

## **Biochemische Reaktionen zur Identifizierung von Bakterien**

### **1. Einleitung**

Bakterien kann man einerseits durch ihre morphologischen und cytologischen Eigenschaften identifizieren. Andererseits bedient man sich für die exakte Identifizierung biochemischer Reaktionen, anhand derer man verwertbare Merkmale von den verschiedenen Bakterien ermitteln kann. Diese Methoden sind zeitaufwendig, führen aber zu einer oftmals exakten Charakterisierung und Identifizierung.

Wir verwenden in diesem Versuch 4 bekannte Bakterien zur Ermittlung eines unbekanntes Testorganismus. Bei den bekannten Bakterien handelt es sich um *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes* und *Citrobacter freundii*.

Die Bakterien können die Glucose in verschiedenen Stoffwechselwegen abbauen. Darunter gehören die Glycolyse, der KDPG-Weg, der Pentosephosphat-Weg und verschiedene Gärungstypen.

*E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* gehören zu der Familie der Enterobakterien. Sie sind gramnegative, fakultativ anaerobe Stäbchen, die unbeweglich oder peritrich begeißelt sind. Typisch ist außerdem die Gemischte Säuregärung (Ameisensäuregärung). *Bacillus sp.* gehört zu den Bacillaceae, ist grampositiv und weist als besondere Eigenschaft Exoenzyme zur Verdauung von extrazellulären Polypeptiden (Glykogen) und Polysacchariden (Stärke) auf. Außerdem bildet es Endosporen, die bei Nährstoffmangel das Überleben der Population gewährleisten können.

*Pseudomonas* gehört zu den Pseudomonadaceae, die gramnegative, strikt aerobe Stäbchen oder Kokken sind. Sie können somit keine Glucose vergären.

Diese Organismen und ein Testorganismus werden folgenden Tests unterzogen: Oxidation oder Fermentation von Glucose, Oxidase-Test, Katalase-Test, Nitrat-Reduktions-Test, Indolnachweis-Test, Methylrot-Test, Voges-Proskauer-Test, Citratverwertungs-Test, Schwefelwasserstoff-Test, Amylase-Test und der Nachweis von proteolytischen Enzymen.

Nach der Auswertung der Versuche kann man an den gewonnenen Ergebnissen den Testorganismus bestimmen.

### **2. Material und Methode**

Das Material ist im Skript unter „Biochemische Reaktionen zur Identifizierung von Bakterien“ zu finden.

#### **2.1. Ansetzen des Mediums für den Oxidase-Katalase Test**

Für das Ansetzen des Mediums wurden in 300ml 7,5g Standard-I und 3,6g Agar gegeben.

Danach wurde das Medium unter ständigem Rühren zum Kochen gebracht, um ein völliges Auflösen des Agars zu gewährleisten. Je 5ml des Mediums wurden in 54 Reagenzgläser gefüllt und diese dann autoklaviert.

Anmerkung:

Die weiteren Medien für die Durchführung der Biochemischen Versuche wurden durch andere Praktikumsteilnehmer durchgeführt.

## **2.2. Beimpfen der Medien**

Zur Beimpfung der Medien durch die Testorganismen werden die Beimpfung im Stich, Ausstreichen auf Schrägagar, das Ausschütteln im Flüssigagar und das Ausstreichen auf Agar in Petrischalen angewendet.

Bei allen Methoden ist es wichtig, dass die Impfösen vorher in der Bunsenbrennerflamme ausgeglüht werden. Danach wird das Reagenzglas mit den Bakterien geöffnet, abgeflammt und mit der abgekühlten Impföse Bakterien entnommen. Das Reagenzglas wird erneut abgeflammt und geschlossen. Das Reagenzglas mit dem zu beimpfenden Medium wird geöffnet, abgeflammt, nach einer der obigen Methoden beimpft, erneut abgeflammt und geschlossen.

Alle Arbeitsschritte finden so nah wie möglich an der Flamme des Bunsenbrenners statt, um eine Kontamination mit anderen Organismen zu vermeiden!

