

Juni 1976 / 39
Herausgegeben von der
Eidgenössischen Forschungsanstalt für Milchwirtschaft
CH-3097 Liebefeld
Direktor: Prof. Dr. B. Blanc

Identifizierung von Milchsäurebakterien mit Hilfe des API-Systems

Fernanda Hofer

Einleitung

Die Taxonomie von Mikroorganismen ist ein wichtiges wissenschaftliches Spezialgebiet der Mikrobiologie. Aber auch Labors, die nicht in systematischer Richtung tätig sind, sondern sich mit anderen Fragen auf dem Gebiete der Mikrobiologie befassen, sind auf eine Klassifizierung der sie interessierenden Organismen angewiesen. Für solche nicht spezialisierte Betriebe ist es unerlässlich, ein einfaches Mittel in der Hand zu haben, um die Mikroorganismen im Rahmen ihrer Bedürfnisse einzuordnen.

Auf der Suche nach einer Methode, die uns gestatten würde, Milchsäurebakterien schnell und zuverlässig zu identifizieren, sind wir auf das API-System gestossen und haben dieses auf seine Eignung für unsere Zwecke geprüft. API-Systeme, käufliche gebrauchsfertige Test-Sets für biochemische Reaktionen, gibt es für verschiedene Mikroorganismen. Offenbar recht häufig verwendet werden API-Platten zur Identifizierung von Enterobacteriaceae (ROBERTSON und Mac LOWRY, 1974). Weniger verbreitet dürfte das API-System für Lactobazillen sein. Wir berichten in dieser Arbeit über die damit gemachten Erfahrungen.

*) API-System:

Hersteller: — API-System, La Balme-les-Grottes, 38390 Montalieu-Vercieu (France)
Vertretung in der Schweiz:
API Produits de Laboratoire S. A.
65, rue de la Prulay, 1217 Meyrin
oder
— Institut Pasteur, Production, 36, rue du Docteur-Roux, Paris XV
Vertretung in der Schweiz:
BIOKEMA S. A., 1020 Renens

Material und Methoden

1) Test-Set «API-System Lactobacillus — 50 biochemische Tests zur Identifizierung von Lactobazillen»

Steril verpackte Plasticplatten in der Grösse von 165 × 110 mm, auf welchen in 5 Reihen 50 Mikroreaktionsgefässe (Röhrchen) mit einem Fassungsvermögen von je 0,12 ml in horizontaler Lage angeordnet sind. Die Röhrchen enthalten Testsubstrate und in den meisten Fällen Bromkresolpurpur als Farbindikator in getrocknetem Zustand. Durch eine Einfüllöffnung wird die Bakteriensuspension eingebracht und mit sterilem Paraffinöl überschichtet. Die beimpften Platten werden in je eine mitgelieferte Plasticwanne mit Deckel gelegt, deren Boden mit destilliertem Wasser benetzt wurde. Bei Wachstum und Säurebildung verfärben sich die Suspensionen in den Kammern von violett zu gelb; die Intensität des Farbumschlages wird mit Noten bewertet. Die Platten sind im Kühlschrank mehrere Monate haltbar; das Verfalldatum ist aufgedruckt. Eine ausführliche Arbeitsanleitung gibt die Herstellerfirma ab.

Gemäss Prospekt des Herstellers eignen sich API-Lactobacillus-Platten ebenfalls zur Identifizierung von Milchsäurestreptokokken und Leuconostoc-Arten.

2) Stämme

In die hier beschriebenen Untersuchungen wurden 18 zuvor geklonte Lactobacillus (Lb.)-Stämme aus der Stammsammlung unserer Anstalt einbezogen. Dabei handelt es sich durchwegs um homofermentative Arten, die mit zwei Ausnahmen bei 15° C nicht wachsen und somit thermophil sind.

3) Medien

Komplettmedium: DIFCO Bacto Lactobacilli MRS Broth (MRS DIFCO), zur Weiterzüchtung der Stämme und für die Vorkulturen für den API-Test.

Identifikationsmedium: MRS-Medium (DE MAN, ROGOSA und SHARPE, 1960) ohne Fleischextrakt und Zucker (MRS/Id), zur Herstellung der Bakteriensuspension für die Beimpfung der API-Platten. Das Medium hat folgende Zusammensetzung: Pepton (OXOID), 10 g; Hefeextrakt (OXOID), 5 g; $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 5 g; K_2HPO_4 , 2 g; di-Ammoniumhydrogencitrat, 2 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 570 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 140 mg; Tween 80, 1 ml; H_2O dest., 1 Liter. Das pH wurde vor dem Autoklavieren auf 6,6 eingestellt.

