

# **Undersøgelse af kulhydratomsætning**



## *Kapitel 17*

### **Alment om kulhydratomsætning**

Kulhydrater forekommer i stor mængde i naturen og er for mange bakterier deres vigtigste kulstof- og energikilde. Som følge heraf er der under evolutionen udviklet et stort antal bakterielle enzymer med den opgave at omdanne de naturlige kulhydrater til simplere forbindelser, så de enten kan indgå som brændstof i bakteriernes energistofskifte eller tjene som byggesten for bakteriecellerne.

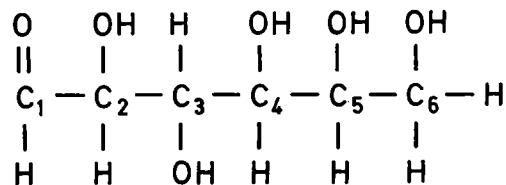
Forskellige bakterier har mere eller mindre forskellige måder, hvorpå de omsætter kulhydrater, og måden hvorpå en bestemt større eller mindre gruppe af bakterier gør det er ofte så karakteristisk, at man derved kan adskille grupperne fra hinanden.

Biokemisk har man efter mere end 100 års arbejde med disse problemer nogenlunde rede på de vigtigste former for bakteriel kulhydratomsætning og kan på denne baggrund beskrive og forstå de forskellige bakteriologiske prøver, der anvendes. Da det uden en vis biokemisk baggrundsviden er svært at få samling på det omfattende stof, vil vi indledningsvis give en kort oversigt over A) de vigtigste kulhydrater, B) de vigtigste biokemiske nedbrydningsmekanismer og nævne C) syntese af enkelte diagnostisk vigtige polysakkarkerider. I øvrigt henvises til de mere detaillierte fremstillinger i eksisterende biokemiske og mikrobiologiske håndbøger. Særlig vil vi anbefale Stanier, Adelberg & Ingraham: *The Microbial World*, 4. udg. 1976, og Hoff-Jørgensen, Moe & Munksgaard: *Elementær biokemi*, 3. udg. 1975.

#### **A. De vigtigste kulhydrater**

Sukkerarter eller kulhydrater er bygget som kæder eller ringe af indbyrdes forbundne kulstofatomer (-C-), hvortil der er bundet brintatomer (-H) og hydroxylgrupper (-OH). Antallet af kulstofatomer i den enkelte ring eller kæde er hyppigst 6, men kan være både større og mindre.

Et typisk kulhydrat er D-glukose, som i kædeform ser således ud:



Ringformen opstår ved at molekylets ender bøjes mod hinanden, og der dannes en ny binding mellem C<sub>1</sub> og C<sub>5</sub> atomet.

Glukosemolekylet er modersubstans for de fleste andre kulhydrater, som adskiller sig fra glukose enten ved at brintatomer og hydroxylgrupper ved de forskellige kulstofatomer vender i andre retninger eller ved at antallet af kulstofatomer varierer, eller ved at flere ringe er bundet sammen til længere molekyler (di-, tri- og polysakkarkerider).

Hvis man forestiller sig, at -H og -OH gruppen ved C<sub>5</sub> atomet byttede stilling, ville man have et stof med samme sammensætning som D-glukose, men med lidt andre egenskaber. Dette stof kaldes L-glukose, og D- og L-formerne af glukose kaldes stereoisomere stoffer. Hvis molekylet findes i ringform, vil der være en -H og en -OH gruppe på C<sub>1</sub> atomet, som også kan bytte stilling, og disse to stereoisomere stoffer kaldes  $\alpha$ - og  $\beta$ -former af henholdsvis D- og L-glukose. Stereoisomeri spiller en vigtig rolle i biokemien, fordi visse enzymer er i stand til at angribe den ene stereoisomere form af et stof, men ikke den anden form, og derfor skal de kulhydrater, der anvendes i bakteriologiske prøver, være mærket som D- eller L- og evt. også som  $\alpha$ - eller  $\beta$ , så man præcist ved i hvilken form stoffet findes.

De kulhydrater, der hyppigst anvendes i bakteriologiske prøver, er sakkarkerider og alkoholer, som omtales i det følgende.

**Monosakkarkerider:** Af navnet mono fremgår, at der i molekylet kun er een ring eller kort kæde. De fleste af de monosakkarkerider, der bruges, har 6 kulstofatomer og kaldes under et hexoser (hexa = 6); fx. fruktose, galaktose, glukose, mannose og sorbose. Monosakkarkerider med 5 kulstofatomer kaldes tilsvarende pentoser (penta = 5), fx. arabinose, xylose og ribose.

Rhamnose er en hexose med et iltatom mindre end sædvanligt og betegnes derfor som en desoxyhexose.

**Di- og trisakkarkerider** er kulhydrater med henholdsvis to og tre monosakkarkerider forbundet ved en særlig kemisk binding kaldet en glykosidbinding, se fx. formlen for laktose i kapitel 26). Et fællesnavn for begge grupper er oligosakkarkerider (oligo = få), som angiver at de består af få monosakkardenheder modsat polysakkarkerider (poly = mange), der består af mange sammenkoblede

enheder. De hyppigst anvendte *disakkarkerider* med angivelse af de monosakkarkerider, der indgår, er følgende:

- Trehalose → α-D-glukose + α-D-glukose  
Sakkarose → α-D-glukose + β-D-fruktose  
Cellobiose → β-D-glukose + β-D-glukose  
Maltose → α-D-glukose + β-D-glukose  
Laktose → β-D-glukose + β-D-galaktose  
Melibiose → D-glukose + α-D-galaktose

De hyppigst anvendte *trisakkarkerider* med angivelse af de monosakkarkerider, der indgår, er følgende:

- Raffinose → α-D-galaktose + α-D-glukose + β-D-fruktose  
Melezitose → α-D-glukose + β-D-fruktose + α-D-glukose

Et andet navn for disakkarkerider er glykosider på grund af navnet på den særlige kemiske binding mellem de to monosakkarkerider. Til glykosiderne regnes også stoffer, hvor kun en af komponenterne er et monosakkardin, medens den anden komponent er et andet stof. Af sådanne glykosider anvendes i bakteriologien følgende:

- Æskulin → glukose + 6,7-dihydroxycumarin (= æskuletin)  
Salicin → glukose + salicylsyrealkohol (= salignin)

*Polysakkarkerider:* Eksempler på disse kulhydraters opbygning er omtalt i afsnittene om stivelse, cellulose og pectin. Det er ofte meget lange molekyler opbygget af een bestemt slags monohexose.

*Alkoholer:* I laboratoriejargon regnes visse alkoholer med blandt kulhydraterne, fordi de bruges på linie med de egentlige kulhydrater i de såkaldte forgæringsrækker, og desuden er de kemisk nært beslægtede. De almindeligst anvendte alkoholer er følgende, ordnet efter antallet af primære alkoholgrupper:

Monovalent :	ætanol	= ætylalkohol
Trivalent :	glycerol	
Pentavalent :	adonitol	= reduceret ribose
	sorbitol	= reduceret glukose
Hexavalent :	mannitol	= reduceret mannose
	dulcitol	= reduceret galaktose
	inositol	(dette molekyle er ringformet modsat de øvrige alkoholer)

Efter korrekt kemisk nomenklatur ender alle alkoholers navne på -ol, men i Danmark bruges ofte betegnelserne adonit, sorbit, mannit, dulcit og inositol uden tilføjet -ol.

### B. Hovedprincipperne for bakteriel kulhydratnedbrydning

Det er en hovedregel for al bakteriel udnyttelse af organiske stoffer i naturen, at den sker gennem en trinvis spaltning af store molekyler til stadig mindre molekyler, og at disse mindre molekyler derefter gennemgår en række omdannelser på en sådan måde, at den energi, der er til stede i molekyernes kemiske bindinger, frigøres til brug for bakteriestofskiftet. De meget simple kemiske forbindelser, som tilsidst bliver tilbage, indgår påny i naturens stofkredsløb, hvor de tjener til opbygning af nye generationer af levende organismer, herunder også nye bakterieceller. Hver af de nævnte biokemiske spaltninger og omdannelser foregår under medvirken af særlige enzymer, dvs. proteinmolekyler dannet af bakterierne med det formål at fremme bestemte biokemiske omdannelser.

Det første trin i nedbrydningen af poly- og oligosakkarkerider er spaltning af glykosidaseprøver, fx. ONPG-prøven og andre tilsvarende som ONPX- og PGUA-prøverne (se kapitel 21) samt æskulinprøven (se kapitel 22).  
pler på prøver, der påviser sådanne enzymer, kan nævnes stivelse-, cellulose- og pectinspaltningsprøver (se kapitel 23, 24 og 25). Desuden de såkaldte glykosidaseprøver, fx. ONPG prøven og andre tilsvarende som ONPX- og PGUA-prøverne (se kapitel 21) samt æskulinprøven (se kapitel 22).

Når de forskellige monosakkarkerider er frigjort, vil de først blive omdannet til glukose, inden den videre nedbrydning begynder, og desuden er det nødvendigt, at der herefter sker en binding af fosfatgrupper til glukosen, en såkaldt fosforylering. Der findes bestemte enzymer, der omdanner de andre monosakkarkerider til glukose og fremkalder fosforyleringen, men der er ikke udarbejdet bakteriologiske prøver, som specielt påviser disse processer.

Glukosenedbrydningen kan foregå på forskellige måder, som er karakteristiske for bestemte hovedgrupper af bakterier:

*1) Fermentation og fermentativ syredannelse*

Strikt anaerobe bakterier og fakultativt anaerobe bakterier under anaerobe forhold omdanner først glukose til pyrodruesyre, et molekyle der kun er halvt så stort som glukose, og afhængig af hvilke slægter og arter der er tale om bliver pyrodruesyren derefter omdannet til andre stoffer, især syrer og alkoholer. Den række af biokemiske processer, der fører fra glukose til pyrodruesyre, kan variere noget. Højest følger processen Embden-Meyerhof reaktionskæden, i andre tilfælde Entner-Doudoroff reaktionskæden, eller den såkaldte pentose-fosfat-shunt, og undertiden benyttes flere veje samtidigt. Den samlede proces kaldes fermentation eller forgæring, og afhængig af slutprodukternes art taler man om følgende hovedtyper af forgæringer: mælkesyre-, smørsyre-, mixed-acids-, butanol-acetone- og propionsyreforgæring. En analyse af slutprodukterne vil altså oplyse, hvilken form for forgæring der har fundet sted, og dermed give vigtige diagnostiske oplysninger. En moderne metode til analyse af slutprodukterne er gaskromatografi, som især har fundet anvendelse ved diagnostik af anaerobe bakterier. Den kræver et ret kostbart apparatur og skal ikke nærmere omtales her. Den forgæringstype, som kaldes 2,3-butandiol-forgæring, har acetoin som mellemprodukt, og det er det stof, man påviser ved Voges-Proskauers prøve (se kapitel 19).

Da syrer udgør en større eller mindre del af slutprodukterne ved de fleste forgæringer, behøver man ikke en fuldstændig analyse af slutprodukterne for at afgøre, om en forgæring har fundet sted; det er tilstrækkeligt at vise, at der er dannet syre, og det kan nemt gøres ved hjælp af en indikator. Dette er grundlaget for forgæringsprøver, der påviser fermentativ syredannelse (se kapitel 18). I nogle tilfælde er der blandt slutprodukterne luftarter som brint og kuldioxyd, og derfor er nogle af forgæringsglassene indrettet, så man kan afgøre om der har fundet luftudvikling sted, hvorved man får en ekstra oplysning.

*2) Oxidation, respiration eller fuldstændig forbrænding*

Hos fakultativt anaerobe bakterier under aerobe forhold og hos strikt aerobe bakterier følger glukosenedbrydningen i begyndelsen de samme veje som ved forgæring, men fra pyrodruesyrestadiet sker der noget helt andet.

Ved hjælp af to reaktionskæder, den ene kaldet Krebs cyklus, den anden respirationskæden, overføres energien i molekylet trinvis til bakterien samtidig med, at den frigjorte brint kobles til luftens ilt, så der dannes vand, mens

kulstofatomer frigøres som kuldioxyd. En sådan fuldstændig omdannelse (forbrænding) af glukose til kuldioxyd og vand under samtidig afgivelse af store mængder energi kalder man en respiratorisk eller oxidativ proces, fordi den modsat fermentationen forudsætter, at der enten er fri ilt til stede eller iltholdige kemiske forbindelser som fx. nitrat, sulfat og karbonat, hvorfra ilten kan overføres. Når ilten stammer fra en af de nævnte kemiske forbindelser, taler man om en anaerob respiration, fordi den kan foregå under anaerobe forhold, men biokemisk svarer til en respiration. Bakteriel respiration er i principippet den samme proces, som den hvorved alle højere organismer – inklusive mennesker – skaffer sig den energi, der er nødvendig til livets oprettholdelse.

Da fuldstændig oxidation af kulhydrater ikke fører til dannelse af karakteristiske slutprodukter, men kun til  $H_2O$  og  $CO_2$ , er der ingen specielle bacteriologiske prøver som kan vise, at der har fundet en fuldstændig oxidation sted i lighed med de prøver, der bruges til påvisning af forgæringsprodukter. Man kan indirekte gennem vækstforsøg fastslå, at fx. en fuldstændig glukoseoxidation har fundet sted, men det er ikke en prøve, der specielt anvendes til undersøgelse af kulhydratomsætning.

Det kan nævnes, at den energimængde, der friges ved fuldstændig oxidation af et molekyle glukose, er mere end 10 gange så stor som den, der friges ved fermentation af samme molekyle. Det skyldes at fermentationsprodukterne kun repræsenterer en delvis nedbrydning af det oprindelige molekyle, og derfor stadig indeholder en stor del af den bundne energi.

### *3) Oxidativ syredannelse og dannelse af 3-ketoglykosider*

Nogle strikt aerobe bakterier, deriblandt eddikesyrebakterier og pseudomonader, har enzymer, der medfører at visse mono- og disakkarker eller alkoholer ved en iltkrævende proces omdannes til en syre. Da processen er iltkrævende, er det praktisk at betegne den som oxidativ syredannelse, modsat den fermentative syredannelse, men brugen af ordet oxidativ i denne sammenhæng må ikke forlede til at tro, at der er tale om en respiration. De væsentligste træk, som skiller oxidativ syredannelse fra fuldstændig oxidativ nedbrydning af glukose er følgende: (1) Der sker ingen indledende fosforylering, (2) der dannes ingen energi, og (3) der er kun tale om små ændringer i molekylerne. Fx. kan den ene eller den anden ende af et glukosemolekyle iltes, så der opstår en syregruppe; i det ene tilfælde betegnes syren som glukonsyre, i det andet som glucuronsyre. På tilsvarende måde kan aldehydgruppen i et disakkridmolekyle iltes, så der opstår fx. laktobionsyre eller maltobionsyre af henholdsvis laktose og maltose, og ætanol iltes, så der opstår eddikesyre.

Hvad bakterierne opnår ved en oxidativ syredannelse, er ikke kendt, men syredannelse kan udnyttes diagnostisk, fordi forskellige arter varierer med hensyn til de kulhydrater, de kan danne syre af. Oxidativ syredannelse påvises i Hugh & Leifson's O/F medium (se kapitel 20).

En nyopdaget, sjælden oxidativ proces, er visse disakkriders og de tilsvarende bionsyrers omdannelse til 3-ketoglykosider. Enzymer, der kan foretage denne omdannelse, er foreløbig kun fundet hos plantepatogene varianter af *Agrobacterium radiobacter*, og da et produkt som 3-ketolaktose er nemt at påvise, er der på dette grundlag udviklet en særlig 3-ketolaktoseprøve til identificering af disse bakterier (se kapitel 26).

### C. Bakteriel syntese af kulhydrater

I bakteriers vægge og kapsler findes mange slags polysakkriders som normale cellebestanddele, syntetiseret af den pågældende bakterie ved hjælp af særlige enzymer. Ofte udgør polysakkriderne en del af de antigener, som benyttes i den serologiske diagnostik, og for så vidt udnyttes de i bakteriologisk differentialdiagnose, men direkte påvisning af syntese af et bestemt polysakkrid anvendes derimod sjældent. Kun påvisning af kapselpolysakkriderne levan og dextran ud fra sakkarose er udformet som en særlig bakteriologisk prøve (se kapitel 27).

## *Kapitel 18*

# Forgæringsprøver

Prøver der påviser, om der i bakteriekulturer under anaerobe forhold dannes syre eller syre + luft af glukose og andre kulhydrater. Syredannelsen tages under disse forhold som udtryk for, at der i kulturen er foregået en forgæring eller fermentation, men man kan ikke uden yderligere undersøgelser afgøre, hvilken forgæringstype der er tale om.

### **1. Historisk indledning**

Gæring i sukkerholdige naturprodukter, især plantesaft, har man kendt og udnyttet fra ældgammel tid, bl.a. til fremstilling af berusende drikke og syrnedede mælkeprodukter. I 1830'erne opdagede man, at gæringsprocesserne ved øl- og vinfremstilling skyldes tilstedeværelsen af gærsvampe, og i løbet af 1860'erne viste Pasteur, at der ved alle slags gæringar fandtes mikroorganismer og ved en bestemt slags gæring altid en bestemt svamp eller bakterie. Pasteurs gæringsundersøgelser fik stor betydning ved at bane vej for den opfattelse, at mikroorganismer også kunne være årsag til sygdomme. At den egentlige årsag til gæringsprocesserne er mikroorganismernes enzymer, blev vist af E. Buchner i 1897, og dermed blev grunden lagt til den detaillerede biokemiske udforskning af forgæringsprocesserne og de involverede enzymer.

Da man i begyndelsen af 1880'erne begyndte at arbejde med renkulturer af bakterier, var det en nærliggende tanke at undersøge, hvilke forgæringsprodukter de enkelte bakterier dannede i sukkerholdige medier (Brieger 1884, 1885; Frankland et al. 1891; Grimbart 1895, 1896), men med de analysemетодer, man dengang rådede over, var undersøgelserne ikke egnet til praktisk diagnostiske formål. Derimod fik det stor praktisk betydning, da man begyndte at interesser sig for, om reaktionen i udvoksede bakteriekulturer blev sur eller alkalisk bedømt efter farveomslag af tilsat lakmus (H. Buchner 1885; Petruschky 1889, 1890). Det viste sig hurtigt, at sur reaktion skyldtes tilstedeværelse af sukker i medierne, og at der var forskel på forskellige bakteriers evne til at danne syre af en bestemt sukkerart; desuden viste Theobald Smith (1890), at det samme var tilfældet med evnen til at danne luft, undersøgt i

en Einhorns gæringskolbe. Af disse tre bakteriologers undersøgelser fremgik det fx., at colibakterier regelmæssigt dannede syre og luft af glukose og laktose, medens tyfusbakterier manglede evnen til luftdannelse og heller ikke dannede syre af laktose. Her havde man altså simple metoder til at skelne mellem to bakterier, hvis adskillelse tidligere havde været et stort problem. Fra disse iagttagelser udvikledes i de følgende 10 år de såkaldte ”lange sukker-rækker” til differentiering af nært beslægtede bakterier, især takket være undersøgelser af Capaldi & Proskauer i Tyskland (1896), C.O. Jensen i Danmark (1897, 1898) og Durham i England (1900/01).

Da man først havde erkendt, at syre- og luftdannelse fra bestemte sukkerarter var nyttige kriterier i bakteriekarakteristikken, og havde indført forgæringsrækker, hvor en længere række glas med hver sin forskellige sukkerart undersøges samtidig, blev det en vigtig opgave at fastlægge undersøgelsesbetingelser, som gav reproducerbare og let aflæselige resultater.

#### *Påvisning af luftudvikling*

Begrebet gæring var oprindelig først og fremmest knyttet til luftudvikling i form af bobler i den gærende væske, og de første diagnostiske forgæringsprøver var også baseret på iagttagelse af luftbobler i kulturglasset (se fx. Prazmowski 1880 og H. Buchner 1885). Det kan her nævnes, at C.J. Salomonsen i sin disputats (1877) beskrev en forsøgsanordning, som kunne påvise luftudvikling i bakteriekulturer. Han viste, at luften især optrådte i kulturer, som indeholdt sporedannere, og at luften bestod af  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$  og spor af  $\text{H}_2\text{S}$ . I 1890 foreslog Theobald Smith at bruge Einhorns gæringskolbe i bakteriologien, da man herved opnåede dels en mere sikker påvisning af luftdannelse, dels en mulighed for at undersøge det relative forhold mellem udviklet  $\text{CO}_2$  og brint, et forhold som viste sig at være ret konstant og forskelligt hos forskellige bakterier. I Einhorns gæringskolbe opfanges en del af den udviklede luft i den ene, lukkede ende af et ombøjet glasrør (U-glas), hvori kulturen befinder sig.

Durham lancerede i 1898 en meget simpel metode til luftpåvisning, som stadig er i brug de fleste steder. Han anbragte et lille omvendt glas i bunden af et almindeligt substratfyldt kulturglas. På grund af varmeudviklingen under steriliseringen blev luften drevet ud af det omvendte glas, så det blev fyldt med substratet. Hvis der senere under forgæringer udvikles luft, ville noget samle sig i toppen af det omvendte glas og være tydeligt synlig. Et substratglas med et lille indvendigt glas med bunden i vejret kaldes stadig et Durham-glas, og det hele er i virkeligheden – som Durham selv udtrykte det – et modificeret U-glas. Fordelen ved at have et U-glas i to separate dele er indlysende både ved oprensning og fyldning af glassene. Durham anførte, at det lille glas skulle være så stort, at det kunne rumme ca. halvdelen af substratmængden. Det er en regel, der nu om stunder syndes stærkt imod, og vistnok med det resultat,

at luftpåvisningen er blevet mindre pålidelig.

Til at skelne mellem homo- og heterofermentative mælkesyrebakterier foreslog Gibson & Abdel-Malek (1945), at forgæringsglasset forsyndes med en "agarprop" lige over det flydende medium, da den ville blive skubbet i vejret, hvis der produceredes CO<sub>2</sub>, dvs. bakterien var heterofermentativ. Sperber & Swan (1976) sammenlignede denne agarprop-metode dels med en kemisk metode, hvor CO<sub>2</sub> udfældes i bariumhydroxyd, dels med en ny "hot-loop" metode, hvor en rødgødende " nichrome" øse stikkes ned i kulturen med det resultat, at en strøm af CO<sub>2</sub>-bobler frigøres. Det viste sig, at agarprop-metoden svigtede i  $\frac{1}{3}$  til  $\frac{1}{2}$  af tilfældene, mens "hot-loop" metoden gav samme resultat som den kemiske metode. Forfatterne antager, at metoden også vil kunne anvendes til påvisning af luftudvikling hos andre bakterier.

#### *Syrepåvisning – indikatorer*

De oprindeligt anvendte kemiske metoder til kvalitativ og kvantitativ syrebestemmelse (se fx. Brieger 1884, 1885 og Grimbart 1895, 1896) var for besværlige til at få betydning i den daglige diagnostik. Beijerinck (1891) angav dog en simpel metode baseret på tilsætning af kalciumkarbonat til pladerne, så der opstod en opklaring omkring syreproducerende kolonier.

Hurtigt gik man over til blot at bestemme den samlede titrerbar syremængde uanset syrens art ved hjælp af en indikator. Den mest anvendte indikator var lakmus fremstillet af forskellige lavarter (se fx. H. Buchner 1885 og Petruschsky 1889, 1890). Lakmus var ikke nogen god indikator, da den var af uensartet sammensætning og svag i farven, men i begyndelsen havde man ikke andre.

Først med danskeren S.P.L. Sørensens arbejder (1908, 1912, cit. fra Clark & Lubs 1917) fik man den rette forståelse af syre-base begrebet og et kriterium for udvælgelse af indikatorer, som var egnede til brug i biologiske væsker. Særlig Clark & Lubs i USA (1917) arbejdede for at indføre S.P.L. Sørensens synspunkter i bakteriologien.

Da det efterhånden blev erkendt, at den titrerbare syremængde i bakteriologiske substrater er et meningsløst begreb, gik man over til i stedet for at bestemme slut-pH i forgæringsglassene som et udtryk for syredannelsen.

Den mest præcise pH bestemmelse opnår man ved at måle brintjonkoncentrationen direkte med en glaselektrode, men i dagligt arbejde, hvor stor præcision ikke er nødvendig, kan man opnå brugbare resultater ved hjælp af indikatorer.

De nu hyppigst anvendte indikatorer, som alle er syntetiske stoffer, er opstillet i følgende tabel:

	pH:
Bromkresolpurpur	gul      5,4 – 7,0 violet
Bromtymolblåt	gul      6,1 – 7,7 blå
Fenolrødt	orange 6,9 – 8,5 rød
Metylrodt	rød    4,2 – 6,3 gul
Neutralrødt	rød    6,8 – 8,0 gul
Andrades indikator	rød    5,2 – 8,0 gul

De tre første er sulfonphthaleiner, de følgende er henholdsvis et azofarvestof, et fenazinderivat og et surt fuksin.

Ved at vælge en bestemt indikator og ved at give substratet en bestemt udgangs-pH og bufferkapacitet kan man til en vis grad regulere forgæringsprøvens følsomhed. Et alt for følsomt system er ingen fordel. I de fleste medier må man regne med, at der samtidig med syredannelse kan ske en vis basedannelse på grund af deaminering af aminosyrer, således at en del af den dannede syre neutraliseres.

#### *De anvendte sukkerarters renhed og stabilitet*

De fleste sukkerarter, der anvendes ved forgæringsprøver, er naturprodukter, dvs. de findes oprindeligt i blanding med andre stoffer, inklusive andre sukkerarter, og må skilles fra disse ved forskellige rensningsprocedurer, inden et rent produkt foreligger. Forskellige handelsvarer varierer med hensyn til renhedsgrad, og man bør naturligvis vælge de reneste, fordi tilblandinger af andre sukkerarter, selv i ret små mængder, kan føre til forkerte resultater, fx. kan en ringe glukosetilblanding på grund af syredannelse fra glukosen føre til den fejlagtige opfattelse, at en ikke-forgærbar sukkerart forgæres.

Hvis man får mistanke om, at et bestemt handelsprodukt giver falsk positive reaktioner på grund af tilstedeværelse af fx. glukose, kan dette som regel afsløres ved forsøg med stammer med kendt forgæringsevne.

Et andet praktisk vigtigt problem er sukkerarternes stabilitet. Ændringer kan finde sted, dels som følge af mutarotation, dels som følge af partiel spaltning af glykosidbindinger i oligo- og polysakkarider, og endelig kan sukkerarterne danne komplekser med andre af substratets komponenter. Der findes i litteraturen en del arbejder, som behandler disse problemer (Durham 1901; Mudge 1917; Fulmer et al. 1931; Llewellyn Smith 1932; Davis & Rogers 1939–40), især med henblik på de ændringer, der kan fremkaldes ved opvarmning

under substratsterilisering, men tolkningen af resultaterne er ikke i fuld indbyrdes overensstemmelse.

Visse kendsgerninger synes dog atstå fast. Varmebehandling af substrater med tilsatte sukkerarter bør være så lempelig som foreneligt med opnåelse af fuld sterilitet. Bedst er formentlig en kortvarig autoklavering, hvor man lukker for dampen, så snart temperaturen har nået 120°C, eller en kortvarig kochning 3 gange med et døgns mellemrum (Tyndallisering). Ved tilsætning af sterilfiltreret sukker kan man helt komme uden om problemet. Her må det tilføjes, at nogle forfattere (Fulmer et al. 1931; Orla-Jensen 1933) har bemærket, at der ved opvarmningen kan opstå vækstfaktorer, som begünstiger væksten af visse mikroorganismer. Et synligt tegn på, at opvarmningen har medført ændringer, er den såkaldte karamelisering, dvs. en mere eller mindre udtalt brunfarvning af det sukkerholdige substrat. Til forgæringsforsøgene må man forlange, at bouillonen ikke har ændret farve ved steriliseringen.

Fra kemien er det kendt, at monosakkarider er noget ustabile i svagt alkaliske opløsninger ved stuetemperatur, men mere stabile i sure opløsninger. Særlig uheldig er opvarmning ved alkaliske pH i nærvær af fosfater. For at få mindst mulig omdannelse af tilsatte monosakkarider bør varmesterilisering derfor foregå efter at pH er indstillet til 6,6-6,8; er det ønskeligt med en højere pH i mediet, må den reguleres efter steriliseringen. Glykosider og nogle polysakkarkerider er mere stabile over for alkali end monosakkarkerider. Ved opvarmning kan reducerende sukkerarter reagere med aminosyre i substratet (Mail-lards reaktion) og derved medføre mangel på disponibele aminosyrer.

#### *Grundsubstratets sammensætning*

Allerede Durham (1901) angav en række forhold, som der bør tages hensyn til ved udførelse af forgæringsprøver, og de fleste har stadig fuld gyldighed.

Om grundsubstratet bemærkes, at det ikke må indeholde forgærbare substanser. Mange kødinfusioner og kødekstrakter indeholder en vis mængde glukose stammende fra muskelkødet. En kontrol med en kendt glukoseforgærende stamme er nødvendig, og viser det sig, at mængden er stor nok til at give syre- og luftdannelse, må glukosen fjernes. Det sker ved tilsætning af en glukoseforgærende bakterie eller gærart, der får lov til at vokse i hele bouillonportionen, hvorefter cellerne fjernes igen ved filtrering.

Nødvendigheden af en kontrol med uønskede sukkermængder i substratbestanddelene er senere bekræftet af Vera (1950), som fandt, at et meget stort antal af over 500 undersøgte prøver af peptoner, kødekstrakter, bouilloner etc. gav anledning til syre- og/eller luftdannelse. Vera fremhæver pankreasfordøjet kasein og gelatinepepton som langt de bedst egnede og

minder om, at gærautolysat kan indeholde op til 40% kulhydrat. Vera's resultater – der er temmelig rystende – må for en del skyldes brug af fenolrødt som indikator. Fenolrødt viser sur reaktion ved pH 6,9, og da medierne var indstillet på pH 7,3 og ikke tilsat ekstra buffer, skulle der ikke megen syredannelse til, før indikatoren slog om.

Durham pointerede også, at hvis mediet ikke giver bakterierne tilstrækkeligt gode vækstbetingelser, kan forventet luftdannelse udeblive.

Ligeledes gjorde Durham opmærksom på, at hvis den tilsatte sukkermængde er for lille (fx. 0,1%), kan syremængden neutraliseres fuldstændigt af basiske produkter dannet af pepton.

Af særlige substrattilsætninger, som kan interferere med forgæringsprøver, må også nævnes hesteserum, der kan indeholde maltase og dermed give falsk positive reaktioner i maltoseglasset (Peizer 1942).