Sämtliche Proben werden im Brutschrank nach den Angaben im Skript kultiviert.

Beim Citrat-Test ist es wichtig, dass die Citronensäure in Form von Citrat dem Nährboden zugefügt wurde. Beim Zufügen von Citronensäure hätte man diese und die restliche Nährlösung getrennt voneinander autoklavieren müssen, um eine Hydrolyse des Agars zu verhindern.

### 3. Ergebnisse

Tab. 1: Zusammenfassung der Ergebnisse der biochemischen Reaktionen

Test	Escherichia coli	Citrobacter freundii	Enterobacter aerogenes	Bacillus subtilis	Unbekannter Testorganismus	Pseudomonas aeruginosa
OF mit Paraffin	+	+	+	N	+	-
OF ohne Paraffin	+	+	+	N	+	+ (oben)
Oxidase	-	-	-	N	-	+
Katalase	+	+	+	N	+	+
Nitrat-Reduktion	+	+	+	N	+	-
Indol	+	-	-	N	-	-
Methylrot	+	+	-	N	+	-
Voges-Proskauer	-	-	+	N	-	-
Citrat	-	+	+	N	+	+
H <sub>2</sub> S (Stich)	-	+	-	N	+	-
H <sub>2</sub> S (Fläche)	-	+	-	N	+	-
Proteolytische Enzyme	-	-	N	+	-	-
Amylase	-	-	N	+	-	-

+: positiv    -: negativ    N: nicht durchgeführt

Bei dem H<sub>2</sub>S-Test ist der Agar bei den Proben von E. coli und Enterobacter aerogenes komplett gelb-orange gefärbt.

### 4. Diskussion

#### 4.1. OF-Test

Der Indikator Bromthymolblau (Umschlagpunkt ist bei pH 7) hat sich bei allen aeroben Proben von grün nach gelb verfärbt. Nur bei Pseudomonas ist unten eine etwas schwächere Gelbfärbung aufgetreten, da es unter anaeroben Bereich des Agars nicht wachsen kann. Die Glucose, die hier als einzige C-Quelle vorliegt, wird somit verstoffwechselt und es bilden sich Säuren (Lactat, Acetat, Succinat, Fumarat, Formiat)

Unter anaeroben Bedingungen kann nur Pseudomonas die Glucose nicht vergären. Der Indikator zeigt hier keine gelbe Färbung.

Alle anderen Organismen zeigen eine Fermentation von Glucose. Sie vergären die Glucose zu Ethanol, Acetat, Lactat, etc., die zur gelben Färbung des Bromthymolblau führen.

#### 4.2. Oxidase-Test

Der Oxidase-Test ist bei allen MO außer bei *Pseudomonas aeruginosa* negativ ausgefallen. Auf dem Teststreifen befindet sich ein Elektronendonator, der seine Elektronen nur auf Cytochrom c übertragen kann und durch die Abgabe der Elektronen eine blaue Färbung annimmt. Nur *Pseudomonas* weist die Cytochrom c- Oxidase auf, da es sich um ein obligat aerobes Bakterium handelt. *Enterobacter* besitzt eine verkürzte Atmungskette, die mit der Chinoloxidase endet. Sie weisen anstatt von Cytochrom c, die Cytochrome d und o auf. Deswegen ist der Nachweis auch hier negativ, da der Farbstoff seine Elektronen nicht übertragen kann.

#### 4.3. Katalase-Test

Der Katalase-Test hat bei allen Organismen eine Gasproduktion gezeigt und ist somit positiv ausgefallen. Die Katalase setzt Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff um, welcher dann aufsteigt. Die Funktion der Katalase ist es das toxisch wirkende Wasserstoffperoxid abzubauen und somit einer Schädigung der Zelle entgegen zu wirken.

Neben den Peroxidationen gibt es auch noch Superoxidationen (einfach negativ geladen), die zu einer Bildung von OH-Radikalen führen und deswegen so schädlich sind. Diese Superoxidationen werden durch Dismutase zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff umgewandelt. Die Katalase katalysiert dann die Umwandlung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff.