4) Durchführung der Versuche

Für jeden Stamm wurden mindestens zwei aufeinanderfolgende 24-stündige Passagen in MRS DIFCO gemacht. Für die Versuche selbst haben wir 15-stündige Kulturen im gleichen Medium verwendet. Diese wurden zweimal in NaCl gewaschen und das Sediment in wenig MRS/Id aufgeschwemmt. Davon ausgehend haben wir in MRS/Id die endgültige Bakteriensuspension für die Beimpfung der API-Platten hergestellt. Ihre optische Dichte bei 650 nm betrug 2,8, gemessen mit einem LUMETRON Photometer Modell 401 (PHOTOVOLT New York). Diese Dichte entspricht einem Bakterientiter von durchschnittlich $2 \cdot 10^8$ koloniebildenden Einheiten/ml.

Sämtliche Vorkulturen und Testplatten wurden bei 37°C inkubiert.

Die Reaktionen wurden nach 3, 6, 24 und 48 Stunden abgelesen. Wir notierten die Farbveränderungen. Nach 48 Stunden wurden überdies den letzten beiden Röhrchen, die nicht mit Paraffinöl zu überschichten waren, die vorgeschriebenen Reagenzien zugefügt; die betreffenden Reaktionen (Nitratreduktion und Acetoinbildung) können einige Minuten darnach registriert werden. Entgegen der Arbeitsanleitung zum API-System wurden die Platten abschliessend aber noch während mehrerer Tage bei Labortemperatur gehalten und die weitere Entwicklung verfolgt, da für einzelne Stämme und Substrate sich der Farbumschlag nach 48 Stunden noch verstärkte. Auf diese Feststellung wird bei der Besprechung der Resultate näher eingegangen.

Wie in der API-Vorschrift empfohlen wird, haben wir die Intensität der Farbreaktionen bei den einzelnen Ablesungen mit Noten zwischen 0 (für negativ) und 5 (für stark positiv) taxiert. Wir stellten fest, dass sich aus dieser Bewertungsart keine Schwierigkeiten ergeben. Bei Stamm/Substrat-Kombinationen mit reproduzierbaren Ergebnissen stimmte die Notengebung bei mehreren Versuchen, die zeitlich einige Monate auseinanderlagen, sehr gut überein. Dieses Ablesungs- und Bewertungssystem lässt Aussagen über die Schnelligkeit zu, mit der ein bestimmter Stamm auf den API-Platten ein gewisses Substrat abbaut. Zur Differenzierung in negative, positive und schwach vergärende Stämme finden sich Angaben bei der Diskussion der Versuchsergebnisse. Dagegen ist es schwierig, die durch Bakterienwachstum verursachte Trübung in den Röhrchen quantitativ zu erfassen. Wir haben sie lediglich in Zweifelsfällen zum Vergleich herangezogen.

Die Befunde bei den einzelnen Ablesungszeiten können in Form von Profilen dargestellt werden; entsprechende Blätter werden mit den API-Platten geliefert. Das zeitliche Auftreten positiver Reaktionen verschiedener Stämme kann so leichter verglichen werden.

Auf einzelnen Platten zeigten gewisse Teströhrchen bereits nach Auflösung des Farbindikators durch die eingefüllte Bakteriensuspension eine Verfärbung von violett gegen grün. Wir empfehlen daher, ca. 40 Minuten nach Füllen der Kammern, also noch bevor nennenswertes Bakterienwachstum stattgefunden hat, eine eventuelle Verfärbung zu notieren. Dadurch können bei den eigentlichen Ablesungen Fehlinterpretationen vermieden werden.

Resultate und Diskussion

In Voruntersuchungen stellten wir fest, dass es sich bei den fraglichen Stämmen um grampositive, Katalase-negative Stäbchen handelt, die in Glucose-Nährlösung kein Gas bilden. Alle Stämme wurden auf ihre Fähigkeit, bei 15°C zu wachsen, geprüft. Menge und Konfiguration der gebildeten Milchsäure wurden in unserem Enzymlabor nach der Methode von STEFFEN (1971) bestimmt. Die entsprechenden Ergebnisse erlaubten bereits eine Klassierung der Bakterien innerhalb eines engen Bereichs. Die endgültige Spezieszuordnung erfolgte auf Grund der Resultate aus dem API-System (Tab. 1 und 2), wobei wir uns auf die Differenzierungsmerkmale nach «BERGEY» (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Edition, 1974) stützten. Die Zuhilfenahme des «BERGEY» ist unumgänglich, denn für Lactobazillen hat die Herstellerfirma der API-Platten keine Codiertafel mit numerischem Schlüssel zusammengestellt, wie dies für das API 20 Enterobacteriaceae-System der Fall ist (ROBERTSON und Mac LOWRY, 1974). Bei den ersten API-Versuchen bemerkten wir, dass an sich Galactose-vergärende Stämme diesen Zucker auf den Platten nicht abbauten. Ferner kam es verschiedentlich vor, dass vorerst als negativ registrierte Reaktionen sich nach längerem Stehenlassen der Platten bei Labortemperatur noch veränderten. Diese Tatsachen veranlassten uns, das System eingehender als ursprünglich beabsichtigt auf seine Zuverlässigkeit zu prüfen. So wurden für ein und denselben Stamm drei bis vier API-Versuche durchgeführt. Eine Anzahl Stämme wurde für einzelne Substrate parallel nach konventioneller Methode im Reagenzglas (RG) getestet. (MRS/Id mit dem entsprechenden Substrat und Chlorphenolrot als Indikator.)