Tilsætning af en fosfatbuffer, som regel en blanding af  $K_2HPO_4$  og  $KH_2PO_4$ , er hensigtsmæssig, fordi det forøger den eksisterende bufferkapacitet og gør det lettere at etablere en bestemt udgangs-pH i substratet.

#### *Iltningsofholdene i forgæringsglasset*

Den almindelige forgæringsrækkes største anvendelsesområde er de fakultativt anaerobe bakterier. Da forgæringen af sukker er en anaerob proces, burde prøven teoretisk set udføres under helt anaerobe forhold. Dette ville have den fordel, at man undgik den alkalidannelse, der er en følge af oxidativ nedbrydning af substratets kvælstofholdige bestanddele, men er samtidig meget upraktisk med så mange glas.

Man bruger derfor stationære kulturer (dvs. uden rystning eller luftgennembobling), og høje væskesøjler, hvor iltspændingen i den nederste del af søjlen hurtigt bliver så lav, at forgæringen her kan foregå under optimale betingelser. Man vil i en del tilfælde se, at indikatoromslaget i øverste del af glasset er forsinket, eller at der sekundært sker et tilbageslag af indikatoren – begge dele udtryk for alkalidannelse på grund af oxidative processer.

Hvis syredannelsen er kraftig, har de nævnte forhold ingen praktisk betydning, men ved svagere grader af syredannelse kan de medvirke til, at aflæsningen bliver usikker.

En hæmning af de oxidative processer kan opnås ved agartilsætning, altså ved at lade processerne foregå i en halvflydende eller fast agarsøjle, hvor ilt-diffusionen er hæmmet, og hvor samtidig blandingen af syre og base fra glassets nederste og øverste del vil blive stærkt forsinket (Conn & Hucker 1920; Hugh & Leifson 1953).

### *Forgæringsmønstre*

De enkelte bakteriearters forgæringsmønster er en relativt konstant egenskab og kan derfor udnyttes ved identifikation af nye isolater.

Erfaringen har dog vist, at der blandt stammer af samme art kan være mindre forskelle i forgæringsmønstret. Det kan enten skyldes, at en bestemt stamme på grund af en mutation har tabt evnen til at forgære en bestemt sukkerart, eller at en stamme på grund af plasmiderhvervelse har fået evne til at forgære en sukkerart, som de øvrige stammer af arten ikke kan forgære (se fx. Smith & Parsell 1975; Schmid & Schmitt 1976; Efsthathiou & McKay 1976).

Ved identifikationen, hvor den ukendte stammes mønster sammenlignes med mønstrene i et forgæringskema, må der tages hensyn til denne variation, og i de bedste forgæringskemaer er resultaterne ikke angivet som rent plus og minus resultater, men et procenttal angiver hvor hyppigt man kan forvente afvigelser (se fx. forgæringskemaer fra CDC i Atlanta, USA).

### *Forskellige udformninger af forgæringsprøver: plademetoder, mikrometoder, hurtigmetoder og direkte enzymtest*

Ved primær isolering af tarmpatogene bakterier er det en fordel, hvis de alt-dominerende colibakterier straks kan kendes på pladen. Da man havde erkendt, at evnen til at danne syre af laktose var en af forskellene mellem *E. coli* og *S. typhi*, var det nærliggende at udnytte denne forgæringsforskel i selve primærpladen ved at til sætte laktose og en indikator, så man på indikatoromslaget straks kunne udskille alle laktoseforgærende kolonier.

De første plader af denne slags var Conradi-Drigalski's lakmus-laktose-agar (1902), Grünbaum & Hume's neutralrødt-laktose-agar (1902) og lidt senere MacConkey's galdesalt-neutralrødt-laktose-agar (1905). Senere er mange forskellige varianter angivet, deriblandt vores såkaldte "blå plade", som indeholder laktose og bromtymolblåt, så alle laktoseforgærende bakterier danner gule kolonier.

Mikrometoder, hvor forgæringen finder sted i meget små substratportioner, er beskrevet af Bronfenbrenner & Schlesinger (1918a, b), der især tilstræbte substratbesparelse på grund af forholdene under første verdenskrig, og af Hannan & Weaver (1948), som foruden substratbesparelsen lagde vægt på at reaktionerne kunne aflæses hurtigere. De moderne kits som "API" og "Enterotube" etc. er også mikrometoder. At der er økonomisk gevinst ved at bruge mikrometoder – dog nok ikke ved de kommersielle sæt – kan næppe benægtes, men den omstændighed at man i de fleste laboratorier holder fast ved makrometoderne, tyder på at de øvrige fordele er tvivlsomme. At man af tidsbesparende grunde har anbefalet mikrometoder, der foregår i plasticbakker med huller og en automatisk multiinokulator, nævnes for en fuldstæn-

digheds skyld (fx. Young & Udey 1976).

Prøver, der er baseret på virkningen af præformeret enzym i et meget stort inoculum tilsat en sukkeropløsning, har været forsøgt, især med bakterier som *Neisseria* og *Brucella*, der vokser så dårligt, at man har en mistanke om, at den ofte svage syredannelse væsentligst skyldes den dårlige vækst. *Neisseria*-undersøgelser efter dette princip er omtalt af Kellogg & Turner (1973) og Young et al. (1976). *Brucella*-metodikken er omtalt af Manclark et al. (1975). Efter erfaringer i diagnoseafdelingen fungerer direkte enzymtest af denne type ikke altid tilfredsstillende, hvad der måske skyldes, at der her – i modsætning til de fleste andre direkte enzymtests vi bruger – ikke er tale om, at et enkelt eller nogle få enzymer skal fungere, men lange rækker af enzymer.

## 2. Biokemisk baggrund

Ved de her omtalte simple forgæringsprøver konstateres alene, om der er produceret syre nok til at give omslag af den anvendte indikator, og om der samtidig med syredannelsen er dannet synlig luft. Af disse to simple konstateringer kan man ikke udlede, hvilke biokemiske processer der har været involveret, og kan derfor ikke i det konkrete tilfælde formulere undersøgelsens resultat som mangel eller tilstedeværelse af bestemte enzymer eller rettere enzymrækker.

Det betyder ikke, at man mangler viden om forgæringsprocessernes biokemi; faktisk udgør en detailleret beskrivelse af disse processer en stor del af enhver lærebog i biokemi. Da den biokemiske baggrund ikke kan udnyttes ved fortolkning af de simple forgæringsprøvers umiddelbare resultater, og da en forståelig fremstilling ville fylde mange sider, har vi valgt at nøjes med allerede i den historiske indledning at medtage de biokemiske forhold, som har praktisk betydning, og i øvrigt at henvise til de bakteriologiske og biokemiske håndbøger (se kapitel 17).

Ved en kvalitativ og kvantitativ analyse af de forskellige luftarter, syrer og andre stoffer, som ophobes i et forgæringsglas, kan man nå et langt stykke i retning af at fastslå, hvilke biokemiske processer der i et konkret tilfælde er tale om, og på den måde få forskelle frem, som kan udnyttes i diagnostikken. Sådanne analyser kan i dag udføres ved hjælp af gaskromatografi, men ser man bort fra anaerobe bakterier, er der vist almindelig enighed om, at til rutineidentifikation er gaskromatografisk analyse ikke nødvendig.

### 3. Valg af metode

Ved valg af metode skal man dels tage stilling til, hvilke sukkerarter der skal indgå i forgæringsrækken, dels vælge grundsubstrat, indikator, inkubationstid osv. for det enkelte forgæringsglas.

Ideelt set burde valget af sukkerrækken individualiseres, idet man på grundlag af en foreløbig diagnose afgjorde, hvilke sukkerarter man især forventede ville være nyttige til at sikre en endelig diagnose. I praksis vælger man som regel at arbejde med én eller flere standardrækker. Den korteste standardrække består af 1 glas: glukoseglasset. Hvis der ikke dannes syre i glukoseglasset, kan man til alle praktiske formål regne med, at der heller ikke vil dannes syre af de andre sukkerarter, fordi de første trin i næsten alle forgæringsprocesser er en omdannelse af udgangsmaterialet til glukose (undtagelser er visse oxidative syredannelsesprocesser, som vil blive kommenteret i afsnittet om oxidativ syredannelse). Heraf følger, at hvis ikke tidsfaktoren ved prøvebesvarelser vejede så tungt i al klinisk bakteriologi, ville det være rationelt og økonomisk at starte enhver undersøgelse med glukoseglasset alene. Som et kompromis har man valgt en forgæringsrække, der er tilstrækkelig omfattende til, at en definitiv diagnose som regel kan stilles på de hyppigst forekommende bakterier, og at supplere denne række med ekstra glas, så snart det står klart, at standardrækvens glas ikke vil være tilstrækkelige til at stille en endelig diagnose. Forskellige laboratorier her i landet anvender noget forskellige standardrækker bestemt af en kombination af hensyn til den diagnostiske sikkerhed og størrelsen af det disponible personale. Diagnoseafdelingens standardrække inkluderer for tiden følgende sukkerarter: arabinose (Ar), xylose (X), rhamnose (Rh), glukose (Gl), laktose (Lak), sakkarose (Sak), maltose (Ma), adonit (Ad), dulcit (Du), sorbit (So), inosit (It) og salicin (Sal). Det må betegnes som en lang standardrække, der er forholdsvis dyr i materiale og arbejdskraft, men til gengæld giver en god diagnostisk sikkerhed.

De supplerende forgæringsglas, som evt. senere føjes til standardrækken, er bestemt af resultaterne i denne første række og af de øvrige resultater, idet man udnytter sit kendskab til bestemte sukkerarters differentialdiagnostiske værdi, når de diagnostiske muligheder er indsnævret så meget, at valget står mellem ganske få diagnoser.

Da metodestabilitet altid er vigtig, og det gælder ikke mindst forgæringsprøver, skal der tungtejende grunde til at ændre en indarbejdet metode. Den metode, som i dag anvendes i de fleste danske laboratorier, er fastlagt i diagnoseafdelingen i 1930'erne af Martin Kristensen og Kauffmann og er ikke undergået principielle ændringer i mellemtiden. Omkring 1960 indførtes en række med Hugh & Leifson's O/F medium, som i særlige situationer træ-

der i stedet for forgæringsrækken. Denne række er omtalt i kapitel 20.

På grund af vækstkrav og andre forhold bruger man til forgæringsundersøgelse af visse bakteriegrupper andre substrater end diagnoseafdelingens standardforgæringsmedium. Det gælder bl.a. streptokokker, corynebakterier og *Neisseria* samt delvis stafylokokker.

#### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

*Diagnoseafdelingens standardmetode ved forgæringsundersøgelser i flydende medium*

##### *Substrat*

Kødeksstrakt Lab-Lemco (Oxoid)	0,5%
Pepton, Orthana	1,0%
NaCl	0,3%
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ,12 H <sub>2</sub> O	0,2%
Bromtymolblåt (1:500)	12 ml/liter

i demineraliseret ledningsvand.

pH reguleres ved tilsætning af 5 N NaOH, så den efter autoklavering er 7,4. Til denne sterile ekstraktbouillon tilsættes 0,5% af den ønskede sukkerart, og blandingen steriliseres ved 10 minutters kochning. Aftappes som en 5 cm høj søjle i smalle glas (155 x 10/11 mm).

##### *Udførelse*

For hver stamme, der skal undersøges, opstilles standardrækvens glas i et særligt stativ i en bestemt rækkefølge, dvs. den rækkefølge som er angivet i arbejdsbog eller på arbejdskort. Som regel er glukose- og mannitglasset indrettet som Durham-glas til påvisning af luftudvikling.

Tilsåning kan enten ske med en dråbe af en bouillonkultur eller kulturmasse fra en renkultur på agar- eller blodplade. Inoculum bør ikke være mere end 24 timer gammelt (gerne mindre) og bør ikke tages fra sukkerholdige medier. Dels risikerer man i så fald, at der kun er få levende bakterier, hvis reaktionen er blevet stærkt sur på grund af forgæring, dels risikerer man, at der kan være sket en adaption til forgæring af den bestemte sukkerart forkulturen indeholder.

Hvis man tager kultur fra en plade, er det simplest at bruge en lige platin-nål. Med nålen tages en synlig mængde kultur, og derefter inokuleres alle

rækvens glas med samme nål, idet den blot stikkes ned øverst i forgæringsmediet og straks trækkes op igen. Flambering af hvert enkelt glas før og efter tilsåningen er den bedste sikkerhed mod forurening og infektionsrisiko, men øvede laboranter kan undlade flambering, med mindre nålen kommer på afveje, dvs. berører prop eller glas. Ved tilsåningen af en række glas kan man af uopmærksomhed komme til at springe et glas over, idet man tilsår et andet glas to gange; for at undgå dette er det praktisk at rykke et tilsået glas et hul frem i stativet, så man hele tiden direkte kan se, hvor langt man er kommet. Glassene inkuberes ved 35°C.

#### *Aflæsning og fortolkning*

Glassene aflæses efter 24 og 48 timer, og hvis diagnosen ikke kan stilles efter 48 timer, fortsættes inkuberingen med aflæsning hver eller hveranden dag, enten indtil diagnosen er stillet eller indtil der er gået i alt 7 dage.

Aflæsningen skal foregå i dagslys og bedst mod en hvid baggrund; i elektrisk lys ser man ikke farvenuancerne så tydeligt.

Det første, man sikrer sig ved aflæsningen, er, at der er kommet vækst i glasset, dvs. man skal se, om substratet er uklart, før man ser på farven. Væksten kan ligge som et bundfald, der først bliver synligt efter oprystning. Hvis der i et enkelt glas i rækken ikke er synlig vækst, skyldes det sandsynligvis, at det ved en fejl ikke er blevet tilsået. Det er bl.a. for at undgå, at sådanne glas uden videre aflæses som syrenegative, at det er vigtigt først at konstatere, om der overhovedet er vækst i glasset.

*Luftudvikling* i Durham-glassene med glukose og mannit ses som regel tydeligt ved, at en større eller mindre del af det lille indvendige glas er fyldt med luft og evt. er bragt til at flyde op til overfladen. Ved svag luftudvikling dannes kun en lille luftblære i toppen af det indvendige glas, og da det ikke er ualmindeligt, at der i forvejen er en ganske lille luftblære, kan man komme i tvivl om, hvordan det observerede skal fortolkes. Man kan da sammenligne med andre glas uden luftudvikling eller bruge et utilsæt, men inkuberet Durham-glas som kontrol, men bedst er det at gentage undersøgelsen.

*Aflæsning af indikatorfarven* kan ske på forskellig måde. Det er ret almindeligt i arbejdsbogen at sætte et plus for de glas, som er gule, et plus i parentes for de glas, som er grøngule, og et minus ved de øvrige. Denne form for aflæsning er i virkeligheden en samtidig aflæsning og fortolkning og kan accepteres, når det drejer sig om hurtigt og kraftigt syredannende stammer som fx. *E. coli* og *Klebsiella*.

I andre tilfælde står man sig ved at benytte en kort talrække til at angive

de forskellige farvenuancer, som indikatoren viser, fx.:

- 0 = blå
- 1 = blågrøn
- 2 = grøn
- 3 = grøngul
- 4 = gul

og at notere det aktuelle tal i arbejdsbogen for den pågældende aflæsningsdag. Ud fra disse direkte aflæsninger kan man så senere afgøre, hvor man i det pågældende tilfælde vil sætte grænsen mellem syredannelse og ikke-syredannelse.

Ved stammer, der bedømt efter indikatorfarven kun viser svag eller sen syredannelse, står man nemlig i den vanskelige situation, at en samtidig alkalidannelse kan have neutraliseret så meget af syren, at indikatoren ikke viser fuldt omslag. Hvis man i et sådant tilfælde kun registrerer grøngule og gule glas som positive, forlanger man i virkeligheden, at syredannelsen for at registreres som positiv skal være så udtalt, at indikatoren slår helt eller næsten helt om, og det er ikke nødvendigvis den bedste måde af definere syredannelse på.

Her er altså tale om, at man selv kan vælge mellem et lavere og et højere følsomhedsniveau for syredannelsesprøven, afhængigt af hvilken gruppe bakterier man arbejder med. Sikrest er det at inkludere et tilsæt sukkerfrit kontrolglas med grundsubstratet, idet alle glas med farvenuancer, der har fået en højere talværdi end kontrolglasset, i virkeligheden repræsenterer glas med syredannelse.

I glas, hvor indikatoren har været slået helt om til gult, kan man på et senere tidspunkt se indikatoren øverst i glasset begynde at slå tilbage, dvs. igen blive mere grønlig eller grønblå. Det er udtryk for alkalidannelse på grund af oxidativ deaminering af aminosyrerne i peptonen, som fortrinsvis finder sted øverst i glasset, hvor iltmængden er størst. Dette tilbageslag i indikatorfarve ændrer ikke tolkningen; et glas, der én gang har været gult, skal altid tages som udtryk for, at syredannelse har fundet sted.

## 5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ingen særlige ud over de sædvanlige ved omgang med patogene bakterier.

## 6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

Delvis af pladshensyn og delvis fordi litteraturens forgæringsmønstre er baseret på vidt forskellige metoder har vi her udeladt den sædvanlige fortægnelse.

Diagnoseafdelingens diagnoseskemaer kan bruges, og i øvrigt henvises til litteraturen, specielt til monografiene fra CDC i Atlanta.

## 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Forgæringsrækvens enkelprøver har vidt forskellig værdi i forskellige situationer og må udledes af foreliggende forgæringsmønstre. Generelt set gælder, at forgæringsprøver er meget værdifulde i diagnostisk bakteriologi, når det drejer sig om anaerobe og fakultativt anaerobe bakterier.

## 8. Referencer

- Beyerinck, M.W.: Verfahren zum Nachweise der Säureabsonderung bei Mikroben. Cbl. Bakt. 9: 781, 1891.
- Brieger, L.: Ueber Spaltungsprodukte der Bacterien. I. Mitt. Z. physiol. Chemie 8: 306, 1884.
- Brieger, L.: Ueber Spaltungsprodukte der Bacterien. II. Mitt. Z. physiol. Chemie 9: 1, 1885.
- Bronfenbrenner, J. & Schlesinger, M.J.: The micro plate. A simple procedure for study of bacterial activity. J. med. Res. 39: 267, 1918a.
- Bronfenbrenner, J. & Schlesinger, M.J.: A rapid method for the identification of bacteria fermenting carbohydrates. Amer. J. publ. Hlth 8: 922, 1918b.
- Buchner, E.: Alkoholische Gährung ohne Hefezellen. Ber. dtsch. chem. Ges. 30: 117, 1897.
- Buchner, H.: Beiträge zur Kenntnis des Neapeler Cholerabacillus und einiger demselben nahe stehender Spaltpilze. Arch. Hyg. (Berl.) 3: 361, 1885.
- Capaldi, A. & Proskauer, B.: Beiträge zur Kenntnis der Säurebildung bei Typhusbacillen und Bacterium coli. Z. Hyg. Infekt.-Kr. 23: 452, 1896.
- Clark, W.M. & Lubs, H.A.: The colorimetric determination of hydrogen ion concentration and its applications in bacteriology. J. Bact. 2: 1, 109 & 191, 1917.
- Conn, H.J. & Hucker, G.J.: The use of agar slants in detecting fermentation. J. Bact. 5: 433, 1920.
- Davis, J.G. & Rogers, H.J.: The effect of sterilisation upon sugars. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 101: 102, 1939-40.
- Drigalski, K.W. v. & Conradi, H.: Ueber ein Verfahren zum Nachweis der Typhusbacillen, Z. Hyg. Infekt.-Kr. 39: 283, 1902.
- Durham, H.E.: A simple method for demonstrating the production of gas by bacteria. Brit. med. J. 1: 1387, 1898.
- Durham, H.E.: Some theoretical considerations upon the nature of agglutinins, together with further observations upon *Bacillus typhi abdominalis*, *Bacillus enteritidis*, *Bacillus coli communis*, *Bacillus lactis aerogenes*, and some other bacilli of allied character. J. exp. Med. 5: 354, 1900-01.

- Efstathiou, J.D. & McKay, L.L.: Plasmids in *Streptococcus lactis*: evidence that lactose metabolism and proteinase activity are plasmid linked. *Appl. environm. Microbiol.* 32: 38, 1976.
- Frankland, P.F., Stanley, A. & Frew, W.: Fermentations induced by the Pneumococcus of Friedländer. *J. chem. Soc.* 59: 253, 1891.
- Fulmer, E.I., Williams, A.L. & Werkman, C.H.: The effect of sterilization of media upon their growth promoting properties toward bacteria. *J. Bact.* 21: 299, 1931.
- Gibson, T. & Abdel-Malek, Y.: The formation of carbon dioxide by lactic acid bacteria and *Bacillus licheniformis* and a cultural method of detecting the process. *J. Dairy Res.* 14: 35, 1945.
- Grimbert, M.L.: Recherches sur le pneumobacille de Friedländer. I. Mem. Étude des fermentations provoquées par cet organisme. *Ann. Inst. Pasteur.* 9: 840, 1895.
- Grimbert, M.L.: Recherches sur le pneumobacille de Friedländer. II. Mem. *Ann. Inst. Pasteur.* 10: 708, 1896.
- Grünbaum, A.S. & Hume, E.H.: Note on media for distinguishing *B. coli*, *B. typhosus* and related species. *Brit. med. J.* 1: 1473, 1902.
- Hannan, J. & Weaver, R.H.: Quick microtechniques for the identification of cultures. II. Fermentations. *J. Lab. clin. Med.* 33: 1338, 1948.
- Hugh, R. & Leifson, E.: The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates. *J. Bact.* 66: 24, 1953.
- Jensen, C.O.: I. Om bakteriers variabilitet med hensyn til gæringsevne. *Biologisk Selskabs Forhandlinger i Vinter-Halvaaret 1897-98. Mødet den 12/11 1897.* København 1898.
- Jensen, C.O.: Forskellige grader af gæringsevne inden for samme bakteriegruppe (tyfuscoli-gruppen). *Biologisk Selskabs Forhandlinger i Vinter-Halvaaret 1897-98. Mødet den 31/3 1898.* København 1898.
- Kellogg, D.S. jr. & Turner, E.M.: Rapid fermentation confirmation of *Neisseria gonorrhoeae*. *Appl. Microbiol.* 25: 550, 1973.
- MacConkey, A.: Lactose-fermenting bacteria in faeces. *J. Hyg. (Lond.)* 5: 333, 1905.
- Manclark, C.R., Pickett, M.J. & Moore, H.B.: *Laboratory Manual for Medical Bacteriology*, 5th ed. Appleton Century Crofts Educational Division Meredith Corporation, New York, 1975.
- Mudge, C.S.: The effect of sterilization upon sugars in culture media. *J. Bact.* 2: 403, 1917.
- Orla-Jensen, A.D.: Hitherto unknown activators for the growth of lactic acid bacteria. *J. Soc. Chem. Ind.* 52: 374T, 1933.
- Pasteur, L.: Fermentations. Fermentations lactique, alcoolique, butyrique, etc. (1857-1863). (*Oeuvres de Pasteur, Tome II.* Masson et Cie, Paris 1922, p. 1).
- Peizer, L.R.: Identification of the gonococcus from cultures and the effect of certain animal sera on the fermentations of the gonococcus. *J. Bact.* 43: 733, 1942.
- Petruschky, J.: Bakterio-chemische Untersuchungen. *Cbl. Bakt.* 6: 625, 657, 1889.
- Petruschky, J.: Bakterio-chemische Untersuchungen. I. Die Farbenreaktion bakterieller Stoffwechselprodukte auf Lackmus als Beitrag zur Charakteristik und als Mittel zur Unterscheidung von Bakterienarten. *Cbl. Bakt.* 7: 1, 49, 1890.
- Prazmowski, A.: Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bacterien-Arten. Verlag von Hugo Voigt, Leipzig 1880.
- Salomonsen, C.J.: Studier over Blodets Forrådnelse. Disputats, G. Torsts Boghandel, København, 1877, p. 143.

- Schmid, K. & Schmitt, R.: Raffinose metabolism in *Escherichia coli* Kl2. Purification and properties of a new  $\alpha$ -galactosidase specified by a transmissible plasmid. *Europ. J. Biochem.* 67: 95, 1976.
- Smith, M. Llewellyn: The effect of heat on sugar solutions used for culture media. *Biochem. J.* 26: 1467, 1932.
- Smith, T.: Das Gährungskölbchen in der Bakteriologie. *Cbl. Bakt.* 7: 502, 1890.
- Smith, H.W. & Parsell, Z.: Transmissible substrate-utilizing ability in enterobacteria. *J. gen. Microbiol.* 87: 129, 1975.
- Sperber, W.H. & Swan, J.: Hot-loop test for the determination of carbon dioxide production from glucose by lactic acid bacteria. *Appl. Environm. Microbiol.* 31: 990, 1976.
- Vera, H.D.: Relation of peptones and other culture media ingredients to the accuracy of fermentation tests. *Amer. J. publ. Hlth.* 40: 1267, 1950.
- Young, E. & Udey, L.R.: Convenient system for multiple screening of microbial carbohydrate metabolism. *J. clin. Microbiol.* 4: 201, 1976.
- Young, H., Paterson, I.C. & McDonald, D.R.: Rapid carbohydrate utilization test for the identification of *Neisseria gonorrhoeae*. *Brit. J. vener. Dis.* 52: 172, 1976.

## *Kapitel 19*

### **Voges-Proskauers prøve**

Den såkaldte V-P prøve påviser tilstedeværelsen af acetoin og diacetyl i glukoseforgæringsglas, og med visse forbehold tages en positiv prøve som udtryk for, at der er foregået en butandiolforgæring.

#### **1. Historisk indledning**

I Robert Koch's "Institut für Infektionskrankheiten" i Berlin arbejdede Voges og Proskauer systematisk på at finde metoder til en gruppering af de mange bakterier i den nuværende familie *Enterobacteriaceae*. I 1898 (Voges & Proskauer 1898) observerede de efter at have sat kaliumhydroxyd (KOH) til deres rækker af forgæringsglas for at binde udviklet kuldioxyd ( $\text{CO}_2$ ), at glassene i en af rækkerne blev svagt røde, da der var gået 24 timer. Denne "Kalirotreaktion" har senere fået navnet Voges-Proskauer's prøve eller blot V-P reaktionen. Reaktionen viste sig at være karakteristisk for bestemte grupper af *Enterobacteriaceae* og kom i en periode sammen med indolreaktionen, metylrødtreaktionen og evnen til citratudnyttelse til at spille en vigtig rolle ved karakteristikken af disse bakterier, idet de grupperedes efter deres såkaldte "Imvic" mønster, hvor "I" står for indol, "m" for metylrødt, "v" for V-P og "ic" for citrat. Således var "Imvic" mønstret for *E. coli* + + - og for *Klebsiella* - - + +.

Harden (1906) viste, at V-P positive kulturer indeholdt acetoin og 2,3-butandiol, og at acetoinet ved KOH tilsætning omdannedes til diacetyl, som med en guanidingruppe stammende fra pepton i mediet gav anledning til den røde farve.

Prøven var i sin oprindelige form ikke særlig praktisk, fordi farven var svag og indtrådte sent, men i 1931 fandt O'Meara på at sætte creatin, som også indeholder guanidingrupper, til glasset før KOH tilsætning. Resultatet var en væsentlig hurtigere og noget kraftigere farvereaktion. Kort efter viste Barritt (1936), at man ved også at tilsætte  $\alpha$ -naftol fik en endnu kraftigere farve og en reaktion, som var 10-20 gange mere følsom end O'Meara's V-P prøve. Hvordan  $\alpha$ -naftolet virker ved man stadig ikke.

Smith, Gordon & Clark (1952) viste, at man ved at udelade bufferen i vækstmediet kunne få positive resultater med *Bacillus* arter, som var negative i det sædvanlige substrat med tilsat buffer. Garibaldi & Payne (1970) tog skridtet fuldt ud og indførte et mineralmedium, så også peptonets buffereffekt kunne undgås. Som venteligt viste det sig nødvendigt af hensyn til væksten at supplere mineralmediet med små mængder gærestrakt. Prøven angives i denne udformning at være meget følsom, måske så følsom at det gør den mindre anvendelig til differentiering; det nævnes således at enkelte *Salmonella*- og *Escherichia*-stammer fandtes positive.

En udformning som direkte enzymtest er forsøgt af flere: Pickett & Scott (1955), Barry & Feeney (1967) og Páčová og Kocur (1973). Sidstnævntes metode synes mest rationel. Kulturen dyrkes på glukoseholdigt medium og suspenderes i en 10% pyruvatopløsning med 0,2% creatin og 0,85% NaCl, men ingen fosfatbuffer. Efter 1 times forløb tilsættes  $\alpha$ -naftol og KOH, og 20 min. senere foretages aflæsningen. Det er en praktisk vanskelighed, at pyruvat er meget lidt stabilt i vandig oplosning; man har derfor forsøgt at bruge pyruvattabletter, der opløses umiddelbart før brugen i selve reaktionsglasset (Pickett & Scott 1955; Bülow, upubliceret).

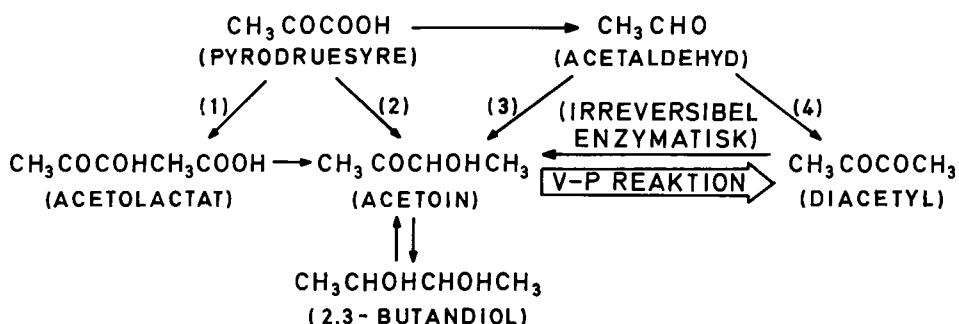
Helt nye muligheder foreligger for den, som råder over en gaskromatograf. Ifølge Lee & Drucker (1975) er der nu udarbejdet metoder til direkte påvisning af acetoin og diacetyl i kultursupermatanter ved hjælp af gaskromatografi.

Schubert (1964) og Schubert & Kexel (1964) har beskrevet en butandioldhydrogenase test, som intet har med V-P prøven at gøre, men som muligvis kunne have interesse hos bakterier, som udfører en butandiolforgæring.

## 2. Biokemisk baggrund

I det generelle afsnit om kulhydratomsætning (kap. 17) er det omtalt, at pyrodruesyre er intermediærprodukt ved alle forgæringer, og at den videre nedbrydning af pyrodruesyren kan foregå på mange måder førende til de forskellige hovedtyper af forgæringsprodukter. Ved den hovedtype af forgæring, som kaldes butandiolforgæring, er 2,3-butandiol (tidl. 2,3-butylen-glykol) hovedproduktet, men samtidig dannes mindre mængder af ætanol, mælkesyre, eddikesyre og myresyre. Der skal her mindes om, at der ved andre hovedtyper af forgæring samtidig med hovedproduktet kan dannes mindre mængder butandiol.