#### 4.4. Nitrat-Reduktion-Test

Bei dem Nitrat-Test ist nur die Probe mit *Pseudomonas* negativ. Bei den *Enterobacteriaceae* hat sich die Griess-Illosvays-Reagenz rot gefärbt. *E. coli* setzt das Nitrat durch die Nitratreduktase in Nitrit um. Dieses wird dann in Ammonium umgesetzt. Das zuvor entstandene Nitrit wird durch einen Farbstoff im Griess-Reagenz nachgewiesen (Ammonifikation, unvollständige Nitratatmung) und es kommt zur Rotfärbung.

Auch die anderen *Enterobacteriaceae* können das Nitrat zu Nitrit reduzieren. *Pseudomonas* kann hier aerob wachsen und muss hier keine Denitrifikation durchführen. Deswegen fällt der Test negativ aus.

#### 4.5. Indol-Test

Nur *E. coli* spaltet Tryptophan in Indol um, da es das entscheidene Enzym, die Tryptophanase, besitzt. Im Reagenzglas entstehen zwei Phasen. Die untere Phase beinhaltet in Wasser gelöstes Tryptophan. Auch dieses weist eine geringe Rotfärbung auf. Die obere Phase beinhaltet das in Amylalkohol gelöste Indol (durch Kovac Reagenz starke Rotfärbung). Die Phase ist bei *E. coli* kräftig rot gefärbt.

Alle anderen Organismen zeigen keine kirschrote Färbung im Überstand und sind somit nicht zur Indolbildung befähigt.

#### **4.6. Methylrot-Test**

Bei der Vergärung von Glucose entstehen unter anderem saure Produkte, wie Lactat, Acetat, Succinat und Formiat. Diese werden durch Methylrot nachgewiesen, dessen Umschlagpunkt zwischen einem pH-Wert von 4,4 und 6,2 liegt. Im sauren Milieu wird Methylrot rot, im basischen Milieu gelb.

Enterobacter setzt 2 Pyruvat in Acetoin um. Dabei werden zwei Kohlendioxidmoleküle gebildet. Das Acetoin kann dann in 2,3-Butandiol umgewandelt werden. Dabei werden zwei  $\text{NADH} + \text{H}^+$  regeneriert. Die sauren Produkte werden nur in geringerer Konzentration gebildet, da das Pyruvat zur Bildung von Acetoin genutzt wird und somit weniger Pyruvat für die Säurebildung vorhanden ist (Konkurrenz). Deswegen fällt der Test negativ aus.

Auch bei Pseudomonas fällt der Test negativ aus, da das Bakterium keine Gärung durchführen kann und somit keine sauren Produkte entstehen.

E.coli, Citrobacter freundii und der Testorganismus bilden Säuren durch die verschiedensten Stoffwechselwege (z.B.: KDPG-Weg, Gemischte Säuregärung). Deswegen fällt der Test für diese MO positiv aus.

#### **4.7. Voges Proskauer-Test**

Der Voges-Proskauer-Test fällt positiv aus, wenn die Bakterien in der Lage sind Acetoin zu bilden. Der Test fällt nur bei Enterobacter positiv aus. Das gebildete Acetoin wird im alkalischen zu Diacetyl oxidiert und bildet mit Arginin, Kreatin und Guanidin einen roten Farbstoff, der durch alpha-Naphthol verstärkt wird. Wichtig ist das kräftige Schütteln der Proben, da Sauerstoff benötigt wird, um das 2,3-Butandiol in Acetoin zu oxidieren!

Die anderen MO sind nicht zur Bildung von Acetoin befähigt. Deswegen fällt der Test negativ aus.

#### **4.8. Citratverwertungs-Test**

Der Citrat-Test fällt nur bei E. coli negativ aus. E. coli ist nicht in der Lage Citrat im Symport mit Protonen aufzunehmen und zu verstoffwechseln. Somit wird der Agar nicht alkalisch und es entsteht keine Blaufärbung.

