

FISKERIDIREKTORATETS SKRIFTER

Serie Teknologiske undersøkelser

(Reports on Technological Research concerning Norwegian Fish Industry)

Vol. II. No. 4.

Published by the Director of Fisheries

Nye skjermete indikatorer

New screened indicators

Av

Sverre Hjorth-Hansen

Avdeling for Mikrobiologi

Fiskeridirektoratets Kjemisk-Tekniske Forskningsinstitutt,

Eergen

1952

A.s John Griegs Boktrykkeri, Bergen

Innledning.

Ved bakteriologiske og mykologiske undersøkelser anvendes enten elektrometrisk eller kolorimetrisk indikering:

1. ved innstilling av et substrat til bestemt pH-verdi,
2. ved bestemmelse av syrer eller baser dannet i et ikke pufret substrat (sammensatt av rene kjemiske stoffer) i nærvær av sub- og supermaksimale mengder av næringsstoffer, hjelpestoffer og vitaminer,
3. ved differensiering av mikroorganismer som dyrkes på fast substrat tilsatt en eller annen kullstoffholdig veldefinert kjemisk forbindelse og
4. ved kvantitative pH-bestemmelser i flytende mikrobevekstmiljø.

Kolorimetrisk indikering.

Ved innstilling til bestemt pH-verdi trenger man en rekke indikatorer hvis pH-område for mikrobiologisk bruk strekker seg fra ca. 2—9. Det er et stort antall fargestoffer som står til rådighet, men bare et lite fåtall av dem er pålitelige. SØRENSEN [1909], CLARK og LUBS [1917] samt KOLTHOFF og STENGER [1947] er autoriteter på dette området og ut fra deres kritiske bemerkninger om visse ellers utmerkete indikatorer tør man anta at følgende lille utvalg uten videre er vel anvendelig ved mikrobiologiske undersøkelser:

Indikatorfortegnelse.

Tymolblått	1.4 — 2.6	Clark & Lubs
Bromfenolblått	3.0 — 4.6	Clark & Lubs
Naftylrødt	3.5 — 5.0	Sørensen
Bromkresolgrønt	3.8 — 5.8	Clark & Lubs
Metylrødt	4.2 — 6.2	Sørensen
Bromfenolrødt	4.8 — 6.8	Clark & Lubs
Bromtymolblått	6.0 — 7,6	Clark & Lubs
Neutralrødt	6.8 — 8.0	Sørensen
Fenolrødt	6.8 — 8.4	Clark & Lubs
Tymolblått	8.0 — 9.6	Clark & Lubs
Fenolftalein	8.2 —10,0	Sørensen

Ikke færre enn 7 av disse indikatorer har »hoved«-fargene gult og rødt og derfor orange som overgangsfarge. Det er ikke umiddelbart lett å skjelne mellom trinn i rekken gult over orange til rødt og volder sikkert de fleste analytikere besvær, hva de dog neppe innser helt før de har prøvet indikatorer av andre fargekvaliteter som for øvrig ekvivalerer de konvensjonelle. Selv om man for snart en menneskealder siden kunne remplasere metylorange med den såkalte »skjermete« metylorange som består av samme indikator tilsatt et pH-indifferent blått fargestoff, xylen-cyanolblått FF, hvorved den gule »hoved«-farge blir forvandlet til grønt, omslagsfargen til svakt grått og den annen hovedfarge forblir noenlunde uforandret rød, har den desverre fremdeles ikke vunnet innpass i alle laboratorier.

Fordelen ved bruk av den skjermete indikator synes innlysende — en forandring fra grønt til rødt eller omvendt er ganske annerledes frapperende enn forandringen fra gult til rødt. Den grå overgangsfarge er, i et hvert fall i pufrete oppløsninger, meget iøynefallende. Når denne overgangsfarge er grå, skyldes dette at grønt og rødt er komplementærfarger og gråfargens kvalitet avhenger da av blandingsforholdet mellom indikator og »skjerm«.

