

Oxidations-reduktionsprøver

Kapitel 14

Oxidaseprøver

Oxidaseprøver påviser tilstedeværelsen af enzymkomplekset cytokrom c i bakterier.

1. Historisk oversigt

Oxidaseprøver i bakteriologien har deres udspring i nogle undersøgelser, som den unge Paul Ehrlich i 1885 offentliggjorde i sin første bog: "Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus". Hans plan var at undersøge, om organismens forskellige organer havde forskelligt iltbehov, og hans metode var på kaniner at indsprøjte farvestoffer, der i ikke-iltet tilstand er farveløse, men i iltet tilstand farvede, så han ved obduktion af dyrene kunne se, hvilke organer der var blevet farvede, dvs. havde indeholdt en særlig stor mængde ilt. Et af de stoffer, han brugte, var indofenol, som dannes in vitro og in vivo når man blander komponenterne dimetyl-p-fenylenediamin og α -naftol. Den blå farvereaktion, der opstår når indofenol iltes, kaldtes nadireaktionen efter de to første bogstaver i ordene *naftol* og *diamin*.

Röhmann & Spitzer (1895) mente, at nadireaktionen i dyrs og planters væv skyldtes et intracellulært oxidationsferment, indofenoloxidase. Her må det indskydes, at cytokromer allerede i 1866 var beskrevet af McMunn under betegnelsen histohematin, men at deres betydning som biologiske oxidations-enzymer først blev erkendt i 1925 af Keilin, som genopdagede stofferne og indførte betegnelsen cytokrom. Omkring dette tidspunkt blev det derefter også vist, dels at Röhmann & Spitzer's oxidationsferment var cytokromoxidase, dels at nadireaktionen ikke direkte skyldtes dette enzym, men et andet enzym, cytokrom c, som efter selv at være blevet oxideret af cytokromoxidase var i stand til at ilte indofenol, så det blev blåt (cit. efter Peters 1971 og Lehninger 1975).

Inspireret af Ehrlich's undersøgelser viste Schultze (1910) og hans elev Kramer (1912), at kulturer af nogle bakterier gav en positiv nadireaktion, mens andre var negative. De blandede de to reagenskomponenter i flydende agar, som derefter blev hældt op som en plade, og såsnart den var stivnet,

afsatte de fra en kultur på en almindelig agarplade et strøg på overfladen af oxidaseagaren, hvorved den overførte kulturmasse antog en dybblå farve, hvis reaktionen var positiv. Agaren var altså kun et bæremedium for reagenserne, ligesom filtrerpapiret i dag er det ved Kovacs' oxidaseprøve. På grund af iltning fra luften blev pladerne spontant blå i løbet af få timer og var dermed hurtigt uanvendelige.

Gordon & McLeod (1928) og Loele (1929) forsøgte at gøre denne bakterielle oxidationsreaktion mere praktisk anvendelig. De kunne vise, at man alene ved at dryppe dimetyl-parafenylendiamin på udvoksede kulturer fik en tydelig farveændring af reagenset i kontakt med såkaldte oxidase-positive kolonier. En ulempe var det, at bakterierne i kulturen ret hurtigt blev dræbt ved kontakt med farvestoffet, men Gordon & McLeod anbefalede at hælde reagenset på pladerne og omgående at hælde det af igen, og viste, at man på den måde kunne have stor nytte af reaktionen, især ved påvisning af gonokokker. De viste også, at tetrametylforbindelsen var et mere følsomt reagens og mindre toksisk. Loele viste på et større stammemateriale, at denne ny form for oxidasereaktion og den ældre nadireaktion stort set gav samme udfald.

Reaktionen var dog længe om at slå igennem som en almindelig anvendt prøve i bakteriologien. Henriksen viste i 1952, at den ved diagnosen af *Moraxella* var en værdifuld prøve, og sidst i 1950'erne blev den anbefalet som støtte ved diagnosen af pigmentløse stammer af *Pseudomonas aeruginosa*. Gaby & Hadley (1957) anbefalede til *P. aeruginosa* diagnostik nærmest en klassisk nadireaktion med tilsætning af reagenserne til en flydende renkultur, mens Kovacs i 1956 foreslog dels at bruge tetrametylparafenylendiaminhydroklorid, som gjorde reaktionen mere følsom end de tidligere anvendte diaminer, dels at dryppe reagenset på et stykke filtrerpapir og udføre reaktionen ved at stryge kulturmasse fra en koloni ud på det fugtede papir. Ved en positiv reaktion blev reagenset i forbindelse med bakteriemassen dybt blå i løbet af 5-10 sekunder.

I kort rækkefølge fulgte derefter tre større undersøgelser, som sammen med Kovacs' praktiske modifikation bidrog til at etablere oxidaseprøven som et værdifuldt hjælpemiddel ved diagnosen af gramnegative bakterier (Ewing & Johnson 1960; Steel 1961; Leclerc & Beerens 1962).

Elektrontransportkæden hos bakterier består af flavoproteiner, cytokromer og quinoner. Hvilke komponenter i kæden, der er ansvarlige for den bakteriologiske oxidasereaktion, har længe været uvist, men i 1966 viste Stanier et al. ved spektrofotometri, at cytokrom c mangler i *Pseudomonas maltophilia* – en af de få pseudomonader der giver en negativ oxidaseprøve – og det anses nu for sandsynligt, at cytokrom c er det enzym, der påvises, selv om det ikke er definitivt bevist (Jurtshuk et al. 1975). Jurtshuk et al. har forsøgt en kvan-

titativ måling af enzymaktiviteten. Resultaterne er interessante, men det er vanskeligt at overskue, hvor pålidelige de er. De fandt oxidaseaktivitet i langt flere bakterier end man finder med Kovacs' prøve, og det er for så vidt hvad man efter cytokromernes udbredelse ville vente med en mere følsom prøve. Kovacs' prøve er altså relativ ufølsom, men det er det, som gør den nyttig, idet skellet mellem Kovacs-positive og Kovacs-negative i visse bakteriegrupper er korreleret med andre egenskaber.

2. Biokemisk baggrund

Som nævnt er cytokrom c en bestanddel af de fleste strikt aerobe og fakultive bakteriers elektrontransportkæde, hvis funktion er at sørge for dels, at brinten bliver til vand ved at forbinde sig med luftens ilt og dels at den energi der frigøres under næringsstofferne oxidation i cellen bliver omsat til energirige bindinger i ATP (oxidativ fosforylering).

Passagen af brinten gennem transportkæden sker ved trinvis overflytning af elektroner og brintjoner, H^+ , mellem kædens komponenter. Det må her erindres, at udtrykket oxideret bruges om et molekyle, som har afgivet en elektron, og udtrykket reduceret om et molekyle, som har modtaget en elektron. Hver komponent reduceres først af den forudgående komponent, og derefter oxideres den af den efterfølgende, idet denne samtidig reduceres. Hver komponent gennemløber derfor skiftevis en reduktion og en oxidation, og da komponenterne er placeret således at der rækken igennem er et stigende elektrodepotential, vil transporten foregå i en bestemt retning. Sidste led i kæden er enzymet – cytokromoxidase – som er i stand til at aktivere luftens ilt, der derefter kan forbinde sig med de frigjorte brintjoner under dannelse af vand.

Cytokrom c er næstsidste led i kæden, og når det efter at have overført sine elektroner til cytokromoxidase derved er blevet reoxygeneret, er det igen i stand til at modtage elektroner ikke blot fra det foranliggende enzym i kæden, som det normalt skal, men også til at modtage elektroner fra andre stoffer som fx. reagenset i oxidaseprøven, der ved at afgive elektroner iltes, så det bliver blåt. Hvorvidt en kunstig elektrondonor som fx. tetrametylparafenyldiamin kun kan overføre elektroner til et ganske bestemt acceptormolekyle i kæden, er noget uvist, men de foreliggende undersøgelser taler for, at dette er tilfældet (Jurshuk et al. 1975), og kun hvis det holder stik er det berettiget altid at tolke reagensets omslag som udtryk for tilstedeværelse af cytokrom c. Da en positiv oxidasereaktion ikke alene forudsætter tilstedeværelse af cytokrom c, men også af cytokromoxidase eller en anden terminal oxidase, kan et negativt prøveudfald ikke altid tolkes som mangel på cytokrom c (se desuden under afsnittet *Fortolkning*).

Komponenterne varierer en del i de forskellige bakteriers elektrontransportkæder, og de enkelte komponenters struktur og funktioner er langtfra kendt i alle detailler. Om cytokromerne generelt ved man, at de alle indeholder hæm, og at det er jernatomet i hæm, som afgiver og modtager elektronerne. "Cytokrom c" er i virkeligheden ikke et enkelt enzym, men betegnelse for en gruppe beslægtede enzymer, og kendskabet til de individuelle enzymer er foreløbig begrænset. Man antager, at de foruden deres funktion ved respiration med ilt som terminal elektronacceptor også har andre – foreløbig ukendte – funktioner.