Omdannelsen af pyrodruesyre til butandiol kan ske på lidt forskellig måde hos forskellige bakterier; fire reaktionsveje (1-4) er vist i følgende skema.



regnet med muligheden af en direkte diacetyl dannelse; men nyere undersøgelser viser, at man i andre bakteriegrupper må regne med denne mulighed. Det medfører en mulighed for fejlfortolkning, idet man fra en positiv V-P reaktion ikke altid kan slutte, at der foreligger en butandiolforgæring. Forholdet rummer måske også en uudnyttet mulighed for at differentiere mellem forskellige biokemiske processer hos forskellige bakterier.

Størmer (1975) og Johansen, Bryn & Størmer (1975) har givet en detaljeret fremstilling af de biokemiske processers forløb under en butandiolforgæring af en kultur af *Enterobacter aerogenes* og oplysning om de involverede enzymer. Skematisk er reaktionsforløbet følgende:



Idet glukosen omdannes til pyrodruesyre, sker der et kraftigt fald i pH til omkring 5,8, og da dette er nærmest optimum for enzymerne  $E_1$  og  $E_2$  og reduktase-aktiviteten af  $E_3$ , vil hele processen hurtigt forløbe mod højre med ophobning af butandiol. Sidste del af processen kan med henblik på kulturens overleven betragtes som en hensigtsmæssig regulering, der forebygger at pH når så lave værdier, at væksten hæmmes eller går i stå, idet de neutrale produkter acetoin og butandiol erstatter de sure produkter acetolaktat og pyruvat. Når kulstofkilden (glukose) er opbrugt, begynder pH at stige, fordi der nu ikke længere dannes syrer. Når pH er steget til omkring 6,5, begynder  $E_3$ -enzymet at reoxidere butandiol til acetoin, som ender med at være det dominerende slutprodukt. Maximalt acetoinindhold fandtes i det konkrete forsøg 30 timer efter kulturens start. Johansen et al. (1975) angav, at der i sidste fase samtidig med stigningen i mængden af acetoin kunne påvises små mængder diacetyl, som må være dannet uden om reaktionsvej 1.

Enzymet  $E_1$  kaldes "det pH6 acetolaktat-dannende enzym". Det har et udtalt pH optimum ved 5,8; det induceres af acetat, som vil være til stede på grund af pyruvats samtidige omdannelse til acetat via acetyl-Co A; acetat virker desuden som aktivator af enzymet. Det kræver tilstedeværelse af Mn-joner og hæmmes af fenylypyruvat, glyoxylat samt  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Enzymet  $E_2$  er en  $\alpha$ -acetolaktatdecarboxylase. Det har pH optimum ved 6,2-6,4, men ved lavere pH sker der i systemet en ikke-enzymatisk decarboxylering. Også dette enzym reduceres af acetat.

Enzymet  $E_3$  kaldes diacetyl (acetoin) reduktase, fordi det har to virkninger. For det første kan det irreversibelt reducere diacetyl til acetoin, og for det andet kan det reversibelt reducere acetoin til butandiol. Enzymet reduceres som de to andre af acetat og samtidig kontrollerer acetat omsætningen mellem

acetoin og butandiol, idet acetat ved et pH omkring 5,8 eller lavere hæmmer omdannelsen af butandiol til acetoin, således at procesforløbet bliver fra acetoin til butandiol.

Det fremgår heraf, at et passende lavt pH (ca. 5,8) og tilstedevarelsen af acetat er de vigtigste forudsætninger for pyruvatets omdannelse til butandiol.

Det nødvendige pH fald kan udeblive, hvis vækstmediet er for stærkt bufferet, men omvendt rummer fuldstændig mangel på buffer en risiko for en så stærkt sur reaktion i kulturen, at væksten hæmmes eller går i stå.

Den for V-P prøven vigtige reversion af sidste del af procesforløbet (butandiol → acetoin) forudsætter, at pH stiger igen. Det vil automatisk ske på et passende tidspunkt, hvis glukosemængden holdes så lav, at hele mængden er omdannet til pyruvat i løbet af 18-24 timer. Det viser, at en stor glukosemængde i mediet vil udskyde det tidspunkt, hvor en positiv V-P reaktion kan påvises. Når glukosen er opbrugt, vil der på den anden side forelægge den mulighed, at bakterierne begynder at udnytte acetoin og butandiol som kulstof- og energikilde for deres videre vækst (Paine 1927). Dels kan disse produkter omsættes til acetat via en cyklisk reaktionskæde (Juni & Heym 1956a, b, 1957), dels kan acetoin oxidativt spaltes til to molekyler acetaldehyd (Lopez et al. 1975).

Evne til denne udnyttelse har øjensynlig mange bakterier, inklusive arter af *Enterobacteriaceae* og *Bacillus*. Følgen kan blive, at en V-P positiv kultur ved fortsat inkubation bliver V-P negativ. For enhver kultur i et bestemt medium er der med andre ord et ganske bestemt tidspunkt, som er optimalt for prøvens udførelse, men desværre kan der ikke gives pålidelige generelle regler for hvornår dette tidspunkt indtræffer.

Johansen et al.'s (1975) undersøgelser synes at vise, at acetoin og butandiol har særlig betydning for bakterierne under delvis anaerob vækst; der skulle således ikke være grund til at fremme iltningen af V-P kulturer under væksten fx. ved at lægge glassene horizontalt, således som man tidligere har ment.

### 3. Valg af metode

De seneste års fremskridt i retning af mere følsomme V-P prøver og muligheden for at anvende gaskromatografisk analyse af fermentationsprodukter er endnu ikke udnyttet i de fleste klinisk bakteriologiske laboratorier her i landet. Diagnoseafdelingen har i mange år kun anvendt O'Meara's V-P prøve, men har haft to standardsubstrater, det ene med buffer, det andet uden buffer. Bülow har forsøgsvis anvendt en direkte enzymtest med pyruvat som substrat (upubliceret). I det følgende beskrives kun O'Meara's V-P prøve.

#### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

##### *O'Meara's V-P prøve*

##### *Standardsubstrat*

Pepton 0,5%

Glukose 0,5% (tilsat efter autoklavering i steril filtreret form)

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5%

Før autoklaveringen indstilles pH til 7,6.

Aftappes i ca. 2 cm høje lag i almindelige reagensglas (155 x 14/15 mm)

Hvis V-P prøven skal udføres på en stamme, som formodes at være en *Bacillus* eller en *Listeria*, anvendes et substrat hvor K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> er erstattet af samme mængde NaCl.

##### *Reagenser*

a) Creatin (ikke creatinin) i substans

b) 40% kaliumhydroxyd

##### *Udførelse*

V-P mediet inoculeres til synlig turbiditet fra renkultur på plade. Inkubering sker rutinemæssigt ved 30°C. Optimum-temperatur er forskellig for forskellige stammer, fx. så lav som 22°C for *Hafnia* og *Yersinia*; derfor vælger man som et kompromis 30° til en ukendt stamme, men man kan blive tvunget til at gentage undersøgelsen ved lavere eller højere temperatur, hvis man vil have alle positive med.

Det optimale tidspunkt for udførelse af reaktionen er for de fleste stammer mellem 24 og 48 timer, men både en kortere og en længere inkubationstid kan være nødvendig for at få en positiv reaktion frem. Som standardmetode kan anbefales at udføre reaktionen efter fulde 24 timer, hvis der er anvendt et stort inoculum, og ellers efter ca. 48 timer. Hvis en forventet positiv reaktion udebliver, kan man tilså 3 glas og udføre reaktionen efter ca. 18 timer og på 4. og 6. dag.

Prøven udføres ved at man først tilsætter lidt creatin i substans; mængden er ikke kritisk, man plejer at angive en knivspids (10–25 mg). Creatinet opløses i kulturen ved at ryste glasset lidt. Derefter tilsættes KOH i en mængde, der svarer til  $\frac{2}{3}$  af kulturens volumen, og da dette i standardglassene er ca.

2 ml, skal der normalt tilsettes ca. 1,3 ml KOH. Mængden bør ikke være større, mens en noget lavere mængde er uden betydning for reaktionen. Derefter stoppes vatpropnen godt ned i glassets øverste del, og med tommelfingeren for enden af det tilstoppede glas rystes det så kraftigt, at størstedelen af væsken omdannes til skum. Dette sker af hensyn til iltningen af acetoin til diacetyl og er et meget vigtigt led i reaktionens udførelse. Det skummende glas lægges næsten vandret på bordet på et stykke hvidt papir.

### Aflæsning

En positiv reaktion består i, at hele kulturen antager en lys rød farve, som i små mængder kan være vanskelig at se. Derfor er en hvid baggrund og sammenligning med et sikkert negativt glas en god hjælp ved aflæsningen. Selv den svageste røde farve vurderes som en positiv reaktion. KOH tilsetningen giver nogle kulturer et gulligt skær, der ikke må opfattes som en positiv reaktion. Kraftige reaktioner indtræder i løbet af få minutter, men svage reaktioner udvikles langsommere, og det er reglen at glassene skal observeres i mindst 20 minutter, før en negativ reaktion kan konstateres.

### Fortolkning

Enhver rød farve kan tages som udtryk for, at der er dannet acetoin eller diacetyl i kulturen. En sikker afgørelse af, om dette er ensbetydende med at bakterien udfører en butanolforgæring, er dog ikke mulig i det enkelte tilfælde, men gælder sandsynligvis for de fleste *Enterobacteriaceae*.

## 5. Sikkerhedsforanstaltninger

Man skal være opmærksom på, at 40% KOH er stærkt ætsende, ellers ingen særlige.

## 6. Fortegnelse over de vigtigste V-P positive bakterier

Alle de anførte bakterier er fakultative eller strikt anaerobe. Strikt aerobe bakterier kan ikke udføre en butanolforgæring, men nogle af dem kan med butanol som C-kilde danne acetoin som intermediet nedbrydningsprodukt. Dette har dog ingen større praktisk betydning, da man normalt ikke vil udføre V-P prøve på en sådan kultur. Se dog det tidligere anførte om Schuberts butanoldehydrogenase test (Schubert & Kexel 1964).

*Klebsiella*, dog ikke *K. ozoena* og *K. rhinoscleromatis*

*Enterobacter*: de fleste stammer

*Hafnia*: de fleste stammer ved lav temperatur

*Serratia*: flertallet; de V-P negative undertiden udskilt som *S. kielensis*

*Proteus*: *P. mirabilis* og *P. vulgaris*: nogle stammer ved lav temperatur

*Yersinia enterocolitica*: nogle stammer ved lav temperatur

*Erwinia*: de fleste species af de 3 hovedgrupper

*Vibrio*: de fleste stammer i de fleste species

*Aeromonas*: *A. hydrophila*: flertallet; *A. formicans (punctata)*: undtagelsesvis

*Photobacterium*: de fleste stammer

*Bacteroides*: enkelte species og enkelte stammer i andre species

*Fusobacterium*: enkelte species og enkelte stammer i andre species

*Bacterionema*: næsten alle stammer

*Staphylococcus*: nogle biotyper i alle species

*Streptococcus*: en del species og nogle stammer fra andre species

*Bacillus*: 8-9 af de hyppige species

*Clostridium*: 67 species

*Listeria*: 3 species

*Propionibacterium*: enkelte stammer

*Eubacterium*: nogle stammer i nogle species

*Rothia*: nogle stammer

## 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Der er 4 hovedgrupper af bakterier, indenfor hvilke man især har nytte af V-P prøver i differentieringen: *Enterobacteriaceae*, *Aeromonas*, *Staphylococcus* og *Bacillus*.

Kort sammenfattet kan man udtrykke V-P prøvens værdi inden for *Enterobacteriaceae* ved at sige, at den deler denne store gruppe bakterier i 2 lige store halvdeler svarende til de 2 hovedforgæringsstyper, "mixed acid" forgæring og 2,3-butandiol-forgæring. Den V-P positive halvdel omfatter *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia* og *Serratia*, og den V-P negative halvdel omfatter *Escherichia*, *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella* og *Shigella*. Hertil må føjes, at i de 3 genera, *Proteus*, *Yersinia* og *Erwinia*, findes en blanding af V-P positive og V-P negative bakterier.

Blandt de mere velkarakteriserede arter i slægten *Bacillus* er ca.  $\frac{1}{3}$  V-P positive, og egenskaben er værdifuld ved species-differentiering.

Som hovedregel er stafylokokker V-P positive, men en enkelt biotype i arten *Staphylococcus epidermidis* er karakteriseret ved at være V-P negativ.

Af de 2 species i slægten *Aeromonas*, som træffes i klinisk-bakteriologiske laboratorier, er *A. punctata* (tidl. *A. formicans*) altid V-P negativ, mens den hyppigste art, *A. hydrophila* er V-P positive, men V-P negative biotyper forekommer.

*Vibrio alginolyticus* er V-P positiv og *V. parahaemolyticus* negativ.

I slægten *Streptococcus* er V-P prøven værdifuld til at skelne *S. milleri* og *S. mutans*, som er V-P positive, fra *S. mitior* og *S. sanguis*, som er V-P negative. I streptokokafdelingen udføres V-P prøver efter Barrit's modifikation.

De 3 sikre species af slægten *Listeria* er alle V-P positive, men arten *L. denitrificans*, der dog næppe er en *Listeria*, er V-P negativ.

## 8. Referencer

- Barritt, M.M.: The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of  $\alpha$ -naph-tol. J. Path. 42: 441, 1936.
- Barry, A.L. & Feeney, K.L.: Two quick methods for Voges-Proskauer test. Appl. Microbiol. 15: 1138, 1967.
- Collins, E.B. & Speckman, R.A.: Evidence for cellular control in the synthesis of acetoin or  $\alpha$ -ketoisovaleric acid by microorganisms. Can. J. Microbiol. 20: 805, 1974.
- Garibaldi, J.A. & Payne, H.G.: Production of acetoin and diacetyl by the genus *Salmonella*. Appl. Microbiol. 20: 855, 1970.
- Harden, A.: On Voges and Proskauer's reaction for certain bacteria. Proc. roy. Soc. B (London), 77: 424, 1905-06.
- Johansen, L., Bryn, K. & Størmer, F.C.: Physiological and biochemical role of the butanediol pathway in *Aerobacter* (*Enterobacter*) *aerogenes*. J. Bact. 123: 1124, 1975.
- Juni, E. & Heym, G.A.: A cyclic pathway for the bacterial dissimilation of 2,3-butanediol, acetyl methyl carbinol, and diacetyl. I. General aspects of the 2,3-butanediol cycle. J. Bact. 71: 425, 1956a.
- Juni, E. & Heym, G.A.: A cyclic pathway for the bacterial dissimilation of 2,3-butanediol, acetyl methyl carbinol, and diacetyl. II. The synthesis of diacetyl methyl carbinol from diacetyl, a new diphosphothiamin catalyzed reaction. J. Bact. 72: 746, 1956b.
- Juni, E. & Heym, G.A.: A cyclic pathway for the bacterial dissimilation of 2,3-butanediol, acetyl methyl carbinol, and diacetyl. III. A comparative study of 2,3-butanediol dehydrogenases from various microorganisms. J. Bact. 74: 757, 1957.
- Lee, S.M. & Drucker, D.B.: Analysis of acetoin and diacetyl in bacterial culture supernatants by gas-liquid chromatography. J. clin. Microbiol. 2: 162, 1975.
- Lopez, J.M., Thoms, B. & Rehbein, H.: Acetoin degradation in *Bacillus subtilis* by direct oxidative cleavage. Eur. J. Biochem. 57: 425, 1975.
- Mahler, H.R. & Cordes, E.H.: Biological Chemistry. Harper and Row, 1966, p. 436.
- O'Meara, R.A.Q.: A simple delicate and rapid method of detecting the formation of acetyl-methylcarbinol by bacteria fermenting carbohydrate. J. Path. Bact. 34: 401, 1931.
- Páčová, Z. & Kocur, M.: A rapid microtest for the detection of acetoin. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. A 223: 106, 1973.

- Paine, F.S.: The destruction of acetyl-methyl-carbinol by members of the colon-aerogenes group. *J. Bact.* 13: 269, 1927.
- Pickett, M.J. & Scott, M.L.: A medium for rapid VP tests. *Bact. Proc.* 1955, p. 110.
- Schubert, R.H.W.: Zur Taxonomie der Voges-Proskauer-negativen "hydrophila-ähnlichen" Aeromonaden. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 193: 482, 1964.
- Schubert, R.H.W. & Kexel, G.: Der Ausfall der Butanoldehydrogenase-Reaktion bei einigen Pseudomonadaceen und Vibrionen. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 194: 130, 1964.
- Smith, N., Gordon, R.E. & Clark, F.E.: Aerobic sporeforming bacteria. U.S. Dept. of Agriculture, Agriculture Monograph No. 16, 1952, p. 8.
- Speckman, R.A. & Collins, E.B.: Diacetyl biosynthesis in *Streptococcus diacetilactis* and *Leuconostoc citrovorum*. *J. Bact.* 95: 174, 1968.
- Størmer, F.C.: 2,3-butanediol biosynthetic system in *Aerobacter aerogenes*. In: Wood, W.A. (Ed.): Methods in Enzymology, vol. 41. Carbohydrate Metabolism, part B. Acad. Press, New York, 1975, p. 518.
- Voges, O. & Proskauer, B.: Beitrag zur Ernährungsphysiologie und zur Differentialdiagnose der Bakterien der hämorrhagischen Septicämie. *Z. Hyg. Infekt.-Kr.* 28: 20, 1898.

## *Kapitel 20*

# **Prøver for oxidativ syredannelse (Hugh & Leifson's medium)**

Prøver der viser, om der af glukose og andre kulhydrater kan dannes syre fremkaldt ved at kulhydratet oxideres af luftens ilt.

### **1. Historisk indledning**

Det ældste kendte eksempel på en oxidativ syredannelse er sandsynligvis dannelsen af eddikesyre ud fra ætylalkohol. Processen må have været iagttaget lige så længe, som man har fremstillet alkoholiske drikke ved gæring. Det videnskabelige studium af eddikesyregæring, som det længe kaldtes, skønt det er en oxidativ proces, begyndte tidligt i 1800-tallet, da eddikesyre allerede var et betydningsfuldt industrielt produkt. Det vigtigste bidrag er Pasteur's "Memoire sur la fermentation acétique" fra 1864. Heraf fremgår det, at omdannelsen skyldtes levende organismer, eddikesyrebakterier (*Actobacter* og *Acetomonas*), og ud fra kendskab til bakteriernes livsbetingelser var det muligt for Pasteur at hjælpe eddikesyreproducenterne i Frankrig til en mere rationel fremstillingsproces, ligesom han senere hjalp vinfabrikanterne og ølbryggerne.

Oxidativ syredannelse var ellers ikke et problem, som i særlig grad havde biokemikernes bevægenhed; de var i langt højere grad optaget af at klarlægge mekanismen ved fermentativ syredannelse. Der var dog enkelte, som tidligt beskæftigede sig med evnen til oxidativ syredannelse hos andre bakterier end eddikesyrebakterierne. Det gjaldt således Alsberg (1911), som viste, at en pseudomonade kunne danne glukonsyre af glukose; Sears & Gourley (1928), som viste, at *P. aeruginosa* kunne danne syre af pentoser ved en aerob proces og Pervozvanskii (1939), som undersøgte fluorescerende bakteriers evne til at oxidere kulhydrater, bl.a. glukose til glukonsyre.

Fra omkring 1940 afspejler litteraturen en stigende interesse for oxidativ syredannelse. Lockwood et al. (1941), Lockwood & Nelson (1946), Lockwood & Stodola (1946) og Stodola & Lockwood (1947) viste, at forskellige pseudomonader var i stand til af kulhydrater at danne de tilsvarende aldonsyrer, og Stanier (1947) viste, at *P. fluorescens* kunne danne eddikesyre af ætylalkohol ganske ligesom eddikesyrebakterier. På samme linie lå Sebek & Randles' (1952) påvisning af, at også pseudomonader kan oxidere polyalkoholer til de homologe sukkerarter.

Af stor biokemisk interesse var påvisningen af, at disse omdannelser skete uden forudgående fosforylering af substratmolekylerne, da det dermed stod klart, at der var tale om andre processer end dem, som indleder den fermentative syredannelse, hvor fosforyleringen er et obligat led i omdannelsen (Norris & Campbell 1949; Barker & Lipmann 1949; Stokes & Campbell 1951; Sebek & Randles 1952; Wood & Schwerdt 1953).

En sammenligning mellem kulhydratstofskiftet hos eddikesyrebakterier og pseudomonader er givet i en oversigtsartikel af de Ley (1960).

Det er Hugh & Leifson's (1953) fortjeneste at have gjort opmærksom på den diagnostiske gevinst, der ligger i at skelne mellem fermentativ og oxidativ syredannelse, og at have angivet en metode, som nemt tillader denne adskillelse. I historisk sammenhæng er det interessant at bemærke, at Conn & Hucker (1920) ved at anbefale brug af en skrå-agar til syrepåvisning fremfor et flydende medium allerede var opmærksomme på nogle af de fordele, som Hugh & Leifson's halvflydende agarmedium har, især det forhold at syren for en tid holdes fikseret på dannelsesstedet, så der kan skelnes mellem, om syredannelsen begynder i klumpen (fermentativt) eller i den flade del (oxidativt) af substratet.

## 2. Biokemisk baggrund

Monosakkarider kan omdannes til syre enten ved at aldehydgruppen ( $\text{CHO}$ ) iltes til en carboxylgruppe ( $\text{COOH}$ ) – i dette tilfælde taler man om aldonsyrer – eller ved at den primære alkoholgruppe ( $\text{CHOH}$ ) iltes til en carboxylgruppe ( $\text{COOH}$ ), hvorved man får uronsyrer. I begge tilfælde er der en lakton som intermediærprodukt. Strikt aerobe bakterier som fx. eddikesyrebakterier og pseudomonader har enzymer (dehydrogenaser), som direkte kan udføre disse omdannelser, og resultatet er en række forskellige syrer med en struktur svarende til udgangsmaterialets, bortset fra syregrupperne. Af aldonsyrer forekommer bl.a. arabonsyre, xylonsyre, glukonsyre, mannonsyre, laktobionsyre, maltobionsyre, melibionsyre og cellobionsyre. Af uronsyrer kan nævnes glukuronosyre, galakturonosyre og manuronosyre. Det ser ud til, at dehydrogenaserne er mere eller mindre substratspecifikke. Et eksempel på en meget uspecifik dehydrogenase findes i *Acinetobacter*, der oxidativt danner syre af alle aldoser, således at brugen af en lang sukkerrække ikke giver flere oplysninger end glukoseglasset alene. Blandt pseudomonaderne synes dehydrogenaserne at være mere specifikke, så syremønstret kan benyttes i differen-

tieringen af de forskellige arter. Visse af disse dehydrogenaser er adaptive enzymer.

Nogle af de strikt aerobe bakterier har også enzymer, som omdanner primære alkoholer til monosakkarider, fx. kan *P. fluorescens* omdanne manitol og sorbitol til fruktose, der efter yderligere omdannelse til glukose oxideres til glukonsyre, og dette evt. videre til 2-ketoglukonsyre, som enten akkumuleres eller metaboliseres videre (Sebek & Randles 1952).

På denne måde vil man derfor også med alkoholer som substrat kunne få oxidativ syredannelse. At det samme er tilfældet med disakkarker, trisakkarker og polysakkarker, skyldes naturligvis, at mange bakterier har glykosidaser, som hydrolyserer dem til monosakkarker, der derefter oxideres som beskrevet.

Umiddelbart synes oxidativ syredannelse at måtte betegnes som incidentelle enzymatiske reaktioner, forstået som reaktioner der hverken fører til energiproduktion eller assimilation af substratbestanddele, men i nogle tilfælde kan de dannede syrer før eller senere kanaliseres ind i andre reaktionskæder og derefter udnyttes i cellestofskiftet. Da således syreophobningen ved oxidativ syredannelse ikke altid er permanent som den er ved fermentativ syredannelse, vil det kunne ske, at et surt indikatoromslag forsvinder igen.

Princippet i anvendelse af Hugh & Leifson's O/F medier er den samtidige anvendelse af to glas, det ene ”åbent”, dvs. med substratoverfladen i direkte kontakt med den omgivende atmosfæres ilt, det andet ”lukket”, dvs. dækket af et lag smeltet paraffin eller andet materiale, som danner en barriere mellem substratoverfladen og luftens ilt. I det lukkede glas vil der kun kunne foregå anaerobe processer – i hvert fald så snart den smule ilt der findes i substratet er opbrugt – og det vil sige, at kun fermentativ, men ikke oxidativ syredannelse vil kunne forekomme. I det åbne glas derimod vil der kunne foregå både aerobe og anaerobe processer, idet man kan regne med, at iltdiffusionen gennem substratsøjlen er så langsom, at der nedadtil i glasset hurtigt vil være så lav en iltkoncentration, at forholdene til praktiske formål kan betegnes som anaerobe, mens ilttilførslen i substratets øverste lag er så rigelig, at alle aerobe processer vil kunne foregå her. Naturligvis forudsætter denne differentiering, at substratsøjlen er tilstrækkelig høj. I det åbne glas vil man altså kunne se både fermentativ og oxidativ syredannelse, men de vil i begyndelsen kunne skelnes ved at fermentativ syredannelse viser sig som et indikatoromslag begrænset til substratets nederste del og oxidativ syredannelse som et indikatoromslag begrænset til substratets øverste del. Denne topografisk forskellige lokalisering af indikatoromslaget er også betinget af, at i det halvflydende medium vil dannet syre kun langsomt diffundere væk fra dannelsesstedet, mens syren i et flydende substrat hurtigt vil blive fordelt

i hele substratsøjlen på grund af konvektionsstrømme. Lokaliseringen af syredannelsen betyder desuden, at den koncentration som giver indikatoromslag nås hurtigere, end hvis syremængden var fordelt i hele glasset. Ved at holde peptonkoncentrationen så lavt som på 0,1% opnåede Hugh & Leifson, at basedannelsen som følge af oxidativ deaminering af aminosyrer i toppen af det åbne glas er forholdsvis ringe, hvorved neutralisering af den dannede syre så vidt muligt undgås. Andre (Otto & Pickett 1976) har med tilsyneladende held brugt en så lav peptonkoncentration som 0,02%. I Hugh & Leifson's medier er sukkerkoncentrationen 1%, mens Otto & Pickett anbefaler 2%. Til påvisning af oxidativ syredannelse fra laktose med *Acinetobacter* har det været anbefalet at bruge helt op til 5% og 10% laktose. Baggrunden herfor må enten være, at man forventer permeabilitetsvanskeligheder (Cook & Fewson 1973), eller at der generelt er en større tendens til syreophobning, når sukkerkoncentrationen er høj (Stanier et al. 1963). Der er altså noget, som tyder på, at pepton- og kulhydratkonzentrationen i Hugh & Leifson's åbne glas, som vi bruger det, med fordel kunne reguleres til et henholdsvis lavere og højere niveau.

### 3. Valg af metode

Den mest aktuelle overvejelse er, om man strengt skal holde sig til Hugh & Leifson's to glas, eller om man kan opnå de samme resultater ved alene at bruge det åbne glas. Fordelen ved kun at bruge eet glas er indlysende både økonomisk og tidsmæssigt, og fordelen ved det lukkede glas er jo ofte kun en bekræftelse på, hvad der er observeret i det åbne. I litteraturen har der været stillet forslag om at nøjes med det åbne glas (Porres & Stanyon 1973; Brown 1974), men de udførte sammenligninger, der af forfatterne selv tages til indtægt for deres forslag, besvarer ikke alle spørgsmål tilfredsstillende.

Vi har i diagnoseafdelingen fulgt den praksis at lade væksten i et glas med halvflydende bouillonagar uden sukker bestemme, hvilke sukkerglas der skal anvendes, således at fakultativt anaerobe bakterier udsås i det flydende forgæringsmedium og strikt aerobic i Hugh & Leifson's åbne glas. Efter en sortering på denne måde synes der ikke at være tvivl om, at man til de strikt aerobic kan nøjes med det åbne Hugh & Leifson glas. Da en sådan fremgangsmåde imidlertid sinker udsåningen i sukkerrækkerne 1 døgn, er det et nærliggende spørgsmål, om man ikke uden forudgående sortering kunne nøjes med at udså alle stammer i en række af åbne Hugh & Leifson glas. Men her er det vores erfaring, at en del fakultativt anaerobe bakterier giver uklare resultater. Det skyldes, dels at syredannelsen i nogle tilfælde sker så hurtigt og er så stærk, at man ved den sædvanlige aflæsning dagen efter har indikatoromslag

i hele søjlen, hvilket i hvert fald teoretisk udelukker en skelnen mellem fermentativ og oxidativ syredannelse, dels at man øjensynlig med nogle stammer får fermentativ syredannelse i nogle sukkerarter og oxidativ syredannelse i andre. Dette sidste er et interessant problem, som fortjener nærmere undersøgelse, men indtil det er sket, vil vi fraråde at nøjes med Hugh & Leifson's åbne glas som eneste substrat til al påvisning af syredannelse, således som Otto & Pickett (1976) anbefaler.

#### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

*Hugh & Leifson's metode i den udformning der anvendes på Seruminstittuttet Substrat*

Pepton Orthana	0,19%
NaCl	0,48%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,03%
Bromthymolblåt (1:500)	11,5 ml/l
Sukkerart	1,0%
Agar	0,36%

i demineraliseret ledningsvand.

pH indstilles med NaOH til 7,2 og er efter autoklaveringen 6,9.

Samme substrat uden sukker anvendes som kontrol.

Substratet aftappes i reagensglas (155 x 14/15 mm) i 4,5 cm høje lag med paraffineret vatprop. Substratafdelingen aftapper kun "åbne" glas. Hvis der er brug for "lukkede" glas, kan man rekvirere steril paraffinolie og med Pasteur-pipette anbringe et 2-3 cm højt olielag over substratsøjlen.

#### *Udførelse*

Som inoculum anvendes bakteriemasse fra en ikke over 24 timer gammel renkultur på et sukkerfrit plademedium. Tilsåning sker med rigelig kulturmasse på en lang, lige platinnål, der stikkes ned midt i søjlen lige til glasses bund og trækkes lige op igen. Flere glas kan tilsås i serie, men som regel er det nødvendigt at tage mere kultur på nålen nogle gange for at komme hele rækken igennem. Inkuberingen sker i termostat ved 30 eller 35°C; resultaterne på Seruminstittutts diagnoseskema for pseudomonader er efter inkubering ved 30°C.

