

Blockkurs Experimentelle Lebensmittelmikrobiologie – HS18

v1

Madlaina Mettier, Gleb Ebert

26. November 2018

Diese Zusammenfassung soll den prüfungsrelevanten Stoff des Blockkurses Experimentelle Lebensmittelmikrobiologie (Stand Herbstsemester 2018) in kompakter Form enthalten. Wir können leider weder Vollständigkeit noch die Abwesenheit von Fehlern garantieren. Für Fragen, Anregungen oder Verbesserungsvorschlägen können wir unter glebert@student.ethz.ch erreicht werden. Die neueste Version kann stets unter <http://www.glebsite.ch> gefunden werden.

1 Mikroorganismen

1.1 Übersicht

Organismus	Zellform	Gram	(An)aerob	Katalase	Oxidase
<i>S. aureus</i>	Haufen-Kokken	+	fakultativ anaerob	+	–
<i>Listeria</i>	kokkoide, kurze Stäbchen	+	fakultativ anaerob	+	–
<i>Enterobacteriaceae</i>	Stäbchen	–	fakultativ anaerob	+	–
<i>Campylobacter</i>	Stäbchen	–	mikroaerophil	+	+
<i>Pseudomonas</i>	Stäbchen	–	aerob	+	+
<i>Bacillus</i>	gerade Stäbchen	+	aerob / fakultativ anaerob	+	
<i>Clostridium</i>	Stäbchen	+	anaerob	–	

1.2 Staphylococcus aureus

Haufen-Kokken, Gram-positiv, fakultativ anaerob, unbeweglich, keine Sporenbildung, gelb, Hämolyse, Wachstum 6.5 – 46 °C (Optimum 35 – 37 °C), Katalase-positiv, Koagulase-positiv, Novobiocin sensibel, DNase-Abbau-positiv, ubiquitär verbreitet in/auf Körper, opportunistisch pathogen (Enterotoxine)

LM-Vergiftungen vor allem durch Enterotoxine A bis E (A > 75%), hitzestabil, führen zu Darm-Hypermobilität, Staph.-Enterotoxine = Superantigene: schädigen Gewebe durch massive (bis > 30%, normalerweise < 0.1%) T-Zell-Aktivierung → Zytokine → systemische Entzündung & Schock

Gefährdete LM: Eiweiss- und Kohlenhydrat-haltig, viel Wasser

Koagulase: bindet Prothrombin → Staphlothrombin, *S. aureus* bindet Fibrinogen, Staphlothrombin aktiviert Fibrinogen zu Fibrin, dieses umkapselt und schützt Bakterium BPA (Tellitreduktion, Eigelbreaktion), RPFA (Koagulasereaktion), LATEX-AT

1.3 Listeria

Kurze Stäbchen aber kokkoide Form und Ketten, rundherum begeißelt, Gram-positiv, keine Sporenbildung, beweglich (unter 30 °C), fakultativ anaerob, psychrotroph: Wachstum 1 – 45 °C (Optimum 30 – 37 °C, > 70 °C tötet ab), pH 4.5-9, pH > 3.5, ubiquitär verbreitet: viele Tiere, LM wie Fleisch-, Fisch- und Milchprodukte die nicht wenig Wasser, viel Salz, viel Konservierungsstoffe haben oder sauer sind

L. monocytogenes: Mensch, IZ: 1-2 (bis 10) Wochen, ID: 10^3 - 10^9 , beta-Hämolyse

L. ivanovii: Tiere, andere Arten apathogen, beta-Hämolyse ANC-Bouillon, Oxford-Agar (bräunlich-grün-orange mit

schwarz-braunem Hof, Asculinspaltung), 1/2 BHI (bläulich-fluoreszierend mit Henry-Beleuchtung), ALOA (grün-blau, dunkler Hof), CAMP-Test

1.4 Enterobakterien

Stäbchen, Gram-negativ, keine Sporenbildung, meist beweglich, fakultativ anaerob, chemoorganotroph, Oxidase-negativ, Temperaturoptimum 37 °C, resistent gegen Gallensalze & Kristallviolett, ubiquitär verbreitet
opportunistische Pathogene: *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens* Obligate Pathogene: *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, manche *E. coli* (EHEC, EIEC, EPEC, ETEC)