Cytokromernes art og mængde er stærkt påvirkelige af miljøfaktorer, specielt af iltningsforholdene, men generelle regler for at nå optimale betingelser for en oxidaseprøve kan næppe opstilles, og det synes heller ikke at have praktisk betydning for prøvens udførelse.

Der kendes en række stoffer (cyanid, azid og CO), som hæmmer cytokromaktiviteten, men heller ikke dette har umiddelbar praktisk betydning.

Som reagens kan anvendes enten dimetyl- eller tetrametyl-p-fenylendiamin som klorid eller dimetyl-p-fenylendiamin som klorid eller oxalat sammen med α -naftol. Tetrametyl-forbindelsen angives at være den mest følsomme, den mindst toksiske og den mest stabile. Reagenserne vil alle kunne iltes direkte af luftens ilt, men dette sker relativt langsomt.

3. Valg af metode

Kovacs' metode må foretrækkes, først og fremmest fordi den er så enkel og hurtig at udføre samtidig med at ingen af de andre modifikationer efter litteraturen at dømme har særlige fordele, som kunne berettige til at bruge dem.

4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

Kovacs' metode

Reagens: Som reagens anvendes en vandig 1% opløsning af enten tetrametylparafenylendiamin dihydroklorid eller den tilsvarende dimetyl-forbindelse. Tetrametyl-forbindelsen angives at være det mest sensitive reagens, men andre hævder, at dimetyl-forbindelsen i sjældne tilfælde giver en positiv reaktion, hvor tetra-forbindelsen giver en negativ. I opløsning kan tetrametyl-forbindelsen holde sig i ca. 14 dage opbevaret i brun flaske og i køleskab, mens man af dimetyl-forbindelsen må fremstille en frisk opløsning hver dag.

Udførelse: Af reagenset dryppes nogle få dråber på et stykke filterpapir, så der fremkommer en fugtig plet. Kulturmasse tages enten fra en renkultur på agarmedium eller fra en enkeltkoloni på en primærplade. Kulturen må

ikke være over 24 timer gammel, og substratet må ikke indeholde et forgærbart kulhydrat, så kulturen er stærkt sur, da det gør reaktionen negativ. Tager man fra kolonier på en blodplade, må der ikke overføres substrat, da levende erytrocytter kan give en falsk positiv reaktion. Kulturmassen tages med en glas-, plast- eller platinnål, men ikke med jernholdigt materiale som kan give falsk positiv reaktion, og gnides energisk ud i randen af den fugtige reagensplet på filterpapiret. Man kan, hvis væksten i en renkultur er meget sparsom eller stærkt adhærent, blive tvunget til at dryppre reagenset direkte på pladen, men vurderingen af positiv og negativ reaktion er her vanskeligere. Der kan udføres så mange prøver, som der er plads til i randen af den fugtige plet, men når reagenset er tørret ind, må man tage et nyt stykke filterpapir.

Aflæsning: En positiv reaktion viser sig ved at den overførte kulturmasse bliver dybt blå inden for 10 sekunder. Tidsgrænsen må overholdes meget strengt, da mange bakterier bliver blå på et senere tidspunkt.

Fortolkning: Indledningsvis blev det angivet, at oxidaseprøver påviser tilstedeværelse af cytochrome c, men dette betyder ikke, at alle bakterier med cytochrome c er oxidase-positive. Ved manometriske målinger af iltningen af reagenset kan det vises, at aktiviteten i bakterier varierer stærkt, og en korrelering med udfaldet af Kovacs' oxidasereaktion ved aflæsning efter 10 sekunder viser, at grænsen mellem positivt og negativt udfald ikke falder sammen med tilstedeværelse eller mangel på cytochrome c, men svarer til en grænse mellem en gruppe med "moderat aktivitet" og en gruppe med "lav aktivitet" (Jurshuk et al. 1975). Dette er i overensstemmelse med den praktiske erfaring, at det i nogle tilfælde er vanskeligt eller umuligt at afgøre, om farven ved Kovacs' prøve efter 10 sekunder er kraftig nok til, at man vil betragte prøven som positiv. Det vil være rimeligt at angive et sådant prøveudfald som en ± reaktion.

5. Sikkerhedsforanstaltninger

Selv om bakterierne efter nogen tids kontakt med reagenset dør, bør filterpapiret under prøvens udførelse være anbragt i låget af en petriskål og både skål og papir bagefter behandles som inficeret materiale.

6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

Campylobacter: i hvert fald 2 species

Pseudomonas: næsten alle species er kraftigt positive. Negative eller svagt positive er *P. vesiculare*, *P. maltophilia* og nogle plantepatogene species

Agrobacterium: alle species

Alcaligenes: alle species
Vibrio: de fleste species
Aeromonas: alle species
Plesiomonas
Photobacterium: 1 af 2 species
Lucibacterium
Chromobacterium
Flavobacterium: nogle species
Haemophilus: nogle stammer af nogle species
Pasteurella: de fleste stammer af alle species
Actinobacillus: de fleste stammer af begge species
Cardiobacterium
Eikenella corrodens
Neisseria: alle species
Branhamella: alle species
Moraxella: alle species
Paracoccus: alle species
Micrococcus: nogle stammer af nogle species
Bacillus: nogle stammer af nogle species

7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Da grænsen mellem en positiv og en negativ Kovacs-prøve ikke er skarp, er de stærkt positive reaktioner de mest pålidelige og derfor de mest værdifulde.

Meget nyttig er prøven ved differentiering mellem de stærkt oxidase-positive *Neisseria*, *Branhamella* og *Moraxella* på den ene side og de oxidase-negative *Acinetobacter* på den anden, bl.a. fordi disse taxa har en ganske ensartet – i sig selv særpræget – morfologi.

Nyttig er prøven også til differentiering på et tidligt stadium mellem fakulative gramnegative stave; medlemmer af fam. *Enterobacteriaceae* er oxidase-negative, mens medlemmer af fam. *Vibrionaceae* er oxidase-positive. Her skal man dog huske, at *Enterobacteriaceae* indeholder små mængder af cytochrome c og kan give en positiv reaktion, hvis tidsgrænsen for aflæsning ikke overholdes meget nøje.

Da næsten alle species af *Pseudomonas* er oxidase-positive, bliver den negative reaktion hos *P. maltophilia* en hjælp ved diagnosen.

8. Referencer

- Ehrlich, P.: Das Sauerstoff-Bedürfnis des Organismus. Eine farbeanalytische Studie. Verlag von August Hirschwald, Berlin 1885. (The Collected Papers of Paul Ehrlich, Vol. I. Pergamon Press, New York 1956).
- Ewing, W.H. & Johnson, J.G.: The differentiation of *Aeromonas* and C27 cultures from Enterobacteriaceae. Int. Bull. bact. Nomencl. and Tax. 10: 223, 1960.
- Gaby, W.L. & Hadley, C.: Practical Laboratory test for the identification of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bact. 74: 356, 1957.
- Gordon, J. & McLeod, J.W.: The practical application of the direct oxidase reaction in bacteriology. J. Path. Bact. 31: 185, 1928.
- Henriksen, S.D.: Moraxella: Classification and taxonomy. J. gen. Microbiol. 6: 318, 1952.
- Jurtshuk, P. jr., Mueller, T.J. & Acord, W.C.: Bacterial terminal oxidases. CRC Critical Reviews in Microbiology, 3: 399, 1975.
- Keilin, D.: On cytochrome, a respiratory pigment, common to animals, yeast, and higher plants. Proc. roy. Soc. B. 98: 312, 1925.
- Kovacs, N.: Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature 176: 703, 1956.
- Kramer, G.: Beiträge zum sofortigen Nachweis von Oxydations- und Reduktionswirkungen der Bakterien auf Grund der neuen Methode von W.H. Schultze. Cbl. Bakt. I. Abt. Orig. 62: 399, 1910.
- Leclerc, H. & Beerens, H.: Une technique simple de mise en évidence de l'oxydase chez les bactéries. Ann. Inst. Pasteur (Lille) 13: 187, 1962.
- Lehninger, A.L.: Biochemistry. Worth Publishers Inc., New York 1975, 2 ed., p. 491.
- Loebe, W.: Ueber die Verwendbarkeit von Oxydationsreaktionen mit Paraphenyldiamin in der Bakteriologie. Cbl. Bakt. I. Abt. Orig. 111: 325, 1929.
- Peters, R.: Some lone pioneers of biochemistry in the nineteenth century. In: Needham, J. (ed.): The Chemistry of Life. Eight Lectures on the History of Biochemistry. Cambridge at the University Press, 1970, p. 201.
- Röhmann, F. & Spitzer, W.: Ueber Oxydationswirkungen thierischer Gewebe. Ber. dtsch. chem. Ges. 28: 567, 1895.
- Schultze, W.H.: Ueber eine neue Methode zum Nachweis von Reduktions- und Oxydationswirkungen der Bakterien. Cbl. Bakt. I. Orig. 56: 544, 1910.
- Stanier, R.Y., Palleroni, N.J. & Doudoroff, M.: The aerobic pseudomonads. A taxonomic study. J. gen. Microbiol. 43: 159, 1966.
- Steel, K.J.: The oxidase reaction as a taxonomic tool. J. gen. Microbiol. 25: 297, 1961.