*Aflæsning*

Glassene aflæses første og andet døgn efter inokuleringen, og glas uden syredannelse observeres yderligere 5 dage, medmindre diagnosen allerede er stillet. Før aflæsning af indikatoromslaget sikrer man sig, at der er kommet vækst visende sig som en vækstskive øverst i glasset, når det drejer sig om strikt aerobe bakterier, og som synlig vækst langs hele inokulationsstikket, hvis det er en fakultativ anaerob bakterie.

Ved aflæsning af de sukkerholdige glas bør man altid sammenligne med kontrolglasset uden sukker.

Ved aflæsning af indikatoromslaget bemærkes to forhold: 1) ændring i indikatorfarven og 2) om ændringen er sket opadtil eller nedadtil i substratsøjlen. Indikatorfarven bør angives ved hjælp af samme talskala, som er omtalt under forgæringsprøver, dvs.:

blå	= 0
grønblå	= 1 = uændret
grøn	= 2
grøngul	= 3
gul	= 4

Med strikt aerobe bakterier er der i begyndelsen kun farveændring af et få millimeter tykt lag øverst i glasset, men det er farven i denne smalle zone, det drejer sig om at fastslå. Med fakultativt anaerobe bakterier får man et farveomslag, som begynder nederst i glasset, men som regel er det her en større del af søjlen, der viser omslag, ofte  $\frac{1}{3}$  eller  $\frac{1}{2}$  af søjlets højde. Det skyldes, at de syrer der dannes fermentativt er stærkere syrer end dem, der dannes oxidativt. Ved fermentativ syredannelse bør prøven laves om i flydende forgæringssubstrat. Hvis der er indikatoromslag øverst i glasset, angives det med signaturen "ox" (= oxidativ); findes omslaget kun nederst i glasset, bruges signaturen "f" eller "ferm" (= fermentativ), og efter signaturen angives det tal, som svarer til indikatorfarven i det pågældende område. Hvis syredannelsens lokalisering er ens i alle glas, er det tilstrækkeligt at benytte signaturene "ox" og "f" ud for glukoseglasset. Hvis der i samme glas er syre både foroven og forneden, eller hvis der er forskel i lokaliseringen afhængig af sukkerarten i glasset, må dette beskrives i arbejdsbogen.

Ved fortsat inkubering og dermed følgende fortsat syredannelse vil området med ændret indikatorfarve tiltage i udstrækning og kan ved oxidativ syredannelse komme til at omfatte glassesets øverste fjerdedel eller mere, og ved fermentativ syredannelse hele glasset. Nedadtil eller opadtil vil farveom-

slaget som regel ikke være skarpt afgrænset, dvs. flere af indikatorskalaens styrketrin vil være repræsenteret, men ved aflæsningen angiver man altid det maximale omslag. Hvis fx. både styrke 2, 3 og 4 kan ses inden for omslagszonen, skal omslaget angives som værende af styrke 4.

I et Hugh & Leifson glas, som er blevet gult i hele sjølen, kan man ikke længere afgøre, om syredannelsen har været oxidativ eller fermentativ – denne afgørelse afhænger af, hvordan glasset så ud på et tidligere tidspunkt, og derfor er en præcis beskrivelse af de tidlige stadier absolut nødvendig.

Med strikt aerobe bakterier, som øverst i glasset danner ammoniak af det tilstedeværende pepton, vil den første ændring i indikatoren ofte være et forbigående omslag til blåt, inden syredannelsen gør sig gældende. Dette bør registreres, men har ikke større betydning ved den endelige vurdering.

#### *Fortolkning*

Hvis der er indikatoromsdag begrænset til det øverste lag i et åbent Hugh & Leifson glas med en bestemt sukkerart, og hvis farven er gul eller grøngul, vil man umiddelbart fortolke dette som udtryk for, at bakterierne har evne til oxidativ syredannelse ud fra den pågældende sukkerart.

Da indikatoren vil adsorberes til cellernes sure overflade, kan man under tiden iagttage gulfarvning af cellelaget alene, uden omslag i den cellefri del af substratsjølen. Et så begrænset omslag regnes ikke som positivt. Ligeledes må man undgå at registrere gult pigmenterede kulturer som positive.

Ofte er strikt aerobe bakterier svage syredannere, og det kan medføre, når der samtidig dannes ammoniak, at indikatoren slet ikke slår om eller kun viser omslag af styrke 2. Da kontrolglasset uden sukker i et sådant tilfælde efterhånden bliver helt blåt opadtil, betyder det, at også sukkerglas med indikatorfarve 1 og 2 er udtryk for oxidativ syredannelse. Dette udnyttes bl.a. ved undersøgelse af *Agrobacterium*, hvor alle sukkerholdige glas, der ikke er dybtblå i toppen efter 5 døgns forløb, registreres som positive.

#### **5. Sikkerhedsforanstaltninger**

Ingen særlige ud over de for alt arbejde med patogene bakterier gældende.

#### **6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med oxidativ syredannelse**

Oxidativ syredannelse forekommer helt dominerende hos strikt aerobe bakterier, og man kan i øjeblikket ikke sige noget sikkert om, blandt hvilke facultativt anaerobe bakterier man kan vente at træffe denne egenskab, eller med hvilken hyppighed den optræder. En gyldig fortegnelse kan derfor ikke

laves. De grupper af strikt aerobe bakterier i det klinisk-bakteriologiske laboratorium, hvor oxidativ syredannelse med sikkerhed vides at forekomme, er:

*Pseudomonas*: visse species

*Agrobacterium*

*Cytophaga*

*Acinetobacter*: visse biotyper

Desuden bør stammer med den foreløbige diagnose *Alcaligenes*, *Moraxella* og *Flavobacterium* undersøges i en Hugh & Leifson række.

## 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Hvor syredannelsen er veludtalt, er prøven værdifuld, fordi den bidrager til artsdifferentieringen af strikt aerobe gramnegative stave på samme måde, som den fermentative syredannelse bidrager til artsdifferentiering blandt fakultativt anaerobe gramnegative stave. Foreløbig gælder dette særligt arter inden for slægten *Pseudomonas*, hvor oxidativ syrepåvisning delvis kan træde i stedet for den mere tidkrævende undersøgelse af, hvilke kulstof- og energikilder der kan udnyttes. Også ved differentiering af arter af *Agrobacterium* har vi i diagnoseafdelingen fundet prøven værdifuld, men på grund af den svage syredannelse gælder der som tidligere nævnt særlige regler for fortolkningen. Adskillelsen mellem stammer med og uden oxidativ syredannelse i slægten *Acinetobacter* kan have epidemiologisk betydning, men tilfælles ikke i øjeblikket taxonomisk værdi, idet både biotyper med og uden syredannelse regnes til samme species.

## 8. Referencer

- Alsberg, C.L.: The formation of d-gluconic acid by *Bacterium savastanoi* Smith. J. biol. Chem. 9: 1, 1911.
- Barker, H.A. & Lipmann, F.: The role of phosphate in the metabolism of *Propionibacterium pentosaceum*. J. biol. Chem. 179: 247, 1949.
- Brown, W.J.: One-tube test for determining oxidative or fermentative metabolism of bacteria. Appl. Microbiol. 27: 811, 1974.
- Conn, H.J. & Hucker, G.J.: The use of agar slants in detecting fermentation. J. Bact. 5: 433, 1920.
- Cook, A.M. & Fewson, C.A.: Role of carbohydrates in the metabolism of *Acinetobacter calcoaceticus*. Biochim. biophys. Acta 320: 214, 1973.
- Hugh, R. & Leifson, E.: The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. J. Bact. 66: 24, 1953.

- Ley, J. de: Comparative carbohydrate metabolism and localization of enzymes in *Pseudomonas* and related micro-organisms. *J. appl. Bact.* 23: 400, 1960.
- Lockwood, L.B., Tabenkin, B. & Ward, G.E.: The production of gluconic acid and 2-keto-gluconic acid from glucose by species of *Pseudomonas* and *Phytomonas*. *J. Bact.* 42: 51, 1941.
- Lockwood, L.B. & Nelson, G.E.N.: The oxidation of pentoses by *Pseudomonas*. *J. Bact.* 52: 581, 1946.
- Lockwood, L.B. & Stodola, F.H.: Preliminary studies on the production of  $\alpha$ -ketoglutaric acid by *Pseudomonas fluorescens*. *J. biol. Chem.* 164: 81, 1946.
- Norris, F.C. & Campbell, J.J.R.: The intermediate metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*. III. The application of paper chromatography to the identification of gluconic and 2-ketogluconic acids, intermediates in glucose oxidation. *Canad. J. Res. C27:* 253, 1949.
- Otto, L.A. & Pickett, M.J.: Rapid method for identification of Gram-negative, nonfermentative bacilli. *J. clin. Microbiol.* 3: 566, 1976.
- Pasteur, L.: Mémoire sur la fermentation acétique. Annales, scientifiques de l'École Normale supérieure, I: 113, 1864. (Œuvres de Pasteur, Tome III: Études sur le vinaigre et sur le vin, p. 23. Masson et Cie, Paris 1924).
- Pervozvanskii, V.V.: Formation of gluconic acid during the oxidation of glucose by bacteria. *Chemical Abstracts* 34: 7321, 1940.
- Porres, J.M. & Stanyon, R.E.: One-tube oxidation-fermentation test. *Amer. J. clin. Path.* 61: 368, 1974.
- Sears, H.J. & Gourley, M.F.: Studies in the carbohydrate metabolism of *Ps. aeruginosa* (*B. pyocyanus*). *J. Bact.* 15: 357, 1928.
- Sebek, O.K. & Randles, C.I.: The oxidative dissimilation of mannitol and sorbitol by *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bact.* 63: 693, 1952.
- Stanier, R.Y.: Acetic acid production from ethanol by fluorescent pseudomonads. *J. Bact.* 54: 191, 1947.
- Stanier, R.Y., Doudoroff, M. & Adelberg, E.A.: General Microbiology, 2nd ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey 1963, p. 268.
- Stodola, F.H. & Lockwood, L.B.: The oxidation of lactose and maltose to bionic acids by *Pseudomonas*. *J. biol. Chem.* 171: 213, 1947.
- Stokes, F.N. & Campbell, J.J.R.: The oxidation of glucose and gluconic acid by dried cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Biochem.* 30: 121, 1951.
- Wood, W.A. & Schwerdt, R.F.: Carbohydrate oxidation by *Pseudomonas fluorescens* I. The mechanism of glucose and gluconate oxidation. *J. biol. Chem.* 201: 501, 1953.

## *Kapitel 21*

# **ONPG-prøven og andre glukosidaseprøver**

Prøver, der påviser tilstedeværelse af glykosidaser, dvs. hydrolytiske enzymer der spalter glykosidbindinger dels i naturligt forekommende oligo- og polysakkarkerider, dels i syntetiske, kromogene enzymsubstrater, hvorved en farvet forbindelse frigøres. I dette afsnit omtales først og fremmest ONPG-prøven. Angående glykosidaser, der spalter polysakkarkerider, henvises til kapitlerne 23, 24 og 25.

### **1. Historisk indledning**

Selv om mange havde vist, at der fandtes særlige enzymer, glykosidaser, som spalter oligo- og polysakkarkerider fortrinsvis til monosakkarkerider som første trin i disse kulhydraters fuldstændige nedbrydning, manglede man indtil 1950 en tilstrækkelig simpel undersøgelsesmetode, der kunne bruges i bakteriologien til direkte glykosidsepåvisning. Takket være ældre fysiske, kemiske og biokemiske metoder havde man dog et ganske godt kendskab til glykosidaser (se Pigman's oversigt 1944), og man havde ved disse undersøgelser i stor udstrækning anvendt syntetisk fremstillede glykosider, hvor et monosakkardimolekyle via en glykosidbinding var koblet til andre molekyler, som fx. fenoler og nitrofenoler.

Huggins & Smith havde i 1947 anvendt et såkaldt kromogent substrat, p-nitrofenylsulfat, til enzymmålinger, og det fik i 1950 Lederberg til at prøve, om et syntetisk glykosid,  $\alpha$ -nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktosid (= ONPG) kunne anvendes til påvisning af galaktosidaseaktivitet i en colistamme. ONPG er selv farveløst, men efter spaltning af glykosidbindingen frigøres  $\alpha$ -nitrofenyl, som i alkalisk miljø er et gult farvestof, hvis koncentration kan måles i et spektrometer.

Lederbergs metode til påvisning af  $\beta$ -galaktosidase fik overordentlig stor betydning både videnskabeligt og praktisk.

Monod og andre ved Institut Pasteur i Paris udnyttede kort efter metoden til grundlæggende undersøgelser over enzyminduktion og permeaser, og disse undersøgelser dannede senere grundlag for opdagelse af repressormekanismen og allosteriske enzymer (om Monod's indsats, se Stanier 1977).

Den praktiske anvendelse af ONPG-prøven i bakteriologisk diagnostik stammer også fra Institut Pasteur, hvor den i 1962 indførtes af Le Minor og Ben Hamida og desuden anvendtes af Mollaret & Le Minor (1962), Leclerc (1962) og Szturm-Rubinstein & Piéchaud (1962, 1963). De anbefalede især prøven ved undersøgelse af *Enterobacteriaceae*, fordi den gav et hurtigt positivt resultat med mange af de stammer, der bliver sent positive i et laktoseforgæringsglas. Disse erfaringer blev hurtigt bekræftet af andre (Bülow 1964a, b; Lapage & Jayaraman 1964 m.fl.), og i dag indgår ONPG-prøven i de fleste diagnostiske laboratoriers repertoire. Prøven bør ikke alene betragtes som en hurtigere metode til at opnå samme slags resultat, som man opnår med et laktoseforgæringsglas, men også som et supplement til forgæringsglasset, da resultaterne med de to prøver med nogle stammer falder forskelligt ud og derved giver ekstra oplysninger (Bülow 1964a, b; Lapage et al. 1973).

Le Minor et al. (1977) har rokket ved den hidtidige opfattelse, at en positiv ONPG-prøve altid kan fortolkes som tilstedeværelse af  $\beta$ -galaktosidase. De viste, at alle undersøgte stammer af visse arter og slægter (fx. *Serratia marcescens*, *Levinea amalonatica*, *Hafnia*, *Yersinia*, *Aeromonas* og *Vibrio*), som giver en positiv ONPG-prøve, ikke er i stand til at spalte laktose under frigørelse af glukose. Resultatet er overraskende og endnu ikke bekræftet. Le Minor et al. foreslår, at ONPG-positive stammer skal deles i  $\beta$ -gal<sup>+</sup> og  $\beta$ -gal<sup>-</sup> stammer, men deres metode til at skelne mellem de to grupper er ikke så simpel, at den er egnet til rutinebrug.

Blandt de af Huggins og medarbejdere beskrevne kromogene enzymsubstrater var også fenolphthalein-glukuronysyre til påvisning af glukuronidase (Talalay et al. 1946). Det blev hurtigt udnyttet til undersøgelse af glukuronidase forekomst hos streptokokker (Robinson et al. 1952; Jacox 1953; Williams 1954), og det blev vist, at visse serotyper inden for gruppe A streptokokker særlig hyppigt producerer glukuronidase. Senere er det vist, at de fleste gruppe B streptokokker også indeholder  $\beta$ -glukuronidase, mens enzymet mangler i gruppe D streptokokker (Röd et al. 1973).

Forskellige typer syntetisk fremstillede kromogene enzymsubstrater er efterhånden blevet kommersielt tilgængelige i stort antal. Hidtil har de især været anvendt af biokemikere, som søger at klariægge glukosidasernes bio-kemi (se fx. Dey & Pridham (1971) om  $\alpha$ -galaktosidase) og kun i mindre omfang af praktisk arbejdende bakteriologer.

Brisou et al. (1972) har dog undersøgt ca. 1100 stammer af *Enterobacteriaceae* for tilstedeværelse af  $\beta$ -xylosidase ved hjælp af orto-nitrofenyl- $\beta$ -D-xylopyranosid og para-nitrofenyl- $\beta$ -D-xylopyranosid og fundet, at positive reaktioner fortrinsvis ses hos stammer i slægterne *Klebsiella* og *Enterobacter* og i arterne *Yersinia pestis* og *Yersinia pseudotuberculosis*.

Kilian & Bülow (1976) har undersøgt godt 600 stammer af *Enterobacteriaceae* og *Vibrionaceae* over for 5 forskellige nitrofenylglukopyranosider med henblik på påvisning af  $\alpha$ -glukosidase,  $\beta$ -glukosidase,  $\beta$ -glukuronidase,  $\beta$ -xylosidase og  $\alpha$ -fucosidase. Af resultaterne skal særlig fremhæves, at  $\beta$ -glukuronidase blandt disse gramnegative stave udelukkende fandtes i slægterne *Escherichia* og *Shigella*, og at et flertal af stammerne i disse slægter var positive.

Kilian (1978) har også med held anvendt et større antal kromogene enzymsubstrater til differentiering blandt bakterier i slægten *Actinomycetaceae*.

## 2. Biokemisk baggrund

Oligosakkarker og polysakkarker består som tidligere nævnt af kæder af monosakkarker forbundet ved glykosidbindinger. Det er et fællestræk ved glykosidbindinger, at et kulstofatom fra hvert af de to ringformede monosakkarker er forbundet via et iltatom, men bindingerne er alligevel forskellige, bestemt af hvilke af kulstofatomerne i ringene, der indgår, og af monosakkarkerernes detailstruktur, herunder også stereo-isomere forskelle.

Fællesbetegnelsen for disse forbindelser indeholdende glykosidbindinger er glykosider, men hvor carbonylgruppen stammer fra glukose bruges under tiden betegnelsen glukosider.

Mange bakterier danner enzymer, glykosidaser, som kan spalte forskellige glykosidbindinger, og påvisning af de forskellige glykosidaser, som findes i en bestemt bakterie, er derfor med til at karakterisere den og kan udnyttes i klassifikation og identifikation.

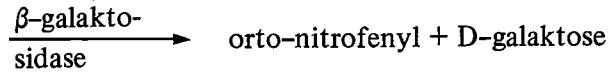
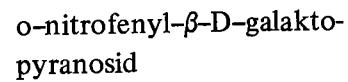
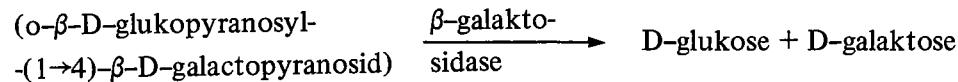
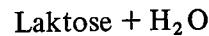
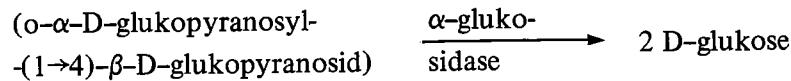
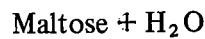
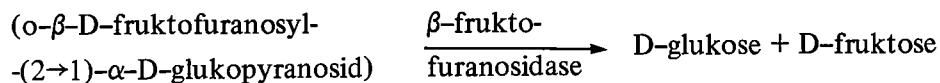
En indirekte påvisning af glykosidaser sker i de klassiske forgæringsprøver, idet påvisning af fermentativ syredannelse ud fra oligosakkarker og polysakkarker forudsætter, at der først er sket en nedbrydning til monosakkarker netop ved hjælp af glykosidaser. Når fx. en bestemt bakterie er i stand til fermentativt at danne syre af laktose, så kan man deraf udlede, at bakterien er i stand til at danne den glukosidase, som spalter glukosidbindingen i laktose, så glukosemolekylet og galaktosemolekylet frigøres. Uden denne indledende spaltning af laktosen til monosakkarker vil bakterien nemlig ikke være i stand til fermentativ syredannelse (derimod ville der uden medvirken af glykosidasen kunne ske en oxidativ syredannelse, hvis laktosen blev iltet direkte til laktonsyre). Den specielle glykosidase, der her er tale om, kaldtes tidligere laktase, men efter nyere terminologi kaldes den  $\beta$ -galaktosidase.

Hvis formålet alene er at påvise, om en bestemt glykosidase, fx.  $\beta$ -galaktosidase, er til stede, kan man gå en anden mere direkte vej og benytte et kunstigt fremstillet stof, der indeholder samme glykosidbinding som laktose.

Hvis man kemisk kobler et galaktosemolekyle sammen med et molekyle af orto-nitrofenyl, har man et stof: ONPG eller *o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galaktosid, der netop indeholder samme glykosidbinding som laktose, og mens det uspalte ONPG er farveløst, vil en spaltning af glykosidbindingen frigøre o-nitrofenyl, som er et gult stof, således at spaltningen direkte kan observeres som et farveomslag i opløsningen.

Analogt med fremstillingen af ONPG har man fremstillet andre syntetiske glykosider, der indeholder ganske bestemte glykosidbindinger, og ved hjælp af dem kan man undersøge for tilstedeværelse af en række forskellige glykosidaser.

Stort set er de forskellige glykosidaser specifikke, dvs. de spalter fortrinsvis en bestemt glykosidbinding, men da visse glykosidbindinger molekulært set ligner hinanden meget, kan i nogle tilfælde samme enzym spalte flere nærtstående forbindelser, omend med forskellig intensitet. Virkningen af nogle typiske glykosidaser fremgår af de følgende ligninger:



Om nogle glykosidaser, fx.  $\beta$ -galaktosidase, vides det med sikkerhed, at de er inducerbare, og rimeligvis gælder det alle eller flertallet. Induktionen kan fremkaldes af mange naturlige og syntetiske forbindelser, som indeholder den til glykosidasen svarende glykosidbinding. Samtidig med glykosidasein-

duktionen vil der normalt ske en induktion af den permease, som er nødvendig for aktivt at transportere glykosidet ind i cellen. Mutationer i det gen, der koder for permeaseenzymet er ikke sjeldne og medfører ofte, at et bestemt glykosid ikke metaboliseres til trods for at glykosidases findes i cellen. Dette er en hyppig årsag til afvigelser i "normale" forgæringsmønstre og til at der optræder negative ONPG-prøver hos stammer fra en art, der plejer at være positiv.

De enkelte glykosidaser har et karakteristisk pH optimum; for de af Kilian & Bülow (1976) undersøgte lå dette mellem 7,5 og 8,5, men andre glykosidaser har et andet optimum. Ved brug af syntetiske nitrofenyl-glykopyranosider skal opløsningens pH være alkalisk, også af hensyn til at dette er en forudsætning for at få nitrofenylets gule farve frem. Kilian & Bülow fandt, at Tris-buffer virkede hæmmende på nogle glykosidaser.

### 3. Valg af metode

ONPG-prøven til påvisning af  $\beta$ -galaktosidase er foreløbig den bedst indarbejdede glykosidaseprøve, hvilket til dels hænger sammen med den traditionelle betydning laktoseforgæringsprøver har haft i diagnostisk bakteriologi. Flest oplysninger får man ved samtidig brug af begge prøver, men er der kun mulighed for at benytte een prøve, vil ONPG-prøven alene være bedre end laktoseglasset alene. ONPG-prøven vil her blive beskrevet i den uformning, hvori den har været anvendt i diagnoseafdelingen siden 1963 (Bülow 1964a, b).

Teoretisk set er der mulighed for i et undersøgelsesprogram at inkludere mange andre glykosidaseprøver, da der findes et stort antal forskellige bakterielle glykosidaser og et stort udvalg af kromogene substrater, men foreløbig er den praktiske betydning af anvendelsen af andre glykosidaseprøver end ONPG-prøven kun sparsomt undersøgt. De hidtidige erfaringer tyder på, at ONPX-prøven til påvisning af  $\beta$ -xylosidase og PGUA-prøven til påvisning af  $\beta$ -glukuronidase ville være af værdi (Brisou et al. 1972; Kilian & Bülow 1976). Detailler i udførelsen af disse to prøver vil dog ikke blive nærmere beskrevet i det følgende, da fremgangsmåden er som ved ONPG-prøven.

#### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

*ONPG-prøven ( $\beta$ -galaktosidasepåvisning)*

*Enzymsubstratet*

ONPG, krystallinsk	0,48 g (0,2%)
Buffer	30 ml
Dest. vand	210 ml
<i>Buffer:</i>	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ : 13,8 g i 80 ml dest. vand
	$\text{NaOH}$ 5 N til pH 7,0: ca. 15 ml
	Dest. vand til ialt 100 ml

Aftappes i 0,5 ml portioner i Widalglas (70 x 10/11 mm) med gummiprop. Mærkes "ONPG". (I Bülow's substratbeskrivelser er ONPG-koncentrationen 0,4%).

*Inoculum:* Almindeligvis tages kulturmassen fra en døgngammel renkultur fra en bouillonagar- eller blodagarplade, da erfaringen har vist, at den nødvendige induktion i de fleste tilfælde allerede er sket i sådanne kulturer, formentlig ved hjælp af ukendte galaktosider i disse substrater. I sjældne tilfælde kan et negativt prøveudfald dog ændres til et positivt, hvis inoculum tages fra et substrat indeholdende fra 1 til 10% laktose. Pladerne inkuberes normalt ved 35°C, når det drejer sig om *Enterobacteriaceae*, men i sjældne tilfælde (fx. visse *Hafnia*-stammer) giver en lavere inkubationstemperatur (fx. 22°C) positivt prøveudfald, hvor inkubering ved 35°C giver negativt resultat.

*Udførelse:* 1 eller 2 øskenfulde kulturmasse suspenderes til homogenitet i substratopløsningen. Gummiproppen sættes i, og glasset anbringes ved 35°C i termostat eller vandbad. Der anvendes ikke toluoltilsætning til suspensionen.

*Aflæsning:* Ved aflæsningen observeres for fremkomst af en gul farve i reaktionsglasset. En første aflæsning kan ske efter 20 minutter, og alle glas, som på dette tidspunkt er gule, kan straks regnes som positive. Ofte er det praktisk at udskyde aflæsningen til efter 3 timers inkubation og også i dette tilfælde regnes alle gule glas som positive. Glas, der er farveløse efter 3 timer, kan til praktiske formål regnes som negative, men erfaringen viser, at hvis de aflæses efter ca. 20 timer, vil enkelte vise en svag gul farve. Denne sent fremkomne, svage gule farve er formentlig hyppigst udtryk for en uspecifik spaltning af substratet, men må også kunne skyldes en svag  $\beta$ -galaktosidaseaktivitet, og den kan være anledning til fornyet undersøgelse efter induktion og/eller ved lavere væksttemperatur.

**Fortolkning:** En kraftig gul farve tages altid som udtryk for tilstedeværelse af  $\beta$ -galaktosidase. Hvis suspensionen i forvejen er gul på grund af gule pigmenter i kulturen, må prøven enten opgives eller udføres med et glas med en varmeinaktivert suspension som kontrol. Fortolkningen af sene og svage farveomslag er som ovenfor nævnt diskutabel (se også Szturm-Rubinstein & Piéchaud 1963).

## 5. Sikkerhedsforanstaltninger

De sædvanlige ved omgang med potentiel patogene bakterier. Særlig ved fremstilling af suspensionerne bør man undgå, at bakteriemasse bliver hængende på glasses rand, og undgå at skabe aerosol ved homogeniseringen.

## 6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

Listen er udarbejdet på grundlag af specialliteraturen, da Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ofte mangler oplysninger. Mange grupper af bakterier har hidtil ikke været undersøgt.

*Campylobacter*: en enkelt stamme af *C. fetus*

*Pseudomonadeceae*: få stammer af *P. aeruginosa* og *P. cepacia*

*Escherichia coli*

*Citrobacter*: de fleste stammer; induktion med høj laktosekoncentration undertiden nødvendig.

*Salmonella*: subgenus III (*Arizona*): næsten alle stammer

*Shigella*: *Sh. dysenteriae* serotype 1; *Sh. sonnei*; de fleste stammer

*Klebsiella*: alle undtagen *K. rhinoscleromatis*

*Enterobacter*

*Hafnia*: de fleste stammer; vækst ved 22°C undertiden nødvendig.

*Serratia*

*Yersinia*: alle undtagen nogle stammer af *Y. enterocolitica*

*Erwinia herbicola*

*Vibrio*: alle arter undtagen *V. parahaemolyticus* og *V. alginolyticus*

*Aeromonas*

*Plesiomonas*

*Chromobacterium lividum*: nogle stammer

*Flavobacterium meningosepticum*

*Haemophilus*: nogle species har nogle positive stammer

*Pasteurella*: få stammer af alle species undtagen *P. ureae* som er negativ

*Actinobacillus*: alle species undtagen *A. actinomycetem-comitans*

*Neisseria lactamica*

## 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Prøven er meget hurtig; allerede efter 3 timer har man et pålideligt resultat, uanset om udfaldet er positivt eller negativt.

Prøven er mere følsom end laktoseforgæringsglasset til påvisning af  $\beta$ -galaktosidase. Det betyder, at mange sent laktose-positive stammer og en del laktose-negative inden for slægten *Enterobacteriaceae* hurtigt kan afsløres som  $\beta$ -galaktosidase-positive. En følge af dette er, at i diagnoseskemaet har mange ”d” symboler for laktoseforgæring kunnet erstattes med ”+” symboler for  $\beta$ -galaktosidase, hvorved identifikationen er blevet mere sikker.

De to prøver supplerer hinanden i den forstand, at en negativ ONPG-prøve i forbindelse med syredannelse i et Hugh & Leifson O/F glas støtter tolkningen af syredannelsen som oxidativ (laktobionsyre).

Værdien af ONPG-prøven ved differentiering mellem arter og slægter er indtil videre størst inden for familien *Enterobacteriaceae*. Der henvises til diagnoseskemaerne.

## 8. Referencer

- Brisou, B., Richard, C. & Lenriot, A.: Intérêt taxonomique de la recherche de la  $\beta$ -xylosidase chez les "Enterobacteriaceae". Ann. Inst. Pasteur 123: 341, 1972.
- Bülow, P.: The ONPG test in diagnostic bacteriology. 1. Methodological investigations. Acta path. microbiol. scand. 60: 376, 1964a.
- Bülow, P.: The ONPG test in diagnostic bacteriology. 2. Comparison of the ONPG test and the conventional lactose-fermentation test. Acta path. microbiol. scand. 60: 387, 1964b.
- Dey, P.M. & Pridham, J.B.: Biochemistry of  $\alpha$ -galactosidases. Advanc. Enzymol. 36: 91, 1972.
- Huggins, C. & Smith, D.R.: Chromogenic substrates. III. *p*-nitrophenyl sulfate as a substrate for the assay of phenolsulfatase activity. J. biol. Chem. 70: 391, 1947.
- Jacox, R.F.: Streptococcal  $\beta$ -glucuronidase. J. Bact. 65: 700, 1953.
- Kilian, M.: Rapid identification of *Actinomycetaceae* and related bacteria. J. Clin. Microbiol. 8: 127, 1978.
- Kilian, M. & Bülow, P.: Rapid diagnosis of *Enterobacteriaceae*. I. Detection of bacterial glycosidases. Acta path. microbiol. scand. B, 84: 245, 1976.
- Lapage, S.P. & Jayaraman, M.S.: Beta-galactosidase and lactose fermentation in the identification of enterobacteria including salmonellae. J. clin. Path. 17: 117, 1964.
- Lapage, S.P., Efstratiou, A. & Hill, L.R.: The ortho-nitrophenol (ONPG) test and acid from lactose in Gram-negative genera. J. clin. Pathol. 26: 821, 1973.
- Leclerc, H.: Etude biochimique d'Enterobactériaceae pigmentées. Ann. Inst. Pasteur 102: 726, 1962.

