

m-CP-Agar

Zur Isolierung und Zählung von *Clostridium perfringens*

Nach TWVO 2001
CL55.1

Zusammensetzung in g/l:

Tryptose.....	30,0
Hefeextrakt	20,0
Saccharose.....	5,0
L-Cysteinhydrochlorid.....	1,0
Magnesiumsulfatheptahydrat.....	0,1
Bromcresolrot	0,04
Agar	15,0
pH-Wert.....	7,6 ± 0,2

HERSTELLUNG

71,1 g des Mediums werden in einem Liter destilliertem Wasser suspendiert. Erhitzen bis der Agar vollständig gelöst ist. Autoklavieren für 15 min. bei 121 °C. Man kühle auf 45-50 °C ab und gebe unter sterilen Bedingungen zwei Röhrchen (4 ml) steril rekonstituierten *Clostridium perfringens*-Zusatz zu (Best.-Nr. CL52.1). Weiterhin folgende Zusätze steril zugeben: 25 mg Polymyxinsulfat (Best.-Nr. 0235.1), 60 mg Indoxyl-β-D-Glucosid (gelöst in 8 ml destilliertem Wasser), 100 mg Phenolphthalein-Diphosphat, 90 mg FeCl₃ x 6 H₂O. Gut mischen und in Petrischalen gießen.

EINSATZGEBIET

m-CP-Agar wird empfohlen für die 2-Schritt Membranfiltrationsmethode zur Detektion von *Clostridium perfringens* in Umweltwasserproben oder anderen Wasserproben (Bisson und Cabelli, 1979, *Appl. Environm. Microbiol.* 37:55-88). Das Medium kann auch zur Untersuchung chlorierter Wässer verwendet werden, von unbehandeltem Wasser, das Industrieabfälle enthält, die auf nicht-sporenbildende Bakterien letal wirken, von Schlamm und von Wassern mit kürzlich erfolgter sowie länger zurückliegender Verunreinigung. Die Mischung enthält reichhaltige Nährstoffe wie Tryptose, Hefeextrakt und Saccharose. Cycloserin (*Clostridium perfringens* Zusatz, Best.-Nr. CL51.1) und zugegebenes Polymyxin B inhibieren die Begleitflora und reduzieren die Größe der Kolonien, die trotzdem wachsen. Bromcresolrot ergibt eine gelbe Färbung des Agars und der Kolonien durch die Ansäuerung nach Saccharosefermentation durch *C. perfringens*. Die Zugabe von Indoxyl-β-D-Glucosid resultiert in blauen bis grünen Kolonien bei Bakterien, die β-D-Glucosidase produzieren – was bei *C. perfringens* nicht der Fall ist – und hilft damit, negative Kolonien auszuschließen. Petrischalen werden mit den Proben angeimpft und bei 44 ± 1°C für 21 ± 3 Stunden inkubiert. *C. perfringens* Kolonien sollten durch das Bedampfen mit Ammoniumhydroxid bestätigt werden, das eine Farbverschiebung von gelb nach rot oder pink (durch Alkalisierung des Phenolphthalein-diphosphates zu rotem Phenolphthalein) bewirkt. Mutmaßliche *C. perfringens* Kolonien können außerdem durch Folgetests bestätigt werden, wie z.B. die Gelatinehydrolyse auf Gelatine-Agar (Best.-Nr. HP07). *C. perfringens* kommt in großer Anzahl in menschlichen und tierischen Abwässern vor. Seine Sporen sind resistent gegen die gängigen Abwasserdesinfektionsmaßnahmen, extreme Temperaturen und Umweltstress.

MIKROBIOLOGISCHE TESTS

Die folgenden Ergebnisse wurden erzielt nach Inkubation von Referenzstämmen im angegebenen Agar bei einer Temperatur von 44 °C für 21 ± 3 Stunden.

Mikroorganismen	Wachstum	Koloniefarbe
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 16404	Gut	Opak-gelb. Farbwechsel nach pink oder rot nach ca. 30 sec Bedampfung durch Ammoniumhydroxid

m-CP-Agar

500 g

CL55.1

Product Data Sheet



m-CP Agar

For isolation and enumeration of *Clostridium perfringens*

Acc. to TWVO 2001
CL51.1

Formulation in g/l:

Tryptose.....	30.0
Yeast extract.....	20.0
Saccharose.....	5.0
L-Cysteine hydrochloride.....	1.0
Magnesium sulphate heptahydrate.....	0.1
Bromocresol purple	0.04
Agar	15.0
Final pH	7.6 ± 0.2

PREPARATION

Suspend 71.1 g of the medium in one liter of distilled or deionized water. Heat until the medium is completely dissolved. Sterilize by autoclaving for 15 mins. at 121 °C. Cool to 40 – 50 °C and aseptically add 1 vial (2 ml) reconstituted (sterile) *Clostridium perfringens* Supplement (Art. No. CL51.1). Additionally, aseptically add the following supplements: 25 mg Polymyxin B sulphate (Art. No. 0235.1), 60 mg Indoxyl-β-D-glucoside (solubilised in 8 ml distilled water), 100 mg Phenolphthalein diphosphate, 90 mg FeCl₃ x 6 H₂O. Mix well and pour into petri dishes.

USES

m-CP Agar is used in the two-step membrane-filtration method for the detection of *Clostridium perfringens* in environmental waters or other water samples (Bisson and Cabelli, 1979, *Appl. Environm. Microbiol.* 37:55-88). The medium has been recommended for use for the examination of chlorinated waters and untreated water containing industrial wastes lethal to non-spore forming bacteria, sewage sludge, and situations in which the detection of remote as well as recent pollution is desirable. The formulation contains rich nutrient sources like tryptose, yeast extract and saccharose. Cycloserine (*Clostridium perfringens* Supplement, Art. No. CL51.1) and additionally added Polymyxine B inhibits the accompanying bacterial flora and reduces the size of the colonies that grow nevertheless. Bromocresol purple results in a yellow staining of the agar and of the colonies, caused by acidification after saccharose fermentation by *C. perfringens*. Addition of Indoxyl-β-D-glucoside results in blue (or green) colonies if bacteria are producing β-D-glucosidase – which *C. perfringens* are not – and helps excluding negative colonies. Petri dishes are inoculated and incubated at 44 ± 1 °C for 21 ± 3 hours. Presence of *C. perfringens* colonies should be confirmed by exposure to ammonium hydroxide vapours, that causes a colour shift from yellow to red or pink (by alcalisation of phenolphthalein diphosphate to Phenolphthalein). Presumable *C. perfringens* colonies may also be confirmed by subsequent tests, like e.g. gelatin hydrolysis on Gelatin Agar (Art. No. HP07). *C. perfringens* is present in large numbers in human and animal wastes, and its spores are resistant to wastewater treatment practices, extremes in temperature, and environmental stress.

MICROBIOLOGICAL TEST

The following results were obtained in the performance of the given medium from type cultures after incubation at a temperature of 44 °C and observed after 21 ± 3 hours.

Microorganisms	Growth	Colony colour
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 16404	Good	Opaque yellow. Colour shift to pink or red after 20-30 sec exposure to ammonium hydroxide vapours

m-CP Agar

500 g

CL55.1

Carl Roth GmbH + Co. KG

Schoemperlenstraße 3-5 _ 76185 Karlsruhe
Postfach 100121 _ 76231 Karlsruhe
Telefon: +49 (0) 721/5606-0 _ Telefax: +49 (0) 721/5606-149
E-Mail: info@carlroth.de _ Internet: www.carlroth.de