Kapitel 15

Katalaseprøver

Prøver der påviser tilstedeværelse af enzymet katalase i bakterier.

1. Historisk indledning

Kemisk set har brintoverilte (H_2O_2) været kendt siden 1818, og lige så længe har man vidst, at noget i dyrs og planters væv fremskyndede dets spaltning til ilt og vand. Schönbein (1863) var den første, som satte dette noget i forbindelse med fermentvirksomhed. I 1893 viste Gottstein (1893) og Beijerinck (citeret fra Kluyver 1940), at evnen til at spalte brintoverilte fandtes hos mange bakterier, og Beijerinck fremhævede allerede dengang, at denne egenskab manglede hos mælkesyrebakterier. Loew (1901) kaldte fermentet katalase og fremsatte den teori, at katalasens biologiske funktion er at dekomponere det celletokskiske brintoverilte, der opstår ved cellernes stofskifte. Mange senere undersøgelser, fx. McLeod & Gordon (1922, 1923, 1925a, b), McLeod et al. (1923) og Avery og hans medarbejdere (Avery & Morgan 1924a, b; Avery & Neill 1924a, b, c, d), har beskæftiget sig med betydningen af H_2O_2 ved bakteriers autoinhibition og uddøen i kultur og katalasens betydning for at hindre dette, og en tid har man ment, at obligat anaerobe bakteriers følsomhed for ilt skyldes deres mangel på katalase. Det kan dog ikke være hele forklaringen på obligat anaerobiose, hvorimod det kunne tænkes, at mangel på det senere opdagede enzym superoxyddismutase (Fridovich 1978), der omsætter det under visse oxidationer dannede frie iltradikal superoxyd (O_2^-), har den afgørende rolle, da superoxyd er endnu mere toksisk end brintoverilte.

Et nyt syn på katalasens biologiske betydning fik man, da Chance i 1949 viste, at et kompleks af katalase og H_2O_2 , der har en anden karakter end de sædvanlige enzym-substrat komplekser, er i stand til at oxidere bestemte substratmolekyler, og at kun hvor der intet oxiderbart substrat er til stede, eller hvor H_2O_2 forekommer i overskud, vil $2 H_2O_2$ dekomponeres til $2 H_2O + O_2$. idet det ene molekyle oxideres til ilt, mens det andet reduceres til vand (Chance 1949a, b, c). Efter denne opfattelse kan man altså skelne mellem katalasens funktion som peroxidase (substratoxidation) og som katalase (H_2O_2 -spaltning).

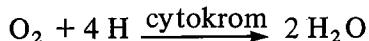
Blandt dem som tidligt har beskæftiget sig med katalasens forekomst hos bakterier må særlig nævnes den danske mejeribakteriolog Orla-Jensen. I 1906 bekræftede han Beijerinck's opdagelse, at enzymet mangler hos mælkesyre-bakterier, og i sin berømte monografi om disse bakterier fra 1919 fremhæver han den negative katalaseprøve som et vigtigt kriterium for afgrænsning af gruppen. Forøvrigt har det senere vist sig, at der er undtagelser; dels er der nogle mælkesyrebakterier som kan danne katalase, hvis de dyrkes på substrater, som indeholder hæm, fx. blodplader, dels findes der en såkaldt "pseudokatalase" hos nogle stammer af *Leuconostoc* og *Pediococcus* (Whittenbury 1960). Dette har fået Deibel & Evans (1960) til at foreslå i stedet for katalaseprøven at bruge en modificeret benzidintest til påvisning af cytokromforekomst i bakterier, idet de viste, at denne test som forventet er negativ hos alle mælkesyrebakterier i bredeste forstand, altså også hos alle streptokokker.

I tidens løb har mange forskellige metoder været benyttet til påvisning af katalase (se fx. Molland 1947). De fleste har dog været baseret på iltudviklingen fra brintoverilte, og dette princip anvendes også hyppigt ved de i bakteriologien anvendte modifikationer (fx. Taylor & Achazar 1972; Buckley 1975). Et afvigende princip er foreslægt anvendt af Hanker & Rabin (1975). De udnytter katalase-H₂O₂ kompleksets evne til som peroxidase at oxidere en farveløs forbindelse, som i iltet tilstand bliver blå. Som farvestof anvendes en blanding af dopamin, p-fenyldiamindihydroklorid og sulfoxid, hvortil sættes en ringe mængde H₂O₂; denne blanding dryppes på et indtørret strøg af bakterier på et objektglas, og en positiv reaktion viser sig ved at bakterierne straks antager en blåviolet farve. En af fordelene ved denne fremgangsmåde er, at man undgår aerosoldannelse – en risiko ved katalaseprøven, som allerede blev omtalt af Knorr i 1927.

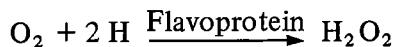
2. Biokemisk baggrund

Hos bakterier med et respiratorisk stofskifte vil størstedelen af den fra næringssstofferne afgivne brint via cytokromer reagere med luftens ilt og blive til vand. I de tilfælde, hvor iltningen alene sker via flavoproteiner, dannes i stedet for vand brintoverilte.

Forskellen mellem de to respirationsmåder ligger i, at cytokrom overfører 2 par brintatomer, altså 4 [H]



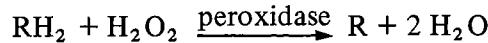
mens flavoprotein kun overfører eet par, altså 2 [H]



Da de fleste bakterier indeholder enten enzymet katalase eller enzymet peroxidase (eller begge), vil det dannede brintoverilte sekundært blive reduceret til vand. Katalase spalter H_2O_2 efter ligningen:



Peroxidase kan kun reducere brintoverilten, hvis der samtidig findes et organisk substrat, der kan fungere som brintdonor. Skematisk kan reaktionen vises på følgende måde:



På denne måde vil brintoveriltens ophobning og toksiske virkning undgås.

Som det fremgår af næstsidste ligning, medfører katalasens spaltning af brintoverilte, at der frigøres ilt. Dette benytter man sig af for at påvise, om bakterier indeholder katalase, idet man bringer den ukendte bakterie i kontakt med brintoverilte og iagttager, om der udvikles luft (ilt).

Katalase og peroxidase er begge oxidoreduktaser af typen hæmproteiner; katalase har en molekulvægt på ca. 250.000 og 4 hæmgrupper, peroxidase har en molekulvægt på ca. 44.000 og 1 hæmgruppe. Katalase er meget hyppigt forekommende både i dyr, planter og mikroorganismer; peroxidase findes fortinsvis i planter og mikroorganismer, bl.a. i mælkesyrebakterier, men også i leukocytter og mælk. Katalasedannelsen i bakterier synes kun lidt afhængig af dyrkningsbetingelser; glukose i mediet hæmmer ikke produktionen, og pH tolerancen er stor. Når katalasereaktionen i sure og/eller gamle kulturer er svagere, skyldes det, at en del af cellerne er døde. Ilt synes at være nødvendig for syntesen af hæmgrupperne og bliver dermed i visse tilfælde en forudsætning for katalasedannelsen (Heady et al. 1964).

Det er vist af Finn & Condon (1975), at tilsætning af små mængder af H_2O_2 til en *Salmonella* kultur stimulerer katalasedannelsen, men det er tvivlsomt, om der er tale om en induktion i sædvanlig forstand. Samme forfattere har bekræftet ældre undersøgelser, som viste, at katalaseaktivitet i forhold til celltettheden i en kultur falder i logaritmisk fase og først begynder at stige ved overgangen til stationær fase, hvorefter stigningen fortsætter. En tilfredsstillende forklaring på dette forhold kendes ikke.

3. Valg af metode

Af sikkerhedsgrunde kunne man være fristet til at anbefale den af Hunker & Rabin (1975) anbefalede metode, men dens overensstemmelse med den klassiske katalaseprøve er ikke tilstrækkelig belyst i øjeblikket.

Hvilken modifikation af den klassiske prøve baseret på iltudvikling, man vælger, er næppe afgørende. En semikvantivering af prøveudfaldet som foreslået af Taylor & Achanzer (1972), vil man vel i alle tilfælde være tilbøjelig til at foretage, men værdien heraf er efter vor opfattelse usikker. Det er den mest pålidelige konstatering af et negativt udfald, som ved denne prøve har størst diagnostisk værdi. Valg af H_2O_2 koncentrationen ser i denne sammenhæng ud til at være af betydning, og selv om vi ikke kan basere vor anbefaling på systematiske undersøgelser, mener vi man til rutineprøven bør anvende en 30% H_2O_2 opløsning.

4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

Som standardmetode har man i diagnoseafdelingen i mange år anvendt at overføre kulturmasse fra en renkultur til en dråbe H_2O_2 på et objektglas, men som supplement anvendes ofte direkte pådrypning af H_2O_2 på en plade-kultur.