Tab. 1 enthält die Ergebnisse, wie sie sich auf den API-Platten nach 48 Stunden zeigten. (Bei negativen und positiven Ergebnissen für ein und dieselbe Stamm/Substrat-Kombination wurde dasjenige Resultat eingesetzt, das überwog. Ergebnisse aus RG-Testen wurden für Tab. 1 nicht berücksichtigt.) Anhand dieser Daten werden wir im anschliessenden Kommentar unsere Beobachtungen mit dem API-System erläutern.

Kommentar zu Tab. 1

Alle geprüften Stämme vergären **Glucose, Mannose und N-Acetylglucosamin**. Keiner der Stämme vermag mit **Arabinose, Rhamnose oder Xylose** zu wachsen. Ebenso wurden **Amylose, Dextrin, Dulcitol, Erythrit, Glycerin, Glykogen, Methyl-D-mannosid, Methyl-xylosid, Sorbose und Stärke** in keinem Falle verwertet. Alle diese Substrate wurden in Tab. 1 weggelassen.

Mit **Adonit, Amygdalin, Inulin, Maltose, Mannit, Ribose, Saccharose und Sorbit** waren die Ergebnisse der einzelnen Stämme bei wiederholten Versuchen zu den verschiedenen Ablesungszeiten identisch und nach 48 Stunden eindeutig positiv oder negativ.

Für die übrigen Substrate werden aufgetretene Unstimmigkeiten in wiederholten API-Versuchen sowie zwischen API-

Tabelle 1: Biochemische Reaktionen zur Identifizierung von *Lactobacillus*-Stämmen

Stamm	Wachstum bei 15°C	Konfiguration der gebildeten Milchsäure	Reaktionen auf API-Testplatten																				
			Adonit	Aesculin	Amygdalin	Arbutin	Cellobiose	Fructose	Galactose	Inulin	Lactose	Maltose	Mannit	Melezitose	Melibiose	meso-Inosit	Methyl-D- glucosid	Raffinose	Ribose	Saccharose	Salicin	Sorbit	Trehalose
13		D						+															
1183/0		D						+															
1701/1		D						s															
1701/2		D						s															
1702		D						s															
1703/1		D						s															
1703/2		D						s															
1704		D						s															
1717		D						+															
1149		DL						+															
1182		DL						s															
1182/G/1		DL						s															
1182/G/2		DL						s															
1716		DL						+															
1459/1		DL			+		+	+		+													
1459/3		DL			+		+	+		+							+			+			
1185	+	L(+)						+												+			
1269	+	L(+)	+					+		+					s	s		+		+		+	

Legende zu Tab. 1

— = positiv innert 48 Stunden; Noten 3 und darüber

s = schwach und/oder langsam verlaufende Reaktionen innert 48 Stunden; Noten unter 3

— = negativ

Reaktionsänderungen, die erst ab dem dritten Tag auftraten, blieben unberücksichtigt.

und RG-Testen im folgenden besprochen. Stamm/Substrat-Kombinationen, bei denen keine Unregelmässigkeiten festgestellt wurden — es handelt sich um die überwiegende Mehrzahl — werden nicht erwähnt. Ferner wird auf die Interpretation der Notengebung hingewiesen. Vorab möchten wir unsere Beobachtungen mit **Fructose**, **Galactose** und **Lactose** behandeln.

Bei **Fructose** zeigten alle neun mit «schwach» (s) bezeichneten Stämme innert 48 Stunden nur eine relativ geringe Verfärbung (Noten um 2); die Farbreaktion verstärkte sich auch bei längerer Inkubation nicht. Bei RG-Testen mit dreien der Stämme betrug das pH nach 48 Stunden 4,48, 4,45 bzw. 4,90 und sank innert 5 Tagen bei 37°C auf 4,15, 3,95 bzw. 4,28. Auf Grund der Ergebnisse darf man diese drei Stämme — und wohl auch die übrigen sechs — als **Fructose**-positiv betrachten. Auch bei der **Galactose** sind zwei mit «s» bezeichnete Stämme zu finden, die innert 48 Stunden Noten von 1 oder 2 erreichten. Sie vermochten im RG innert 48 Stunden das pH auf 4,35 zu senken und sind somit eindeutig positiv. Die fraglichen Stämme wachsen allerdings mit **Fructose** bzw. **Galactose** langsamer und teilweise etwas schlechter als die als positiv (+) bezeichneten Stämme (als Mass wird die Säurebildung genommen). Sie zeigten im RG nach 24 Stunden noch keine oder höchstens eine schwache Verfärbung, und das pH sank erst nach zwei bis fünf Tagen auf die maximalen Tiefstwerte, während bei den schnell wachsenden Stämmen bereits nach 24 Stunden maximale Gelbfärbung festgestellt wurde und die möglichen Säurewerte fast erreicht waren. (Wie noch zu sehen sein wird, verhalten sich auch andere Stamm/Substrat-Kombinationen in gleicher Weise.) Würde man sich strikte an die API-Arbeitsanleitung halten, wären alle diese Stämme als **Fructose**- bzw. **Galactose**-negativ zu bezeichnen, denn gemäss dieser Anleitung sind Stämme, welche für ein bestimmtes Substrat innert 48 Stunden Noten unter 3 erreichen, als negativ zu betrachten. Auf Grund unserer Erfahrungen empfehlen wir, solche