- Lederberg, J.: The beta-D-galactosidase of *Escherichia coli*, strain K-12. *J. Bact.* 60: 381, 1950.
- Minor, L. Le & Hamida, F. Ben: Avantages de la recherche de la  $\beta$ -galactosidase sur celle de la fermentation du lactose en milieu complexe dans le diagnostic bactériologique, en particulier des *Enterobacteriaceae*. *Ann. Inst. Pasteur* 102: 267, 1962.
- Minor, L. Le, Coynault, C. & Guiso, N.: Discordances entre la positivité du test à l'ONPG et la présence d'une  $\beta$ -galactosidase chez les *Enterobacteriaceae* et autres bacilles Gram-a métabolisme fermentatif. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 128B: 35, 1977.
- Mollaret, H. & Minor, L. Le: Recherche de la  $\beta$ -galactosidase chez les différentes *Pasteurella* et conséquences quant à leur taxinomie. *Ann. Inst. Pasteur* 102: 649, 1962.
- Pigman, W.W.: Specificity, classification, and mechanism of action of the glycosidases. *Arch. Enzymol.* 4: 41, 1944.
- Robinson, J.J., Blinn, C.W. & Frank, P.F.: Glucuronidase production by *Streptococcus pyogenes*. *J. Bact.* 64: 719, 1952.
- Röd, T.O., Haug, R.H. & Midtved, T.:  $\beta$ -glucuronidase in the streptococcal groups B and D. *Acta path. microbiol. scand. B*, 82: 533, 1974.
- Stanier, R.Y.: Jacques Monod, 1910-1976 (Obituary). *J. gen. Microbiol.* 101: 1, 1977.
- Szturm-Rubinstein, S. & Piéchaud, D.: Sur l'utilisation du lactose par les germes du groupe *Alkalescens-Dispar*. *Ann. Inst. Pasteur* 103: 935, 1962.
- Szturm-Rubinstein, S. & Piéchaud, D.: Observations sur la recherche de la  $\beta$ -galactosidase dans le genre *Shigella*. *Ann. Inst. Pasteur* 104: 284, 1963.
- Talalay, P., Fishman, W.H. & Huggins, C.: Chromogenic substrates. II. Phenolphthalein glucuronic acid as substrate for the assay of glucuronidase activity. *J. biol. Chem.* 166: 757, 1946.
- Williams, R.E.O.: Glucuronidase production by serotypes of *Streptococcus pyogenes*. *J. gen. Microbiol.* 10: 337, 1954.

## *Kapitel 22*

### **Æskulinspaltningsprøver**

Prøver der påviser tilstedeværelsen af det enzym, som spalter glykosidbindingen i stoffet æskulin. Enzymet har intet officielt navn, men kan betegnes som "æskulinase".

#### **1. Historisk indledning**

Beijerinck, der var professor i bakteriologi ved den polytekniske højskole i Delft, publicerede flere grundlæggende arbejder om mælkesyrebakterier. I et af disse arbejder fra 1908 omtalte han æskulinspaltung som en vigtig karakteriserende egenskab, og det fremgår, at han både brugte en farvereaktion med ferricitrat og tab af det uspalte substrats blå fluorescens som kriterium for stedfundens spaltning, og han anførte, at reaktionen var blevet brugt i årevis i hans laboratorium. Ifølge en fodnote stammede hans kendskab til prøven fra hans professorkollega i Delft, H. ter Meulen, som havde udført omfattende undersøgelser over glykosidspaltninger.

I Beijerinck's laboratorium arbejdede omkring dette tidspunkt van der Leck, og kort efter optog han sammen med Harrison i Canada brugen af æskulin-spaltung ved hygiejniske undersøgelser af vand og mælk. Deres to arbejder (Harrison & van der Leck 1909a, b) citeres som regel i litteraturen som de første, hvor bakteriel æskulin-spaltung er omtalt, men altså med urette. I disse publikationer anbefales et nyt indikatorsubstrat til simpel påvisning af colibakterier. Det bestod af McConkey's galdesaltmedium suppleret med æskulin og ferricitrat, således at kolonier af æskulin-spaltende bakterier farvede substratet sort. Metoden vandt tilsyneladende ingen større udbredelse, men herfra stammer de mange senere metoder, hvor galde og æskulin er kombineret i samme medium – en kombination som kan være nyttig til bestemte formål, men som er principielt uheldig, når talen alene er om æskulin-spaltung, da denne spaltung som sådan ikke på nogen måde er betinget af tilstede-værelsen af galdesalte.

Æskulin-spaltung viste sig senere at være værdifuld som differentierende egenskab inden for streptokokgruppen. Rochaix (1924) fandt, at enterokok-

ker regelmæssigt spaltede æskulin, og Meyer & Schönfeld (1926) kunne vise, at prøven var egnet til at skille enterokokker fra såkaldt *Streptococcus viridans*, som ikke spaltede æskulin, og de viste også, at andre streptokokker – bl.a. nogle ”mælkesyrestreptokokker” – havde evne til æskulinspaltning. Senere undersøgelser har bekræftet prøvens værdi inden for dette område (Facklam & Moody 1970; Facklam 1973; Facklam et al. 1974).

Til differentiering inden for familien *Enterobacteriaceae* blev æskulinprøven først brugt af Levine (Levine et al. 1932, 1934; Vaughn & Levine 1942). Han brugte den oprindelig på den måde, at fermentativ syredannelse af den fraspalte glukose var kriterium for æskulinspaltningen, hvilket med denne gruppe bakterier skulle være i orden; alligevel gik han senere over til også at tilsætte ferricitrat, som med det fraspalte æskuletin danner et sort farvekompleks. I denne udformning har prøven været brugt af Edwards & Ewing (1972) og Ewing (1973) ved undersøgelse af store materialer af *Enterobacteriaceae*.

Forskellige hurtigprøver er lanceret i de seneste år. Wasilauskas (1971) og Lindell & Quinn (1975) brugte en galde-æskulin-ferricitrat skrå-agar og et stort inoculum, som tillod aflæsning efter 4 timer, og Edberg et al. (1976, 1977) anvendte en spottest, hvor inoculum placeredes på en æskulinvædet plet på et stykke filterpapir, og eventuel spaltning påvistes ved tab af blå fluorescens under en Wood-lampe inden for 30 minutter. Fluorescenstab som indikator for en positiv prøve havde foruden af Beijerinck også tidligere været anvendt af Gemmell & Hodgkiss (1964). De sidstnævnte viste også, at det fraspalte æskuletin dannede synlige korallagtige krystaller i plademærker.

Resultaterne med hurtigprøverne afviger i nogle tilfælde fra resultaterne med de sædvanlige prøver (se senere), men viser ligesom disse, at inden for *Enterobacteriaceae* er prøvens værdi begrænset på grund af egenskabens fordeling mellem og inden for taxa. Om Edberg's spottest må det bemærkes, at alle prøver bliver positive ved forlænget inkubation.

## 2. Biokemisk baggrund

I naturen findes glykosidet æskulin i barken af hestekastanie (*Aesculus hippocastanum*), i vilde jasminer og i forskellige andre planter. Det består af et molekyle D-glukose og et molekyle 6,7-dihydroxycoumarin, også kaldet æskuletin, forbundet ved en  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6) glykosidbinding. En karakteristisk egenhed ved æskulin er stærk blå fluorescens i vandig opløsning med en pH højere end 5,8. Også æskuletin fluorescerer, men kun ved alkalisk pH.

Vi har ikke fundet generelle enzymatiske data om den glykosidase, der spalter æskulin, men Miskin & Edberg (1978) har for *E. coli*'s vedkommende vist, at enzymet er inducerbart, og at både æskulin og salicin inducerer. Af hensyn til teknikken ved prøvens udførelse ville det være værdifuldt at vide, om enzymet er konstitutivt eller inducerbart hos andre taxa. Spaltningen er en hydrolyse, hvorved  $\beta$ -D-glukose og æskuletin frigøres. Med følgende metoder kan det påvises, at spaltning har fundet sted: 1) Påvisning af syredannelse ud fra den dannede glukose. 2) Dannelse af et sort farvekompleks ud fra æskuletin i forbindelse med ferrijoner. 3) Tab af æskulinets fluorescende evne ved spaltning. 4) Dannelse af koralagtige, hvide krystaller af æskuletin (Gemmell & Hodgkiss 1964). Syredannelse forudsætter naturligvis, at bakterierne har enzymer, der metaboliserer glukose med syrer som slutprodukt. Det biokemiske grundlag for dannelsen af et sortfarvet kompleks af æskuletin og ferrijoner er ikke kendt og heller ikke de miljøfaktorer, som begünstiger dannelsen. Tab af fluorescens synes kun sjældent at have været anvendt som indikator, og så vidt man kan skønne af den nyere litteratur, kræves der yderligere undersøgelser, før en metode baseret på dette princip kan betragtes som tilfredsstillende funderet. Krystaldannelsen af æskuletin er kun omtalt i et enkelt arbejde.

### 3. Valg af metode

I diagnoseafdelingen har prøver til æskulin-spaltning ikke haft større anvendelse. Når de har været brugt, har det været som led i en sukkerrække, hvor syredannelse var kriteriet for spaltning. Dog har også prøver baseret på dannelsen af et mørkt farvekompleks med ferricitrat været anvendt forsøgsmæssigt. Efter litteraturen at dømme er sidstnævnte metode bedst egnet til rutinebrug.

Et kombineret substrat med tilsætning af galdesalte kan ikke anbefales som generel undersøgelsesmetode. I en sammenlignende undersøgelse af *Enterobacteriaceae* med flere metoder har Edberg et al. (1977) vist, at med stammer fra visse taxa giver vækstprøver flere positive resultater end de direkte enzymtests, og at procenten af positive i vækstprøverne stiger med stigende inkubationstid. Særlig for *E. coli* er dette forhold meget udtalt. Senere har Miskin & Edberg (1978) vist, at det skyldes, at enzymet i *E. coli* er inducerbart. De mener, prøven har størst differentierende værdi, hvis man anvender prøver, hvor *E. coli* falder negativ ud, og anbefaler derfor enten vækstmedier sparsomt inokuleret og aflæst efter 18-24 timer, eller en af hurtigmetoderne hvor induktionen ikke når at gøre sig gældende.

#### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

*Udfældning af spaltningsproduktet æskuletin med ferricitrat som et synligt brunsort stof i substratet*

*Substrat (modificeret Vaughn & Levine 1942)*

Pepton	0,5%
Gæretekstrakt	0,5%
Æskulin	0,5%
Ferricitrat	0,05%

i destilleret vand. Slut pH 7,4.

Aftappes som flydende medium i reagensglas (150 x 13 mm) i 6–7 cm høje søjler, evt. efter tilsætning af agar som et skråglas.

*Udførelse:* Glasset tilsås som et forgæringsglas med lille inoculum fra en renkultur på plade. Et skråglas tilsås ved spredning på overfladen og stik gennem klumpen. Inkuberes ved 35°C.

*Aflæsning:* Hvis det drejer sig om *Enterobacteriaceae*, kan anbefales en enkelt aflæsning efter ca. 24 timer – med andre grupper af bakterier må man empirisk fastlægge den mest hensigtsmæssige inkubationstid, hvis man ikke kan finde anvisninger i originallitteraturen. En positiv reaktion viser sig ved, at substratet antager en mørkere brun til sort farve. Ifølge Beijerinck (1908) er farven sort ved sur og brun ved alkalisk reaktion.

*Fortolkning:* Grænsen mellem en negativ og en positiv reaktion er ikke skarp, og indtil man har skaffet sig personlig erfaring i aflæsning, bør man medtage en positiv kontrolstamme, fx. en *Klebsiella pneumoniae*.

#### 5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ingen særlige.

#### 6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

Fra Bergey's Manual, 8. udg., er medtaget de taxa, hvor positive reaktioner er omtalt, uanset at metoden og inkubationstidens længde ikke er anført. Nogle data er fra originallitteraturen.

*Escherichia coli*: nogle stammer (0,3% ved aflæsning efter 24 timer, 61% ved aflæsning efter 5 døgn ifølge Edberg et al. 1977).

*Citrobacter*: nogle stammer (sent positive).

*Klebsiella*: *K. pneumoniae*: alle stammer; andre species: nogle stammer.

*Enterobacter*: *E. aerogenes*: alle stammer, andre species: nogle stammer.

*Serratia*: de fleste stammer af alle species.

*Proteus*: nogle stammer af *P. vulgaris* og *P. rettgeri*.

*Yersinia*: *Y. pestis* og *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, biotype 1.

*Erwinia*: flere species, bl.a. *E. carotovora*.

*Actinobacillus*: *A. suis*.

*Pasteurella*: *P. haemolytica*, nogle biotyper.

*Aeromonas*: nogle stammer af alle species.

*Chromobacterium lividum*: 95% af stammerne.

*Bacteroides*: *B. ruminicola*: de fleste stammer; enkelte stammer i andre species.

*Fusobacterium*: 4 af 16 species.

*Streptococcus*: 15 af 25 species og nogle stammer af nogle af de øvrige species (se streptokokafdelingens diagnoseskema).

*Leuconostoc*: *L. oenos* og nogle stammer af 3 andre species.

*Peptostreptococcus productus*: nogle stammer.

*Lactobacillus*: 9 af 25 species og nogle stammer af 4 andre species.

*Listeria*: alle species.

*Corynebacterium*: 8 af 12 plantepatogene species.

*Propionibacterium*: 5 af 8 species.

*Eubacterium*: enkelte stammer i flere species.

*Bifidobacterium*: 2 af 5 testede species; nogle stammer af en tredje species.

*Bacterionema*: ca 90% af stammerne.

*Rothia*: alle stammer.

*Nocardia*: 16 af 31 species.

## 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Prøven anvendes regelmæssigt i streptokokdiagnostik både som flydende og fast medium. Et æskulinglas med fenolrødt, men uden ferricitrat, indgår rutinemæssigt ved forgæring af ikke-hæmolytiske streptokokker, og ved CAMP-reaktionen til påvisning af gruppe B streptokokker tilsætter man æskulin og ferricitrat til pladerne, så man umiddelbart kan frasortere de æskulin-positive streptokokker, der giver en positiv CAMP-reaktion, mens gruppe B stammer er æskulin-negative.

Ellers anvendes prøven kun sjældent i klinisk-mikrobiologiske laboratorier. Dens værdi er især begrænset af, at fordelingen af positive og negative stammer eller taxa sjældent tillader nyttig differentiering. Også sent indtrædende positive reaktioner i nogle taxa begrænser dens værdi.

Som en nyttig differentiering fremhæves i litteraturen, at *Listeria* er positiv og *Erysipelothrix* negativ.

## 8. Referencer

- Beijerinck, M.W.: On lactic acid fermentation in milk. Proc. roy. Acad. Amst. 10: 17, 1908.
- Edberg, S.C., Gam, K., Bottenbley, C.J. & Singer, J.M.: Rapid spot test for the determination of esculin hydrolysis. J. clin. Microbiol. 4: 180, 1976.
- Edberg, S.C., Pittman, S. & Singer, J.M.: Esculin hydrolysis by *Enterobacteriaceae*. J. clin. Microbiol. 6: 111, 1977.
- Edwards, P.R. & Ewing, W.H.: Identification of *Enterobacteriaceae*. Burgess Publishing Co., Minneapolis 1972.
- Ewing, W.H.: Differentiation of *Enterobacteriaceae* by Biochemical Reactions. Revised, U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service. DHEW. No. (CDC) 74-8270. Atlanta, Georgia, 1973.
- Facklam, R.R., Padula, J.F., Thacker, L.G., Wortham, E.C. & Sconyers, B.J.: Presumptive bile-esculin test. Appl. Microbiol. 20: 245, 1970.
- Facklam, R.R.: Comparison of several laboratory media for presumptive identification of enterococci and group D streptococci. Appl. Microbiol. 26: 138, 1973.
- Facklam, R.R., Padula, J.F., Thacker, L.G., Wortham, E.C. & Sconyers, B.J.: Presumptive identification of group A, B, and D streptococci. Appl. Microbiol. 27: 107, 1974.
- Gemmell, M. & Hodkiss, W.: The physiological characters and flagellar arrangement of motile homofermentative lactobacilli. J. gen. Microbiol. 35: 519, 1964.
- Harrison, F.C. & van der Leck, J.: Aesculin bile salt media for water analysis. Cbl. Bakt. 2. Abt. 22: 547, 1909a.
- Harrison, F.C. & van der Leck, J.: Aesculin bile salt media for milk analysis. Cbl. Bakt. 2. Abt. 22: 551, 1909b.
- Levine, M., Vaughn, R., Epstein, S.S. & Anderson, D.Q.: Some differential reactions in the colon-aerogenes group of bacteria. Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N.Y.) 29: 1022, 1932.
- Levine, M., Epstein, S.S. & Vaughn, R.H.: Differential reactions in the colon group of bacteria. Amer. J. publ. Hlth 24: 505, 1934.
- Lindell, S.S. & Quinn, P.: Use of bile-esculin agar for rapid differentiation of *Enterobacteriaceae*. J. clin. Microbiol. 1: 440, 1975.
- Meyer, K. & Schönenfeld, H.: Ueber die Unterscheidung des *Enterococcus* von *Streptococcus viridans* und die Beziehungen beider zum *Streptococcus lactis*. Cbl. Bakt. I. Abt. Orig. 99: 402, 1926.
- Miskin, A. & Edberg, S.C.: Esculin hydrolysis reaction by *Escherichia coli*. J. clin. Microbiol. 7: 251, 1978.

- Rochaix, A.: Milieux à l'esculine pour le diagnostic différentiel des bactéries du groupe strepto-entéro-pneumocoque. C.R. Soc. Biol. (Paris) 90: 771, 1924.
- Vaughn, R.H. & Levine, M.: Differentiation of the "intermediate" coli-like bacteria. J. Bact. 44: 487, 1942.
- Wasilaukas, B.L.: Preliminary observations on the rapid differentiation of the *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group on bile-esculin-agar. Appl. Microbiol. 21: 162, 1971.

## *Kapitel 23*

# **Stivelsesspaltningsprøver**

Prøver, der påviser tilstedeværelsen af stivelsesspaltende enzymer, sammenfattet under betegnelsen "amylase".

### **1. Historisk indledning**

Længe før man havde nogen forestillinger om enzymer og deres virkemåde blev det første enzym opdaget. Det skete, da to franske kemikere, Payen og Persoz, ansat ved en sukkerfabrik, i 1833 af malt ekstraherede en substans, som var i stand til at spalte stivelse til sukker (cit. efter Dixon 1971). Det aktive stof, koncentreret ved en påfølgende udfældning med alkohol, kaldte de diastase, fordi det separerede det opløselige sukker fra de uopløselige stivelseskorn. Senere blev amylase den gængse betegnelse for enzymet.

Da amylase i tidens løb var påvist i mange planter (en historisk oversigt findes hos Baranetzky 1878), blev det efterhånden nærliggende at undersøge, om enzymet også fandtes i bakterier. Botanikeren Nägeli (1877), der bl.a. er kendt for sine studier over stivelseskornenes bygning, nævner, at bakterier er i stand til at spalte stivelse; men det første større arbejde om emnet synes at hidrøre fra Julius Wortmann (1882) fra det botaniske institut i Strassburg. Wortmann arbejdede ikke med renkulturer, men kunne fastslå, at forskellige bakterieinfuser var i stand til at nedbryde stivelse. Som kriterier for nedbrydningen brugte han mikroskopisk påviselige ændringer af stivelseskornene, ændringer i den blå farve, som jod giver med uspalte stivelse, og påvisning af reducerende sukker i kulturene. Han ekstraherede og fældede også enzymet fra bakteriekulturer efter samme mønster som Payen og Persoz. Derved var vejen åbnet for en udnyttelse af evnen til stivelsesspaltning som et middelet til at karakterisere forskellige bakterier. Claudio Fermi (1889) undersøgte 30 forskellige bakteriestammer og fandt evne til at spalte stivelse hos 7 af dem, deriblandt 3 sporedannere. Fermi satte dræbte, udvoksede kulturer til stivelse og undersøgte om der blev dannet sukker.

I 1901 angav Eijkman, at stivelsesspaltning kunne påvises ved hjælp af en agarplade tilsat stivelse, da pladen er uigennemsigtig på grund af stivelsen, men viser opklarede zoner omkring stivelsesspaltende kolonier.

Både plantefysiologiske og bakteriologiske undersøgelser gjorde det efterhånden klart, at stivelsesspaltung var en kompliceret proces, hvor der kunne optræde forskellige mellemprodukter, og at der fandtes flere slags stivelsesspaltende enzymer (se fx. Beijerinck 1895). Endnu i dag har man ikke kendskab til alle detailler i stivelsesspaltningsprocessen.

Som ovenfor nævnt, var kemisk påvisning af den ved nedbrydningen dannede glukose en af de måder, hvorpå stivelsesspaltung blev konstateret. Da mange bakterier oxidativt eller fermentativt omdanner glukose til syrer, er det klart, at man i visse tilfælde også kan benytte syrepåvisning som indikator for stivelsesspaltung. Dette princip har været anvendt bl.a. i diagnoseafdelingen, hvor syredannelse i et forgæringssubstrat med tilsat stivelse er taget som udtryk for evne til stivelsesspaltung. Processens uoverskuelighed og vanskeligheden ved at fremskaffe glukose- og maltosefri stivelse medfører, at denne metodes resultater ikke kan fortolkes med sikkerhed.

En bedre metode blev foreslægt allerede i 1918 af Allen. Han satte 0,2% vandopløselig stivelse til et plademedium, hvor bakterierne kunne vokse, og tilsåede pladen med et enkelt lineært strøg. Efter inkubering i nogle dage påvistes stivelsesspaltung ved at flyde pladen med en jodopløsning, hvorved uomdannet stivelse farves blåt, mens stivelsesspaltung markeres som en farveløs zone omkring bakteriestrøget, hvis amylase er til stede. Denne metode i forskellige udformninger har siden været den mest anvendte (se fx. Smith et al. 1952; Burdon 1956; Stanier et al. 1966; Iverson & Millis 1974; Lee 1976).

## 2. Biokemisk baggrund

Stivelse dannes som intracellulære stivelseskorn i planteceller, hvor de udgør planternes reservernærings; i ris findes 75% stivelse, i maïs ca. 50% og i kartofler ca. 20%. Stivelse er opbygget udelukkende af glukosemolekyler forbundet ved glykosidbindinger, men der forekommer to forskellige slags glykosidbindinger:  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) og  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) bindinger. Resultatet er, at stivelse består af to hovedkomponenter: dels lange ugrenede molekyler (= amylose), som alene indeholder 1 $\rightarrow$ 4 bindinger, dels lange forgrenede molekyler (= amylopektin), hvor begge slags bindinger indgår, idet 1 $\rightarrow$ 6 bindingerne udgør forgreningspunkterne.

Denne særlige struktur medfører, at stivelsesnedbrydning er en kompliceret proces, der kan føre til forskellige intermediær- og slutprodukter, afhængigt af hvilke enzymer, der deltager i nedbrydningen.

Der er beskrevet flere forskellige stivelsesspaltende enzymer (amylaser) isoleret fra dyr, planter og mikroorganismer, men om de bakterielle amylaser ved man kun lidt. Hyppigst er  $\alpha$ -amylase (=  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) glucan glucanohydrolase),

som også findes i spyt og sekret fra bugspytkirtlen; sjælden er  $\beta$ -amylase (=  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  glucan maltohydrolase), der er bedst kendt fra spirende malt, som anvendes ved fremstilling af øl og spiritus ud fra korn og kartofler. Sjældne og usædvanlige amylaser er fundet i *Bacillus macerans* og *Bacillus polymyxa* (Sokatch 1969).

Slutproduktet ved de fleste bakterielle stivelsesspaltninger vil bestå af en blanding af dextrin, maltose og glukose, i vekslende mængdeforhold. Dextrin er delvis nedbrudt stivelse, men med så mange glukoseenheder, at det regnes som et polysakkarid, skønt det ikke med jod giver en kraftig blå farve. Den blå farve fremkaldes af amylose mens dextrin med jod kan give samme rødlige farve som amylopektin eller være farveløs. En fuldstændig nedbrydning til maltose og glukose forudsætter enzymer, som kan spalte 1 $\rightarrow$ 6 bindingerne i amylopektinets forgreningspunkter, og øjensynlig er sådanne enzymer sjældne i bakterier.

De enkelte enzymatiske trin i den bakterielle stivelsesnedbrydning er ikke kendt, og det er en oversimplificering at forestille sig, som angivet af Blazevic & Ederer (1975), at  $\alpha$ -amylase først spalter stivelse til dextrin, derefter dextrin til maltose og sluttelig maltose til glukose.

$\alpha$ -amylase fra bakterier er et ekstracellulært enzym, der kræver forudgående induktion, men fx. *Clostridium welchii* amylasen kan induceres af både stivelse, glykogen og maltose (Gale 1947).

### 3. Valg af metode

Som nævnt er diagnoseafdelingens hidtidige standardmetode (syredannelse ud fra stivelse) uheldig, fordi der er grund til at tro, at syredannelsen ofte alene skyldes metabolisering af glukose- og maltoseurenheder i stivelsen med det resultat, at man får en del falsk positive resultater. Det må derfor anbefales at bruge en stivelsesholdig plade, hvor nedbrydningen påvises ved, at den typiske farvereaktion med jod forsvinder, hvis spaltning har fundet sted. Ved denne fremgangsmåde vil forekomst af glukose og maltose som forurening ikke påvirke udfaldet.

### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

*Agarplade med opløselig stivelse og jod-stivelse-farvereaktionen som indiktorsystem*

Specialitteraturen indeholder mange, tildels varierende angivelser med hensyn til valg af stivelse, grundsubstrat og reagens som udtryk for at valget ikke er særlig kritisk og delvis bestemt af, hvilke bakterier undersøgelsen gælder. Her angives den metode, som er brugt af Stanier et al. (1966) og Blazevic & Ederer (1975).

*Substrat:* Til en bouillonagar – evt. beriget med 0,5% gærekstrakt – sættes vandopløselig stivelse i en mængde svarende til 0,2%. Efter autoklavingen ophældes substratet som almindelige plader. Autoklavingen medfører en vis grad af hydrolyse, men ikke nok til at interferere med prøven (Allen 1918).

*Reagens:* Den modificerede Lugols jodopløsning som anvendes til Gramfarvning; den indeholder 1 g jod og 2 g kaliumjodid i 300 ml destilleret vand.

*Udførelse:* Fra en frisk renkultur tilsås stivelsesplassen med et enkelt strøg midt på pladen. Inkuberingen sker ved bakteriernes optimale væksttemperatur. Inkuberingstiden afhænger af bakteriernes væksthastighed. Stanier et al. (1966) angiver for pseudomonader 48 timer, andre har inkuberet op til 7 dage. Det kan tilrådes at vente yderligere 48 timer med reagenstilsætningen, efter at kulturen er fuldt udvokset, medmindre man laver en serie plader, der kan prøves med fx. 48 timers interval. Reagenstilsætning dræber bakterierne, så fortsat inkubering af samme plade ikke kan gennemføres.

*Aflæsning:* Pladen flydes med jodopløsningen og aflæses straks. Jod og uændret stivelse indgår en forbindelse, som er kraftigt blå, mens delvis nedbrudt stivelse i forbindelse med jod enten giver en rødlig farve eller er farveløs, afhængigt af hvor vidt fremskredet nedbrydningen har været. En nedbrydning vil derfor vise sig ved, at en bredere eller mindre zone omkring vækststrøget er rødlig farvet eller helt farveløs, mens resten af pladen er dybt blå. Ved en negativ prøve bliver hele pladen blå. Aflæsningen skal foretages inden for et par minutter efter reagenspåhældningen, da den blå farve hurtigt bleges.

*Fortolkning:* Kun en helt farveløs zone omkring vækststrøget fortolkes som et positivt udfald af prøven.

## 5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ingen særlige.

## 6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

Det er en usikkerhed ved opregning af bakterier med positiv reaktion, at det ikke i alle tilfælde i Bergey's Manual er angivet, om egenskaben er påvist på grundlag af den ene eller den anden metode, således at man i det enkelte tilfælde kan være i tvivl om, hvorvidt der er tale om egentlig hydrolyse af stivelse. Derfor anbefales det i de konkrete tilfælde at slå efter i Bergey's Manual og i tvivlstilfælde at gå til originalitteraturen. Af mangel på personlig erfaring med prøven har vi været helt henvist til litteraturens oplysninger.

*Pseudomonas*: *P. stutzeri*, *P. pseudomallei*, *P. saccharophila* og nogle stammer af *P. mallei*.

*Xanthomonas*: de fleste species.

*Vibrio*: *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. anguilarum* og nogle stammer af *V. fisheri*.

*Lucibacterium harveyi*

*Chromobacterium*: ca. 20% af stammerne.

*Flavobacterium*: *F. ferrugineum*, *F. lutescens* og *F. indoltheticum*.

*Pasteurella*: de fleste stammer af *P. pneumotropica* og *P. haemolytica* (påvist som syredannelse).

*Bacteroides*: nogle stammer af *B. ruminicola*.

*Fusobacterium*: nogle stammer af 4 (5) species.

*Leptotrichia*: nogle stammer af *L. buccalis*.

*Neisseria*: nogle stammer af *N. mucosa*, *N. sicca* og *N. subflava*, men påvist ved syredannelse.

*Micrococcus*: nogle stammer af *M. luteus* angives at oxidere (?) stivelse.

*Staphylococcus*: kun enkelte stammer.

*Streptococcus*: nogle stammer af serogrupperne C, D og G og enkelte andre.

*Gemella*: *G. haemolysans* påvist ved syredannelse.

*Peptostreptococcus*: nogle stammer af *P. productus*.

*Bacillus*: 19 af 26 species i *Bacillus* gruppe II.

*Clostridium*: 13 (15) af 54 species.

*Corynebacterium*: nogle stammer af *C. pyogenes*.

*Arthrobacter*: nogle stammer af 3 species.

*Eubacterium*: 2 af 10 species.

Ordo *Actinomycetales*: mange af denne store gruppens undertaxa er helt eller delvis positive, fx. *Actinomyces bovis*, nogle *Bifidobacterium*, alle *Bacterionema*, *Nocardia coeliaca*, *Nocardia vaccinii*, mange *Streptomyces* og en del *Micromonospora*.

