

Carl von Ossietzky Universität Oldenburg

Mikrobiologisches Anfängerpraktikum



(J. Czichos)

WS 04 / 05

ACHTUNG!

... unbedingt beachten. Zu Ihrem und zum Schutz der Umwelt.

Für das gesamte Praktikum gilt: Bei Unklarheiten im Umgang mit Chemikalien, Bakterien und Medien auf alle Fälle die Betreuer/Innen fragen!

1. Im Labor nicht essen, trinken und/ oder rauchen.
2. Kittel tragen (Baumwolle).
3. **Keine** Lösungen, Suspensionen etc. mit dem Mund pipettieren. Pipettierhilfen (Peleusball, Gummihütchen) verwenden.
4. Färbelösungen nicht an die Haut bekommen: Einmal-Handschuhe verwenden.
5. **Keine** Färbelösungen(= Sondermüll) in den Ausguß gießen: **nur** in besonderen Kanistern sammeln (Gift!).
6. **Keinen** Agar in den Ausguß gelangen lassen: in sterilisierbaren Tüten sammeln (Verstopfung!).
7. Sauber arbeiten. Verunreinigungen des Arbeitsplatzes sofort beseitigen.
8. Glasbruch (auch Pasteurpipetten) im Glasabfallbehälter sammeln.
9. Alufolie gesondert sammeln.
10. Medien mit möglicherweise pathogenen (= krankheitserregenden) Keimen (z. B. *E. coli*, Staphylokokken) gesondert zum Sterilisieren sammeln. Benutzte Objektträger mit Keimen in besonders gekennzeichneten Behältern sammeln (zwecks Desinfektion).
11. Beschriftung von benutzten Glasgeräten entfernen und eventuell ausspülen.
12. Einige Substanzen sind giftig, ätzend bzw. möglicherweise carcinogen.
Dazu gehören z. B.
 - NaOH-Plätzchen (ätzend)
 - KOH (ätzend)
 - Kovacs-Reagenz (carcinogen)
 - Safranin (carcinogen?)
 - Malachitgrün (carcinogen?)

Bei Punkt 3 - 5 bitte besondere Vorsicht walten lassen!

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Allgemeine Hinweise	4
2. Einführung in die Mikroskopie	6
3. Das Prinzip der Anreicherungskultur.....	10
Praktikumsaufgaben	
4. Morphologischer Überblick	12
5. Färbemethoden in der Mikrobiologie	
5.1. Gramfärbung.....	16
5.2. KOH-Test.....	20
5.3. Zahnflorapräparat	22
5.4. Sporenfärbung.....	25
6. Gewinnung von Reinkulturen	
6.1. Hefeisolierung von Rosinen	28
6.2. Anreicherung von <i>Lactobacillus</i> aus Hefe	29
7. Keimzahlbestimmungsmethoden	31
7.1. Zählkammer	32
7.2. Plattengußverfahren.....	35
8. Herstellung von Nutrient-Agarplatten	36
8.1. Luftkontamination	38
9. Einfluß von Lysozym auf bakterielles Wachstum.....	39
10. Wirkung von Schwermetallen	42
11. Untersuchung verschiedener Milchsorten	44
12. Sterilisation.....	47
13. Stoffwechselleistungen von Mikroorganismen	
13.1. Auxanogramm	52
13.2. Infektion von Äpfeln mit pilzlichen Erregern (Kochsche Postulate)	54
14. Kompetitive Hemmung durch Sulfonamide.....	58
15. N ₂ -fixierende Clostridien	61
Anhang	
Reagenzien und Medien	64
Literaturhinweise	69

1. ALLGEMEINE HINWEISE

Nährmedien:

Für das Züchten von Mikroorganismen benutzt man flüssige und feste Nährmedien. Feste Nährböden werden meistens verwendet, um Kolonien zu isolieren und um Kulturen aufzubewahren. Feste Medien erhält man durch Zugabe von Agar-Agar (ein Polysaccharid) zum Medium.

Agar wird bei ca. 95 °C flüssig und beim Abkühlen bei 45 °C wieder fest. Agarmedien können also über das ganze Temperaturspektrum, bei dem Mikroorganismen gezüchtet werden, angewendet werden. Er wird für das Herstellen von festen Nährböden am häufigsten benutzt. Außerdem hat Agar den Vorteil, daß er nur durch wenige Organismen hydrolysiert wird. Solche Organismen stammen fast ausschließlich aus dem marinen Milieu. Das ist nicht ungewöhnlich, wenn man bedenkt, daß Agar aus Meeresalgen hergestellt wird.