Substratet er en 30% brintoverilteopløsning, som opbevares i brune flasker i køleskab. En så stærk opløsning har en ganske ringe tendens til spontan iltafgivelse, en tendens som forstærkes af katalysatorer som platin og alle slags partikulære urenheder og ved mekaniske påvirkninger i form af omrøren og rystning. Resultatet er, at H_2O_2 koncentrationen langsomt falder, men da den præcise koncentration ikke er afgørende, kan samme opløsning anvendes i flere år.

Udførelse: Fra en døgngammel renkultur eller fra en døgngammel koloni på en agarplade tages med en flamberet, afkølet glasstav en rigelig mængde kultur. Kulturer på blodagar og ascitesagar er uegnede, da tilstedeværende røde blodlegemer og/eller leukocytter indeholder katalase. I chokoladeagar er katalasen inaktivert på grund af opvarmningen, og kultur fra dette substrat kan godt anvendes. I forvejen har man på et fuldstændig rent objektglas i bunden af en petriskål afsat en stor dråbe H_2O_2 opløsning, og kulturmasse afsættes nu i dråben med et minimum af gniden og omrøren. Det sker bedst ved at spidsen af glasstaven føres næsten vandret midt ind i dråben, så spidsen hviler på glasset, og med en hurtig rotationsbevægelse af glasstaven mellem fingrene forsøger man derefter at få kulturmassen til at slippe staven, så den

bliver hængende på objektglasset nede i dråben. Ofte vil den blotte berøring af dråben med kulturmassen straks føre til en kraftig luftudvikling, og i disse tilfælde er der ingen grund til at søge kulturmassen afsat på objektglasset; glasstaven kan straks løftes op af dråben og kasseres, da prøven med sikkerhed er positiv. Hvis der ikke kommer umiddelbar luftudvikling, lægges petriskålens låg straks på, og med lup observerer man i nogle minutter dråben for at se, om der kommer luftbobler fra bakteriemassen.

Aflæsning: Enhver luftudvikling — fra voldsom skumdannelse til fremkomsten af ganske enkelte luftblærer — betragtes som en positiv reaktion. Hvis der kun er enkelte luftblærer, eller hvis der ingen luftblærer er i et tilfælde hvor man forventer det, gentages prøven. Får man samme resultat begge gange, accepteres det som prøvens udfald; er der uoverensstemmelse, gentages prøven flere gange, og desuden dryppes H_2O_2 direkte på pladen, evt. på et udskåret stykke af agaren overflyttet til et objektglas, hvis man skal bruge pladen til andre formål, idet H_2O_2 hurtigt dræber bakterierne.

Fortolkning: Konventionelt accepterer vi, at en katalaseprøve er negativ, hvis man overhovedet ikke ser nogen luftudvikling, og positiv uanset hvor ringe luftudviklingen er, forudsat at prøven udføres som ovenfor beskrevet. Fra et videnskabeligt synspunkt kan man herimod indvende, at der er erfaringer som viser, at katalasedannelsen kan afhænge af dyrkningsbetingelserne, fx. kan anaerob dyrkning af stafylokokker i nogle tilfælde føre til en negativ reaktion, og en positiv reaktion af visse mælkesyrebakterier og visse *Haemophilus* arter kan være afhængig af, at dyrkningsmediet indeholder præformeret hæm (Whittenbury 1964; Biberstein & Gills 1961). Hvor disse forhold er kendt må man naturligvis lade dem indgå i fortolkningen af prøven.

5. Sikkerhedsforanstaltninger

En 30% opløsning af H_2O_2 er så stærk, at den ætser huden; får man noget af opløsningen på hænderne, skal stedet straks afvaskes med rigeligt vand.

Den eksplosive iltudvikling, som kan blive resultatet af en stærk positiv katalasetest, medfører at bakterier fra prøven i betydeligt antal slynges ud i luften. Risikoen for at den person, som udfører prøven, får bakterier på slimhinder, hud og tøj er derfor stor, især da man vil være tilbøjelig til at sidde med hovedet bøjet over arbejdet, og da der ofte er tale om patogene bakterier, rummer dette en infektionsrisiko. Man skal derfor udføre reaktionen i bunden af en petriskål, og idet man fører glasstaven med bakteriemassen ned i reagensdråben, skal man holde låget så tæt ned over skålen som muligt, og når glasstaven tages væk, skal låget lægges helt på. Udfører man prøven ved at dryppe H_2O_2 direkte på pladen, skal låget på samme måde under pådrypningen

holdes som et skjold mellem pladen og undersøgeren og derefter straks lægges helt på. Glasstav, objektglas og petriskål behandles som inficeret materiale.

6. De vigtigste katalase-negative bakterier

Da der er en stor overvægt af katalase-positive bakterier blandt dem, der forekommer i et klinisk-mikrobiologisk laboratorium, er det mere hensigtsmæssigt at give en fortægnelse over de negative end de positive arter. Som hovedregel er aerobe og fakultative arter positive og anaerobe arter negative, så det er afvigelserne fra hovedreglen, som har diagnostisk interesse. Fortægnelsen følger som sædvanlig angivelserne i Bergey's Manual, 8. udg., men de er nok ikke i alle tilfælde den endelige sandhed.

Campylobacter: 1 species (*C. sputorum*)

Bordetella: i *B. pertussis* 20–25% af stammerne

Francisella: begge species

Shigella: serotype 1 af *S. dysenteriae*, dvs. de ægte toksindannende Shiga's bakterier, samt nogle stammer af *S. flexneri* (ca. 5%)

Haemophilus: blandt arter med manglende evne til at syntetisere hæm (= X faktor) vil alle stammer være negative, med mindre de dyrkes på hæmholdigt medium; er det tilfældet, vil nogle være negative, men de fleste svagt positive.

Cardiobacterium

Streptobacillus

Eikenella corrodens

Fusobacterium

Leptotrichia

Moraxella kingae

Veillonella: i nogle species en atypisk katalase

Acidaminococcus

Megasphaera

Streptococcus med meget få undtagelser, fx. er ca. halvdelen af *S. faecalis* stammer positiv på chokoladeagarplader.

Leuconostoc med få undtagelser

Pediococcus med få undtagelser

Aerococcus med få undtagelser

Gemella

Peptococcus med nogle undtagelser

Peptostreptococcus

Sarcina

Bacillus: som hovedregel positiv, men 3 insektpatogene species (*B. larvae*, *B. popilliae* og *B. lentimorbus*) er negative.

Lactobacillus med meget få undtagelser

Erysipelothrix

Propionibacterium: som hovedregel positiv, men enkelte species og stammer er negative.

Eubacterium med få undtagelser

Actinomyces, dog er *A. viscosus* positiv

Arachnia

Bifidobacterium

Mycobacterium

7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Prøvens værdi er begrænset, dels fordi dens reproducerbarhed i for mange tilfælde synes afhængig af små variationer i substrat og dyrkningsbetingelser, dels fordi hovedskellet mellem positive og negative følger skellet mellem aerobe (strikt og fakultative) og anaerobe.

Ved diagnosen af grampositive kokker har prøven værdi ved at skelne de negative streptokokker, pneumokokker og aerokokker fra de positive mikrokokker og stafylokokker.

Blandt grampositive stave, som kan vokse under aerobe forhold, er *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* og *Erysipelothrix* katalase-negative.

Blandt gramnegative stave, som kan vokse aerobt, er følgende katalase-negative: *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens*, *Moraxella kingae*, *Actinobacillus equuli*, "Haemophilus" vaginalis, *Haemophilus aphrophilus*, *Streptobacillus moniliformis* og *Leptotrichia buccalis*.

8. Referencer

- Avery, O.T. & Morgan, H.J.: The occurrence of peroxide in cultures of pneumococcus. J. exp. Med. 39: 275, 1924a.
- Avery, O.T. & Morgan, H.J.: Studies on bacterial nutrition. V. The effect of plant tissue upon the growth of anaerobic bacilli. J. exp. Med. 39: 289, 1924b.
- Avery, O.T. & Neill, J.M.: Studies on oxidation and reduction by pneumococcus. I. Production of peroxide by anaerobic cultures of pneumococcus on exposure to air under conditions not permitting active growth. J. exp. Med. 39: 347, 1924a.
- Avery, O.T. & Neill, J.M.: Studies on oxidation and reduction by pneumococcus. II. The production of peroxide by sterile extracts of pneumococcus. J. exp. Med. 39: 357, 1924b.