De første som gjorde oppmerksom på at en slik skjermeffekt kunne oppnås ved indikatorer var LUTHER [1907] og KIRSCHNIK [1907]. HICKMAN og LINDSTEAD [1922] var de første som anvendte det pH-indifferente fargestoff xylen-cyanolblått FF som skjerm da de framstilte den skjermete indikator med metylorange som særlig i de siste år er blitt sterkt anbefalt. (BERRY [1939], KOLTHOFF og STENGER [1947] og BELL [1946]).

KOLTHOFF og STENGER [1947] angir en rekke skjermete indikatorer med metylenblått. Deres skjermete indikatorer er imidlertid alle oppløst i alkohol.

Den skjermete indikator, som dels går under navnet *Tashiros*, dels benevnes *de Wesselows* indikator, har sikkert de fleste analytikere stiftet bekjentskap med. Den består av metylrødt som indikator og metylenblått som skjerm, sammensatt etter smak og behag når det gjelder forholdet mellom komponentene. Den kan framstilles oppløst i vann om man bruker metylrødts natriumsalt i stedet for metylrødt selv.

Når jeg her framhever ønskeligheten av å bruke indikatorer oppløst i vann, gjelder dette i virkeligheten bare når disse indikatorer, rene eller skjermete, skal anvendes i svaktpufrete eller ikke pufrete oppløsninger. Såvidt jeg kjenner til er ingen tidligere kommet på den tanke å bruke skjermete indikatorer ved kvantitative pH-bestemmelser. Ved undersøkelser over mikrober benytter man oftest ikke-

pufrete vekstsubstrater og hvis man til dem setter en alkoholisk oppløsning av en indikator, enten ren eller skjermet, må man være klar over at indikatoren, som enten er en syre eller en base, derfor ikke blir *helt* uten innflytelse på vannstoffjonekonsentrasjonen av det substrat som måles. Natriumsaltet eller kloridet av en indikator (alt etter dens protolytiske natur) innfluere derimot ikke på vannstoffjonekonsentrasjonen av vedkommende miljø.¹

Forskjellige mikrobearter, dyrket på kulhydratholdige substrater, vil, under dannelsen av kolonier, produsere syrer og assimilere ammoniumjoner hvorved koloniene antar en viss lavere pH-verdi forskjellig for mikrobeartene. Tilsetter man derfor en indikator med egnet pH-område, vil man kunne skille mellom mikrobearter som danner forskjellige syremengder, men kolonier av samme formtype. Ved mikrober vil det ikke være lett å skille mellom forskjellige nyanser av orange om man ønsker å differensiere nøyere.

Ved anvendelse av skjermete indikatorer burde dette meget lettere kunne utføres. Man skulle oppnå røde, grå og grønne kolonier alt etter vannstoffjonekonsentrasjonen og muligens også andre farger hvis de angjeldende mikrober ikke kan absorbere det blå fargestoff.

Egne undersøkelser.

Av hensyn til at indikatorene også skulle kunne brukes ved kvantitative pH-bestemmelser foretrakk jeg å lage dem oppløst i vann som natriumsalter, da de derved, foruten til bestemmelser i lite pufrete miljø som f. eks. naturlig forekommende vann selvsagt også kunne brukes i ekstrakter og »sera« av fiskemusculatur og fiskeorganer og ved volumetriske analyser [Hjorth-Hansen 1951, 1952].

Tre indikatorer, med vidt forskjellige dissosiasjonsekspONENTER, ble undersøkt, såvel med som uten skjerming. Ved skjermingen er benyttet det før nevnte *xylene-cyanoblått FF*.

1. *Metylrødt*, som egner seg for titrering av svake baser som ammoniakk og trimetylamin, ble framstillet i konsentrasjonen 0,2 g/100 ml idet natriumsaltet fra Gurr & Co. ble brukt.
2. *Bromfenolrødt*, som dels kan brukes i samme øyemed, dels er en utmerket indikator ved titreringer av sterk syre med sterk base, ble framstillet i konsentrasjonen 0,08 g/100 ml idet et preparat fra Merck & Co. ble anvendt og tilsatt nødvendig mengde natronlut.