Das Verflüssigen fester Nährböden geschieht z. B. im Wasserbad bei 100 °C. Um beim Gießen in eine Petrischale Wasserkondensation im Deckel der Petrischale zu verhindern, wird das Medium erst auf etwa 50°C abgekühlt. Erst dann wird gegossen. Um dabei Luftkontaminationen zu verhindern, hebt man den Deckel möglichst wenig an. Man sollte schnell und an einem zugfreien Platz arbeiten.

Während des Festwerdens des Agars tritt oft Wasser aus. Die Oberfläche der Agarplatte sollte aber trocken sein, wenn man Einzelkolonien isolieren will. Daher wird nach dem Beimpfen die Schale umgedreht, um zu verhindern, daß der Agar austrocknet oder Kondenswasser vom Deckel auf die Oberfläche tropft. Früher wurden Glaspetrischalen verwendet. Heute bestehen sie meist aus Plastik. Sie werden durch Ethylenoxid-Begasung sterilisiert.

Handhabung von Mikroorganismen:

Beim Arbeiten mit Reinkulturen müssen Kontaminationen mit nicht gewünschten Mikroorganismen vermieden werden. Für diese Arbeit verwendet man sterile Nährböden, Glassachen, Impfösen usw. Außerdem arbeitet man an einem sauberen, zugfreien Platz in der Nähe eines brennenden Bunsenbrenners.

Nährböden werden meistens im Autoklaven (20 Minuten bei 121 °C und 2 bar) oder durch Filtration sterilisiert. Glasgeräte werden in einem Trockenschrank 60 - 90 Minuten bei

160 °C oder über Nacht bei 125 °C sterilisiert.

Wenn möglich werden Glassachen (Röhrchen, Kolben, Pipetten) mit Wattestopfen verschlossen. Dadurch ermöglicht man freien Zugang von Luft, und zwar ohne daß Bakterien eindringen können. Wattestopfen werden mitsterilisiert (autoklaviert). Für Arbeiten mit Anaerobiern sind Wattestopfen nicht geeignet. Hierfür werden sterilisierbare, luftundurchlässige Gummistopfen oder Serumplättchen und Schraubverschlüsse verwendet.

Für das aseptische Überimpfen von Mikroorganismen werden Öse, Pipette oder Pasteurpipette benutzt. Die Öse wird in der Flamme ausgeglüht und im Agar abgekühlt. Dann kann das Bakterienmaterial ausgestrichen werden. Auch nach dem Gebrauch wird die Öse sofort wieder ausgeglüht und erst dann abgelegt. Diese Manipulationen werden demonstriert.

Sterile Pipetten werden bei der Flamme aus der Pipettendose genommen.

Bitte beim Pipettieren immer eine **Pipettierhilfe** verwenden! (Reine Pipette).

Beim Öffnen des Kulturgefäßes bitte den **Wattestopfen** immer mit dem **kleinen Finger** umschließen.

Beim Pipettieren bitte die **Wattestopfen in den Pipetten** lassen!

Pipettenspitze und andere **Öffnungen** möglichst immer in **Nähe der Flamme** halten!

Kulturröhrchen schräg nach oben!

Keine Wattestopfen vorübergehend ablegen!

2. EINFÜHRUNG IN DIE MIKROSKOPIE

In einem mikrobiologischen Praktikum kann im allgemeinen der Abschnitt über mikroskopische Methoden kurz gehalten werden, da die Einführung in das Mikroskop und das Erlernen mikroskopischer Verfahren meist im kleinen botanischen Praktikum oder in anderen biologischen Grundkursen geboten werden sollten. Dennoch soll ein kurzer Überblick über mikroskopische Methoden gegeben werden.

Lichtmikroskopie:

Die geringe Abmessung der Mikroorganismen (zwischen $0,1\ \mu\text{m}$ und ca. $1\ \text{mm}$ Durchmesser und einigen mm Länge) erfordert komplizierte Mikroskope, die im allgemeinen den Studierenden in einem Praktikum nicht zur Verfügung stehen. Es sollte jedoch darauf geachtet werden, daß Studierende wenigstens einmal die Gelegenheit bekommen, auch an leistungsfähigen Mikroskopen zu arbeiten. Denn viele der heute allgemein gebräuchlichen Methoden sind nur mit solchen Mikroskopen durchführbar.