- Avery, O.T. & Neill, J.M.: Studies on oxidation and reduction by pneumococcus. III. Reduction of methylene blue by sterile extracts of pneumococcus. *J. exp. Med.* 39: 543, 1924c.
- Avery, O.T. & Neill, J.M.: Studies on oxidation and reduction by pneumococcus. IV. Oxidation of hemotoxin in sterile extracts of pneumococcus. *J. exp. Med.* 39: 745, 1924d.
- Biberstein, E.L. & Gills, M.: Catalase activity of *Haemophilus* species grown with graded amounts of hemin. *J. Bact.* 81: 380, 1961.
- Buckley, J.M.: A capillary tube test for bacterial catalase. *Med. Lab. Technol.* 32: 125, 1975.
- Chance, B.: The composition of catalase-peroxide complexes. *J. biol. Chem.* 179: 1311, 1949a.
- Chance, B.: The primary and secondary compounds of catalase and methyl or ethyl hydrogen peroxide. II. Kinetics and activity. *J. biol. Chem.* 179: 1341, 1949b.
- Chance, B.: The enzyme-substrate compounds of horseradish peroxidase and peroxides. II. Kinetics of formation and decomposition of the primary and secondary complexes. *Arch. Biochem.* 22: 224, 1949c.
- Deibel, R.H. & Evans, J.B.: Modified benzidine test for the detection of cytochrome-containing respiratory systems in microorganisms. *J. Bact.* 79: 356, 1960.
- Finn, G.J. & Condon, S.: Regulation of catalase synthesis in *Salmonella typhimurium*. *J. Bact.* 123: 570, 1975.
- Fridovich, I.: The biology of oxygen radicals. The superoxide radical is an agent of oxygen toxicity; superoxide dismutases provide an important defense. *Science* 201: 875, 1978.
- Gottstein, A.: Ueber die Zerlegung des Wasserstoffsuperoxyds durch die Zellen, mit Bemerkungen über eine makroskopische Reaction für Bakterien. *Virchows Arch. path. Anat.* 133: 295, 1893.
- Hanker, J.S. & Rabin, A.N.: Color reaction streak test for catalase-positive microorganisms. *J. clin. Microbiol.* 2: 463, 1975.
- Heady, R.E., Jacobs, N.J. & Deibel, R.H.: Effect of haemin supplementation on porphyrin accumulation and catalase synthesis during anaerobic growth of *Staphylococcus*. *Nature* 203: 1285, 1964.
- Kluyver, A.J.: Beijerinck the microbiologist. In: Iterson, jr., G. van, den Dooren de Jong, L.E. & Kluyver, A.J. (eds): *Martinus Willem Beijerinck, his Life and his Work*. Haag 1940, p. 122.
- Knorr, M.: Zur differentialdiagnostischen Bedeutung und Teknik der Katalasereaktion. *Cbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 103: 147, 1927.
- Loew, O.: Catalase, a new enzym of general occurrence, with special reference to the tobacco plant. U.S. Department of Agriculture, Report No. 68, 1901.
- McLeod, J.W. & Gordon, J.: Production of hydrogen peroxide by bacteria. *Biochem. J.* 16: 499, 1922.
- McLeod, J.W. & Gordon, J.: Catalase production and sensitiveness to hydrogen peroxide amongst bacteria: with a scheme of classification based on these properties. *J. Path. Bact.* 26: 326, 1923.
- McLeod, J.W., Gordon, J. & Pyrah, L.N.: Further observations on peroxide formation by bacteria. *J. Path. Bact.* 26: 127, 1923.
- McLeod, J.W. & Gordon, J.: Further indirect evidence that anaerobes tend to produce peroxide in the presence of oxygen. *J. Path. Bact.* 28: 147, 1925a.

- McLeod, J.W. & Gordon, J.: The relations between the reducing powers of bacteria and their capacity for forming peroxide. *J. Path. Bact.* 28: 155, 1925b.
- Molland, J.: Bacterial Catalase. A contribution to the discussion of the anaerobic respiration. *Acta path. microbiol. scand. Suppl.* 66: 1-165, 1947.
- Orla-Jensen, S.: Om Oprindelsen til Komælkens Oxydaser og Reduktaser. *Oversigt over det Kgl. Danske Videnskabernes Selskabs Forhandlinger*, No. 5, 1906, p. 295.
- Orla-Jensen, S.: The Lactic Acid Bacteria, Andr. Fred. Høst & Søn, København, 1919.
- Schönbein, C.F.: Ueber die katalytische Wirksamkeit organischer Materien und deren Verbreitung in der Pflanzen- und Thierwelt. *J. prakt. Chemie* 89: 323, 1863.
- Taylor, W.I. & Achanzar, D.: Catalase test as an aid to the identification of *Enterobacteriaceae*. *Appl. Microbiol.* 24: 58, 1972.
- Whittenbury, R.: Two types of catalase-like activity in lactic acid bacteria. *Nature* 187: 433, 1960.
- Whittenbury, R.: Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. *J. gen. Microbiol.* 35: 13, 1964.

Kapitel 16

Nitratreduktionsprøver

Prøver der kan afgøre, om bakterier indeholder enzymerne nitratreduktase og nitritreduktase.

1. Historisk indledning

Kvælstofomsætningen i naturen har mange aspekter, og litteraturen om emnet er enorm. Erkendelsen af, at evnen til at reducere nitrat til forbindelser hvori kvælstof indgår med et lavere iltningstrin (nitrit, kvælstofforilte, kvælstof og ammoniak) kunne bruges som en karakteriserende egenskab hos bakterier, udvikledes sideløbende med undersøgelser, der primært var rettet imod at opklare problemer af landøkonomisk natur, fx. salpetersaltes egnethed som gødning og denitrifikationens og kvælstoffikseringens henholdsvis skadelige og gavnlige virkning på landbrugsjorden.

At ikke alene planter, men også mikroorganismer besidder evne til at reducere nitrat, finder man anført som hypotese hos Schönbein (1868), Schloesing (1868) og Meusel (1875), men bevis for, at det er tilfældet, findes først hos Gayon & Dupetit (1882a, b, 1886), som med renkulturer af forskellige bakterier viste, at tilsat nitrat under bestemte betingelser omdannedes til nitrit, luftformige kvælstofforbindelser eller ammoniak. Sammen med tilsvarende undersøgelser af Burri & Stutzer (1895) udgør Gayon & Dupetit's forsøg grundlaget for alt senere arbejde med bakteriers udnyttelse af nitrat dels som kvælstokilde (assimilatorisk nitratreduktion) dels som elektronacceptor ved en energigivende anaerob respiration (dissimilatorisk nitratreduktion).

De ældre metoder til kemisk nitritpåvisning var ikke specifikke (Laurent 1890), men i 1879 havde den tyske kemiker Griess vist, at en blanding af svovlsure opløsninger af naftylamin og sulfanilsyre var et både specifikt og meget følsomt reagens, og den ungarske kemiker Ilosvay angav i 1889, at følsomheden og især reaktionshastigheden forøgedes, hvis man anvendte eddikesyre som opløsningsmiddel i stedet for svovlsyre. Nitritpåvisning med dette modificerede reagens – hurtigt betegnet som Griess-Ilosvay's prøve – har siden været standardmetode i bakteriologien.

De første undersøgelser med bakteriologisk-diagnostisk formål for øje med denne prøve blev udført af Lunkewicz (1894), Dieudonné (1895) og Maassen (1901). En del af resultaterne ser med nutidige øjne overraskende ud, men fra omkring århundredeskiftet var prøven etableret som rutinemetode ved bakteriologiske differentialdiagnoser.

Værdien af prøven var dog på grund af vanskeligheder med reproducerbarhed og fortolkning ikke stor. Bidrag til en forbedring af disse forhold gav Conn & Breed (1919), Bronfenbrenner & Schlesinger (1920), Wallace & Neave (1927), ZoBell (1932) og Conn (1936). Blandt andet blev det fastslået, at god og hurtig vækst var en væsentlig forudsætning for at få reproducerbare resultater, og ZoBell fremhævede værdien af tilsætning af zinkpulver som en kontrol der kunne vise, om der stadig var nitrat i mediet efter reagensets tilsætning, hvorved tolkningen uddybedes. At tilsætning af zinkpulver kan reducere nitrat til nitrit var vist af Schönbein allerede i 1861. Steel & Fisher gjorde i 1961 opmærksom på, at denne kontrol kan blive illusorisk, hvis der tilsættes så store mængder zink, at reduktionen går ud over nitritstadiet. Bronfenbrenner & Schlesinger (1920) foreslog at bruge to glas – et med nitrat og et med nitrit – da det ville give bedre mulighed for at fortolke resultatet end ét nitratglas alene. Dette var før ZoBell (1932) anbefalede tilsætning af zinkpulver, men forslaget er stadig relevant, fordi der findes bakterier, som mangler nitratreduktase, men alligevel har nitritreduktase.

Et skridt i retning af en forøgelse af nitratreduktionsprøvens differentierende værdi findes måske i Pichinoty's påvisning i 1964 af to forskellige nitratreduktaser, kaldet A og B, der i bestemte bakterier kan forekomme hver for sig eller begge sammen. Senere undersøgelser (Pichinoty 1973) antyder, at fordelingen af de to reduktaser på de forskellige bakteriegrupper har en vis taxonomisk værdi, men foreløbig har disse iagttagelser ikke ført til større praktiske resultater.