## 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Som det fremgår af forrige afsnit er amylaser hyppigt forekommende blandt bakterier, men som differentieringsprøve synes stivelseshydrolyse ikke at have fundet stor udbredelse. Det kan skyldes besvaret med substratfremstillingen og den lange tid, der kan medgå inden et svar foreligger.

De områder, inden for klinisk mikrobiologi hvor det ser ud til at prøven især har differentialdiagnostisk værdi, er blandt streptokokker og *Bacillus* og *Clostridium* arter. Også ved adskillelse af *P. stutzeri* og atypisk *P. aeruginosa* kan prøven være nyttig.

## 8. Referencer

- Allen, P.W.: A simple method for the classification of bacteria as to diastase production. *J. Bact.* 3: 15, 1918.
- Baranetzky: Die stärkeumbildenden Fermente in den Pflanzen. Leipzig 1878.
- Beyerinck, M.W.: Ueber Nachweis und Verbreitung der Glukase, das Enzym der Maltose. *Cbl. Bakt. II. Abt. I*: 221, 265, 329, 1895.
- Blazevic, D.J. & Ederer, G.M.: Principles of Biochemical Tests in Diagnostic Microbiology. John Wiley & Sons, New York, 1975, p. 99.
- Burdon, K.L.: Useful criteria for the identification of *Bacillus anthracis* and related species. *J. Bact.* 71: 25, 1956.
- Dixon, M.: The history of enzymes and of biological oxidations. In: Needham, J. (ed.): The Chemistry of Life. Eight Lectures on the History of Biochemistry. University Press, Cambridge 1971, p. 17.
- Eijkman, C.: Ueber Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilzen. *Cbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 29: 841, 1901.
- Fermi, C.: Die Leim und Fibrin lösenden und die diastatischen Fermente der Mikroorganismen. *Cbl. Bakt.* 7: 469, 1889.
- Gale, E.F.: The Chemical Activities of Bacteria. University Tutorial Press Ltd., London 1947, p. 45.
- Iverson, W.G. & Millis, N.F.: A method for the detection of starch hydrolysis by bacteria. *J. appl. Bact.* 37: 443, 1974.
- Lee, W.-S.: Use of Mueller-Hinton agar as amylase testing medium. *J. clin. Microbiol.* 4: 312, 1976.
- Nägeli, C.v.: Die niederen Pilze in ihren Beziehungen zu den Infektionskrankheiten und der Gesundheitspflege. München 1877, p. 12.
- Smith, N.R., Gordon, R.E. & Clark, F.E.: Aerobic Sporeforming Bacteria. Agriculture Monograph No. 16, U.S. Dept. Agriculture. 1952, p. 31.
- Sokatch, J.R.: Bacterial Physiology and Metabolism. Academic Press, London & N.Y. 1969, p. 58.
- Stanier, R.Y., Palleroni, N.J. & Doudoroff, M.: The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J. gen. Microbiol.* 43: 159, 1966.
- Wortmann, J.: Untersuchungen über das diastatische Ferment der Bacterien. *Z. physiol. Chemie* 6: 287, 1882.

## *Kapitel 24*

### **Cellulosespaltningsprøver**

Prøver, der påviser tilstedeværelse af cellulosespaltende enzymer, sammenfattet under navnet ”cellulase”.

#### **1. Historisk indledning**

Der er flere grunde til, at man i mange år intensivt har beskæftiget sig med bakteriel cellulosenedbrydning. For det første er cellulose det kulhydrat, som forekommer i størst mængde i naturen, og for det andet er denne enorme fødereserve kun i ringe grad tilgængelig for mennesker og de fleste dyr, fordi deres fordøjelseskanal mangler de nødvendige enzymer til nedbrydningen. Blandt de højere dyr kan drøvtyggerne udnytte cellulose, fordi vommen hos dem indeholder en væske fyldt med bakterier og andre mikroorganismer, hvoraf nogle producerer cellulosenedbrydende enzymer. Efter nyere undersøgelser kan imidlertid en ringe mængde cellulose udnyttes af cellulosespaltende bakterier i tarmkanalen også hos mennesker og andre pattedyr. Andre motiver til at interessere sig for cellulosenedbrydning er dels muligheden for at fremstille nyttige organiske forbindelser som alkohol, acetone ect. i industriel målestok ud fra cellulose, dels problemet med at bortskaffe de stadigt stigende mængder celluloseholdigt affald, der ophobes i moderne samfund.

Trots interesse for bakteriel cellulosenedbrydning er der stadig mange huller i den eksisterende viden. Nogle af grundene hertil er, at det tog lang tid, inden det lykkedes at skaffe renkulturer især af de anaerobe cellulospaltere, at måling af enzymaktiviteten komplieres af at enzymesubstratet i sin rene form er uoploseligt, og formodentlig også den omstændighed, at bakteriel cellulosenedbrydning i naturen er resultatet af flere forskellige slags bakteriers samtidige aktivitet.

Den tyske kemiker Mitscherlich (1850) regnes som den første, der forbant forestillingen om cellulosenedbrydning i naturen med bakteriers virksomhed, og von Tappeiner (1883–84) viste, at cellulosenedbrydning i vommen hos drøvtyggere skyldtes mikroorganismer. Den russiske bakteriolog Omelianski (1902) – en elev af den kendte jordbundsbakteriolog Winogradsky – gjorde de første

forsøg på rendyrkning, idet han anviste metoder til at fremstille berigede kulturer. Han kunne også vise, at de aktive bakterier var anaerobe sporedanere, men renkulturer lykkedes det ham ikke at opnå. Først Clausen (1931), der arbejdede i Kiel, fik vækst af rendyrkede enkeltkolonier på celluloseagar af anaerobe cellulosespaltere, og mere regelmæssigt lykkedes det først for Hungate fra USA (se fx. Hungate 1950), efter at han havde udarbejdet en forebedret teknik til anaerob dyrkning. Hungate og hans elever, især Bryant (1959) og McBee (1948) har isoleret og beskrevet mange af de anaerobe cellulosenedbrydere, der kendes i dag.

Sideløbende med denne række undersøgelser blev det også vist, at der fandtes fakultativt anaerobe og strikt aerobe bakterier med evne til cellulosenedbrydning. De vigtigste bidrag skyldtes van Iterson (1903), Kellerman & McBeth (1912), Hutchinson & Clayton (1919), Winogradsky (1929) og Stanier (1942). Det drejer sig især om bakterier af slægterne *Cellulomonas*, *Cellvibrio* og *Cytophaga*.

Den første, der benyttede filterpapirstrimlers desintegrering som indikator for cellulosenedbrydning, synes at have været Popoff (1875), og de første, der anvendte en agarplade med inkorporeret finfordelt cellulose, hvor opklaring omkring enkeltkolonier markerede nedbrydningen, var Kellerman & McBeth (1912).

Pringsheim (1912) viste som den første, at cellobiose og glukose var intermediærprodukter ved cellulosens nedbrydning.

Renfremstilling af cellulosespalrende enzymer er stadig ikke lykkedes, men der er i litteraturen talrige undersøgelser, hvor spalningsprocessen og de nærmere omstændigheder for enzymets optimale virksomhed er søgt klarlagt. Som eksempler kan nævnes arbejder af Han & Srinivasan (1968), Berg et al. (1972a, b), Child et al. (1973), Lee & Blackburn (1975), Breuil & Kushner (1976), Kaufmann et al. (1976) og Thayer (1976).

## 2. Biokemisk baggrund

Cellulose er et polysakkharid fra plantevæv opbygget udelukkende af glukosemolekyler forbundet ved  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) bindinger. Molekylet er en ugrenet kæde med fra få hundrede til mange tusinde glukoseenheder. Cellulose forekommer i alle planteceller, men mængden varierer stærkt: blade indeholder ca. 2%, træmasse ca. 45% og bomuld ca. 98%. I de fleste tilfælde findes cellulosen sammenbygget med andre polymerer som lignin, hemicellulose, pektin og extensin. Ren cellulose, som fx. filterpapir og affedtede bomuldsfibre, er fuldstændig uopløseligt i vand og alle sædvanligt anvendte opløsningsmidler, men det er opløseligt i Schweizer's reagens (cupritetraaminhydroxyd) og kan

derfra udfældes med syre som et fint fordelt præcipitat. Kellerman & McBeth (1912) indførte brugen af således udfældet cellulose som bestanddel af agarplader. Også mekanisk findelte cellulosefibre anvendes i agarplader. Ved forskellige kemiske behandlinger kan dannes opløselige cellulosederivater som carboxymetylcellulose og ætylcellulose, der er kommersielt tilgængelige.

De nævnte forskellige celluloseprodukter angribes med forskellig lethed af cellulosespaltende enzymer, og nogle derivater angribes også af enzymer, der ikke spalter ren cellulose. Variationer i cellulosefibrene struktur og sammensætning påvirker også den lethed, hvormed de nedbrydes (Berg et al. 1972a, b). Af de anførte grunde er det nødvendigt altid at præcisere, hvilket substrat der har været benyttet til undersøgelse for evne til cellulosespaltning. Tidligere regnede man med, at den enzymatiske spaltning foregik ved hjælp af et enkelt enzym, cellulase, som var i stand til at afspalte to glukoseenheder ad gangen, således at der opstod cellobiose, som derefter af samme enzym spaltedes til to molekyler D-glukose.

Nyere undersøgelser har vist, at processen er mere kompliceret. Selv om spørgsmålet endnu ikke er fuldt opklaret, regner man i dag med, at "cellulase" er et kompleks af enzymer omfattende 1) C<sub>1</sub>-cellulase, som spalter tilfældige bindinger i kæden, 2) C<sub>x</sub>-cellulase, som fra frie ender afspalter cellobiose og 3) cellobiase, som spalter cellobiosen til glukose. I nogle tilfælde er det vist, at både C<sub>x</sub>- og C<sub>1</sub>-komponenterne indeholder underkomponenter med lidt varierende substratspecificitet.

Nogle bakterier danner en ekstracellulær cellulase, hos andre er enzymet intracellulært og frigøres først ved bakteriens lyse, og i endnu andre tilfælde er der påvist både frit og cellebundet enzym.

I alle tilfælde synes enzymets dannelse at kræve induktion med cellulose, og tilmed forudsættes en nær kontakt mellem bakteriecellen og substratet. På hvilken måde denne kontakt udløser enzymproduktionen er ikke kendt.

Tilstedeværelse af glukose og cellobiose i kulturerne hæmmer eller forhindrer enzymdannelsen. Det optimale pH for enzymaktiviteten er noget varierende, men ligger hyppigt omkring neutralpunktet.

Metoder til påvisning af cellulosespaltning i diagnostisk bakteriologi er enten synlig desintegrering af filterpapirstrimler eller påvisning af opklaring omkring kolonierne på plader, som indeholder fint fordelt cellulose. Af kvantitative metoder, som især anvendes i biokemiens, kan nævnes: vejning af cellulosemængden før og efter enzympåvirkning, ændringer i cellulosepræparatets viskositet, måling af den dannede mængde reducerende sukker og brug af <sup>14</sup>C-mærket cellulose med måling af den frigjorte radioaktivitet.

### 3. Valg af metode

Diagnoseafdelingens erfaringer med påvisning af cellulosespaltende evne hos bakterier er begrænset til nogle få lejligheder, hvor der er blevet anvendt filtrerpapirstrimler i et flydende mineralmedium eller på overfladen af en speciel skrå-agar. Fordelen ved denne metode er, dels at den let lader sig improvisere i de sjældne tilfælde der vil være brug for den, dels at et positivt udfald virkelig er udtryk for spaltning af ren cellulose.

Af litteraturen fremgår, at spaltning af carboxymetylcellulose påvist ved viskositetsændring – en meget anvendt metode – kun forudsætter nærvær af C<sub>x</sub>-komponenten. Denne prøve kan derfor ikke direkte sammenlignes med påvist desintegrering af filtrerpapir, som forudsætter, at også C<sub>1</sub>-komponenten er til stede.

### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

#### *Vækstmedium og enzymsubstrat*

Afhængig af bakteriernes vækstkrav anvendes et simpelt mineralmedium med (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eller NaNO<sub>3</sub> som kvælstofkilde eller samme medium beriget med gærestrakt og/eller pepton. En strimmel filtrerpapir tilsættes som kulstof- og energikilde.

Hvis bakterierne kan udnytte nitrat som kvælstofkilde, er det af hensyn til pH i kulturen under væksten en fordel at benytte nitrat fremfor et ammoniumsalt. Mediet kan bruges i flydende eller fast form. I det flydende medium anbringes – umiddelbart før tilsåningen – et stykke sterilfiltrerpapir (Whatman nr. 1 anbefales, men er næppe strengt nødvendigt), ca. 10 x 70 mm, således at ca.  $\frac{1}{3}$  rager op over væskens overflade. I fast form dispenseres mediet som en skrå-agar, og filtrerpapiret trykkes fast på den skræ overflade.

Mineralmediets sammensætning er ikke kritisk. Hütner's medium (se Cohen-Bazire et al. 1957 og den modificerede opskrift fra substratafdelingen) eller følgende kan anvendes:

NaCl	0,6 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,05 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,05 g
MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	0,01 g
CaCl <sub>2</sub>	0,01 g
i postevand	100 ml
pH indstilles til 7,0-7,4.	

Af det flydende medium aftappes ca. 5 ml i reagensglas ca. 150 x 13 mm. Ikke tilsåede kontrolglas er strengt nødvendige.

#### *Udførelse*

Inoculum tages fra en frisk renkultur på plade. Efter at filtrerpapiret i glasset er blevet fugtigt, så det klæber til glassets væg, tilsås det flydende medium ved at suspendere et moderat stort inoculum i væskeren, og en skrå-agar tilsås ved at inoculum spredes på overfladen af filtrerpapiret.

Da nær kontakt mellem bakterier og filtrerpapir er en forudsætning for enzyminduktionen, vil det måske også være en fordel at tilså det flydende medium ved at sprede inoculum på strimlen, inden den anbringes i glasset. Det vil af hensyn til aflæsningen være en fordel at råde over 2-3 glas, der kan undersøges successivt.

Glassene anbringes ved optimal væksttemperatur. Termofile clostridier kan kræve op til 45°C, cytophaga-arter vokser som regel bedst ved stuetemperatur.

#### *Aflæsning*

Prøverne aflæses dagligt i op til 30 dage, hvis cellulosespaltning ikke er konstateret forinden. Nedbrydningshastigheden kan variere fra få dage til 1 måned.

I de flydende medier med strikt aerobe bakterier vil cellulosespaltningen i typiske tilfælde vise sig ved, at filtrerpapirstrimlen går i to stykker, når glasset vippes, idet væksten og derfor cellulosespaltningen foregår i et smalt bælte svarende til substratoverfladen, så papiret knækker sammen, når spaltningen er tilstrækkelig vidt fremskreden. I andre tilfælde sker der en mere diffus spaltning resulterende i papirets omdannelse til en så blød masse, at det enten synker til bunds i glasset eller går i stykker ved berøring med en øsken eller pinçet. I et skråglas, hvor papiret ikke har mulighed for at knække eller synke sammen, påvises spaltningen ved at det er blevet så mørkt, at det meget let går i stykker ved skub eller træk. I tvivlstilfælde er det vigtigt at sammenligne skørheden af papiret i prøveglas og kontrolglas.

#### *Fortolkning*

Et knækket eller helt blødgjort stykke filtrerpapir er bevis for, at der har fundet en cellulosespaltning sted. I tilfælde, hvor spaltning ikke er helt oplagt, beror afgørelsen på en sammenligning med kontrollen. Fortsat inkubering af prøve- og kontrolglas med gentagne undersøgelser af papirets mørhedssgrad må anbefales i tvivlstilfælde.

## 5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ingen særlige.

## 6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

Da mange grupper af bakterier ikke er undersøgt systematisk for evne til cellulosespaltning, er nedenstående liste nødvendigvis ufuldstændig. Fra Bergey's Manual er medtaget de taxa, hvor det er anført at hydrolyse af cellulose eller carboxymetylcellulose er iagttaget, og hertil er føjet enkelte observationer fra specialliteraturen.

*Cytophaga*: nogle species.

*Sporocytophaga myxococcoides*

*Pseudomonas*: en enkelt stamme af *P. fluorescens*.

*Alcaligenes*: en enkelt stamme af *A. faecalis*.

*Serratia*: en enkelt stamme af *S. marcescens*.

*Bacteroides*: *B. ruminicola* og *B. succinogenes*.

*Butyrivibrio*: nogle stammer af *B. fibrisolvens*.

*Ruminococcus*: de fleste stammer.

*Bacillus*: svag aktivitet hos nogle stammer af *B. polymyxa*, *B. macerans* og *B. circulans*.

*Clostridium*: flere species (se 7. udg. i stedet for 8. udg. af Bergey's Manual).

*Cellulomonas*: alle stammer af eneste nu anerkendte species: *C. flavigena*; *I Bergey's Manual, 7. udg., flere andre species*.

*Eubacterium cellulosolvans*

*Streptosporangium rubrum*

*Micromonospora*: 7 af de 16 species spalter cellulose, men i nogle tilfælde langsomt.

## 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

I et klinisk-mikrobiologisk laboratorium vil prøven sjældent finde anvendelse, fordi de fleste isolater hører til bakteriegrupper, hvor cellulosespaltning efter vor nuværende viden ikke forekommer.

I sjældne tilfælde kan der være anledning til at undersøge en isoleret clostridieart eller en cytophaga-art. Da *Cellulomonas flavigena* kan forveksles med *Corynebacterium*, kunne der være grund til at anvende prøven på coryne-forme isolater, især hvis de er gult pigmenterede.

### 8. Referencer

- Berg, B., Hofsten, B. v. & Petterson, G.: Growth and cellulase formation by *Cellvibrio fulvus*. J. appl. Bact. 35: 201, 1972a.
- Berg, B., Hofsten, B. v. & Petterson, G.: Electronmicroscopic observations on the degradation of cellulose fibres by *Cellvibrio fulvus* and *Sporocytophaga myxococcoides*. J. appl. Bact. 35: 215, 1972b.
- Breuil, C. & Kushner, D.J.: Cellulase induction and the use of cellulose as a preferred growth substrate by *Cellvibrio gilvus*. Canad. J. Microbiol. 22: 1776, 1976.
- Bryant, M.P.: Bacterial species of the rumen. Bact. Rev. 23: 125, 1959.
- Child, J.J., Eveleigh, D.E. & Sieben, A.S.: Determination of cellulase activity using hydroxyethylcellulose as substrate. Canad. J. Biochem. 51: 39, 1973.
- Clausen, P.: Studien über anaerobe Zellulosebazillen unter besonderer Berücksichtigung der Züchtungstechnik. Zbl. Bakt. 2. Abt. 84: 20, 1931.
- Cohen-Bazire, G., Sistrom, W.R. & Stanier, R.Y.: Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulphur purple bacteria. J. cell. comp. Physiol. 49: 25, 1957.
- Han, Y.W. & Srinivasan, V.R.: Isolation and characterization of a cellulose-utilizing bacterium. Appl. Microbiol. 16: 1140, 1968.
- Hungate, R.E.: The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. Bact. Rev. 14: 1, 1960.
- Hutchinson, H.B. & Clayton, J.: On the decomposition of cellulose by an aerobic organism (*Spirochaeta cytophaga*, n.sp.). J. agricult. Sciences 9: 143, 1918.
- Iterson, G. van, jr.: De aantasting van cellulose door aerobe mikro-organismen. Koninklijke Akademie van Wetenschappen te Amsterdam. Verslagen der Afdeeling Natuurk. D1. XI: 807, 1903.
- Kaufmann, A., Fegan, J., Doleac, P., Gainer, C., Wittich, D. & Glann, A.: Identification and characterization of a cellulolytic isolate. J. gen. Microbiol. 94: 405, 1976.
- Kellerman, K.F. & McBeth, I.G.: The fermentation of cellulose. Cbl. Bakt. I. Abt. Orig. 34: 485, 1912.
- Lee, B.H. & Blackburn, T.H.: Cellulase production by a thermophilic *Clostridium* species. Appl. Microbiol. 30: 346, 1975.
- McBee, R.H.: The culture and physiology of a thermophilic cellulose-fermenting bacterium. J. Bact. 56: 653, 1948.
- Mitscherlich, E.: Über die Zusammensetzung der Wand der Pflanzenzelle. Bericht über die zur Bekanntmachung geeigneten Verhandlungen der Königl. Preuss. Akademie der Wissenschaften zu Berlin, 1850, p. 102.
- Omelianski, W.: Über die Gärung der Cellulose. Cbl. Bakt. II. Abt. 8: 225, 1902.
- Popoff, L.: Ueber die Sumpfgasgärung. Arch. ges. Physiol. 10: 113, 1875.
- Pringsheim, H.: Über den fermentativen Abbau der Cellulose. Z. physiol. Chemie 78: 266, 1912.
- Stanier, R.Y.: The cytophaga group: A contribution to the biology of myxobacteria. Bact. Rev. 6: 143, 1942.
- Tappeiner, H.: Untersuchungen über die Gärung der Cellulose insbesondere über deren Lösung in Darmkanale. Z. Biol. 20: 52, 1884.
- Thayer, D.W.: Facultative wood-digesting bacteria from the hind-gut of the termite *Reticulitermes hesperus*. J. gen. Microbiol. 95: 287, 1976.
- Winogradsky, S.: Études sur la microbiologie du sol. IV Mem. Sur la dégradation de la cellulose dans le sol. Ann. Inst. Pasteur 43: 549, 1929.

## Kapitel 25

# Pektinspaltningsprøver

Med disse prøver påvises bakteriers evne til at spalte pektinholdigt plantevæv.

### 1. Historisk indledning

Interessen for bakteriel pektinspaltning stammer dels fra den såkaldte ”rødnings”proces, som er første trin i fremstilling af hør og hamp, dels fra plantsygdommen ”fugtig råd” eller hvidbakteriose der angriber mange slags grøntsager (ordene ”røde” og ”råd” er begge gamle betegnelser for forrådnelse). Ved ”rødning” blev i ældre tid hør- og hampeplanterne nedlagt nogle uger i et vandløb dækket med slam, hvorved pektin og andre kitsubstanse opløstes, så taverne, dvs. cellulosefibrene, derefter kunne frigøres ved en mekanisk behandling. Forestillingen om at mikroorganismer kunne spille en rolle ved processen var tidligere fremsat, da Winogradsky (1895) sammen med sin elev, Fribes, i St. Petersborg udførte nogle opformeringsforsøg med hørplanter som substrat og fra kulturerne isolerede en anaerob sporedanner, der var i stand til at nedbryde pektinholdigt materiale, men ikke angreb cellulose. I 1904 blev disse forsøg bekræftet af Beijerinck & van Delden i Holland og af flere andre. Beijerinck isolerede to forskellige anaerobe sporedannere og udfældede af kulturerne et enzym, pektosinase, som bl.a. fremkaldte henfald af kartoffelskiver. Baseret på Beijerinck’s resultater gik man i hør- og hampe-industrien derefter over til at foretage rødningsprocessen i opvarmede tanke tilsat kulturer af de aktive sporedannere. Et eksempel på, at der stadig er bakteriologer der interesserer sig for rødningsprocessen, er Betrabet & Bhat’s arbejde fra Indien i 1958. Siden Winogradsky’s og Beijerinck’s dage er det vist, at også fakultativt anaerobe og strikt aerobe bakterier kan bidrage til rødning af hørplanter.

Påvisning af *Erwinia carotovora* som årsag til fugtig råd hos gulerødder og andre rodfrugter skyldes den amerikanske plantepatolog Jones (1901, 1905). Han arbejdede i Wisconsin sammen med plantepatologen Erwin F. Smith, som har givet navn til slægten *Erwinia*. Jones påviste bakteriernes pektinspalrende evne ved direkte inokulation af sterile gulerodsskiver. Her kan det

nævnes, at den franske læge Davaine, der ellers især er kendt for sine miltbrandundersøgelser, allerede i 1868 inoculerede plantevæv med bakterier og derved fremkaldte fugtig råd (cit. efter Clark 1961).

En anden amerikansk plantepatolog, Starr, angav i 1947 en ny metode til påvisning af pektinspaltning baseret på at et vækstsubstrat indeholdende en pektингel, der bliver flydende, hvis bakterierne danner pektinolytiske enzymer. Året efter viste han sammen med Burkholder, at også xanthomonader kan spalte pektin, og i 1967 undersøgte han sammen med Nasuno nærmere, hvilke pektinolytiske enzymer der forekommer i denne gruppe. I en oversigt fra 1972 har han givet en detailleret redegørelse for de pektinolytiske enzymer i slægten *Erwinia* (Starr & Chatterjee 1972).

Schneider (1912) var den første der undersøgte, om nogle af de i tarmkanalen forekommende bakterier havde evne til at spalte pektin, og senere har mange andre gentaget undersøgelsen (McCoy & Peterson 1928; Barker & Martin 1936; Kertesz 1940; Davis & Ewing 1964 og flere andre). Nogle undersøgelser på dette område var inspireret af brugen af revne, rå æbler (der er meget pektinholdige) som middel mod diarré (Steinhaus & Georgi 1941; Werch et al. 1942). Det samlede resultat var, at når der ses bort fra *Erwinia*, var der ingen bakterier i familien *Enterobacteriaceae* der spaltede pektin. En enkelt senere undersøger hævder dog, at *Klebsiella* af biotypen *oxytoca* og alle *Yersinia*-arter danner pektolytiske enzymer (van Riesen 1975, 1976).

Enkelte forfattere har i de seneste år særlig interesseret sig for pektinolyse blandt *Bacillus*-arter, hvoraf en del er positive (Ottow 1972; Steinigeweg & Ottow 1974; Lajudie & Dumanoir 1976).

Den biokemiske analyse gjorde i mange år kun langsomme fremskridt, men siden det i 1960 af Albersheim et al. blev vist, at nogle af de implicerede enzymer er lyaser, som fører til dannelsen af umættede galakturonider, har der tilsyneladende været en opblussen i interessen, og nyere metoder er taget i brug ved enzymundersøgelserne (se fx. Fuchs 1965; Hsu & Vaughn 1969; Nagel & Wilson 1970; Zucker & Hankin 1971; Davé & Vaughn 1971). Et fremskridt er muligvis også en ny metode til påvisning af pektinspaltning i det bakteriologiske laboratorium (Jayasankar & Graham 1970; Hankin et al. 1971). Pektin er her indlejret i en plade stivnet ved hjælp af agar (i tidligere anvendte substrater var det pektингelen selv, der tjente som geleringsmiddel), og spaltningen påvises ved at flyde pladen med cetavlon = cetyl-

trimethylammoniumbromid, hvorved uspalte pektin udfældes, så der dannes opklarede zoner omkring kolonier med pektinolytisk aktivitet.

## 2. Biokemisk baggrund

I naturen forekommer pektin i størst mængde i umodne frugter, især æbler, og desuden i rødder og rodknolde. Pektin er i plantevævet den intercellulære kitsubstans, som holder cellerne på plads i et bestemt mønster og bliver derved intimt forbundet med cellevæggernes cellulosefibre.

Kemisk er det en polymer af galakturonsyre-enheder bundet sammen med  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) glykosidbindinger, men desuden er et større eller mindre antal methylgrupper bundet i esterbinding til de frie carboxylgrupper.

I plantevæv er pektin vanduopløseligt, men i renset form er det delvis oploseligt og tåler dårligt autoklavering, især ved pH-værdier uden for neutralpunktet. Det er en karakteristisk egenskab ved pektin, at det i nærvær af calciumjoner går i forbindelse med stoffer, der indeholder hydroxylgrupper, og danner en fast gel. Denne pektingel er basis for frugtgeleér, hvor sukkeret leverer hydroxylgrupperne. Man kan forstærke de naturlige frugtsafters gelé dannende evne ved tilslætning af ekstra pektin, og som følge heraf er det opstået en pektinindustri, som også er leverandør af de produkter, der anvendes i laboratorierne. Den gelé dannende evne går tabt ved enzymatisk nedbrydning.

Det er tvivlsomt, om bakteriel pektinspaltning altid foregår på samme måde; i hvert fald ser det ud til, at forskellige bakterier kan have forskellige kombinationer af de indtil nu kendte enzymer, der falder i følgende 3 grupper (referencer, se historisk indledning):

- 1) Pektinmetylerase eller blot pektinesterase – tidligere kaldet ”pektase” – fraspalter methyl fra carboxylgrupperne, hvorved pektin bliver til pektinsyre, dvs. polygalakturonsyre.
- 2) Flere forskellige hydrolytiske polygalakturonaser eller pektatglykosidaser – tidligere kaldet ”pektinase” – som spalter glykosidbindinger enten tilfældige steder i kæden eller fra den reducerende ende, således at der danner galakturonsyre og/eller oligogalakturonider med forskelligt antal monomerer.
- 3) Flere forskellige polygalakturonatlyaser eller transeliminaser – også kaldet pektatlyase – som samtidig med spaltning af en glykosidbinding om-

danner et molekyle galakturonsyre til en umættet forbindelse ved eliminering af brintatomer.

Normal eller umættet galakturonsyre og normale eller umættede galakturonider udgør altså pektinets primære spaltningsprodukter. Nogle bakterier har enzymer til videre metabolisering af disse produkter. Det antages, at den umættede galakturonsyre spontant omdannes til 4-deoxy-L-threo-hexose-ulose-uronsyre, der ligesom normal galakturonsyre ender som 2-keto-3-deoxyglukonsyre, der efter fosforylering nedbrydes ad Entner-Doudoroff vejen.

Samspillet mellem disse 3 slags enzymer er ikke ganske klart, men det synes at gælde generelt, at pektatlyaseaktivitet forudsætter, at methylgrupperne er afspalte ved hjælp af pektinesterasen.

Alle de nævnte enzymer danner ekstracellulært. Polygalakturonase kræver sur reaktion (pH 4-6) både for at danner og fungere. Pektatlyase kræver ligeledes sur reaktion ved dannelsen, men aktiviteten er størst ved svag alkalisk reaktion.

Begge disse enzymer angives hyppigst som konstitutive, men hos nogle bakterier er i hvert fald lyasen inducerbar (*P. fluorescens*, *Bacillus pumilus* og *Cytophaga pectinovorum*).

Hos en *Aeromonas*-stamme er det vist, at den konstitutiv lyase i udalt grad er under katabolit repression næsten uanset hvilke stoffer, der anvendes som kulstof- og energikilde (Hsu & Vaughn 1969). Hvis det samme er tilfældet for andre arter, er det et spørgsmål, hvor mange af litteraturens oplysninger om manglende evne til pektinspaltning, man kan stole på.