¹ Forf. har med hell anvendt bromfenolrødt tilsatt *xylene-cyanoblått FF* (en skjermet indikator som blir nærmere omtalt i det følgende) bl. a. ved pH-bestemmelser i svakt pufrete naturlige forekommende elve- og innsjøvann.

3. *Fenolrødt*, som i alminnelighet vel mest brukes ved kvantitative pH-bestemmelser, ble framstillet i samme konsentrasjon. Preparatet var fra Merck & Co. Det ble tilsatt den nødvendige mengde natronlut.

Av xylen-cyanolblått FF ble framstillet en 0,5 g/100 ml oppløsning.

4. 100 ml metylrødt -Na ble tilsatt 16,7 ml xylen-cyanolblått FF oppløsning 0,5 g/100 ml.
 5. 100 ml bromfenolrødt -Na ble tilsatt 12,5 ml xylen-cyanolblått FF oppløsning 0,5 g/100 ml.
 6. 100 ml fenolrødt -Na ble tilsatt 25,0 ml xylen-cyanolblått FF oppløsning 0,5 g/100 ml.

Oppløsingene 4 og 5 ble fortynnet til totalvolum 125 ml.

Ved å blande indikatoroppløsning og skjermoppløsning i forskjellige forhold, ble funnet en kombinasjon som ga godt merkbar fargeforandring (forholdet er angitt ovenfor). Muligens vil der kunne være visse merkbarhetsdivergenser til stede og det må overlates til det subjektive skjønn i hvilket forhold blandingen bør foregå.

Konsentrasjonen av indikatorene i de skjermete indikatorer var med andre ord 80 % (100 ml fortynnet til 125 ml) av de tilsvarende rene indikatorer.

For å bestemme disse 6 indikatorers omslagspunkter ble et visst antall dråper av dem satt til 10 ml av en pufferblanding med varierte pH (som puffer ble brukt McIlwains som består av 0,2 n Na_2HPO_4 og 0,1 n citronsyre) og den farvete blanding ble iaktatt ved hjelp av øyet.

Tabell 1.

<i>Indikator</i>	<i>Omslag ved pH</i>
1. Metylrødt	ca. 5,0
4. Metylrødt, skjernet	- 5,3
2. Bromfenolrødt	- 6,0
5. Bromfenolrødt, skjernet	- 5,8
3. Fenolrødt	- 7,8
6. Fenolrødt, skjernet	- 7,4

Ved de skjermete indikatorer synes en viss forskyvning av indikatorenens omslagspunkt å finne sted. For metylrødts vedkommende foregår forskyvningen i basisk retning, ved de to andre i sur retning.

Da en slik forskyvning også burde gi seg tilkjenne av spektrofotometriske absorpsjonskurver, ble ekstinksjonene av indikatorene målt ved forskjellige bølgelengder ved hjelp av Beckman fotometer.

Til 10 ml pufferopløsning ble satt enten 0,4 eller 0,2 ml indikatoropløsning og ekstinksjonen målt mellom 4000—6500 Ångstrøm. Resultatene framgår av kurvetegningene (se plansje I). Lambert-Beers lov viste seg å gjelde for xylencyanolblått og de anvendte indikatorer. Man kan, da ekstinksjonene som bekjent er additive, beregne ekstinksjonen for de skjermete indikatorer av de funne resultater for de rene indikatorer og det blå fargestoff og overenstemmelsen er helt utmerket som det vil framgå av tabell 2.

Tabell 2.
Funne og beregnete ekstinksjoner.
Bølgelengder i Ångstrøm enheter.