Stämme als positiv zu taxieren, eventuell mit einem entsprechenden Vermerk. So werden langsam und/oder schwach vergärende Stämme ebenfalls erfasst.

Daneben stellten wir fest, dass sieben Stämme die **Galactose** auf den API-Platten überhaupt nicht verwerteten. Auch längere Inkubation veränderte die Farbe nicht. Zwei der Stämme wurden gleichzeitig im RG geprüft, wo das pH innert 48 Stunden auf 4,38 bzw. 4,03 sank. Auch die übrigen fünf negativen Stämme, für welche keine parallelen RG-Teste vorgenommen wurden, können auf **Galactose** wachsen, wie dies in einem anderen Zusammenhang festgestellt worden war.

Sowohl für die im API-System **Fructose** und **Galactose** schwach vergärenden als auch für die **Galactose**-negativen Stämme liegen die im RG nach 48 Stunden gemessenen pH-Werte in der Grössenordnung von 4,03 bis 4,90. Solche pH-Werte sollten — wie Kontrollversuche zeigten — in den API-Röhrchen viel grössere Farbumschläge bewirken, d. h. höhere Noten ergeben bzw. positiv sein. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass auf einem bestimmten Substrat langsam wachsende Bakterien sich in den kleinen API-Kammern, im Gegensatz zu den normalen Reagenzgläsern, nur schlecht oder überhaupt nicht entwickeln, so dass sich zwischen API-Test und RG-Test abweichende Resultate ergeben. Die Ursache für dieses Verhalten ist noch nicht restlos abgeklärt.

Für **Lactose** war Stamm **1459/3** bei allen API-Versuchen nach 48 Stunden negativ; auch nach längerer Inkubation blieb die Reaktion aus. Im parallelen RG-Test zeigte sich nach 24 Stunden noch keine Verfärbung; dagegen war das pH nach 48 Stunden auf 4,12 und nach 5 Tagen auf 4,08 gesunken. Der Stamm zeigt somit gleiches Verhalten wie die erwähnten **Galactose**-negativen Stämme.

Stamm **1185** war im API-Test nach 48 Stunden einmal **Lactose**-positiv und dreimal negativ, wobei die Reaktion bei zwei Versuchen nach weiteren 4 Tagen bei Labor-temperatur noch positiv wurde. Im RG war nach 24 Stun-

den keine Reaktion festzustellen; dagegen sank das pH innert 48 Stunden auf 4,70 und innert 5 Tagen auf 3,68. Der Stamm ist also ein guter, wenn auch langsamer **Lactose**-Vergärer. Stamm **1459/1** war für **Lactose** bei drei API-Versuchen nach 48 Stunden zweimal positiv und einmal negativ. Das negative Ergebnis blieb auch nach längerer Inkubation bestehen. Im RG-Test ist der Stamm positiv.

Am Beispiel der letztgenannten beiden Stämme für **Lactose** — und weiterer noch zu besprechender Daten für andere Stamm/Substrat-Kombinationen — wird klar, dass die Ergebnisse wiederholter Versuche gelegentlich nicht übereinstimmen. Im Falle von Stamm **1459/1** registrierten wir völlig gegensätzliche Ergebnisse, und bei nur einem API-Versuch würde man den Stamm entsprechend dem Resultat entweder als negativ oder als positiv taxieren. Mit Stamm **1185** traten die gleichen (positiven) Reaktionen — wenigstens bei dreien der Versuche — zu unterschiedlichen Zeiten auf. In diesem Falle kann das Risiko von Fehlinterpretationen dadurch verringert werden, dass die API-Platten länger als 48 Stunden inkubiert werden.

Trehalose und **meso-Inositol** wurden von Stamm **1269**, **Methyl-D-glucosid** wurde von den Stämmen **1269** und **1185** im API-System schlecht verwertet. Diese Stamm/Substrat-Kombinationen zeigten das bei der **Fructose** bzw. **Galactose** eingehender besprochene Verhaltensmuster: Nach 48 Stunden wurden die Farbreaktionen im API-System mit Noten unter 3 bewertet. Für Stamm **1269** betrug das pH mit **Trehalose** nach 48 Stunden 4,50 und nach 5 Tagen 3,88. Analoges Verhalten wie für die **Galactose**-negativen Stämme beschrieben zeigten Stamm **1269** mit **Melezitose** sowie die Stämme **1459/1**, **1459/3**, **1185** und **1269** mit **Melibiose**. Im API-Test waren alle diese Kombinationen negativ, während die Stämme mit den erwähnten Substraten im RG wuchsen.