Zucker & Hankin (1971) har vist, at der i kartofler findes en faktor, som synergistisk forstærker induktionen af lyaseenzymet hos en *Pseudomonas*-stamme og andre jordbundsbakterier. Der er ingen forklaring på mekanismen, men fænomenet er måske værd at erindre, hvis man planlægger undersøgelse af bakteriel pektinspaltning.

Både hydrolaser og lyaser kræver tilstedeværelse af calciumjoner.

De vigtigste metoder til biokemisk analyse af pektinspaltningsprocessen er viskometri, titrering af frie syregrupper, spektrofotometri og papirkromatografi, men disse prøver er for komplicerede til rutinebrug i bakteriologiske laboratorier. Her har man anvendt påvisning af ændring i pektinholdigt plantevæv, påvisning af ændring i pektinpræparaters fysiske tilstand og påvisning af spaltningsprodukter ved nedbrydning af et pektinpræparat.

### 3. Valg af metode

Diagnoseafdelingens erfaringer med pektinspaltnings er begrænset til en enkelt serie forsøg med nogle *Erwinia*-stammer, der blev inokuleret direkte på sterile gulerodsskiver. Tilsyneladende fungerede metoden godt, og også af litteraturen får man indtryk af, at den er velegnet, måske bedst hvis gulerods- eller kartoffelskiven anbringes i et flydende vækstmedium. Her bør man dog tænke på den mulighed, at der i det flydende substrat kan dannes kataboliter, som hæmmer dannelsen af de pektolytiske enzymer.

Af litteraturen fremgår, at prøver der er baseret på smeltning eller sammensynkning af en pektingel – enten som en søjle i et reagensglas eller som en lagkageplade med pektingelen øverst – ikke er ganske tilfredsstillende, hvad der muligvis hænger sammen med, at gelen let undergår forandringer ved den nødvendige steriliseringsproces. Mere lovende er tilsyneladende agarplader med indstøbt pektin, hvor senere flydning med et polysakkaridfældende reagens markerer, om spaltning har fundet sted.

Her vil vi nøjes med at beskrive den oprindelige metode med direkte inokulation af sterile skiver af rodfrugter – vi betegner den som Jones' metode (Jones 1901, 1905) uden at være helt sikre på, at han var den første, som brugte den. Samtidig vil vi dog gøre opmærksom på, at hvis man står over for en systematisk undersøgelse af bakteriegrupper, hvor der kan være grund til at undersøge for pektolytisk aktivitet, vil det være rimeligt at inkludere andre metoder, fx. Jayasanker & Graham's (1970), der også er beskrevet hos Hankin et al. (1971), eller andre af de i den nyeste litteratur beskrevne fremgangsmåder, fx. hos Ottow (1974) og Lajudie & Dumanoir (1976).

### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

#### *Jones' metode, dvs. direkte inokulering af sterile skiver af rodfrugter*

*Substrat:* Hos grønthandleren køber man – så vidt muligt friske – grøntsager, fx. gulerødder, radiser eller kartofler. Efter mekanisk rengøring af overfladen nedlægges materialet 2 minutter i 0,2%  $HgCl_2$  eller et andet desinfektionsmiddel for at dræbe bakterier på overfladen. Desinfektionsmidlet afskylles derefter grundigt. Rodfrugten udskæres steril i skiver, ca. 5 mm tykke, og anbringes i en steril petriskål med vandfugtet steril filterpapir i bunden.

*Udførelse:* Tilsåningen kan ske enten fra en renkultur på plade eller fra et flydende medium. I første tilfælde indgnides kulturmassen med en øsken på skivens overflade, i det andet tilfælde pådryppes overfladen nogle få dråber af kulturen. Inkubering sker ved bakteriernes optimumstemperatur.

*Afløsning:* Når der er kommet synlig vækst på overfladen, prøver man ved at trykke en øsken eller glasstav mod overfladen, om vævet er blevet blødt. Til sammenligning tjener en utilsættet skive. Kommer der ikke vækst, kan prøven ikke udføres med denne metodik, og man må evt. prøve at anbringe sterile stykker af rodfrugten i et flydende medium, hvor bakterierne kan vokse, og på samme måde prøve om plantevævet bliver mørkt og henfaldende.

*Fortolkning:* Forskellen mellem det normale hårde plantevæv og det ved pektinolyse blødgjorte, macererede væv er i typiske tilfælde så udtalt, at der ikke hersker tvivl om prøvens udfald.

## 5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ingen særlige.

## 6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

Fortegnelsen må tages med stort forbehold, både fordi mange bakteriegrupper endnu ikke har været undersøgt, og fordi de tidligere anvendte metoder muligvis ikke har været pålidelige. Nogle af de som positive anførte taxa er ikke anført som sådan i Bergey's Manual.

*Pseudomonas:* nogle stammer af *P. fluorescens* og *P. solanacearum* og muligvis stammer af flere andre species.

*Xanthomonas:* ca. halvdelen af de benævnte species.

*Aeromonas:* en enkelt stamme af *A. liquefaciens*.

*Klebsiella:* alle stammer af biotypen *oxytoca*.

*Yersinia*

*Erwinia:* *E. carotovora*, *E. chrysanthemi*, *E. salicis* og *E. rubrifaciens*.

*Streptococcus bovis* (isoleret fra rumen)

*Bacillus:* *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. polymyxa*, *B. macerans* og nogle stammer af andre species.

*Clostridium:* flere arter, men bortset fra *Cl. felsineum* ingen præcise data.

*Eubacterium:* nogle stammer af *E. cellulosolvens*.

*Streptomyces:* nogle stammer, men ingen præcise data.

## 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Plantepatologer bruger regelmæssigt prøven ved differentiering inden for slægten *Erwinia*, men i klinisk-bakteriologiske laboratorier anvendes den

meget sjældent. Efter nyere undersøgelser burde den måske bruges oftere, da den ser ud til at kunne være af værdi ved diagnostik af *Enterobacteriaceae*, *Bacillus*, *Clostridium* og muligvis flere andre grupper.

Før prøven kan få praktisk betydning i medicinsk bakteriologi, er det dog nødvendigt at finde frem til en egnet rutinemetode og derefter gennemføre systematiske undersøgelser af relevante bakteriegrupper.

## 8. Referencer

- Albersheim, P., Neukom, H. & Deuel, H.: Über die Bildung von ungesättigten Abbauprodukten durch ein pektinabbauendes Enzym. *Helv. chim. Acta* 43: 1422, 1960.
- Barker, F. & Martin, R.: Some observations of the iodophile microflora of the coecum of the rabbits; with special regard to the disintegration of cell-wall substances. *Zbl. Bakt. 2. Abt.* 96: 18, 1937.
- Beijerinck, M.W. & van Delden, A.: Sur les bactéries actives dans le rouissage du lin. *Arch. néerl. Sci. exactes et nat.* 9: 418, 1904.
- Betrabet, S.M. & Bhat, J.V.: Pectin decomposition by species of *Pseudomonas* and their role in the retting of malvaceous plants. *Appl. Microbiol.* 6: 89, 1958.
- Burkholder, W.H. & Starr, M.P.: The generic and specific characters of phytopathogenic species of *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 38: 494, 1948.
- Clark, P.F.: Pioneer Microbiologists of America. Univ. Winsconsin Press, 1961, p. 228.
- Davé, B.A. & Vaughn, R.H.: Purification and properties of a polygalacturonic acid *trans*-eliminase produced by *Bacillus pumilus*. *J. Bact.* 108: 166, 1971.
- Davis, B.R. & Ewing, W.H.: Lipolytic, pectolytic, and alginolytic activities of *Enterobacteriaceae*. *J. Bact.* 88: 16, 1964.
- Fuchs, A.: The *trans*-eliminative breakdown of Na-polygalacturonate by *Pseudomonas fluorescens*. *Antonie v. Leeuwenhoek* 31: 323, 1965.
- Hankin, L., Zucker, M. & Sands, D.C.: Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. *Appl. Microbiol.* 22: 205, 1971.
- Hsu, E.J. & Vaughn, R.H.: Production and catabolite repression of the constitutive polygalacturonic acid *trans*-eliminase of *Aeromonas liquefaciens*. *J. Bact.* 98: 172, 1969.
- Jayasankar, N.P. & Graham, P.H.: An agar plate method for screening and enumerating pectinolytic microorganisms. *Canad. J. Microbiol.* 16: 1023, 1970.
- Jones, L.R.: *Bacillus carotovorus* n.sp., die Ursache einer weichen Fäulnis der Möhre. *Cbl. Bakt. II. Abt.* 7: 12, 1901.
- Jones, L.R.: The cytolytic enzyme produced by *Bacillus carotovorus* and certain other soft rot bacteria. *Cbl. Bakt. II. Abt.* 14: 257, 1905.
- Kertesz, Z.I.: Pectic enzymes. V. The fate of pectins in the animal body. *J. Nutrition* 20: 289, 1940.
- Lajudie, J. & Dumanoir, V.C.: Recherche de l'activité pectinolytique chez le genre *Bacillus*. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 127 A: 423, 1976.
- McCoy, E. & Peterson, W.H.: The use of pectin in fermentation tests. *J. infect. Dis.* 43: 475, 1928.
- Nagel, C.W. & Wilson, T.M.: Pectic acid lyases of *Bacillus polymyxa*. *Appl. Microbiol.* 20: 374, 1970.

- Ottow, J.C.G.: Pectinolytic-, ureolytic-, and lecithinolytic activity as a diagnostic aid in the identification of species classified in the genus *Bacillus* Cohn. Zbl. Bakt. II. Abt. 127: 301, 1972.
- Riesen, V.L. von: Polypectate digestion by *Yersinia*. J. clin. Microbiol. 2: 552, 1975.
- Riesen, V.L. von: Pectinolytic, indole-positive strains of *Klebsiella pneumoniae*. Int. J. system. Bact. 26: 143, 1976.
- Schneider, E.C.: A nutrition investigation on the insoluble carbohydrates or marc of the apple. Amer. J. Physiol. 30: 258, 1912.
- Starr, M.P.: The causal agent of bacterial root and stem disease of guayule. Phytopathology 37: 291, 1947.
- Starr, M.P. & Nasuno, S.: Pectolytic activity of phytopathogenic xanthomonads. J. gen. Microbiol. 46: 425, 1967.
- Starr, M.P. & Chatterjee, A.K.: The genus *Erwinia*: enterobacteria pathogenic to plants and animals. Ann. Rev. Microbiol. 26: 389, 1972.
- Steinhaus, J.E. & Georgi, C.E.: The effect of pectin, galacturonic acid and alpha methyl galacturonate upon the growth of Enterobacteriaceae. J. infect. Dis. 69: 1, 1941.
- Steinigeweg, R. & Ottow, J.C.G.: Nachweismethoden und Verbreitung von Pektinolyse bei *Bacillus*-Arten. Z. allg. Microbiol. 14: 419, 1974.
- Werch, S.C., Jung, R.W., Day, A.A., Friedmann, T.E. & Ivy, A.C.: The decomposition of pectin and galacturonic acid by intestinal bacteria. J. infect. Dis. 70: 231, 1942.
- Winogradsky, S.: Sur le rouissage du lin et son agent microbien. C.R. Acad. Sci. (Paris) 121: 742, 1895.
- Zucker, M. & Hankin, L.: Inducible pectate lyase synthesis and phytopathogenicity of *Pseudomonas fluorescens*. Canad. J. Microbiol. 17: 1313, 1971.

## Kapitel 26

### Prøve for 3-ketolaktosedannelse

Prøven påviser omdannelse af laktose til 3-ketolaktose, en omdannelse som skyldes enzymet hexopyranosid:cytokrom c oxidoreduktase.

#### 1. Historisk indledning

To belgiske biokemikere, Bernaerts og de Ley, har angivet denne prøve i 1963. Især de Ley har i mange år interesseret sig både for bakteriers kulhydratstofskifte og for resultaternes udnyttelse i bakterieklassifikationen. I 1958 opdagede de, at to bakterier isoleret fra flodvand var i stand til at omdanne disakkiderne laktose og maltose til stærkt reducerende forbindelser, som de identificerede som henholdsvis 3-ketolaktose og 3-ketomaltose (Bernaerts & de Ley 1960a, b). De to bakterier blev tentativt identificeret som hørende til slægten *Alcaligenes*, men da systematisk undersøgelse for produktion af 3-ketolaktose af et stort antal kendte arter viste, at *Agrobacterium tumefaciens* og *Agrobacterium radiobacter* var de to eneste arter, som var i stand til at fremkalde denne omdannelse, sluttede de med god grund, at flodvandsisolaterne også var agrobakterier (Bernaerts & de Ley 1963).

Da påvisning af 3-ketolaktose kan udføres på simpel måde ved hjælp af Fehling's væske, og da *Agrobacterium tumefaciens* er en plantepatogen bakterie af økonomisk betydning, som det hidtil kun har været muligt at identificere med sikkerhed ved langvarige inokulationsforsøg på planter, foreslog de i 1963 en 3-ketolaktose test, der kunne anvendes som en hurtig prøve til identifikation af *A. tumefaciens* og *A. radiobacter* (det er sandsynligt, at den plantepatogene art *A. tumefaciens* er en plasmidbærende variant af den ikke-patogene *A. radiobacter*).

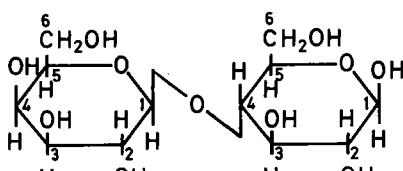
Senere undersøgelser (Hendrie et al. 1964; Beaud & Manigault 1966; Lautrop 1967; Kersters et al. 1973; Riley & Weaver 1977) har bekræftet, at med få undtagelser giver *A. tumefaciens* og *A. radiobacter* altid en positiv 3-ketolaktoseprøve. Andre, fx. Grebner et al. (1964), Kern (1966) og Clark (1969) har sat spørgsmålstegn ved, om disse bakterier er de eneste, der giver en positiv reaktion, men de har undersøgt så få stammer, at man må afvente yder-

ligere undersøgelser. I diagnoseafdelingen har Brita Bruun (upubliceret) fundet nogle 3-ketolaktose-positive stammer i et større materiale af såkaldt *Flavobacterium*, men den taxonomiske betydning af dette fund er endnu uafklaret.

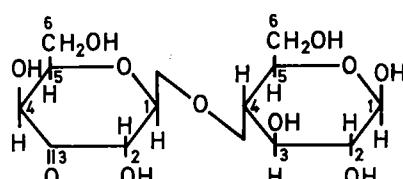
Da Bernaerts & de Ley i 1958 påviste 3-ketoglykosiderne, var disse glykosider så godt som ukendte. De har siden i fødevareindustrien fået en vis betydning som antioxiderende midler, og nu fremstilles de industrielt (Tyler & Nakamura 1971).

## 2. Biokemisk baggrund

Disakkaridomdannelsel indledes hyppigst med en spaltning af glykosidbindingen, så monosakkariderne friges, men der kendes to eksempler på omdannelsel, som sker uden at glykosidbindingen spaltes. Det ene er omdannelsel af disakkaridet til de tilsvarende bionsyrer, og det andet er omdannelsel til de tilsvarende 3-ketoglykosider.



LAKTOSE



3 - KETOLAKTOSE

Efter ovenstående formler for laktose og 3-ketolaktose kan man se, at ændringer i disakkaridet sker ved C<sub>3</sub> atomet i glykosyldelen, og at ændringen består i en oxidation (fjernelse af to brintatomer), således at der på dette sted dannes en ketogruppe; heraf fremgår navnet 3-ketolaktose.

Den mest karakteristiske egenskab ved 3-ketolaktose er en meget kraftig reducerende evne, så kraftig at Fehling's eller Benedict's væske reduceres ved almindelig temperatur, mens de reducerende sukkerarter ellers kræver opvarmning af blandingen for at reduktion skal foregå.

Denne kraftige reducerende evne udnyttes til at påvise, om omdannelsen af laktose til 3-ketolaktose har fundet sted, idet man flyder den laktoseholdige plade, hvor reaktionen foregår, med et tyndt lag Benedict's reagens.

Det er en alkalisk kobbersulfatopløsning i natriumcitrat, der holder kobberjonerne i opløsning, mens Fehling's væske er alkalisk kobbersulfat i en kaliumnatriumtartratopløsning. Hvis der er 3-ketolaktose til stede, vil kobberjonerne i reagenset udskilles som kuprioxyd ( $Cu_2O$ ), der er et rødligt stof, og på den blå baggrund, som skyldes det kobbersulfatholdige reagens, vil udfældet kuprioxyd vise sig som en gul plet svarende til det område, hvor der er dannet 3-ketolaktose.

Bernaerts & de Ley (1960a, b) viste, at der kan dannes 3-ketoglykosider af både laktose og maltose og desuden af laktobionsyre og maltobionsyre, men prøven er baseret på laktose, fordi det er let tilgængeligt modsat bionsyrene, og fordi der af maltose kun dannedes små mængder 3-ketomaltose. Tyler & Nakamura (1971) har senere vist, at ved industriel fremstilling af 3-ketoglykosider giver maltose et godt udbytte. Fukui & Hochster har i 1965 påvist dannelse af 3-ketosakkarose ud fra sakkarose.

De Ley & van Beeuman (1966) har renfremstillet den dehydrogenase, der katalyserer omdannelsen. Det er et flavoenzym kaldet hexopyranosid: cyto-krom c oxidoreduktase. Det fremgår ikke, om enzymet er adaptivt, men ved prøvens udførelse er cellerne i kontakt med laktosen i 48 timer, før reagenset tilsættes. Bernaerts & de Ley (1967) viste, at reaktionsforløbet er ret upåvirket af pH værdien i mediet inden for grænserne pH 6-8. De mener, at et medium uden buffer med pH 6,5-6,7 er lidt bedre end et medium med fosfatbuffer, fordi der er vanskeligheder ved sterilisering af laktoseholdige medier med buffer. Ved pH over 7,5 sker der nogen nedbrydning af 3-ketolaktosen. Agrobakterierne, der giver en positiv 3-ketolaktoseprøve, vil ofte samtidig udføre en spaltning af glykosidbindingen, så der også dannes glukose og galaktose. Hos Tyler & Nakamura (1971) finder man data af relevans for maximumproduktion af 3-ketomaltose, og formodentlig har disse data også betydning for forståelse af optimale betingelser for udførelse af 3-ketolaktose-prøven, selv om produktionen er baseret på en voksende kultur, mens prøven repræsenterer et hvilende system. De lægger vægt på, at pH holdes mellem 6,5 og 7,5; de finder, at en temperatur på 28°C er gunstig modsat en temperatur på 35°C, og de anbefaler urinstof som kvælstofkilde og opnår herved samtidig den fordel, at pH holder sig mellem 7,0 og 7,5 uden buffer. De finder maximal ophobning efter 18-20 timer og derefter gradvis svind af 3-ketomaltosen.

### 3. Valg af metode

Der er foreløbig ikke store valgmuligheder. Clark (1969) angiver hvad han kalder en modifieret og forbedret 3-ketolaktosetest, men da man af artiklen ikke kan se, hvori forbedringen består, og substratmodifikationen væsentligst udgøres af en højere koncentration af gærestrakt (0,5% i stedet for 0,1%) og tilslætning af 1% CaCO<sub>3</sub>, er der i øjeblikket ikke grund til at afvige fra Bernaerts & de Ley's oprindelige metode.

### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

*Bernaerts & de Ley's 3-ketolaktoseprøve (1963)*  
*Substrater*

*Vækstsubstrat*

Difco gærestrakt	1 g
Glukose	2 g
CaCO <sub>3</sub>	2 g
Agar	1,5-2,0 g
Dest. vand	100 ml

Ophældes som skrå-agar.

*Reaktionssubstrat*

Difco gærestrakt	0,1 g
Laktose	1,0 g
Agar	2 g
Dest. vand	100 ml

Ophældes i Petriskål.

*Reagens*

Benedict's reagens som består af:

Natriumcitrat	17,3 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , anhyd.	10,0 g
CuSO <sub>4</sub> ,5 H <sub>2</sub> O	1,73 g
Dest. vand	100 ml

*Udførelse*

En skrå agar indeholdende vækstmediet tilsås fra en frisk renkultur, så størstedelen af substratoverfladen dækkes. Skrålasset inkuberes ved 25–30°C i 1–2 dage. 1 dag er tilstrækkeligt, hvis der fra glasset kan høstes to store øskensfulde.

Den høstede kulturmasse overføres umiddelbart til reaktionssubstratet, hvor det placeres som en lille forhøjning stablet så højt som muligt på et areal, der ikke er over  $\frac{1}{2}$  cm i diameter. Der kan på denne måde undersøges 4–6 stammer i en lille Petriskål.

Reaktionsmediet med påsat kultur henstilles ved 28–30°C i 1–2 dage, inden reagenset påhældes. Da vi ingen sikker viden har om den optimale tid for reaktionens forløb, kan det anbefales at fremstille to plader og flyde den ene med reagens efter 24 timer og den anden efter 48 timer.

Princippet i prøven svarer nærmest til det velkendte i en direkte enzymtest, hvor de aktive celler produceres på vækstmediet og derefter overflyttes til kontakt med enzymsubstratet (laktose) på reaktionsmediet. Grunden til at enzymsubstratet findes i en plade i stedet for i opløsning i et reagensglas er bl.a., at man derved på en nem måde opnår den rigelige tilgang af luftens ilt, som processen kræver.

Før reagenset sættes til reaktionspladen kan det af hensyn til aflæsningen være hensigtsmæssigt at fjerne kulturmassen fra pladens overflade ved hjælp af en podepind med vat. Benedict's reagens kan påhældes direkte fra flasken og skal ligge i et tyndt lag (ca. 1–2 mm) ud over hele overfladen. Pladen skal henstå med reagenset i mindst 1 time ved stuetemperatur, inden den endelige aflæsning finder sted.

*Aflæsning:* Der observeres for fremkomst af grøngule til gule pletter i den af reagenset blåfarvede plade. Farveomslaget ved positiv reaktion indtræder gradvis; det begynder svarende til de steder, hvor kulturmassen har været anbragt og breder sig koncentrisk udefter, så pletterne kan blive flere centimeter i diameter. I begyndelsen er farven grøngul, men som regel bliver den mere og mere gul. Pletternes afgrænsning mod det omgivende medium står ikke som en skarp rand, men farven toner gradvis over i den blå baggrundsfarve. Afhængigt af reaktionens styrke kan det være kortere eller længere tid, inden pletterne dukker frem; efter ca. 20 minutter vil man i næsten alle tilfælde kunne se, om en reaktion vil blive positiv, men styrken vil som regel tiltage yderligere efter dette tidspunkt. Ret arbitrart er 1 time sat som grænse for den endelige aflæsning.

*Fortolkning:* Alle tydelige pletter fremkommet efter 1 time er, uanset deres størrelse og farvenuance, udtryk for en positiv reaktion. Man kan naturligvis gradere styrken efter pletternes diameter, men nogen diagnostisk betyd-

ning har det så vidt vides ikke. Pletter, der er så svagt antydet, at man er i tvivl om fortolkningen, må kunne forekomme. Et nyt forsøg med en større cellekoncentration på pladen kan anbefales i et sådant tilfælde.

### 5. Sikkerhedsforanstaltninger

Benedict's reagens er dels ætsende på grund af dets alkali-indhold og dels giftigt på grund af dets indhold af kobbersulfat. Kobbersulfat er også en bakteriegift og vil antagelig dræbe alle bakterier på reaktionspladen, således at infektionsrisikoen er væk fra det øjeblik reagenset er hældt på.

### 6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

Af den historiske indledning fremgår, at prøven endnu er så ny, at der mangler en systematisk afprøvning af mange bakteriegrupper. Hvad man indtil nu med sikkerhed ved, er, at næsten alle stammer af *Agrobacterium radiobacter* og *A. tumefaciens* giver en positiv reaktion. De ketolaktose-positive "flavobakterier", der er fundet i diagnoseafdelingen, er ikke altid gule; de er udtalt sakkarolytiske, og det kan ikke udelukkes, at de hører hjemme i slægten *Agrobacterium*. I slægten *Alcaligenes* eller, som nogle siger, *Achromobacter*, der vil kunne give anledning til forveksling med agrobakterier ved en overfladisk undersøgelse, har man hidtil ikke fundet arter, som giver en positiv 3-ketolaktoseprøve.

### 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Prøven er først og fremmest af praktisk værdi for jordbundsbakteriologer og plantepatologer, men da agrobakterier undertiden også findes i kliniske prøver og som nævnt kan ligne *Alcaligenes*, kan prøven i sjældne tilfælde også være nyttig i det klinisk-bakteriologiske laboratorium. Her er det vigtigt at vide, dels at enkelte stammer af *A. radiobacter* og *A. tumefaciens* er negative,, dels at *A. rhizogenes*, der også er fundet i kliniske prøver, altid er negativ, hvis prøven udføres som her beskrevet (Lautrop 1967; Kesters et al. 1973).

**8. Referencer**

- Beaud, G. & Manigault, P.: Propriétés physiologiques de différentes souches d'*Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Town) Conn. Ann. Inst. Pasteur 111: 345, 1966.
- Bernaerts, M.J. & Ley, J. de: Microbiological formation and preparation of 3-ketoglycosides from disaccharides. J. gen. Microbiol. 22: 129, 1960a.
- Bernaerts, M.J. & Ley, J. de: The structure of 3-ketoglycosides formed from disaccharides by certain bacteria. J. gen. Microbiol. 22: 137, 1960b.
- Bernaerts, M.J. & Ley, J. de: A biochemical test for crown gall bacteria. Nature (Lond.) 197: 406, 1963.
- Bernaerts, M.J. & Ley, J. de: Mechanism of the 3-ketolactose test for *Agrobacterium*. Arch. Mikrobiol. 56: 81, 1967.
- Clark, A.G.: A selective medium for the isolation of *Agrobacterium* species. J. appl. Bact. 32: 348, 1969.
- Fukui, S. & Hochster, R.M.: On the active transport of sucrose and of 3-ketosucrose in *Agrobacterium tumefaciens*. Cand. J. Biochem. 43: 1129, 1965.
- Grebner, E.E., Durbin, R. & Feingold, D.S.: Formation of  $\beta$ -D-fructofuranosyl- $\alpha$ -D-ribohexopyranoside-3-ulose by a *Micrococcus* sp. Nature (Lond.) 201: 419, 1964.
- Hendrie, M.S., Hodgkiss, W. & Shewan, J.M.: Considerations on organisms of the *Achromobacter-Alcaligenes* group. Ann. Inst. Pasteur Lille 15: 43, 1964.
- Kern, H.: Zum Nachweis der Virulenz bei *Agrobacterium tumefaciens*. Arch. Microbiol. 53: 92, 1966.
- Kersters, K., Ley, J. de, Sneath, P.H.A. & Sackin, M.: Numerical taxonomic analysis of *Agrobacterium*. J. gen. Microbiol. 78: 227, 1973.
- Lautrop, H.: *Agrobacterium* spp. isolated from clinical specimens. Proc. XV. Scand. Congr. Path. Bact. Copenhagen, June 19-22, 1967. Acta path. microbiol. scand. Suppl. 187: 63, 1967.
- Ley, J. de & van Beeumen, J.: The aldo-hexose dehydrogenase from *Agrobacterium*. IX. Int. Congr. Microbiol. Moscow, July 24-30, 1966 (Abstracts).
- Riley, P.S. & Weaver, R.E.: Comparison of thirty-seven strains of Vd-3 bacteria with *Agrobacterium radiobacter*: Morphological and physiological observations. J. clin. Microbiol. 5: 172, 1977.
- Tyler, D.D. & Nakamura, L.K.: Conditions for production of 3-ketomaltose from *Agrobacterium tumefaciens*. Appl. Microbiol. 21: 175, 1971.

## Kapitel 27

# Prøver for dextran- og levandannelse

Prøver der påviser de bakterielle enzymer levansukrase og/eller dextransukrase, som i sakkaroseholdige medier fører til dannelse af polysakkariderne levan og/eller dextran.

### 1. Historisk indledning

Studiet af såkaldte viskøse gæringer karakteriseret ved dannelse af slim- eller gummiagtige stoffer går tilbage til begyndelsen af 1800-tallet. At de skyldes mikroorganismer, blev først hævdet af Pasteur (1861) og senere af Jubert (1874) og Mendes (1875), som særligt beskæftigede sig med deres forekomst i sukkerraffinaderier, hvor man hyppigt var generet af disse slimmasser, som tilstoppede filtre og rørledninger (cit. efter van Tieghem 1878). I 1874 havde Scheibler vist, at slimen i sukkerfabrikkerne bestod af polysakkaridet dextran (cit. efter van Tieghem 1878), og i 1878 isolerede Cienkowski i Lenigrad og van Tieghem i Paris uafhængigt af hinanden den skyldige bakterie, som af van Tieghem fik navnet *Leuconostoc mesenteroides* (van Tieghem 1878). Bakterierne var omgivet af store slimkapsler, så de i mikroskopet lignede en klump frøæg; deraf kommer det tyske navn Froschlaichpilz. Liesenberg & Zopf (1892) var de første, som arbejdede med renkulturer af *L. mesenteroides*, og de viste, at når bakterierne dyrkes på sakkarosefri medier, dannes der ikke slimkapsler, og de ligner da almindelige streptokokker.

Det andet polysakkarid, levan, er først beskrevet af kemikeren Lipmann i 1881 (cit. efter Harrison et al. 1930), og i 1901 isolerede og beskrev Greig Smith i Australien fra rørsukker en polysakkariddannende *Bacillus*, hvor slimen blev identificeret som levan (Steel 1901).

I 1912 publicerede Beijerinck et grundlæggende arbejde om levan- og dextrandannelse hos bakterier. Han viste, at der var flere forskellige *Bacillus*-arter, som dannede levan, og beskrev en ny dextrandannende bakterie, *Lactococcus dextranicus*, senere omdøbt til *Leuconostoc dextranicum*. Han fastslag, at sakkarose og raffinose var de eneste blandt de almindeligt forekommende kulhydrater, som gav anledning til levan- og dextrandannelse, og han

beskrev med mange detailler de forskellige sakkarosekulturers udseende. Deraf mente han bl.a. at kunne udlede, at dextranenzymet altid er cellebundet, mens levanenzymet også forekommer i fri, diffusibel form, hvilket medfører, at der på en sakkaroseholdig plade kan optræde kolonilignende slimhobe, der ikke indeholder bakterier. I flydende medier med dextran og levan iagttog han en tydelig opalescens.