1.4.1 Coliforme Keime

können Laktose fermentieren, Hygieneindikator (Gasbildung, Farbumschlag), *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citro- / Enterobacter*, LST (Gasbildung), MUG (*E. coli*), VRBD (rot), Endo (rot), Chromagar (lachs)

1.4.2 Salmonella

Stäbchen, Gram-negativ, rundum begeißelt, fakultativ aerob, obligat pathogen, Laktose-negativ

***Salmonella enterica* subsp. Enterica:**

Serovare **Enteritidis** und **Typhimurium**: Gastroenteritis, nicht Wirtsspezifisch (Warmblüter), Tiere als Reservoir, LM zur Übertragung (10^8 - 10^9), Inkubation: Stunden bis Tage, Krankheit wenige Tage, Therapie symptomatisch

Serovare **Typhi** oder **Paratyphi**: Typhus, nur humanpathogen, systemische Infektion → Antibiotika, Reservoir: Kranke / Dauerausscheider, 10^2 - 10^3 zur Infektion, Inkubation: 1-2

Wochen, Krankheit: 2-4 Wochen
XLD (transparent, auch *Shigella*), Chromagar (rot-violett)

1.4.3 *Serratia marcescens*

Hostienpilz, blutende Hostien (Pigment: Prodigiosin bei Raumtemperatur)

1.4.4 *E. coli*

Darm Mensch & Tier, Indikator für fäkale Verunreinigung und Hygiene

EHEC (Enterohämorrhagische *E. coli*, gehören zu Shigatoxin produzierende *E. coli* = STEC / VTEC / SLTEC): vor allem aus Rind

ETEC (Enterotoxische *E. coli*): Cholera-toxin-ähnliches Toxin (thermolabil, Inaktivierung bei 30min @ 60 °C), Fieber, Bauchkrämpfe, Blut im Stuhl, Pathogenität beruht auf spezifischen Fimbrien

EIEC (Enteroinvasive *E. coli*): ähnlich *Shigella*, lokale Invasion und Abtötung der Darmschleimhaut → geschwrigere Entzündungen

EPEC (Enteropathogene *E. coli*): Säuglingsdiarrhö, Anheftung an Dünndarmepithel, Zerstörung der Mikrovilli, 2-3 Tage Durchfall, Fieber, Erbrechen, Bauchschmerzen

1.4.5 *Shigella*

Stäbchen, ungeweglich, Laktose-negativ, ID: < 100 Zellen
Shigellenruhr = Dysenterie, meist *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei* in Deutschland, Exo- und Endotoxine, Enterotoxine sind Neurotoxine, intrazelluläre Vermehrung, Diarrhö

1.5 *Pseudomonas*

Stäbchen, Gram-negativ, beweglich, strikt aerob, Wachstum 0 – 43 °C, ubiquitär verbreitet, äusserst resistent gegen Umwelteinflüssen, Fäulnis- und Kühlhausflora, schwierig spezifisch nachzuweisen und zu identifizieren (meist reicht Nachweis mit Enterobakterien zusammen)

1.6 Sporenbilder

Endosporen hitzeresistent (bis 120 °C → 5min @ 120 °C autoklavieren)

Dipicolinsäure: ca. 10% Trockengewicht, dehydratisiert Kern, stabilisiert DNA

Endosporen-Nachweis: Weinzierl-Test (Gasbildung)

Aerob: *Bacillus*, Stäbchen, Gram-positiv, ubiquitäre Bodenkeime, aerob bis fakultativ anaerob, ***B. cereus***: Gastroenteritis (2 Endotoxine), PEMBA **Anaerob:** *Clostridium*, Silage stark kontaminiert, ***C. perfringens***: LM-Vergiftung mit Enterotoxin, ***C. tetani***: Tetanus, ***C. botulinum***: Botulismus, ***C. tyrobutyricum***: Buttersäuregärung (Spätkblähung)

2 Medien

2.1 PC-Agar

Plate count Agar ist ein Standard Agar und enthält Peptone, Glucose, Hefeextrakt und Agar.

