
Biochemische Reaktionen zur Identifizierung von Bakterien

1. Theoretische Grundlagen

Viele Bakterien lassen sich nur anhand von wenigen Stoffwechselreaktionen unterscheiden. Hierbei kann man entweder die Gärungsendprodukte selbst oder zuvor abgefangene wichtige Zwischenprodukte meist mit Hilfe von Indikatoren nachweisen.

Im Folgenden sollen *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* sowie ein unbekannter Testorganismus auf ihre Fähigkeit getestet werden, verschiedene biochemische Reaktionen durchzuführen.

Zu den Tests zählt der OF-Test, mit dessen Hilfe man obligat aerobe von fakultativ anaeroben Organismen unterscheiden kann, indem man jeweils eins von zwei Reagenzgläsern mit Paraffin überschichtet und so anaerobe Bedingungen schafft. Die aus Glucose vergäerte Säure wird mit Bromthymolblau nachgewiesen.

Beim Oxidase-Test wird die Cytochrom-c-Oxidase mit Hilfe von Teststreifen nachgewiesen, Farbstoff ist Indolphenolblau. Da die Cytochrom-c-Oxidase Bestandteil der Atmungskette ist, lässt ein positives Testergebnis auf einen aeroben Organismus schließen.

Die Katalase-Aktivität (Fähigkeit, Wasserstoffperoxid zu spalten) wird durch Zugabe von H_2O_2 getestet. Positive Aktivität wird durch Gasentwicklung angezeigt.

Sind Organismen in der Lage, Nitrat zu Nitrit zu reduzieren, kann man dies mit Hilfe von GRIESS-ILOSVAYS-Reagenz nachweisen (es bildet sich ein roter Azofarbstoff).

Die Tests aus der IMViC-Reihe werden durchgeführt, um *Enterobacter aerogenes* und *Escherichia coli* zu unterscheiden. Diese aus vier Tests bestehende Reihe beinhaltet einen Indolnachweis, bei dem beim Tryptophanabbau entstehendes Indol mit KOVACS- oder EHRLICH'S-Reagenz (Wirkstoff: p-Dimethylaminobenzaldehyd) eine kirschrote Färbung im Überstand bildet. Der Indikator Methylrot (Umschlag bei pH 4,5) zeigt eine Säurebildung der Bakterien an, während man mithilfe des Voges-Proskauer-Tests Acetoin nachweist. Da sich

Acetoin selbst nicht nachweisen lässt, aber im alkalischen Bereich zu Diacetyl oxidiert wird, erhöht man mit KOH den pH-Wert. Diacetyl bildet mit Kreatin, Guanidin und Arginin einen roten Farbstoff, welcher durch BARRIT-Reagenz (Wirkstoff: α -Naphthol) verstärkt wird. Mithilfe des letzten Tests der Reihe weist man die Fähigkeit nach, Citrat als Kohlenstoffquelle zu verwenden. Das verwendete Medium (SIMMONS Citratagar) enthält außer Citrat keine andere Verbindung aus Kohlenstoff. Die Alkalisierung des Mediums wird mit Bromthymolblau sichtbar gemacht.

Der H_2S -Nachweis zeigt zum einen an, ob Organismen in der Lage sind, Thiosulfat zu reduzieren. Zudem ermöglicht er es, Aussagen über Lactose- und Glucoseabbau zu machen (Im KLIGLER-Agar liegen Lactose und Glucose im Verhältnis 10:1 vor). Eine Alkalisierung des Mediums wird mithilfe von Phenolrot nachgewiesen.

Des Weiteren werden proteolytische Enzyme und Amylasen (beides sind Exoenzyme) nachgewiesen. Erstere sind in der Lage, Gelatine zu verflüssigen, wohingegen Amylasen Stärke spalten können. Nicht abgebaute Stärke wird durch LUGOLS-Lösung ($KI \times I_2$) angezeigt.

2. Material und Methode

Siehe Skript.