Bei wiederholten Versuchen nicht identische Resultate stellten wir in folgenden Fällen fest:

Aesculin: Stamm **1702** war bei drei Versuchen zweimal negativ und einmal schwach positiv. Stamm **1703/1** war dreimal negativ und einmal stark positiv. Beide Stämme waren im RG-Test **Aesculin**-negativ. Stamm **1185** war zweimal stark positiv, zweimal dagegen nach 48 Stunden immer noch negativ, wobei diese Reaktionen nach Stehenlassen bei Labortemperatur während weiterer drei Tage ebenfalls positiv wurden. Der Stamm war im RG-Test positiv.

Arbutin: Stamm **1185** zeigte bei zwei Versuchen nach 48 Stunden stark positive Reaktionen. Bei zwei weiteren Wiederholungen waren die Reaktionskammern jedoch nach der gleichen Zeit lediglich sehr schwach verfärbt; erst nach Stehenlassen während weiterer drei Tage bei Labortemperatur waren die Reaktionen eindeutig positiv.

Cellobiose: Stamm **1185** war dreimal bereits nach 48 Stunden, beim vierten Versuch jedoch erst nach weiteren vier Tagen bei Labortemperatur stark positiv.

Raffinose: In insgesamt vier API-Testen reagierte Stamm **1149** innerhalb von 48 Stunden einmal positiv und dreimal negativ, wobei weitere Inkubation in einem Fall zu einem schwachen Farbwechsel führte. Ein paralleler RG-Test bestätigte, dass der Stamm **Raffinose**-negativ ist.

Salicin: Nach 48 Stunden war bei Stamm **1185** zweimal eine optimale Gelbfärbung festzustellen, während die Suspension zweimal nur schwach verfärbt und die Reaktion erst nach mehreren Tagen Stehenlassen bei Labortemperatur als eindeutig positiv zu bezeichnen war. Zu den drei

in Tab. 1 als **Salicin**-negativ eingetragenen Stämmen **1701/2**, **1703/1** und **1149** ist folgendes zu sagen: **1701/2** war bei drei Versuchen nach 48 Stunden zweimal negativ und einmal schwach positiv, jedoch unter Note 3, so dass er nach der API-Vorschrift als negativ zu bezeichnen wäre. Im RG sank das pH innert 48 Stunden auf 4,62 und innert 5 Tagen auf 4,42. Der Stamm ist nach dem RG-Test somit als **Salicin**-vergärend zu betrachten. Die beiden Stämme **1703/1** und **1149** verhielten sich im API-Test gleich wie **1701/2**, waren jedoch im RG-Test absolut negativ.

Neben den bereits erwähnten metabolischen Fähigkeiten werden mit dem API-System noch folgende Merkmale geprüft:

- Wachstumshemmung durch verschiedene Konzentrationen von Teepol und NaCl
- Anwesenheit von Arginindihydrolase und β -Galactosidase
- Nitratreduktion
- Bildung von Acetoin

Die Röhrchen mit **Teepol** und **NaCl** enthalten ebenfalls den Farbindikator Bromkresolpurpur, so dass sie bei Ausbleiben des Bakterienwachstums, d. h. negativer Reaktion, violett und bei Wachstum gelb gefärbt sein sollten.

Teepol^R (Shell): Bei der Konzentration von 0,6% waren alle geprüften Stämme negativ. Mit 0,4% war ein Stamm bei drei Versuchen zweimal negativ und einmal positiv, ein anderer Stamm war einmal negativ und zweimal schwach positiv. Alle übrigen Stämme zeigten kein Wachstum. Es ist hier zu erwähnen, dass sich die Suspensionen in den beiden API-Kammern mit Teepol besonders häufig schon zu Beginn verfärbten. Bei der ersten Sendung von Platten zeigten sie überhaupt nicht die normale violette Farbe, sondern waren nach Auflösung des Indikators durchwegs grau-grün. Die Resistenz gegenüber **Teepol** erachten wir als unwesentliches Charakterisierungsmerkmal. Aus diesem Grunde messen wir diesen Resultaten keine Bedeutung bei.

NaCl: Es wird die Resistenz der Bakterien gegenüber Konzentrationen von 4, 6 und 10% geprüft. Wie bei Teepol stellten wir auch hier fest, dass die drei betreffenden Röhrchen auf vielen Platten von Anfang an eine grau-grüne statt eine violette Färbung zeigten. Ferner gab es hinsichtlich des zeitlichen Auftretens positiver Reaktionen bei den NaCl-Röhrchen häufiger Variationen als bei den übrigen Substraten. Bei 10%-iger Konzentration ergaben sich mit der Hälfte der Stämme bei Versuchswiederholungen widersprüchliche Resultate. Da die NaCl-Toleranz für die Klassifizierung von Lactobazillen unseres Erachtens jedoch unwesentlich ist, verzichten wir darauf, die Ergebnisse in Einzelheiten zu besprechen.