2.2 Baird-Parker Agar (BPA)

Nachweis von	koagulase positiven Staphylokokken
Reaktionen	Telluritreduktion → Schwarzfärbung der Kolonie Eigelbreaktion → Trübung und/oder Klärung um Kolonie
Nachteil	Kann nicht direkt <i>S. aureus</i> nachweisen

2.3 Rabbit-Plasma-Fibrinogen Agar (RPFA)

Nachweis von	<i>S. aureus</i>
Reaktionen	Koagulasetest → Staphylokoagulase reagiert mit Prothrombin aus dem Kaninchenplasma. Das gebildete Staphylothrombin reagiert mit dem Fibrinogen, was einen trüben Hof zur Folge hat, das Fibrin.

Statt Eigelb wie im BPA enthält er Kaninchenplasma und Fibrinogen.

2.4 ANC-Bouillon

Verwendung	Selektive Anreicherung von Listerien
Substrate	Sojatrüpton, Hefeextrakt und Acriflavin, Nalidixinsäure, Cycloheximid

2.5 Oxford Agar

Nachweis von	Listerien
Reaktionen	Aesculinspaltung → Bildung schwarz-brauner Hof
Vorteile	Unterdrückung der Enterokokken und vielen Gram-negativen Bakterien
Nachteile	Meist zu viel Begleitflora, darum ist oft ein Reinigungsausstrich auf 1/2 BHI nötig.
Begleitflora	aerobe Sporenbildner, Mikrokokken, <i>Actinobacter</i> spp.

2.6 1/2 BHI

Ist ein sehr nährstoffreiches Medium, welches viele durch tierische Komponenten beigefügte Aminosäuren enthält.

2.7 ALOA

Nachweis von *L. monocytogenes* & *L. ivanovii*
Alle Listerien Kolonien werden blau. Zusätzlich bildet sich um die pathogenen Kolonien ein trüber Hof.

2.8 Laurylsulfat-MUG-Bouillon

Nachweis von	Coliforme Keime durch die Gasbildung aus Laktose <i>E. coli</i>
Reaktionen	MUG-Reaktion → Methylumbelliferylglucuronid wird durch die β -Glucuronidase gespalten, wodurch sich das durch UV-Licht fluoreszierende Methylumbelliferon bildet. Gasbildung durch den Abbau von Laktose

2.9 Violet Red Bile Dextrose Agar (VRBD)

Nachweis von	Enterobakterien
Hemmt	Gram-positive Keime
Reaktionen	Säureproduktion durch die Dextroseverwertung, was sich aufgrund von ausfallenden Gallensalzen in einem roten Hof äussert

2.10 Coliformen-Chromagar

Nachweis von	<i>E. coli</i> Coliforme Keime
Hemmt	Gram-positive Keime durch Tergitol
Reaktionen	beta-D-Galaktosidase → lachsfarbene coliforme Kolonien beta-D-Glucuronidase → <i>E. coli</i> wird dunkelblau-violett

2.11 Rappaport-Vassiliadis Soya Broth (RV)

Selektiv für Salmonellen, jedoch weniger stark als MKTT

2.12 Müller Kauffmann Tetrathionate Broth (MKTT)

Selektiv für Salmonellen

2.13 Xylose-Lysin-Desoxycholat Agar (XLD)

Nachweis von	Salmonellen und viele andere Bakterien, welche sich unterscheiden durch die Fähigkeit zur Spaltung verschiedener Zucker.
Enthält	Xylose, Lactose, Saccherose, Phenolrot, Thiosulfat, Eisen-(III)-Salz, Lysin
Koloniemorphologie	Salmonellen → transparent mit schwarzem Punkt; kein Zuckerabbau aber Eisensulfid-Bildung Shigellen → transparent Darmbakterien → gelb; Zuckerabbau Proteus-Keime → schwarz, milchig trüb; Eisensulfid-Bildung
Hemmung	schwach gegen Gram-negative Begleitflora, stark gegen Gram-positive wegen der Gallensalze