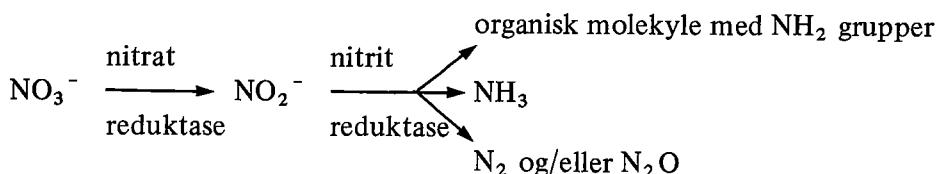
Følgende den almindelige tendens siden 1950'erne har man også indført mikrometoder og hurtigmetoder baseret på den klassiske nitratreduktionsprøve. Resultater kan opnås i løbet af 1–2 timer, og overensstemmelsen med standardmetoden er tilsyneladende god (se fx. Porres & Porter 1974 og Páčová & Kocur 1975).

2. Biokemisk baggrund

Til forståelse af nitratets reduktion anføres her en figur, som viser kvælstoffets forskellige iltningstrin (oxidationstrin):

- | | | |
|-----|------------------------|---|
| + 5 | NO_3^- | nitratjon, HNO_3 salpetersyre |
| + 4 | NO_2 | kvælstofoverilte, luftart |
| + 3 | NO_2^- | nitritjon, HNO_2 salpetersyrling |
| + 2 | NO | kvælstofilte, luftart |
| + 1 | N_2O | kvælstofforilte, luftart |
| 0 | N_2 | frit kvælstof, luftart |
| - 1 | NH_2OH | hydroxylamin, svag base |
| - 2 | N_2H_4 | hydrazin, svag base |
| - 3 | NH_4^+ | ammoniumjon, NH_3 ammoniak |

Nitrat (NO_3^-) udnyttes af bakterier på to forskellige måder: dels optager nogle bakterier fra nitratmolekylet det kvælstof, de skal bruge i biosyntesen dels kan nogle bakterier bruge molekylets ilt ved en anaerob, mere eller mindre energigivende respiration. I begge tilfælde vil der ske en reduktion af nitratmolekylet; ved den første proces taler man om en assimilatorisk, ved den anden om en dissimilatorisk reduktion. Udover at de to processer adskiller sig med hensyn til deres funktion i bakteriestofskiftet, er der også forskelle mellem de enzymer, der indgår i reaktionskæderne, men i øvrigt viser selve reaktionsforløbet – så vidt det er oplyst – mange lighedspunkter. Det gælder i hvert fald første og andet trin i reduktionen, der skematisk kan vises på følgende måde:



Ved en assimilatorisk reduktion vil slutproduktet være forskellige kvælststoffholdige organiske molekyler i cellen og kun sjældent, og i så fald i ringe mængde, vil der findes ekstracellulære, delvis reducerede uorganiske kvælstoffforbindelser.

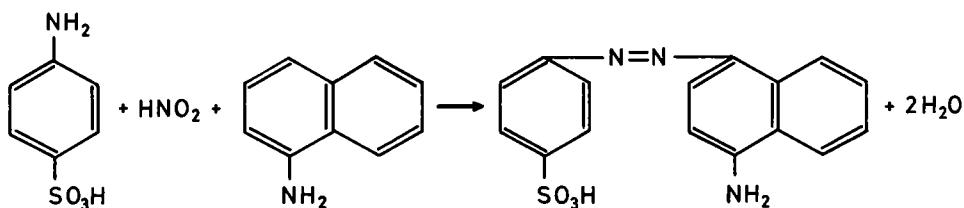
Anderledes er det ved den dissimilatoriske reduktion, hvor den samlede kvælstofmængde fra nitratmolekylet vil findes ekstracellulært i kulturen som reducerede uorganiske forbindelser. Hvilke forbindelser, der findes, vil afhænge af bakteriens art og de kulturelle betingelser; i nogle tilfælde ophobes nitrit, i andre frit kvælstof og kvælstofforilde og i andre igen NH_3 eller ukendte intermediærprodukter. Teoretisk kan der skelnes mellem de tilfælde, hvor elektronerne på deres vej fra det organiske substrat til nitrat har passeret elektrontransportkæden, så der dannes ATP (ægte dissimilatorisk nitratreduktion), og de tilfælde, hvor elektronerne – uden om elektrontransportkæden – mere eller mindre direkte overføres til nitrat (tilfældig (incidentel) dissimilatorisk nitratreduktion), hvorved der kun dannes en ringe mængde energi.

Med de i bakteriologien anvendte nitratreduktionsprøver kan man ikke skelne mellem de lige nævnte situationer, men kun påvise følgende tre muligheder: 1) ingen påviselig reduktion af nitrat (hvilket dog strengt taget ikke udelukker en assimilatorisk reduktion), 2) nitrat er reduceret til nitrit, som opphobes, og 3) nitrat er reduceret ud over nitrit. I sidste tilfælde kan man evt. vise, at reduktionsproduktet er en luftart (N_2 og/eller N_2O). Dette særlige udfald af reduktionsprocessen kaldes fra gammel tid en denitrifikation, som dog kun er et specielt tilfælde af en dissimilatorisk nitratreduktion.

Det specifikke substrat for prøven er det til kulturmediet tilsatte KNO_3 . Ved prøvens udførelse tilsættes et reagens, som kan påvise tilstedeværelsen af nitrit. Finder man nitrit, er det udtryk for, at nitratreduktase har reduceret nitrat til nitrit. Finder man derimod ikke nitrit, kan det skyldes enten at der ikke har været nogen nitratreduktase-aktivitet, eller at dannet nitrit er forsvundet igen ved at være blevet reduceret videre af en nitritreduktase. For at skelne mellem disse to muligheder sættes til de glas, hvor der ikke er påvist nitrit, en lille mængde zinkstøv, som kemisk er i stand til at reducere nitrat til nitrit. Sker dette, hvad der vil vise sig ved, at der nu fremkommer en nitritreaktion i glasset (nitritreagenset er jo allerede til stede), betyder det, at der stadig var nitrat i glasset, og heraf kan sluttes, at den manglende nitritreaktion ved reagenstilsætningen må betyde, at der ikke har været nogen nitratreduktase-aktivitet, dvs. nitratreduktionsprøven er negativ. Hvis der efter tilslætning af zinkstøv stadig er en negativ nitritreaktion, ved man, at der i glasset hverken findes nitrat eller nitrit, og det kan tages som udtryk for, at det oprindelig tilstedeværende nitrat er reduceret til et stadium ud over nitrit, og at der altså må have være både nitrat- og nitritreduktase-aktivitet. Hvorvidt reduktionen er gået, får man ikke at vide på denne måde, med mindre man samtidig undersøger for luftudvikling. Påviser man luft, kan resultatet ”nitrat reduceret ud over nitrit” ændres til ”nitrat reduceret til luftformige

kvælstofforbindelser = denitrifikation". Vi ved ikke sikkert, hvilken diagnostisk betydning det har at skelne mellem disse to slags resultater. Nogle hævder, at ægte denitrifikation (dvs. luftudvikling) er karakteristisk for bestemte bakterier, men det er muligt, at forskellen alene beror på de nærmere betingelser, hvorunder prøven udføres.

Der findes flere metoder til påvisning af nitrit (se fx. Wallace & Neave 1927), men den helt dominerende metode i bakteriologien er Griess-Ilosvay's. Ved tilsetning af sulfanilsyre og α -naftylamin i eddikesur opløsning til kulturen dannes i nærvær af nitrit et rødt azofarvestof (p-sulfobenzene-azo- α -naftylamin) efter følgende ligning:



Sulfanilsyre + salpetersyrling + α -naftylamin \rightarrow p-sulfobenzene-azo- α -naftylamin (rødt azofarvestof)

Reaktionen er så følsom, at den kan påvise 1 del nitrit i 100 millioner dele vand (Warington 1881). Da farven under visse omstændigheder ikke er stabil, har man undertiden anvendt dimetyl- α -naftylamin (Wallace & Neave 1927), der giver samme røde farve, men er mere stabil, og reaktionen er kun en anelse mindre følsom. Siden 1966, da det blev kendt, at α -naftylamin ved indånding eller berøring med hud eller slimhinder rummede risiko for fremkaldelse af blærekræft (pjece fra The Chester Beatty Research Institute, Royal Cancer Hospital, London, april 1966), er man gået over til i stedet at bruge enten 1- α -naftylamin-7-sulfonsyre – også kaldet Cleve's syre (Crosby 1967) eller α -naftol (McLean & Henderson 1966). Med Cleve's syre indtræder reaktionen lidt langsommere, og den røde farve har en lidt anden nuance, men følsomheden er af samme størrelsesorden som med α -naftylamin.