Nachweis von Arginindihydrolase:

Aus der Arbeitsanleitung zum API-System und der dieser zugrundeliegenden Dissertation von R. PAULE (1971) glauben wir entnehmen zu dürfen, dass mit dem Röhrchen Nr. 40 die Bildung von Ammoniak aus Arginin durch das Enzym Arginindihydrolase nachgewiesen werden soll.

Durch zahlreiche Arbeiten konnte der Mechanismus des Argininabbaus geklärt und gezeigt werden, dass das früher als «Arginindihydrolase» bezeichnete Enzym in Tat und Wahrheit ein komplexes System darstellt (BARKER, 1961). Die Reaktion beginnt mit einer Hydrolyse des Argi-

nins unter Bildung von Citrullin und Ammoniak durch das Enzym Arginindeiminase. Es folgt der Abbau des Citrullins zu Ornithin, Ammoniak und CO₂, wobei diese Reaktion mit einer Phosphorylierung von ADP gekoppelt ist (SCHMIDT und LENOIR, 1974). Ein Enzym mit der Bezeichnung «Arginindihydrolase» ist denn auch im Enzym-Handbuch von BARMAN (1969) nicht aufgeführt. Um Missverständnisse zu vermeiden, sollte der Ausdruck «Arginindihydrolase» durch eine passendere Bezeichnung ersetzt werden, z. B. «Argininabbau». Keiner der in dieser Arbeit geprüften Stämme ist fähig Arginin abzubauen.

Nachweis von β -Galactosidase:

Als Substrat zum Nachweis von β -Galactosidase dient Ortho-nitro-phenyl- β -galactopyranosid (ONPG). Ist das Enzym nicht vorhanden, bleibt die Lösung im Röhrchen farblos, bei positiver Reaktion wird sie gelb gefärbt. Da die Gelbfärbung relativ schwach ist, ist die Differenzierung bei der Notengebung bei diesem Nachweis — im Gegensatz zu den übrigen Reaktionen — etwas schwierig; es kann jedoch gut zwischen schwächer und stärker positiven Reaktionen unterschieden werden.

Bei allen untersuchten Stämmen stellten wir β -Galactosidase-Aktivität fest. Die Färbung war in den meisten Fällen bereits nach 3 bis 6 Stunden maximal; oft verblasste sie nach 24 Stunden wieder. Die beiden im API-System Lactose-negativen Stämme zeigten eine schwache und verspätete Reaktion.

Nitratreduktion und Acetoinbildung (Röhrchen Nr. 48 bzw. 49):

Nitratreduktion war bei keinem der Stämme nachzuweisen. Der Nachweis auf **Acetoin** (Acetyl-Methyl-Carbinol; VOGES-PROSKAUER-Reaktion) war bei den beiden Stämmen 1185 und 1269 positiv, bei allen übrigen negativ. Die Resultate waren jeweils eindeutig und geben zu keinen Bemerkungen Anlass.

Den Röhrchen Nr. 48 und 49 sind nach der Inkubation zur Sichtbarmachung der Reaktion noch Reagenzien zuzufügen. Daher ist das Paraffinöl hier wegzulassen. Die Röhrchen sollten aber bis zum obern Rand der Einfüllöffnung mit Bakteriensuspension gefüllt werden, da sie sonst leicht gänzlich austrocknen. In der API-Arbeitsanleitung wird vermerkt, dass die Reagenzien zum Nachweis der Nitritbildung alle übrigen Reaktionen modifizieren würden. Aus diesem Grunde seien sie erst am Schlusse des Versuches zuzugeben. Wir haben die Reagenzien, sowohl für den Nachweis der Nitratreduktion als auch der Acetoinbildung, bei allen Versuchen nach 48 Stunden beigegeben. Die Resultate können nach einigen Minuten abgelesen werden. In keinem Falle konnten wir als Folge davon bei weiterer Inkubation der Platten eine Störung der übrigen Reaktionen bemerken: Reaktionen, die zuvor schon positiv waren, veränderten ihre Farbe nicht mehr. Andererseits waren die vorstehend beschriebenen Farbumschläge nach länger dauernder Inkubation eindeutig auf Bakterienwachstum zurückzuführen.