2.14 Salmonellen-Chromagar

Nachweis von	nicht-Typhi-Salmonellen
Hemmt	Gram-positive Begleitflora durch Natriumdesoxycholat
Substrate	ermöglichen Wachstum von Enterobakterien
Koloniemorphologie	Salmonellen → rot Coliforme → blau-grün bis blau-violett durch beta-D-Galaktosidase Andere → farblos-gelb

2.15 Charcoal-Cefoperazon-Desoxycholat-Agar (CCDA) — blutfrei

Selektivagar für *Campylobacter*

2.16 Polymyxin-Eigelb-Mannit-Bromthymolblau Agar (PEMBA)

Nachweis von	<i>B. cereus</i>
Hemmt	Gram-negative Bakterien durch Polymyxin B (versch. Cyclopeptid-Antibiotika)
Koloniemorphologie	<i>B. cereus</i> → Gezackte, etwa 5 mm groe, auffällig türkis gefärbte Kolonien, die von einer ausgeprägten Eigelb Präzipitation der gleichen Färbung umgeben sind. Gründe sind die Eigelbreaktion und die Verarbeitung von Mannit zu Säure. <i>B. mycoides</i> und <i>B. pseudomycoides</i> → wurzelartig

2.17 Hefeextrakt Glucose Chloramphenicol Bromphenolblau Agar (YGCB)

Nachweis von	Hefe → Blaufärbung unterschiedlicher Stärke durch Bromphenolblau
Hemmt	Gram-positive und negative Bakterien durch Chloramphenicol
Substrat	Glucose und Hefeextrakt

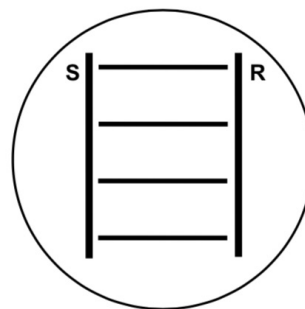
3 Bestimmungstests

3.1 Indol-Nachweis

Mittels der Kovacs-Reagenz kann die Tryptophanase-Aktivität von Bakterien gezeigt werden. Tryptophan wird zu Indol, Brenztraubensäure und Ammoniak umgewandelt.
Positiv rot, z.b. *E. coli*
Negativ z.b. *Salmonella*

3.2 CAMP- / Zucker-Test

Bestimmt die Hämolyse-Eigenschaften mit *Rhodococcus equi* (R) und *Staphylococcus aureus* (S). Es bilden sich klare Höfe je nach Abbaufähigkeiten. Zusammen mit den Abbaufähigkeiten von Mannit, Xylose und Rhamnose können die verschiedene Listerien-Arten unterschieden werden.



3.3 KOH-Test

Test zur Gram-Bestimmung von Bakterien. Man fügt einer Kolonie KOH bei. Wenn die Zellwand lysiert wird, macht sich die DNA durch ihre fadenziehende Konsistenz bemerklich.

3.4 Oxidase-Test

Man braucht ein Oxidase-Teststäbchen, auf das man eine Bakterienkultur impft. Wenn es sich blau färbt, ist der Test positiv ausgefallen.

3.5 Katalase-Test

Es wird H_2O_2 auf eine Bakterienkolonie gegeben. Wenn sich Bläschen bilden, ist der Test positiv (Sauerstoffbildung). Wird hauptsächlich zur Differenzierung Gram-positiver Bakterien genutzt.

3.6 API Test

Teststreifen mit verschiedenem Zuckern und anderen Reagenzien. Wird verwendet, um die Enzymzusammenstellung von Bakterien zu erkennen. Die Auswertung erfolgt mit einem Computerprogramm.

3.7 Weinzierl-Test

Nachweis von Endosporen. Ein Glasröhrchen mit Parafilm wird mit der Probe des zu testenden Mittels stark erhitzt. Dies tötet alle Keime, lässt den Parafilm schmelzen und an die Oberfläche steigen. Nach Inkubation nachgeschaut, ob Gasbildung stattgefunden hat.