Bebrütung einheitlich schwarz gefärbte Kolonien.

Andere Salmonellen

Nach 18 Stunden Bebrütung unterschiedliche Koloniemorphologie; sie können schwarz, grün, klar oder schleimig sein. Nach 48 Stunden Bebrütung einheitlich schwarz gefärbte Kolonien, oft mit ausgedehnter Verfärbung des Nährbodens und deutlichem Metallglanz.

Andere Mikroorganismen, z. B. coliforme Bakterien, *Serratia* spp., *Proteus* spp.

Gelegentlich matte, grüne oder braune Kolonien ohne Metallglanz und ohne Verfärbung des umgebenden Nährbodens.

Lagerung und Haltbarkeit

Trockennährboden:

Fest verschlossen, lichtgeschützt, 10-25°C.

Haltbarkeit: siehe Etikett.

Anmerkung: Wird der Trockennährboden der Atmosphäre ausgesetzt, zersetzt er sich wegen der in ihm enthaltenen reaktiven und hygroskopischen Substanzen schnell. Anzeichen für eine solche Zersetzung sind Braunfärbung des Trockennährbodens sowie Verklumpung zu einer festen, nicht mehr pulverigen Masse. Wird aus solchem Material Nährboden zubereitet, so bleibt dieser braun, die Platten werden auch bei Lagerung nicht blaßgrün. Die charakteristischen differenzierenden und selektiven Eigenschaften gehen dabei verloren. Daher ist unbedingt darauf zu achten, daß der Trockennährboden kühl und trocken aufbewahrt und der Behälter nach jedem Gebrauch gut verschlossen wird.

Qualitätskontrolle

Positivkontrolle

Salmonella enteritidis ATCC 13076

Salmonella typhimurium ATCC 14028

Negativkontrolle

Escherichia coli ATCC 25922

Citrobacter freundii ATCC 8090

Zusätzliche Hinweise

Gebrauchsfertige Platten sollten nicht länger als 1-2 Tage bei 2-8°C gelagert werden. Bei längerer Lagerung kann der Farbstoff oxidieren; dies kann das Wachstum bestimmter Salmonellen, besonders von Salmonellen aus dem Geflügelbereich, hemmen. Bismutsulfit-Agar, mod. sollte daher nur frisch zubereitet eingesetzt werden. Dies gilt auch für die Isolierung von *S. typhi*. Das Wachstum von *Shigella* spp. wird in der Regel völlig gehemmt.

Salmonella sendai, *S. cholera-suis*, *S. berta*, *S. gallinarum* und *S. abortus-equi* werden deutlich gehemmt⁴.

Der Nährboden sollte so beimpft werden, daß gut abgegrenzte Kolonien zu erwarten sind. Die typische Koloniemorphologie entwickelt sich nicht, wenn der Nährboden zu stark bewachsen ist oder die Kolonien konfluent wachsen. *S. typhi* kann in diesem Fall in hellgrünen Kolonien wachsen. Im Zweifelsfall sollte jede gewachsene Kolonie weiter getestet werden.

Literatur

1. Wilson, W.J. und Blair, E.M.McV. (1927) J. Hyg. Camb. 26, 374.
2. Cook, G.T. (1952) J. Path. Bact. 64, 559.
3. Harvey, R.W.S. und Price, T.M. (1974) Public Health Laboratory Service Monograph Series Nr. 8: "Isolation of salmonellas". HMSO, London.
4. Hajna, A.A. (1951) Pub. Hlth. Rep. 9, 48-51.