Alle anderen MO sind in der Lage Citrat aufzunehmen. Der Test fällt somit positiv aus. Als Indikator dient hier Bromthymolblau, das im neutralen Bereich eine grüne, im sauren Bereich eine gelbe und im alkalischen Bereich eine blaue Färbung aufweist.

#### **4.9. Schwefelwasserstoff-Test**

Der im Kligler-Agar (komplexes Medium mit Lactose und Glucose (10:1) und Natriumthiosulfat und Ammoniumeisen-III-sulfat) durchgeführte Schwefelwasserstoff-Test war bei *Citrobacter freundii* und dem Testorganismus positiv. Die Organismen besitzen das Enzym Desulfurase, die das Thiosulfat schwefelhaltige Enzyme in Sulfid reduzieren können. Auch der Abbau von schwefelhaltigen Proteinen / Peptiden führt letztendlich zur Bildung von Sulfid. Das Sulfid wird über mehrere Schritte zu Schwefelwasserstoff reduziert, welches dann das Schwefelion auf das nun zweiwertige Eisen übertragen kann. Dadurch entsteht durch das FeS eine Schwarzfärbung.

Eine komplette Gelbfärbung tritt bei der Probe mit *E. coli* und *Enterobacter* auf. Dies zeigt, dass sie über die  $\beta$ -Galactosidase verfügen, um das Disaccharid Lactose in Glucose und Galactose zu spalten. Die Glucose kann nun umgesetzt werden und es entstehen auf anaeroben Wege Säuren, die das Phenylrot im sauren Milieu gelb färben.

Eine Grundlage für die Untersuchung vom Abbau der Lactose bilden die eingesetzten Konzentrationen von Lactose und Glucose (10:1).

*Pseudomonas* zeigt keine Schwarzfärbung und auch keine Gelbfärbung des Agars. *Pseudomonas* ist nicht in der Lage Schwefelwasserstoff zu bilden. Außerdem verfügt es nicht über die beta Galactosidase, da auch an der Oberfläche keine Gelbfärbung zu erkennen war und somit keine Säurebildung stattgefunden hat.

#### **4.10. Nachweis von proteolytischen Enzymen**

Das Nährmedium enthält Gelatine (Strukturprotein aus Knochen, Kollagen). Wird dieses abgebaut, wird das Medium flüssig. Zum Abbau der Gelatine benötigen die MO allerdings Enzyme, die sie ins Medium abgeben können.

Der Test fällt nur bei *Bacillus subtilis* positiv aus. Es kann die Gelatine abbauen, die Produkte aufnehmen und verwerten.

#### **4.11. Amylase-Test**

Der Amylase-Test beruht auch auf der Fähigkeit Enzyme ins Medium abzugeben. Im Medium ist Stärke vorhanden, die aus Amylose (alpha 1-4-glycosidisch verknüpfte Glucosemoleküle) und Amylopektin (zusätzlich alle 25 Glucosemoleküle alpha 1-6 glykosidisch verknüpft) aufgebaut ist. Besitzen MO Amylase so können sie die Amylose spalten und die Glucosemoleküle aufnehmen und verstoffwechseln.

Der Nachweis erfolgt mit 1ml Jod-Jodkalium-Lösung. Das Iod kann sich in die Windungen der Stärke einlagern und es kommt zu einer Blaufärbung des Mediums. Wird die Stärke

abgebaut, so entsteht um den MO ein Hof, der keine Färbung aufweist und der Test fällt positiv auf den Nachweis nach stärkeabbauenden MO aus.

Der Test fällt nur bei *Bacillus subtilis* positiv aus.

Beim Testorganismus handelt es sich um *Citrobacter freundii*, da er die gleichen Testergebnisse wie *Citrobacter freundii* zeigt.

## **5. Literatur**

Schlegel „Allgemeine Mikrobiologie“, 7. überarbeitete Auflage, Thieme Verlag, 1992

Skript „Übungen in Mikrobiologie F1-Teil1“