Indikatornavn	Ren indikator		Skjernet indikator	Ekstinksjon (log ϵ)	
	Angitt i litteraturen	Funnet	Funnet	Beregnet	Funnet
Metylrødt. . . .	5280	5280	5550	1,320	1,320
Bromfenolrødt	5740	5740 4400	5780 4280	1,240 0,910	1,240 0,915
Fenolrødt	5580	5580 4340	5640 4280	1,065 1,450	1,060 1,450

Der eksisterer m. a. o. *to* absorpsjonsmaksima for indikatorene bromfenolrødt og fenolrødt. Xylen-cyanolblått FF har sitt maksimum ved ca. 6140 Ångstrøm (se diagrammene).

Ved skjerming av metylrødt med xylen-cyanolblått FF forandres absorpsjonsmaksimum fra 5280 til 5550 Ångstrøm. Ved skjerming av bromfenolrødt med samme fargestoff forandres maksimum I fra 4400—4280 Ångstrøm, maksimum II fra 5740—5780 Ångstrøm.

Ved skjerming av fenolrødt med samme fargestoff forandres maksimum I fra 4340—4280 Ångstrøm og maksimum II fra 5580—5640 Ångstrøm.

Maksimum I for de to siste rene indikatorer forandres ved skjerming i motsatt retning av maksimum II, som øker ved skjermingen.

Absorpsjonsmaksima for en rekke indikatorer er angitt dels av CLARK [1928] dels av BRODE (1924) og stemmer godt overens med de her funne for de rene indikatorer. Dog angir begge bare *ett* absorpsjonsmaksimum for disse indikatorer. BRODES målinger foregår nemlig bare

ned til ca. 4400 Ångstrøm. Absorpsjonsmaksima for skjermete indikatorer synes ikke å være bestemt tidligere.

Ved dyrking av *Sporobolomyces salmonicolor*, *Saccharomyces ellipsoideus* og *Zygosaccharomyces florentinus* på maltekstraktagar, med og uten tilsetning av skjermet metylrødt, ble oppnådd resultater som best framgår av plansje II.

Resumé.

Absorpsjonsmaksima er bestemt for 3 indikatorer i ren og skjermet tilstand. Indikatorene dekker et større pH-område og xylen-cyanolblått FF er brukt som skjerm. Fordelen ved å bruke skjermete indikatorer er at det er meget lettere å iaktta fargeovergangen grønt-grått-rødt enn gult-orange-rødt. Bromfenolrødt og fenolrødt har to absorpsjonsmaksima.

Ved dyrking av en del mikroorganismer grodde disse i kolonier med forskjellige fargenyanser i nærvær av skjermet metylrødt.