En præcis formulering af de optimale kulturelle betingelser for udførelse af en standard-nitratreduktionsprøve er vanskelig. For det første kan reaktionen som nævnt skyldes to helt forskellige processer, der hver især kræver særlige betingelser, og for det andet er oplysningerne om undersøgte bakterier så spredte, at man må være forsiktig med generaliseringer. For flertallet af de kendte nitrat- og nitritreduktaser er det vist, at de kræver tilstedeværelse af nitrat for at induceres. Mens den assimilatoriske reduktion stort set synes

upåvirket af ilt, er de dissimilatoriske enzymer overordentlig iltfølsomme, så selv meget små iltkoncentrationer udøver total repression over for enzymdannelse, foruden at de hæmmer aktiviteten (Nason 1962; Pichinoty 1963). Heraf fremgår, at hvis man tilstræber at påvise flest mulige af de tilfælde, hvor nitrat-reduktion er en potentiel mulighed, og i disse tilfælde ønsker, at reduktionen skal gå så langt som muligt, vil det være hensigtsmæssigt at udføre prøverne under strikt anaerobe forhold; men biokemiske erfaringer tyder på, at kravene til anaerobiose er så strenge, at de vil være vanskelige at opfylde i et rutinelaboratorium (Skerman et al. 1951, 1957, 1958, cit. efter Pichinoty 1973).

3. Valg af metode

Med de nu gængse nitratreduktionsprøver udnytter man ikke alle de muligheder, der i dag er for at karakterisere en ukendt stamme i dens forhold over for nitrat. Man kunne derfor overveje, om man ikke på baggrund af den nuværende viden om assimilatorisk og dissimilatorisk nitratreduktion burde indføre nogle simple vækstforsøg under aerobe og anaerobe forhold, som kunne give oplysning om bakteriernes krav med hensyn til kvælstofkildens art (nitrat, ammoniak eller organisk kvælstof) og give mulighed for at skelne mellem obligat denitrifikation og fakultativ (incidentel) nitratreduktion ud over nitritstadiet. Ved at kombinere vækstforsøg under varierende betingelser med påvisning af nitrit, N_2 , N_2O og NH_3 , er der efter litteraturen at dømme mulighed for at skelne mellem assimilatorisk og dissimilatorisk reduktion og for en underopdeling af sidstnævnte på grundlag af slutproduktet. Mens man uden tvivl bør udnytte disse muligheder, hvis man arbejder med taxonomiske revisioner, er det mere tvivlsomt, om det vil være rimeligt at gøre det ved rutine-identifikationer. Vort foreløbige skøn er, at gevinsten ikke ville stå i forhold til indsatsen, men at det ville være af værdi at gennemføre en større undersøgelse, som kunne vise dette. Indtil en sådan undersøgelse foreligger, kan man fortsætte med at bruge de to metoder, som i mange år har været anvendt i diagnoseafdelingen:

- A) Nitratreduktionsprøve efter vækst i 0,5% pepton tilsat nitrat
- B) Nitratreduktionsprøve efter vækst i halvflydende ascitesagar tilsat nitrat

4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

A. Nitratreduktionsprøve efter vækst i 0,5% peptonopløsning Substrat

Pepton (Bacto)	0,5%
KNO ₃	0,02%

i dest. vand, pH 7,4

Aftappes i reagensglas (155 x 14/15 mm), i ca. 5 cm høje lag.

Reagenser

a) Sulfanilsyre	3 g
Iseddikesyre	180 ml
Dest. vand	720 ml
b) 1-naftylamin-7-sulfonsyre (Cleve's syre)	1,2 g
Iseddikesyre	180 ml
Dest. vand	720 ml

Udførelse

Nitratglasset tilsås rigeligt fra en renkultur på standardplade og inkuberes ved 35°C eller den temperatur, hvor stammen vokser bedst. Nogen fast aflæsningstid kan ikke angives; reglen er, at kulturen skal være fuldt udviklet, hvilket med *Enterobacteriaceae* som regel tager mindre end 20 timer, men med andre bakterier kan tage 48 timer eller længere.

Af reagenser tilsettes ca. 1 ml sulfanilsyre og ca. 1 ml af Cleve's syre. Man venter derefter i ca. 5 minutter på fremkomsten af rød farve, inden der evt. tilsettes zinkpulver. En lille mængde zinkpulver (ca. 20–25 mg/glas) drysses oven i alle glas, som ikke har udviklet rød farve, hvorefter glassene henstår til observation i 10 minutter. Da det er en reduktion, som skal foregå, må glasset ikke rystes energisk, men med et par slag på siden af det kan man undgå, at zinkstøvet bliver liggende som et lag på overfladen af kulturen. Som kontrol bør altid medtages et ikke-tilsat glas, der inkuberes sammen med kulturerne.

Aflæsning og fortolkning

Der er to trin i aflæsningen: 1) Efter tilsætning af reagens a+b noteres, om glasset er blevet rødt. En rød farve betyder, at der er nitrit i glasset, og det registreres som +, hvilket altså betyder, at nitrat er reduceret til nitrit. 2) Til glas, der ikke er blevet røde, tilsættes zinkpulver, og det noteres om glasset nu bliver rødt. Et rødt glas på andet trin af aflæsningen registreres som 0, og det betyder, at nitrat ikke er blevet reduceret, hvorimod et farveløst glas registreres som +++ som tegn på, at både nitrat og nitrit er blevet reduceret. Kontrolglasset undersøges på samme måde som de tilsåede glas.

Hvis nitratglasset er udstyret som et Durham-glas til påvisning af luftudvikling (ligesom i glukose- og mannitforgæringsglas), aflæses, om der er luftudvikling, og i så tilfælde angives resultatet som "+++ med luftudvikling". De forskellige prøveudfald tillader følgende slutninger:

0	:	Ingen nitratreduktase til stede
+	:	Nitratreduktase, men ikke nitritreduktase til stede
+++	:	Både nitrat- og nitritreduktase til stede
+++ med luft		

En farve, der er så svagt rød efter zinktilsætning, at man vil være tilbøjelig til helt at se bort fra den, kan rejse tvivl om, hvorvidt resultatet skal være 0 eller +++. Erfaringen viser, at disse stammer som regel er +++ positive, men det vil være klogt at lave prøven om og inkubere lidt længere.

Fejlkilder

1) Hvis væksten er sparsom, evt. fordi pepton er et uegnet næringsstof for den pågældende bakterie, kan det føre til falsk negative resultater. Prøv i sådanne tilfælde at dyrke i nitratglasset med ascitesagar.

2) Små forurenninger af substratbestanddelene med nitrit kan give falsk positive "+" resultater, derfor altid kontrolglas.

3) NO_2^- i laboratorie- eller termostatluften kan absorberes i glassene og give falsk positive "+" resultater, derfor altid kontrolglas.

4) Den røde nitritfarve kan bleges hurtigt (ved meget høje nitritkoncentrationer), så et positivt "+" resultat overses, derfor kontinuelig observation efter reagenstilsætningen.

5) Den overgang til en mere brunlig farve, som især ses i kulturer, der er H_2S positive, betyder intet for aflæsningen; en brun farve er i denne sammenhæng så god som en rød.

6) Tilsætning af en for stor mængde zinkstøv kan give en falsk "+++" reaktion, idet zinkstøvet kemisk reducerer ikke blot nitrat til nitrit, men også det dannede nitrit videre til andre forbindelser.

7) Længere tids inkubering i rigere medier fx. filtreret bouillon kan ændre en "+" reaktion til en "+++" reaktion. Det er iagttaget bl.a. med *Proteus rettgeri* og *Proteus inconstans* biotype B, men kan sikkert forekomme med andre *Enterobacteriaceae*, og det sker formentlig, fordi nitrat og nitrit opbruges under den incidentelle dissimilation som følge af den kraftigere vækst.

B. Nitratreduktionsprøve efter vækst i halvflydende ascitesagar Substrat

Filtreret bouillon

KNO ₃	0,1%
Ascites	30%
Vandagar	ca. 0,3%

Aftappes i glas (155 x 14/15 mm), med paraffineret vatprop i høj søjle og mærkes "30% ascites, halvflydende agar med KNO₃".

Forskellen på de to prøver er alene, at det sidste medium giver bedre vækstbetingelser for nogle bakterier samt at forholdene i kulturen på grund af den halvflydende konsistens kan holdes mere anaerobe end i et flydende medium, hvilket generelt set er en fordel. I øvrigt gælder alt, hvad der er beskrevet om prøven i peptonmediet også for prøven i halvflydende ascitesagar.

6. Fortegnelse over de vigtigste nitratreducerende "+" og denitrificerende "+++" species (ifølge Bergey's Manual, 8. udg.)

Ved denitrificerende forstås enten at luftdannelse er påvist eller at både nitrat og nitrit er reduceret.