3. Ergebnisse

Tabelle: Biochemische Reaktionen

	Escherichia coli	Citrobacter freundii	Enterobacter aerogenes	Bacillus subtilis	Test	Pseudomonas aeruginosa
OF + Paraffin	+	+	+	N	+	-
OF	+	+	+	N	+	+
Oxidase	-	-	-	N	-	+
Katalase	+	+	+	N	+	+
Nitratreduktion	+	+	+	N	+	+
Indol	+	-	-	N	-	-
Methylrot	+	+	-	N	+	-
Voges/Proskauer	-	-	+	N	-	-
Citrat	-	+	+	N	+	+
H_2S	-	+	-	N	+	-
Proteol. Enzyme	-	-	-	+	-	N
Amylase	-	-	N	+	-	N

+: positiv

-: negativ

N: nicht durchgeführt

Der OF-Test liefert die erwarteten Ergebnisse. Als aerober Organismus ist Pseudomonas nicht in der Lage, unter anaeroben Bedingungen Glucose

abzubauen. Auch in dem Röhrchen ohne Paraffin verfärbt sich nur der obere Bereich gelb (à Sauerstoff!), während der untere Bereich unverändert grün bleibt. Alle anderen getesteten Organismen können Glucose sowohl aerob als auch anaerob zu Säure abbauen.

Lediglich *Pseudomonas* ist im Besitz einer Cytochrom-c-Oxidase, welche Bestandteil der Atmungskette ist. Enterobakterien besitzen anstelle der Cytochrom-c-Oxidase eine Chinoloxidase.

Der Katalase-Test fällt bei allen getesteten Organismen positiv aus. Hervorzuheben ist die Reaktion im *Pseudomonas*-Röhrchen, welche mit Abstand am intensivsten ausfällt.

Während die Enterobakterien imstande sind, Nitrat als Teilschritt einer Nitratammonifikation (unvollständige Nitratatmung) zu Nitrit zu reduzieren, fällt dieser Nachweis bei *Pseudomonas aeruginosa* hingegen negativ aus.

Der Indolnachweis der IMViC-Reihe fällt einzig bei *E. coli* positiv aus, während der Methylrot-Test bei *Enterobacter aerogenes* und *Pseudomonas aeruginosa* ein negatives Ergebnis anzeigt. Beide sind offensichtlich nicht in der Lage aus Glucose genug Säure zu bilden, um den Indikator zum Umschlagen zu bringen.

Enterobacter aerogenes ist als einziger Testorganismus in der Lage, Acetoin zu bilden. Der VOGES-PROSKAUER-Test fällt bei allen anderen Organismen negativ aus. Bis auf *E. coli* sind alle untersuchten Organismen imstande, Citrat als einzige Kohlenstoffquelle zu verwenden.

Der H₂S-Nachweis fällt bei *Citrobacter freundii* und dem Testorganismus positiv aus. Zudem ermöglicht der Nachweis Rückschlüsse auf die Lactose- und Glucoseverwertung von *E. coli* und *Enterobacter*. *E. coli* kann beide Zucker verwerten, durch die entstehende Säure färbt sich das Medium komplett gelb. Auch *Enterobacter* kann Glucose und Lactose (mit β -Galactase) verstoffwechseln. Allerdings ist nicht das komplette Medium gelb gefärbt, sondern nur der untere Teil. Vermutlich hat *Enterobacter* schon damit begonnen, die Aminosäuren aus dem Pepton abzubauen, was nur unter aeroben Verhältnissen möglich ist. Aufgrund dieser Realkalisierung ist der obere, aerobe Teil des Röhrchens rot gefärbt.

Sowohl der Nachweis der proteolytischen Enzyme als auch der der Amylasen fällt einzig bei *Bacillus* positiv aus.

Literatur:

MADIGAN, MICHAEL T. et. al (2001): Brock. Mikrobiologie, Heidelberg.
SCHLEGEL, HANS G. (1992): Allgemeine Mikrobiologie, Stuttgart.