De første polysakkariddannende bakterier af human oprindelse er beskrevet af Hlava i Prag (1902). Han fandt, at der i svælggodninger både fra syge og sunde hyppigt fandtes bakterier, som dannede store slimkapsler når de dyrkedes på sakkaroseholdige plader. Jeppe Ørskov på Seruminstittuttet (1930) og Ørskov & Poulsen (1931) genopdagede de dextrandannende bakterier fra svælget, og i forlængelse af disse arbejder viste F.E. Koch (1933/34, 1935), at de fandtes i den normale mundflora. Hlava betegnede sine bakterier som *Leuconostoc hominis*, mens Ørskov regnede sine til streptokokkerne. Koch mente ikke, der var så stor forskel mellem mundhulestammerne og de fra sukkertfabrikkerne kendte stammer, at de burde henregnes til forskellige slægter. En afklaring på dette punkt var dog allerede sket takket være en meget grundig undersøgelse af Hucker & Pederson (1930), der viste, at *Leuconostoc* var forskellig fra både streptokokker og lactobaciller, og at der trods de mange beskrevne arter i litteraturen under forskellige navne kun var to forskellige arter af *Leuconostoc* karakteriseret ved dextrandannelse: *L. mesenteroides* og *L. dextranicum*.

Inspireret af Ørskovs arbejder opdagede Niven og hans medarbejdere i 1941, at de hyppigt forekommende svælgstreptokokker, som dannede mucoide kolonier på sakkaroseplader var den tidligere beskrevne *Streptococcus salivarius*. Ved samme lejlighed blev det vist, at en enkelt stamme af *S. bovis* havde samme egenskab (Niven et al. 1941a, b; Sherman et al. 1943). Da man lidt senere gik over til at undersøge for dextran- og levandannelse i flydende medier, viste det sig, at mange flere bovisstammer var dextrandannende, og at det samme gjaldt nogle stammer af *S. mitis* (senere har disse dextrandannende stammer fået betegnelsen *S. mitior*) og en ny endocarditis fremkaldende art, *S. sanguis*, der var identisk med nogle tidligere undersøgte gruppe H streptokokker (Niven & White 1946; Niven et al. 1946; White & Niven 1946; Hehre & Neill 1946; Niven et al. 1948). Langt senere er det vist, at også *Streptococcus mutans* hører til de polysakkariddannende streptokokker.

I samme tidsrum klargjordes en lang række forhold vedrørende streptokop-polysakkariderne dannelse og egenskaber, især takket være arbejder af Hehre og hans medarbejdere i USA. Det blev først vist, at levan og dextran var antigene og kunne påvises og skelnes serologisk, hvilket i høj grad lettede undersøgelserne. Enzymaktiviteten i cellefri suspensioner blev påvist og syntesens

biokemi klarlagt. Det blev endvidere vist, at hverken dextran eller levan var et i fysisk-kemisk henseende enkelt veldefineret stof, men at hvert af dem omfattede flere varianter med noget vekslende egenskaber, afhængigt af den anvendte stamme og dyrkningsbetingelserne, og at nogle arter, som fortrinsvis producerede den ene polymer, samtidig dannede små mængder af den anden. Den begunstigende indflydelse anaerobiose og/eller  $\text{CO}_2$ -tilsætning har på polysakkariddannelsen hos nogle arter af streptokokker blev også påvist og forklarede diskrepansen mellem undersøgelser udført på plade og i flydende kultur (se Hehre et al. 1945; Hehre 1946; Hehre & Neill 1946; Dain et al. 1956; Baily & Oxford 1958).

I 1959 foretog Fuchs i Leyden en større undersøgelse over forekomsten af levandannelse hos bakterier. Blandt 25 forskellige genera var 10 i stand til at danne levan. Særlig hyppig var forekomsten i slægten *Pseudomonas*, hvor dels *P. fluorescens* dels mange plantepatogene arter var positive, et resultat som senere er bekræftet af Jessen (1965) og Stanier et al. (1966). Andre arbejder, der rapporterer om levan- og dextrandannende bakterier, er Jeanes et al. (1954), Hestrin (1962), Sutherland (1972) og Sidebotham (1974).

Påvisning af mucoide kolonier på sakkaroseagar er i sig selv ikke tilstrækkelig evidens for, at en stamme danner levan eller dextran; polysakkaridet må analyseres nærmere. Fx. angav Sutherland, at en bestemt *Xanthomonas* dannede levan, men senere er det vist, at der er tale om et hetero-polysakkarid (Stanier et al. 1976). Flere *Neisseria*-arter danner også polysakkarid på en sakkaroseplade (Berger 1963), og analysen viser, at det udelukkende består af glukosemolekyler ligesom dextran, men da jodprøven er positiv hører stoffet til stivelses-glykogengruppen. Skønt påvisningen af dette polysakkarid udnyttes diagnostisk, kan undersøgelsen ikke regnes blandt levan- og dextran-prøverne.

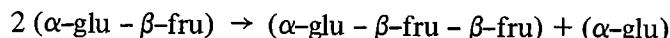
Dextran har fundet anvendelse på forskellig måde og produceres derfor industrielt. Dels anvendes det siden 1944 som en bestanddel af transfusionsvæsker, dels benyttes det ved søjlekromatografi (fx. Sephadex) til adskillelse af stoffer med forskellig molekylvægt. Talrige studier af disse stoffer og deres dannelsesiden 1960'erne udsprunget af arbejdet med at finde årsagen til tandsygdommen caries. Dannelsen af såkaldte plaque på tænderne anses nu for at være udgangspunkt for caries, og det er vist, at plaquedannelsen øjensynlig er knyttet til bakteriernes evne til at danne levan eller dextran. Interessen har særlig samlet sig om de to streptokokarter *S. mutans* og *S. sanguis* og bakterien *Actinomyces viscosus*, som også er dextrandanner (se fx. Gibbons & Banghart 1967; Facklam 1974; Montville et al. 1977 og Warner og Miller 1978).

## 2. Biokemisk baggrund

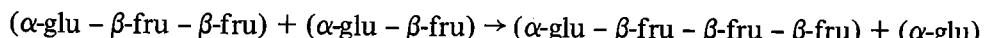
De kapsler eller den ekstracellulære slim, som mange bakterier danner, er næsten alle polysakkarkerider. De fleste er heteropolysakkarkerider, dvs. de indeholder to eller flere forskellige monosakkarkerider bygget sammen på en måde, som er karakteristisk for hvert polysakkakrid. Heteropolysakkarkerider syntetiseres under energiforbrug af cellens normale metaboliske apparat og er stort set uafhængige af, hvilke kulhydrater der er til stede i vækstsubstraterne.

De to polysakkarkerider dextran og levan dannes på en hel anden måde og er desuden såkaldte homopolysakkarkerider, dvs. lange kæder opbygget af kun én slags monosakkarkerider, dextran af glukosemolekyler og levan af fruktosemolekyler. Dannelsen er for det første betinget af tilstedeværelsen af et specielt enzym – dextransukrase eller levansukrase – for det andet af at der i vækstsubstratet findes sakkarose eller raffinose, da ingen andre kulhydrater kan danne udgangspunkt for syntesen. Det er et særligt og usædvanlig træk, at syntesen sker uden energiforbrug; forklaringen herpå er, at den energi som findes bundet i sakkarosens glykosidbinding, umiddelbart kan overføres til den ny glykosidbinding, som skal dannes hver gang der under syntesen føjes et nyt led til kæden. Denne syntesemekanisme forklarer, hvorfor monosakkarkerider ikke kan være udgangspunkt for syntesen: de mangler den glykosidbinding energien skal tages fra. Det forhold, at dextran og levan kun dannes i sakkaroseholdige medier, men ikke i glukose- eller fruktoseholdige, er af praktisk betydning, da det herved bliver muligt på en nem måde at skelne dem fra heteropolysakkarkerider, som vil kunne dannes på begge slags medier. Man skal dog ikke overse muligheden for, at en given stamme foruden levan eller dextran kan danne et heteropolymer eller glemme, at *Neisseria*-stammernes slimdannelse også specielt er betinget af tilstedeværelsen af sakkarose.

Syntesen af fx. levan kan illustreres ved hjælp af følgende formler, idet sakkarose som består af  $\alpha$ -glukose +  $\beta$ -fruktose, skrives som ( $\alpha$ -glu- $\beta$ -fru). Først omdannes 2 molekyler sakkarose af enzymet levansukrase til den begyndende kæde ved at fruktosedelen af det ene molekyle kobles til fruktosedelen af det andet, mens den tiloversblevne glukosedelen frigøres:



Næste trin i syntesen foregår på samme måde ved at fruktosedelen af et nyt sakkarosemolekyle overføres til kæden, mens glukosedelen frigøres som glukose:



Af disse formler kan man se, at det ikke er helt korrekt at betragte levan som en polymer udelukkende bestående af fruktoseenheder; der vil nemlig altid være et enkelt terminalt glukosemolekyle. Ved dextransyntese dannes efter samme mønster kæder af sammenkoblede glukoseenheder med en enkelt terminal fruktoseenhed, mens der i øvrigt frigøres frie fruktosemolekyler (se Stanier et al. 1976).

Bindingerne i levanets hovedkæde er altid (2→6) og i dextranets (1→6), men fra begge slags hovedkæder vil der som regel afgå kortere eller længere sidegrene fra bestemte positioner, så det enkelte polysakkarid indeholder et varierende antal af andre bindinger. Dette forhold har bl.a. været udnyttet til karakteristik af forskellige dextraner (Jeanes et al. 1954). Kædelængden er stærkt varierende, dels stammebestemt dels miljøbestemt. I dextran varierer molekylvægten fra 15.000 til 20.000.000. I vandig opløsninger vil kæderne indgå i et tredimensionalt netværk, som bestemmer karakteren af den gel, som dannes, og stoffets større eller mindre vandopløselighed (Sidebotham 1974). Dextran og levan er optisk aktive, dvs. i stand til at dreje polariseret lys, og navnene er afledt af denne drejningsevne, idet levan drejer det polariserede lys til venstre (lat. levo = venstre), og dextran drejer det til højre (lat. dextra = højre).

Dextran- og levansukrase hører til enzymgruppen glycosyltransferase, som generelt medvirker til at overføre en kulhydrat-monomer fra et bestemt donormolekyle til et andet bestemt acceptormolekyle. Da samme enzym kan formidle overførelsen mellem forskellige donorer og acceptorer, er forløbet i et givet system ret uoverskueligt. Dette kan være forklaringen på, at enzymprodukterne ikke er ens i alle detailler, men uensartetheden kunne også skyldes, at de enkelte bakterier indeholder et kompleks af enzymer med lidt varierende affinitet for bestemte donorer og acceptorer.

Enzymerne kan findes dels ekstracellulært dels bundet til cellerne, og de kan være adaptive eller konstitutive (Fuchs 1959). Det første forhold påvirker koloniernes udseende på faste substrater, som allerede bemærket af Beijerinck; men for koloniudseendet spiller det også en rolle, om bakterierne samtidig danner levan- og dextranspaltende enzymer, hvilket kan være tilfældet både hos *Pseudomonas* og *Bacillus* (Fuchs 1959). Helt nye iagttagelser synes at vise, at enzymaktiviteten øges i nærvær af fosfoglycerider, specielt lysofosfatidylkolin, en iagttagelse som også er gjort med andre membranbundne enzymer (Harlander & Schachtele 1978). Både pH- og temperaturopimum for syntesens forløb varierer meget i forskellige systemer.

Til kvantitativ bestemmelse af enzymaktiviteten anvendes i biokemiens for dextransukrases vedkommende titrering af den frigjorte fruktosemængde i reaktionsblandingens. Bestemmelse af levansukraseaktivitet er kompliceret

af, at der samtidig med syntesen altid sker hydrolytisk spaltning af en vis mængde sakkarose, hvorfor det er nødvendigt først at udfælde den dannede levan med alkohol og derpå efter syrehydrolyse at bestemme fruktosemængden. Semikvantitative metoder er baseret på påvisning af viskositetsændringer, opalescens, serologisk aktivitet og forekomst af alkoholpræcipiterbart materiale. Til kvalitativ påvisning i bakteriologien nøjes man med kulturernes udseende (mucoid vækst på plader og geldannelse i flydende kulturer) eller dannelsen af et alkoholpræcipitat i flydende kulturer.

### 3. Valg af metode

En sakkaroseholdig bouillonagarplade, hvor kulturens mucoide karakter umiddelbart kan erkendes, er velegnet og tilstrækkelig ved undersøgelse af stammer af *Leuconostoc*, *Bacillus* og *Pseudomonas*.

Ved undersøgelse af streptokokker anvender man serumagar tilsat 5% sakkarose inkuberet både i almindelig atmosfære og under anaerobe forhold med tilslætning af ekstra CO<sub>2</sub>. Desuden anvendes et flydende sakkarosemedium, hvor dels kulturens udseende og konsistens dels fældning med alkohol i to forskellige mængdeforhold kan give oplysning om, hvorvidt polysakkaridet er levan eller dextran. Metodebeskrivelsen omfatter tre procedurer, nemlig anvendelse af:

- (1) Bouillonagarplade med 5% sakkarose
- (2) Serumagarplade med 5% sakkarose
- (3) Acetat-bufferet bouillon med 8,5% sakkarose

### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

*Metode (1): Bouillonagarplade med 5% sakkarose, især til undersøgelse af pseudomonader*

*Substrat:* Den sædvanlige bouillonagar tilsat 5% sakkarose og en tilsvarende kontrolplade tilsat 5% glukose.

*Udførelse:* Tilsåning med ca. 24 timer gammel renkultur på en sådan måde, at der dannes enkeltliggende kolonier. Inkubation i almindelig atmosfære og ved stammens optimale væksttemperatur; til pseudomonader vælges stue-temperatur eller 30°C.

*Aflæsning og fortolkning:* Daglig aflæsning i indtil 4 dage med inspektion af enkeltkolonierne makroskopisk og evt. under mikroskopet med lav for-

størrelse. Levandannende pseudomonader danner i løbet af nogle dage kolonier, som er betydeligt større på sakkarosepladen end på glukosepladen; de er stærkt kuplede og konsistensen som en fast gelé. Under mikroskopet iagt-tages i kolonierne et karakteristisk mønster bestående af radiære strøg af næsten cellefri polysakkarid skiftende med strøg, der indeholder mer eller mindre tætlejrede bakterier. I kolonier af ikke-levandannende bakterier vil bakterierne alle vegne ligge tæt sammenpakket. Levandannelse kan påvises noget tidligere ved mikroskopisk undersøgelse end ved makroskopisk inspektion.

*Metode (2): Serumagarplade med 5% sakkarose, især til undersøgelse af streptokokker*

*Substrat:* Til bouillonagar tilskættes 5% sakkarose og 5% sterilt hesteserum. Som kontrolsubstrat anvendes i streptokokafdelingen en 5% blodagarplade med særligt henblik på streptokokker, der danner hyaluronsyre. En yderligere kontrolplade af serumagar tilsat 5% glukose kan anbefales.

*Udførelse:* Tilsåning med 24 timer gammel renkultur, så der dannes enkeltliggende kolonier. Inkubering ved 35°C i CO<sub>2</sub>-holdig krukke. Hvis der efter 24 timers inkubation ikke er tegn på polysakkariddannelse, overflyttes pladen til en anaerob krukke med 10% CO<sub>2</sub>, og der inkuberes yderligere i 3 døgn før endelig aflæsning.

*Aflæsning og fortolkning:* Kolonier af polysakkarid-dannende streptokokker ser forskellige ud. Kolonier af *S. salarius* er typisk kuplede og mucoide, kolonier af *S. bovis* er typisk henflydende og vandige, og kolonier af *S. sanguis* og *S. mutans* er typisk tørre, hårde og adhærente. Der kan være ret store afvigelser fra det typiske udseende, især efter kun 1 døgn inkubation, men ved fortsat inkubation bliver udseendet mere karakteristisk; afgørende er en forskel i udseende på sakkarosepladen og kontrolpladen. Hyaluronsyredannende streptokokker vil være mucoide både på sakkarosepladen og på blodpladen uden sakkarose. Udvikling af de enkelte arters typiske kolonier begunstiges af en bestemt inkubationsatmosfære: *S. salivarius* foretrækker atmosfærisk luft, *S. sanguis* anaerob atmosfære og *S. mutans* og *S. bovis* atmosfærisk luft tilsat ekstra CO<sub>2</sub>. Resultatet af observationerne på plade sammenholdes med udfaldet af dyrkning i flydende medium med sakkarose.

*Metode (3): Sakkarosebouillon med acetatbuffer, især til undersøgelse af streptokokker (efter Baily & Oxford 1958, cit. hos Colman 1970)*

*Substrat*

Trypton (Oxoid)	1,4%
Gæretekstrakt (Oxoid)	0,5%
Sakkarose (sterilfiltreret)	8,5%
Natriumacetat	2,0%
Kaliumcarbonat (sterilfiltreret)	0,055%

Efter kogning indstilles pH på 7,4. Substratet filtreres. Slut-pH ca. 7,6. 8 ml aftappes i almindelige reagensglas (155 x 14/15 mm). Som kontrolsubstrat et tilsvarende glas, hvor sakkarose er erstattet af glukose.

*Udførelse:* Fra en 24 timer gammel renkultur tilsås prøveglas og kontrolglas rigeligt, og begge inkuberes ved 35–37°C i 5–7 dage.

*Aflæsning direkte:* Tegn på polysakkariddannelse er enten at glassets indhold bliver viskøst, hvilket lettest iagttages ved at ryste glasset, så nogle luftblærer indfanges, eller at der optræder en svag blålig opalescens. Ved fortsat inkubering kan nogle stammer af *S. sanguis* danne en så udtalt gel, at hele glasset får konsistens som et glas med halvflydende agar. Polysakkariddannelse, der ikke markerer sig tydeligt ved direkte inspektion af glasset, kan evt. iagttages efter centrifugering ved moderat hastighed, hvorved der nedadtil i glasset kan samles en blød gelatinøs masse, som kan udgøre fra 10–90% af substratsøjlens højde. *S. mutans*-polysakkaridet er tilbøjeligt til at klæbe til glassets sider og slynges ikke ned ved centrifugering.

*Aflæsning efter tilsætning af alkohol:* Efter centrifugering af kulturen (5000 omdr./min. i  $\frac{1}{2}$  time) laves af supernatanten to fortyndinger med en 10% opløsning af natriumacetat, den ene i forholdet 1:10, den anden 1:100. Den højeste fortynding medtages, fordi der er erfaring for at høje koncentrationer af dextran kan hæmme alkoholudfældningen. Til to glas af fortyndingerne sættes derefter henholdsvis 1,2 ml og 2,5 ml 96% ætylalkohol og glassene henstilles i 3 timer. Udfældningen kan ske umiddelbart i form af en diffus uklarhed i glassene eller indtræde lidt efter lidt. Sker der udfældning i glasset med 2,5 ml alkohol, men ikke i det med 1,2 ml, er det sandsynligt, at det dannede polysakkarid er levan. Sker der udfældning i begge glas, kan udfældningen skyldes dextran alene eller en blanding af dextran og levan. For i dette tilfælde at kunne skelne mellem de to muligheder udføres en kemisk analyse, hvor præcipitatet hydrolyses med myresyre, og produktet analy-

seres for glukose og fruktose ved hjælp af papirkromatografi. Teknikken som den anvendes i streptokokafdelingen er beskrevet dels i Colman's disputats (1970) dels i Smith (1960). Ved aflæsning efter tilsætning af alkohol medtages altid kontrolglasset, der behandles på samme måde som sakkaroseglasset.

#### *Serologisk påvisning af dextran og levan i flydende sakkarosekulturer:*

Hvis man råder over egnede sera, kan man ved at anvende kultursuperantanten som antigen opnå præcipitationsreaktioner, som kan vise, om dextran og/eller levan er til stede. Streptokokafdelingen anvender af og til pneumokok type 2 antiserum, der giver et præcipitat med dextran.

#### **5. Sikkerhedsforanstaltninger**

Ingen særlige ud over de sædvanlige ved håndtering af human-patogene bakterier.

#### **6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion**

##### *Genus Pseudomonas:*

*P. fluorescens*, biotype I, II og IV danner levan.

*P. chlororaphis* danner levan.

*P. aureofaciens* danner levan.

*P. syringae* (som samleart rumme den et flertal af de tidligere som individuelle arter beskrevne plantepatogene pseudomonader); de fleste stammer danner levan.

##### *Genus Xanthomonas:*

Sutherland (1972) angiver, at mange plantepatogene arter af slægten danner levan. I Bergey's Manual 8. udg. nævnes intet om levan eller dextran, men for arterne *X. campestris* (samleart) og *X. fragariae* er det anført, at de danner mucoide kolonier på glukoseagar, hvorfaf intet med sikkerhed kan udledes.

##### *Fam. Enterobacteriaceae:*

Oplysningerne er meget sparsomme. Flere forfattere omtaler stammen *Aerobacter levanicus* (se Fuchs 1959) som aktiv levandanner; dens identitet er usikker, muligvis er det en *Enterobacter liquefaciens*. Fuchs har beskrevet en enkelt stamme af *Serratia kiliensis* som dannede levan. I *Erwinia*-gruppen er de fleste stammer af *E. amylovora* og 3 andre species fra amylovoragruppen levandannere.

**Genus *Streptococcus*:**

- S. salivarius*: de fleste stammer danner både dextran og levan, det sidste i størst mængde.
- S. mutans*: de fleste stammer danner både dextran og levan, det første i størst mængde.
- S. sanguis*: næsten alle stammer danner dextran og små mængder levan.
- S. bovis*: næsten alle stammer danner dextran.
- S. mitior*: nogle stammer danner dextran.

**Genus *Leuconostoc*:**

- L. mesenteroides*: danner dextran.
- L. dextranicum* danner dextran.

**Genus *Bacillus*:**

- B. cereus* danner levan, dog ikke varieteten *mycoides*.
- B. subtilis* danner levan.
- B. pumilus* danner levan.
- B. licheniformis* danner levan.
- B. megaterium* danner levan, men desuden en heteropolymer.
- B. polymyxa*: enkelte stammer danner levan og flertallet en heteropolymer.

**Genus *Lactobacillus*:**

Sidebotham (1974) nævner 6 arter som danner dextran:

- L. acidophilus*  
*L. brevis*  
*L. casei*  
*L. musicus*  
*L. pastorianus*  
*L. viridescens*

Bergey's Manual 8. udg. oplyser intet om dextran- og levandannelse. I 7. udgave omtales, at *L. pastorianus* danner en slimproducerende variant, men polysakkaridets natur er ikke oplyst.

## 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Selvstændig diagnostisk værdi har prøven ikke. Dertil kommer, at en sikker påvisning af at dannet polysakkarid er dextran eller levan i de fleste tilfælde kræver et speciallaboratorium med stor erfaring.

I streptokokklassifikationen har dextran- og levandannelse været et værdifuldt kriterium ved den nugældende afgrænsning af arterne *S. salivarius*, *S. sanguis* og *S. mutans*. I rutinediagnostik af streptokokker er prøven nyttig på linie med et antal andre prøver, men den er i mange tilfælde ikke uundværlig, og det bliver således især i diagnostisk vanskelige tilfælde den får betydning.

Ved inddeling af *Pseudomonas fluorescens* i biotyper er det nødvendigt at undersøge stammerne for evne til levandannelse, men da biotypeinddelingen i sig selv er af tvivlsom værdi, er prøvens betydning på dette område ikke stor. Som markør ved epidemiologiske undersøgelser, fx. i hospitalsmiljø, kan påvisning af egenskaben dog være nyttig.

På mange områder er forholdene så dårligt undersøgt, at man for tiden intet kan sige om prøvens anvendelighed.

## 8. Referencer

- Bailey, R.W. & Oxford, A.E.: Pre-requisites for dextran production by *Streptococcus bovis*. Nature 182: 185, 1958.
- Beijerinck, M.W.: Die durch Bakterien aus Rohrzucker erzeugten schleimigen Wandstoffe. Folia Microbiologica, Delft, I: 377, 1912. (Versamelde Geschriften van M.W. Beijerinck, 5. del, s. 89-110, Delft, 1921).
- Berger, U.: Die anspruchslosen Neisserien. Ergeb. Mikrobiol. 36: 97, 1963.
- Cienkowski: Die Gallertbildungen des Zuckerrübensaftes. Charkow 1878.
- Colman, G.: The classification of streptococcal strains. Thesis, London University 1970, p. 18.
- Dain, J.A., Neal, A.L. & Seeley, H.W.: The effect of carbon dioxide on polysaccharide production by *Streptococcus bovis*. J. Bact. 72: 209, 1956.
- Facklam, R.R.: Characteristics of *Streptococcus mutans* isolated from human dental plaque and blood. Int. J. system. Bact. 24: 313, 1974.
- Fuchs, A.: On the synthesis and breakdown of levan by bacteria. Thesis, Uitgeverij Waltman, Delft 1959.
- Gibbons, R.J. & Banghart, S.B.: Synthesis of extracellular dextran by cariogenic bacteria and its presence in human dental plaque. Arch. oral Biol. 12: 11, 1967.
- Harlander, S.K. & Schachte, C.F.: *Streptococcus mutans* dextansucrase: stimulation of glucan formation by phosphoglycerides. Infect. Immun. 19: 450, 1978.
- Harrison, F.C., Tarr, H.L.A. & Hibbert, H.: Studies on reactions relating to carbohydrates and polysaccharides. XXXIII. The synthesis of polysaccharides by bacteria and enzymes. Canad. J. Res. 3: 449, 1930.
- Hehre, E.J., Genghof, D.S. & Neill, J.M.: Serological reactions of two bacterial levans. J. Immunol. 51: 5, 1945.
- Hehre, E.J.: Studies on the enzymatic synthesis of dextran from sucrose. J. biol. Chem. 163: 221, 1946.

- Hehre, E.J. & Neill, J.M.: Formation of serologically reactive dextrans by streptococci from subacute bacterial endocarditis. *J. exp. Med.* 83: 147, 1946.
- Hestrin, S.: Synthesis of polymeric homosaccharides. In: Gunsalus, J.C. & Stanier, R.Y. (eds.): *The Bacteria*, vol. 3, Academic Press, 1962, p. 373.
- Hlava, J.: *Leuconostoc hominis und seine Rolle bei den akuten exanthematischen Krankheiten* (Scharlach, Masern, Flecktyphus). *Cbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 32: 263, 1902.
- Hucker, G.J. & Pederson, C.S.: Studies on the *Coccaceae*. XVI. The genus *Leuconostoc*. N.Y. St. Agric. Exp. Station, Technical Bulletin 167, 1930, p. 3, 22 and 66.
- Jeanes, A., Haynes, W.C., Wilham, C.A., Rankin, J.C., Melvin, E.H., Austin, M.J., Cluskey, J.E., Fisher, B.E. Tsuchiya, H.M. & Rist, E.C.: Characterization and classification of dextrans from ninety-six strains of bacteria. *J. Amer. chem. Soc.* 76: 5041, 1954.
- Jessen, O.: *Pseudomonas aeruginosa* and other green fluorescent pseudomonads. *Disputats*, Munksgaard, København 1965.
- Koch, F.E.: Die polysaccharidbildenden Speichelstreptokokken und die Froschlaichstrep tokokken der Zuckerfabriken. *Cbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 130: 381, 1933/34.
- Koch, F.E.: Biologische Untersuchungen über die Verwandtschaft der polysaccharidbil denden Speichelstreptokokken und Froschlaichstreptokokken der Zuckerfabriken. *Cbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 134: 341, 1935.
- Liesenberg, C. & Zopf, W.: Ueber den sogenannten Froschlaichpilz (*Leuconostoc*) der europäischen Rübenzucker- und der javanischen Rohrzuckerfabriken. *Cbl. Bakt.* 12: 659, 1892.
- Montville, T.J., Cooney, C.L. & Sinskey, A.J.: Distribution of dextranucrase in *Strepto coccus mutans* and observations on the effect of soluble dextran on dextranucrase activities. *Infect. Immun.* 18: 629, 1977.
- Niven, C.F. jr., Smiley, K.L. & Sherman, J.M.: The production of large amounts of a poly saccharide by *Streptococcus salivarius*. *J. Bact.* 41: 479, 1941a.
- Niven, C.F. jr., Smiley, K.L. & Sherman, J.M.: The polysaccharide synthesized by *Strepto coccus salivarius* and *Streptococcus bovis*. *J. Biol. Chem.* 140: 105, 1941b.
- Niven, C.F. jr., Kiziuta, Z. & White, J.C.: Synthesis of a polysaccharide from sucrose by *Streptococcus* s.b.e. *J. Bact.* 51: 711, 1946.
- Niven, C.F. jr. & White, J.C.: A study of streptococci associated with subacute bacterial endocarditis. *J. Bact.* 51: 790, 1946.
- Niven, C.F. jr., Washburn, M.R. & White, J.C.: Nutrition of *Streptococcus bovis*. *J. Bact.* 55: 601, 1948.
- Pasteur, L.: Sur la fermentation visqueuse et la fermentation butyrique. *Bull. Soc. Chim. (Paris)* 1861, p. 30 (Oeuvres de Pasteur, Tome II, p. 134. Masson et Cie, Paris 1922).
- Sherman, J.M., Niven, C.F. jr. & Smiley, K.L.: *Streptococcus salivarius* and other non hemolytic streptococci of the human throat. *J. Bact.* 45: 249, 1943.
- Sidebotham, R.L.: Dextrans. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 30: 371, 1974.
- Smith, I.: Chromatographic and Electrophoretic Technique, 2. ed. vol. 11: 246, 1960. William Heineman, London.
- Smith, R.G.: The gum fermentation of sugar cane juice. *Proc. Linnean Soc. N. South Wales* 26: 589, 1901.
- Stanier, R.Y., Palleroni, N.J. & Doudoroff, M.: The aerobic pseudomonads: a taxonomic study, *J. gen. Microbiol.* 43: 159, 1966.
- Stanier, R.Y., Adelberg, E.A. & Ingraham, J.: *The Microbial World*. Printice-Hall, Engle wood Cliffs, New Jersey, 1976.

- Steel, T.: The chemical properties of bacterial gum levan, Proc. Linnean Soc. N. South Wales 26: 626, 1901.
- Sutherland, I.W.: Bacterial exopolysaccharides. Adv. Microb. Physiol. 8: 143, 1972.
- Tieghem, P. van: Sur la gomme de sucrerie. *Leuconostoc mesenteroides*. Ann. Sciences naturelles, 6 sér. vol. 7: 180, 1878.
- Warner, T.N. & Miller, C.H.: Cell-associated levan of *Actinomyces viscosus*. Infect. Immun. 19: 711, 1978.
- White, J.C. & Niven, C.F., jr.: Streptococcus s.b.e.: a streptococcus associated with subacute bacterial endocarditis. J. Bact. 51: 717, 1946.
- Ørskov, J.: Untersuchungen über einen exzessiv Polysaccharid-bildenden Streptokokkus. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 119: 88, 1930.
- Ørskov, J. & Poulsen, K.A.: Das häufige Vorkommen von Streptokokken im menschlichen Rachen, die bei Wachstum auf der Oberfläche fester, Saccharose (oder Raffinose) enthaltender Substrate exzessiv Polysaccharid produzieren. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 120: 125, 1931.