Campylobacter: 1 species +++, 2 species +

Pseudomonas: mange species +++, enkelte species +

Agrobacterium: 2 species +, mange stammer +++

Alcaligenes: nogle species +++, andre species +

Brucella: alle species +, undtagen *B. ovis*

Bordetella: 1 af 3 species +

Enterobacteriaceae: alle species +, undtagen *Erwinia amylovora*

- Vibrio*: alle species +, undtagen *V. proteus*
- Aeromonas*: alle species +, nogle stammer +++
- Plesiomonas*: alle stammer +
- Photobacterium*: alle stammer +
- Lucibacterium*: alle stammer +
- Chromobacterium*: de fleste stammer +++, nogle +
- Flavobacterium*: 4 species +
- Haemophilus*: de fleste species +
- Pasteurella*: alle species +
- Actinobacillus*: alle species +
- Bacteroides*: nogle species +
- Fusobacterium*: en enkelt species +
- Neisseria*: 1 species +++, flere species reducerer nitrit, men ikke nitrat
- Branhamella*: de fleste stammer +, kan være ++
- Moraxella*: de fleste stammer i 4 species +
- Paracoccus*: 2 species +++
- Veillonella*: 2 species +
- Micrococcus*: nogle stammer +++) (?), nogle +
- Staphylococcus*: nogle stammer +++, nogle +
- Gemella*: nogle stammer reducerer nitrit, men ikke nitrat
- Peptococcus*: 3 species +
- Bacillus*: enkelte species +++, mange species +, nogle stammer af andre species +
- Clostridium*: en del species +, nogle stammer i andre species +
- Lactobacillus*: nogle få stammer af 2 species +
- Listeria*: 2 species +
- Corynebacterium*: nogle animale species +
- Arthrobacter*: de fleste species +, nogle stammer i de resterende species +
- Cellulomonas*: de fleste stammer +
- Propionibacterium*: 4 species +, nogle stammer af andre species +
- Eubacterium*: 7 species +, nogle stammer af andre species +
- Actinomyces*: 3 species +, nogle stammer i de øvrige species +
- Arachnia*: eneste species +
- Bacterionema*: eneste species +
- Rothia*: eneste species +++
- Mycobacterium*: en del species +, nogle stammer af andre species +
- Nocardia*: 15 species +, nogle stammer i 2 andre species +

7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Af det beskrevne fremgår, at man ikke ubetinget kan stole på et negativt udfald af prøven og at man ikke kan være sikker på at kunne påvise alle tilfælde af "reduktion ud over nitrit" samt at det kan være tvivlsomt, hvor ofte man kan identificere dette prøveudfald med begrebet en ægte denitrafikation. Med andre ord, prøven er ikke særlig god.

På den anden side foreligger der en række situationer, hvor den på et rent empirisk grundlag har vist sin anvendelighed.

Et eksempel er slægten *Pseudomonas*, hvor flere vigtige species regelmæsigt giver "+++" reaktioner og nogle species giver "+" reaktioner, mens de fleste ikke reducerer. Lignende forhold gælder for slægten *Alcaligenes*. Det betragtes som en hovedregel, at alle arter i familien *Enterobacteriaceae* reducerer nitrat til nitrit. En enkelt undtagelse er *Erwinia amylovora*, som dog er i stand til at assimilere nitrat i vækstforsøg (Sutton et al. 1960). En del stammer af *Proteus rettgeri* og en del stammer af *Proteus inconstans* biotype B, og muligvis andre *Enterobacteriaceae*, kan man få til at reducere ud over nitrit. I slægten *Bordetella* kan *B. bronchiseptica* reducere til nitrit, mens de 2 andre species mangler evnen. I slægterne *Moraxella* og *Neisseria* kan prøven med nogen fordel anvendes i speciesdifferentiering, når hovedvægten lægges på de positive reaktioner. Til *Neisseria*-gruppen kan det anbefales også at bruge glas med nitrit i en mængde på 0,01%.

Til klassifikatoriske formål har "+" reaktioner kun ringe værdi, mens "+++" reaktioner er værdifulde (Palleroni & Doudoroff 1972).

8. Referencer

- Bronfenbrenner, J. & Schlesinger, M.J.: A study of nitrate reduction by bacteria. Abstr. Bacteriol. 4: 2, 1920.
- Burri, R. & Stutzer, A.: Ueber Nitrat zerstörende Bakterien und den durch dieselben bedingten Stickstoffverlust. Cbl. Bakt. II. Abt. 1: 257, 350, 392, 1895.
- Chester Beatty Research Institute (Royal Cancer Hospital, London): Precautions for laboratory workers who handle carcinogenic aromatic amines. 1966.
- Conn, H.J. & Breed, R.S.: The use of the nitrate-reduction test in characterizing bacteria. J. Bact. 4: 267, 1919.
- Conn, H.J.: On the detection of nitrate reduction. J. Bact. 31: 225, 1936.
- Crosby, N.T.: The determination of nitrite in water using Cleve's acid, 1-naphthylamine-7-sulphonic acid. Proc. Soc. Water Treatment and Examination 16: 51, 1967.
- Dieudonné, A.: Beiträge zur Nitritbildung der Bakterien. Arb. Kaiserl. Gesundh.-Amte (Berl.) 11: 508, 1895.

- Gayon, U. & Dupetit, G.: Sur le fermentation des nitrates. C.R. Acad. Sci. (Paris) 95: 644, 1882a.
- Gayon, U. & Dupetit, G.: Sur la transformation des nitrates en nitrites. C.R. Acad. Sci. (Paris) 95: 1365, 1882b.
- Gayon, U. & Dupetit, G.: Recherches sur la réduction des nitrates par les infiniment petits. Mém. Soc. Sci. Phys. Nat. (Bordeaux) 3. Ser., II: 201, 1886.
- Griess, P.: Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt "Ueber einige Azoverbindungen". Ber. dtsch. chem. Ges. 12: 426, 1879.
- Ilosvay, L.: Sur les réactions des acides azoteux et azotique. Bull. Soc. Chim. (Paris) 2: 347, 1889.
- Laurent, E.: Expériences sur la réduction des nitrates par les végétaux. Ann. Inst. Pasteur 4: 722, 1890.
- Lunkewicz, M.: Eine Farbenreaktion auf die salpetrige Säure der Kulturen der Cholera-bacillen und einiger anderer Bakterien. Cbl. Bakt. Orig. 16: 945, 1894.
- Maassen, A.: Die Zersetzung der Nitrate und der Nitrite durch die Bakterien. Arb. Kaiserl. Gesundh.-Amte (Berl.) 18: 21, 1901.
- McLean, J. & Henderson, A.: Test for the presence of nitrate not involving carcinogenic reagents. J. clin. Path. 19: 632, 1966.
- Meusel, E.: Nitritbildung durch Bacterien. Ber. dtsch. chem. Ges. 8: 1214, 1875.
- Nason, A.: II. Enzymatic pathways of nitrate, nitrite, and hydroxylamine metabolisms. Bact. Rev. 26: 16, 1962.
- Páčová, Z. & Kocur, M.: A comparison of tests for nitrate reduction. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. A 231: 525, 1975.
- Palleroni, N.J. & Doudoroff, M.: Some properties and taxonomic subdivisions of the genus *Pseudomonas*. Ann. Rev. Phytopathol. 10: 73, 1972.
- Pichinoty, F.: L'effet oxygène et la biosynthèse des enzymes d'oxydoréduction bactériens. In: Mechanismes de régulation des activités cellulaire chez les microorganismes. (Colloque, Marseilles, 1963), p. 507, Centre National de la Recherche Scientifique, Paris 1965.
- Pichinoty, F.: Identification d'une nitrate-réductase assimilatrice d'origine bactérienne. C.R. Acad. Sci. (Paris) 259: 3868, 1964.
- Pichinoty, F.: La réduction bactérienne des composés oxygénés minéraux de l'azote. Bull. Inst. Pasteur. 71: 317, 1973.
- Porres, J.M. & Porter, V.: Rapid nitrate reduction test. Amer. J. med. Technol. 40: 257, 1974.
- Schloesing, T.: Sur la décomposition des nitrates pendant les fermentations. C. R. Acad. Sci. (Paris) 66: 237, 1868.
- Schönbein, C.F.: Jahresbericht über die Fortschritte der Chemie. 1861, p. 154.
- Schönbein, C.F.: Ueber die Umwandlung der Nitrate in Nitrite durch Conferven und andere organische Gebilde. J. prakt. Chemie 105: 208, 1868.
- Steel, K.J. & Fisher, P.J.: A fallacy of the nitrate reduction test. Mth. Bull. Minist. Hlth Lab. Serv. 20: 63, 1961.
- Sutton, D.D., Ark, P.A. & Starr, M.P.: The causal agent of bacterial brown rot of Cypripedium orchids. Phytopathology 50: 182, 1960.
- Wallace, G.I. & Neave, S.L.: The nitrite test as applied to bacterial cultures. J. Bact. 14: 377, 1927.
- Warington, R.: Note on the appearance of nitrous acid during the evaporation of water. J. Chem. Soc. 39: 229, 1881.
- ZoBell, C.E.: Factors influencing the reduction of nitrates and nitrites by bacteria in semi-solid media. J. Bac. 24: 273, 1932.