Bei der Mikroskopie ist es unerlässlich, immer auch Skizzen anzufertigen. Die Zellen sollten nie zu klein gezeichnet werden. Man soll das mikroskopische Bild gewissermaßen nachvergrößern. Bakterienzellen von $1\ \mu\text{m}$ Durchmesser und $1-3\ \mu\text{m}$ Länge sollten in der Zeichnung einen Durchmesser von mindestens $1\ \text{cm}$ und eine Länge von $1-3\ \text{cm}$ erhalten!

Hellfeldverfahren und Einstellen des Mikroskops:

Bei der Hellfeldmikroskopie im Durchlicht können Grenzen und Abmessungen, besonders aber auch natürliche Farben und gefärbte Präparate, besonders gut untersucht werden. Die optimale Ausleuchtung des mikroskopischen Präparates und ein optimaler Strahlengang im Lichtmikroskop werden durch folgende Schritte (auch Köhlern genannt) erzielt (Diese Beschreibung gilt für ein Zeiss-Lichtmikroskop):

1. Objektträger mit Präparat auflegen.
2. Kondensor bis zum oberen Anschlag heraufdrehen.
3. Bild mit Objektischschraube und Mikrometerschraube scharfstellen.
4. Leuchtfeldblende schließen.
5. Bei Drehkondensor auf Stellung "J" einstellen

6. Kondensorblende voll öffnen.
7. Falls vorhanden, Leuchtfeldblende mit den Leuchtfeldblendenverstellungsschrauben zentrieren.
8. Rand der Leuchtfeldblende mit Hilfe des Kondensortischtriebs scharf einstellen.
9. Leuchtfeldblende mit den Zentrierschrauben am Kondensor zentrieren
10. Leuchtfeldblende so weit öffnen, daß das Gesichtsfeld gerade voll ausgeleuchtet ist, regelmäßige Ränder am Bildfeldrand überprüfen, eventuell nachstellen.
11. Kondensoraperturblende auf 2/3 der Objektivöffnung schließen. Dies kann durch das herausgenommene Okular kontrolliert werden.

Phasenkontrastverfahren:

Sehr kleine Mikroorganismen wie Bakterien lassen sich nicht so gut wie Algen, Protozoen etc. im Hellfeld untersuchen, da sie nur einen sehr geringen Absorptionsunterschied gegenüber dem umliegenden Einbettungsmedium haben. In diesem Fall bedient man sich seit langem eines Verfahrens, das geeignet ist, die Absorptionsunterschiede zwischen Bakterien und dem Einbettungsmedium (meistens destilliertes, sterilisiertes Wasser) zu erhöhen. Der Phasenkontrast zwischen Zelle und Wasser wird künstlich erhöht. Phasenkontrastobjekte erhöhen nur die Phase, nicht aber die Amplitude des durchfallenden Lichtes. Im Phasenkontrastmikroskop werden die Phasenunterschiede in Amplitudenunterschiede umgesetzt. Dies wird folgendermaßen erreicht:

Das am Objekt ungebeugt vorbeigehende Licht wird in der hinteren Brennebene des Objektives um 90° gedreht. Der phasenändernde Belag des Objektives ist so angeordnet, daß er mit dem durch das Objektiv entworfenen Beugungsbild der ringförmigen Kondensoraperturblende zur Deckung gebracht werden kann. Durch Interferenz zwischen den ungebrochenen und gebrochenen Bildanteilen kommt es im Bild in der Zwischenbildebene zu partieller Auslöschung. Der Phasenbelag des Objektives ändert nicht nur die Richtung, sondern absorbiert auch ca. 70 % des Lichtes. Daher erscheinen die Objekte dunkel und kontrastreich im hellen Umfeld.

Man kann auch umgekehrt verfahren und negativen Phasenkontrast erzielen. Da die Auslöschung und Trennung von direktem und gebeugtem Licht nie vollständig ist, ergibt sich besonders bei "großen" Objekten eine helle "Halo" um die Organismen.

Das Phasenkontrastverfahren erfordert genaue Kenntnis des Mikroskops!

Mikroskopieren ist Übungssache. Ratsam ist, bei einer anderen Gelegenheit nach Einführung in das Mikroskop mehrere Stunden (bis die Augen tränen) am Mikroskop zu üben. Dazu sollte man ein Präparat oder eine Probe immer wieder mikroskopieren.