Auf Grund der in Tab. 1 zusammengestellten Resultate haben wir die Stämme unter Zuhilfenahme von BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology (1974) identifiziert (Tab. 2). Während in Tab. 1 aber nur die Daten aus dem API-System einbezogen wurden, haben wir für Tab. 2 auch die Ergebnisse aus den erwähnten RG-Testen berücksichtigt. In Kolonne 3 sind diejenigen katabolischen Fähigkeiten erwähnt, welche die einzelnen Stämme laut «BERGEY» besitzen sollten, die wir jedoch nicht nachge-

Tabelle 2: Spezieszugehörigkeit der geprüften Lactobacillus-Stämme

Stamm:	Identifiziert als:	Stamm hat die Fähigkeit zum Abbau folgender Stoffe verloren, die er gemäss BERGEY besitzen sollte:
13	Lb. lactis	Maltose Saccharose Salicin Trehalose
1183/0	Lb. lactis	Maltose
1701/1	Lb. lactis	Maltose Saccharose Salicin
1701/2	Lb. lactis	Maltose Saccharose
1702	Lb. lactis	Maltose Saccharose Salicin
1703/1	Lb. lactis	Maltose Saccharose Salicin Trehalose
1703/2	Lb. lactis	Maltose Saccharose Salicin Trehalose
1704	Lb. lactis	Maltose Saccharose Salicin Trehalose
1717	Lb. lactis	Maltose Salicin
1149	Lb. helveticus *)	Maltose
1182	Lb. helveticus *)	Maltose
1182/G/1	Lb. helveticus *)	Maltose
1182/G/2	Lb. helveticus *)	Maltose
1716	Lb. helveticus *)	Maltose
1459/1	Lb. acidophilus	keine
1459/3	Lb. acidophilus	keine
1185	Lb. casei	Amygdalin Melezitose Ribose Sorbit
1269	Lb. casei	keine

*) Diese Stämme könnten auch als **Lb. jugurti** bezeichnet werden, die als Biotyp von **Lb. helveticus** betrachtet werden. **Lb. jugurti**-Stämme unterscheiden sich von **Lb. helveticus**-Stämmen nur dadurch, dass sie Maltose nicht vergären.

wiesen haben. Es ist möglich, dass vereinzelte Stämme das eine oder andere dieser Substrate im RG abbauen würden, jedoch auf API-Platten als negativ erscheinen. Im Rahmen dieser Arbeit war es uns nicht möglich, für alle Stämme und Substrate parallel mit den API-Versuchen RG-Teste durchzuführen; dies war Sache des Herstellers der API-Platten. Da diese verlorenen metabolischen Fähigkeiten der betreffenden Stämme für die Käseertechnologie nicht von Bedeutung sind, können wir diesen geringfügigen Unsicherheitsfaktor in Kauf nehmen. Im Gegensatz dazu ist der Abbau der Lactose und deren Spaltprodukte Glucose und Galactose durch Milchsäurebakterien, die bei der Käsefabrikation eingesetzt werden, unerlässlich. Leider entsprachen gerade die Lactose- und Galactose-Ergebnisse bei den API-Versuchen teilweise nicht den Tat-

sachen. Wir untersuchen indessen alle unsere *Lactobacillus*-Stämme ohnehin auf ihre Charakteristika hinsichtlich Lactose-, Glucose- und Galactose-Abbau, so dass wir auf diese Daten zurückgreifen können.

Abschliessend möchten wir unsere in dieser Versuchsserie mit dem API-System gemachten Erfahrungen nochmals kurz wie folgt zusammenfassen:

- Für die überwiegende Mehrzahl aller Stamm/Substrat-Kombinationen registrierten wir eindeutige und sehr gut reproduzierbare Resultate, zu denen keine weiteren Erörterungen nötig waren.
- Stämme, die ein bestimmtes Substrat nur langsam und/oder schwach abzubauen vermögen, bewirkten in den Mikroröhrchen der API-Platten innert 48 Stunden nur schwache Farbumschläge mit Noten unter 3. Diese Reaktionen sollten — entgegen der API-Arbeitsanleitung — als «schwach» und nicht als negativ bezeichnet werden.
- Es kam vor, dass nach 48 Stunden noch nicht oder nur schwach wahrnehmbare Reaktionen sich bei länger dauernder Inkubation verstärkten und positiv wurden. Wir empfehlen daher, die API-Platten — wiederum entgegen der Arbeitsanleitung — länger als 2 Tage zu inkubieren.
Mit dem API-System kann jedoch nicht entschieden werden, ob die Stämme ein gewisses Substrat langsam vergären, schliesslich aber doch den gleichen Wachstumsertrag ergeben wie die schnell wachsenden Stämme, oder ob sie ein gewisses Substrat schwach vergären, so dass der Wachstumsertrag schlecht ist.
- Wir fanden auch Stämme, die sich mit einem gewissen Substrat auf den API-Platten bei allen Versuchen überhaupt nicht zu entwickeln vermochten, während sie im RG wuchsen. In diesen Fällen sind die API-Ergebnisse unkorrekt.
- Vereinzelt stellten wir mit ein und derselben Stamm-Substrat-Kombination in wiederholten Tests entgegengesetzte Ergebnisse fest. Stützt man sich in diesen Fällen auf einen einzigen API-Test, kann man unrichtige negative oder positive Resultate registrieren.