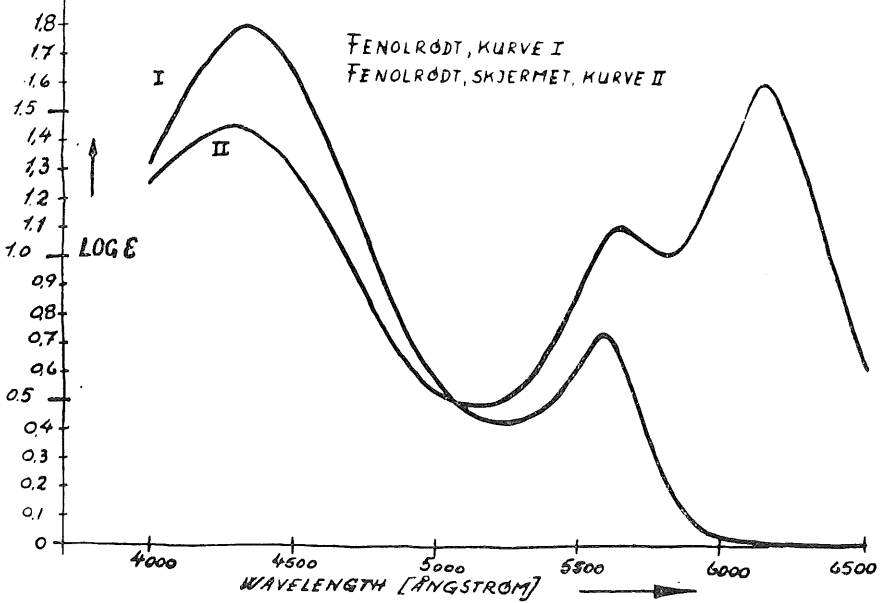
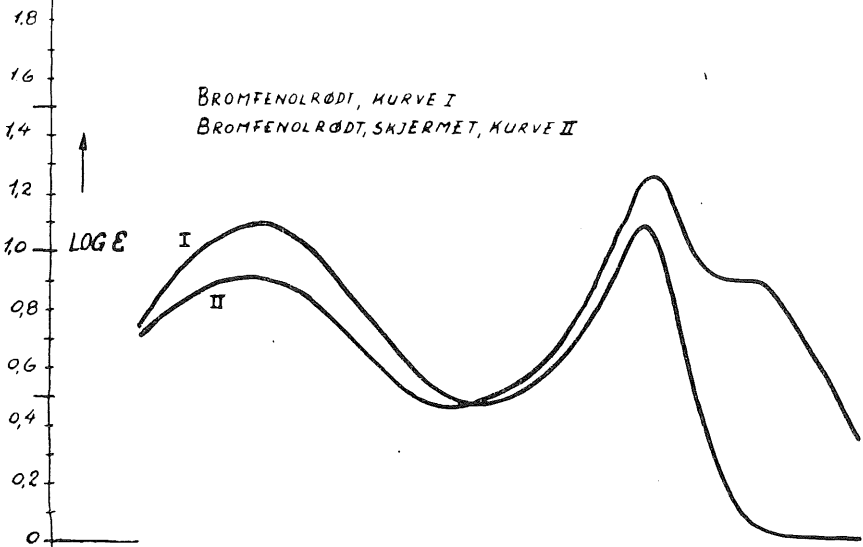
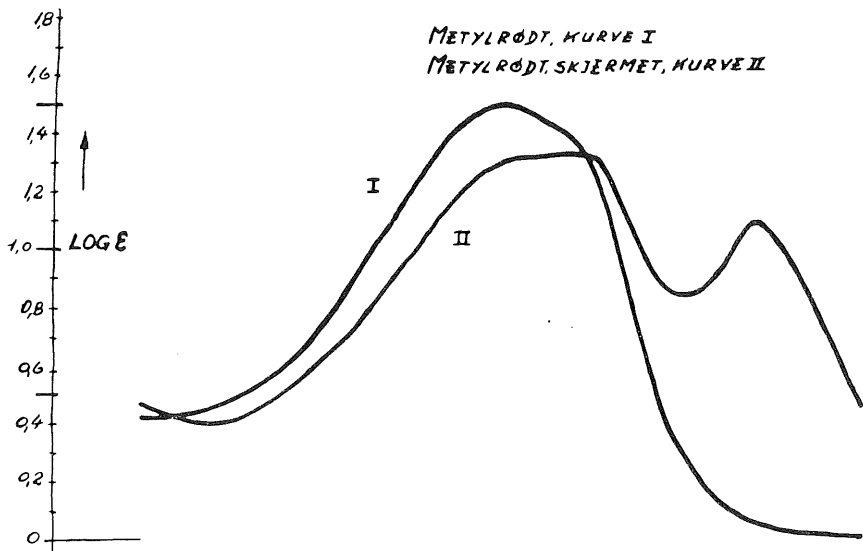
Summary.

The absorption maxima of the „pure” and „screened” indicators methylred, bromophenolred and phenolred with the dye xylene-cyanolblue FF are compared. The screened indicators have the pure ones at advantage the more easily perceptible change green-grey-red compared with yellow-orange-red.

