

Lebensfähigkeitstest mit Nalidixinsäure und Acridinorange

Prinzip

Nalidixinsäure (NA; 1-Aethyl-1,4-dihydro-7-methyl-1,8-naphthydrin-4-on-3-carbonsäure) ist ein sehr spezifischer Inhibitor der DNA-Synthese bei Bakterien (Pedrini 1972); alle anderen metabolischen Prozesse laufen bei dessen Zugabe normal ab. Dies führt zu einer Volumenzunahme lebensfähiger Zellen (Kogure, 1978).

Acridinorange (AO) bindet an Nucleinsäuren und fluoresziert rot-orange (als Dimer) oder grünlich (als Monomer). Die "random-coil"-Konfiguration der in proliferierenden Organismen überwiegenden RNA begünstigt die Dimerbildung der AO-Moleküle, inaktive Zellen weisen grünliche Fluoreszenz auf, da die Doppelhelix der DNA unzugänglicher ist für die Farbstoff-Moleküle (Hobbie et al. 1977).

Anwendungsbereich

Vor allem für die Untersuchung eines fermentativen Dunkelstoffwechsels scheint es ratsam, zusätzlich einen Lebensfähigkeitstest beizuziehen, der die metabolische Aktivität allgemeiner erfasst. Sowohl Hobbie et al. (1977) als auch Kogure (1978) inkubieren Zellen mit AO auf schwarz gefärbten Nucleopore-Filtern und zählen sie unter dem Epifluoreszenz-Mikroskop nach ihrer Farbe aus. Die von Kogure et al. (1978) vorgeschlagene Färbung der Filter mit 0.2% Nigrosin (10-20 Stunden) ergab unbefriedigende Resultate im Vergleich zur Färbung mit Irgalanschwarz nach Hobbie (1977). Die Kombination von NA und AO soll die Unterscheidung lebensfähiger von toten Organismen vereinfachen. Andererseits erwähnen bereits Kogure et al. (1978) NA-resistente Mikroorganismen, bei denen NA auch in hohen Konzentrationen die Zellteilung nicht verhindert.

Vorgehen

- Kulturproben 1:1 mit Medium verdünnen.
- 6 Stunden lang mit NA (0.02 % Endkonzentration) inkubieren.
- Auf schwarz gefärbten Nucleopore-Filter (0.2 µm Porengösse) filtrieren.
- Auf dem Filterstand 3 Minuten lang mit 0.01% AO färben.
- Den feuchten, mit destilliertem Wasser gewaschenen Filter unter dem Epifluoreszenz-Mikroskop untersuchen.

Hinweise

Dieser Test ist für Chromatiaceen i. a. weniger gut geeignet.

Die Fluoreszenz der mit AO behandelten Proben ist ungenügend für Photographie (Film: Kodak ET 160). Ausserdem zeigte sich, dass nur *A. purpureus* so gut auf NA reagiert, dass es möglich ist, vergrösserte Zellen von solchen normaler Form zu unterscheiden. NA bildet mit Komponenten des Mediums grossflockige Ausfällungen.

Literatur

- Hobbie JE, Daley RJ, Jasper S. 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:1225-1228
- Känel B, Mez K. 1992. *Vielfalt und Dynamik mikrobieller Stoffwechselaktivitäten in der Redoxtransitionszone des Lago di Cadagno*. Diplomarbeit Universität Zürich
- Kogure K, Simidu U, Taga N. 1978. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* 25:415-420