Trotz der festgestellten Unvollkommenheiten leistet das API-System gute Dienste für die Charakterisierung von Milchsäurebakterien. Dies gilt insbesondere für Labors, die nicht routinemässig Stämme zu identifizieren haben. Die handlichen API-Platten können während mehrerer Monate im Kühlschrank aufbewahrt werden und sind bei Bedarf sofort griffbereit. Damit fällt die zeitraubende Herstellung der zahlreichen verschiedenen Substrate weg. Es empfiehlt sich jedoch, zusätzlich noch weitere Kriterien zu prüfen, wie Gram-Reaktion, Anwesenheit von Katalase, Wachstum bei 15°C und vor allem Konfiguration der gebildeten Milchsäure.

Zusammenfassung

Das API-System, ein käufliches, gebrauchsfertiges Test-Set für 50 biochemische Reaktionen zur Identifizierung von *Lactobazillen*, wurde auf seine Eignung für unsere Zwecke und auf seine Zuverlässigkeit geprüft (18 Stämme, je 3 bis 4 Wiederholungen). Die Mehrzahl der über 2500 Einzelergebnisse war eindeutig und gut reproduzierbar. Daneben zeigten sich aber auch gewisse Mängel. So erschienen Stämme auf den API-Platten als negativ, die im Reagenzglas ein bestimmtes Substrat langsam und/oder schwach

vergären. Ferner waren die Resultate einzelner Stamm/Substrat-Kombinationen bei Wiederholungen widersprüchlich. Trotzdem ist das System nützlich zur Differenzierung von Milchsäurebakterien, besonders für Labors, die nicht routinemässig Stämme zu charakterisieren haben. Es wird empfohlen, die Stämme vorgängig auf Grund der Konfiguration der gebildeten Milchsäure und des Wachstums bei 15°C der entsprechenden Gruppe zuzuordnen.

Résumé

Le système API, assortiment de 50 tests biochimiques vendu prêt à l'emploi pour l'identification des lactobacilles, a fait l'objet d'une étude destinée à estimer son utilité pour nos besoins propres ainsi que son fiabilité d'une manière générale (18 souches testées chacune 3 à 4 fois). La plupart des 2500 résultats obtenus étaient clairs et bien reproductibles. Ces essais ont pourtant mis en évidence un certain nombre de défauts du système API. Ainsi, quelques souches produisant en tube à essais une fermentation lente et/ou faible d'un substrat donné, n'ont donné aucune réaction sur les plaques API. Pour quelques combinaisons souches/substrats, les essais de reproductibilité se sont révélés assez décevants. Le système est néanmoins utile pour différencier les lactobacilles, surtout pour les laboratoires qui n'effectuent pas en série la détermination des souches. Il est recommandé de procéder à une classification préalable de la souche à déterminer sur la base de la configuration de l'acide lactique qu'elle produit et de sa croissance à 15°C.

Summary

The API system, a commercially available and ready for use test-set with 50 biochemical reactions for the identification of lactobacilli has been examined with respect to its utility for our purposes and its reliability (18 strains, 3 to 4 trials each). The majority of the more than 2500 results were unequivocal and well reproducible. However, we also noticed some deficiencies of the API system. Strains that ferment a certain substrate slowly and/or weakly in the test tube were negative on the API plates. Moreover, a few substrates repeatedly yielded conflicting results with some strains. Nevertheless, the system is useful for differentiating lactic acid bacteria, especially for laboratories which do not routinely identify bacterial strains. As a first criterion in the classification of the strains, we suggest the configuration of the lactic acid formed and their growth behaviour at 15°C.

Literatur

- BARKER H. A., 1961. In: *The Bacteria*, Vol. II, p. 156 ff., ed. by I. C. GUNSALES and R. Y. STANIER, Academic Press, New York/London, 1961
- BARMAN T. E., *Enzyme Handbook*, Vol. 2, Springer-Verlag 1969
- BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology, 1974 (8th Edition), BUCHANAN R. E. and GIBBONS N. E. (Editors), Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974
- DE MAN J. C., ROGOSA M. and SHARPE M. E., 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. appl. Bact.* 23, 130—135
- PAULE R., 1971. Contribution à l'étude biochimique du genre *lactobacillus* par une méthode normalisée; Diss. Université Claude Bernard, Lyon
- ROBERTSON E. A. and Mac LOWRY J. D., 1974. Mathematical Analysis of the API Enteric 20 Profile Register Using a Computer Diagnostic Model. *Appl. Microbiol.* 28, 691—695
- SCHMIDT J. L. et LENOIR J., 1974. Contribution à l'étude des entérocoques et de leurs aptitudes technologiques. Aptitude à la dégradation des acides aminés. *Le Lait* 54 (537) 359—385
- STEFFEN C., 1971. Konzentration und Konfiguration der Milchsäure im reifenden Emmentalerkäse; Diss. Nr. 4630 ETH Zürich