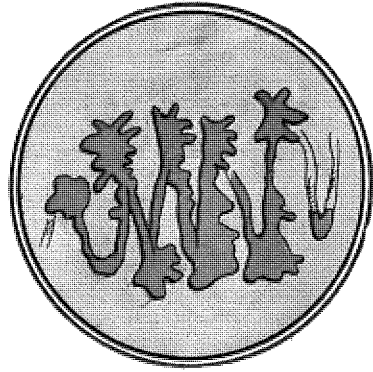
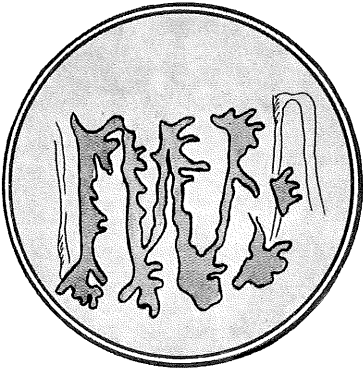
The influence of pure and screened methylred on the colour of colonies of certain microorganisms is shown.

Litteratur.

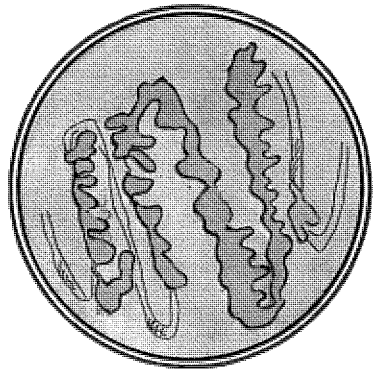
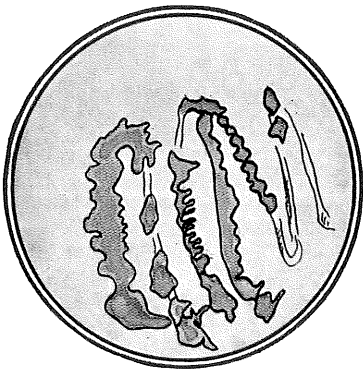
- 1946 BELL, A. E., *Modern Practical Chemistry*, London.
 1939 BERRY, A. J., *Volumetric Analysis*, Cambridge.
 1924 BRODE, W. R., *J. Am. Chem. Soc.* 46, 581.
 1928 CLARK, W. M., *The Determination of Hydrogen Ions*, Baltimore.
 1917 CLARK, W. M. og LUBS, H. A., *J. Bact.* 2, 1, 109 og 191.
 1922 HICKMANN, K. C. D. og LINDSTEAD, R. P., *J. Chem. Soc.* 121, 2502.
 1952 HJORTH-HANSEN, S., *Analytica Chimica Acta* (under trykning).
 1951 — Fiskeridir. Skrifter. Ser. Tekn. Unders. Vol. II, no. 2.
 1935 JØRGENSEN, H., *Wasserstoffionenkonzentration* (pH). Dresden og Leipzig.
 1907 KIRSCHNIK, C., *Chemikerzeitung*, 31, 960.
 1947 KOLTHOFF, I.M., og STENGER, W. A., *Volumetric Analysis*. Vol. II. New York.
 1907 LUTHER, R., *Chemikerzeitung*, 31, 1172.
 1909 SØRENSEN, S. P. L., *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, 8, 1 og 396.



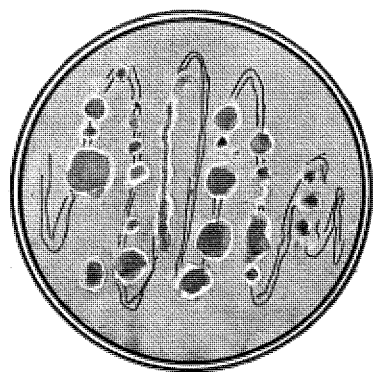
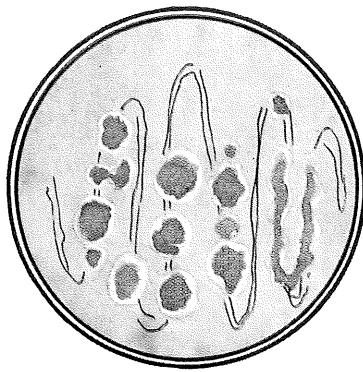
Plansje I.



1.



2.



3.

Plansje 2.

1. *Sp. salmonicolor*. 2 *S. ellipsoidens*. 3. *Sp. florentinus*.
a: metylrødt. b: skjermet metylrødt.