Verfahren zur Einstellung des Phasenkontrastes:

1. Objektträger mit sehr dünnem Präparat auflegen.
2. Kondensordrehscheibe (Ph **1, 2, 3**) auf die dem Objektiv entsprechende Stellung bringen (**1** bei 10er, **2** bei 40er- Objektiv, **3** bei 100er-Ölimmersionsobjektiv bei Zeiss-Mikroskopen).
Ölimmersion entweder auf Deckgläschen geben oder bei Trockenpräparaten direkt auf das getrocknete, gefärbte Präparat.
3. Präparat bei 40 bzw. 100 (nach Auftropfen von Öl und Eintauchen in Öl bei 100er-Objektiv) scharfstellen. 100er sichern bzw. entsichern mit Rändel am Objektiv.
4. Ein Okular oder das Okular entfernen und Hilfsmikroskop einsetzen (ein spezielles Okular).
5. Mit Hilfsmikroskop den Phasenring scharfstellen. (Durch Ziehen am schwarzen Teil und Halten des Metallteiles).
6. Phasenring im Objektiv mit dem Bild der Phasenringblende zur Deckung bringen (Einstellschrauben vorn und links am Drehrand des Kondensortisches). Ein gelblicher und ein grauer Ring sind erkennbar, verschiebbar und zur Deckung zu bringen. Das linke mit Rändelmutter versehene Einstellhebelchen wird erst nach Lösen der Rändelmutter vorwärts und rückwärts gedreht, das vordere wird gleich gedreht und nicht fixiert.
7. Okular wieder einsetzen.
8. **Nach dem Mikroskopieren: Öl abwischen mit Linsenpapier!** Mikroskop abschalten, abdecken!

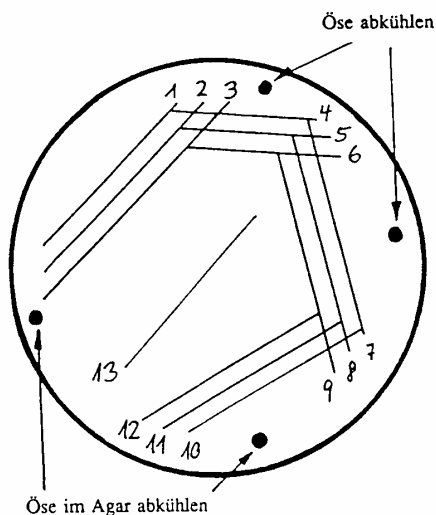
3. DAS PRINZIP DER ANREICHERUNGSKULTUR

Einleitung:

In der Mikrobiologie soll grundsätzlich mit Reinkulturen oder mit definierten Mischkulturen gearbeitet werden. Eine Reinkultur wird definiert als eine Kultur von Organismen, die alle genetisch identisch sind, das heißt, daß alle Zellen in dieser Kultur ursprünglich von einer Zelle abstammen müssen (Klon).

Um eine Kultur, die nicht rein ist, rein zu züchten, wird eine spezielle Methode des Ausstreichens auf dem Agar benutzt. Die Theorie ist, daß man eine Kultur, die den zu isolierenden Organismus enthält, in einer geeigneten Verdünnung auf Agarplatten ausstreicht. Ziel ist es, vereinzelte Kolonien zu bekommen, die aus einer einzigen Zelle entstanden sind. Während der Inkubation teilt sich diese Zelle und viele Tochterzellen bilden eine Kolonie. Wenn wir also auf einer Platte eine isolierte Kolonie finden, dann dürfen wir annehmen, daß deren Zellen von einer einzigen Zelle abstammen. Eine Kultur wird aber erst als rein betrachtet, wenn das Ausstreichen **mindestens noch zweimal** wiederholt wird.

Grundsätzlich gilt: In ein Kulturröhrchen mit sterilem Wasser wird mit einer Öse das zu isolierende Material suspendiert. Die Suspension soll eine kaum sichtbare Trübung haben. Mit einer Öse wird diese Suspension auf Agarplatten ausgestrichen. Hierzu taucht man eine ausgeglühte Öse in die Suspension und streicht aus. Öse nicht in den Agar drücken. Ausstreichverfahren (13- Strichverfahren) wie in der Abbildung durchführen.



Die Impföse muß nach jeweils 3 Strichen erneut ausgeglüht und im Agar abgekühlt werden, bevor die nächsten 3 Striche (zum Schluß 4) zum Ausdünnen der Bakterien gezogen werden.

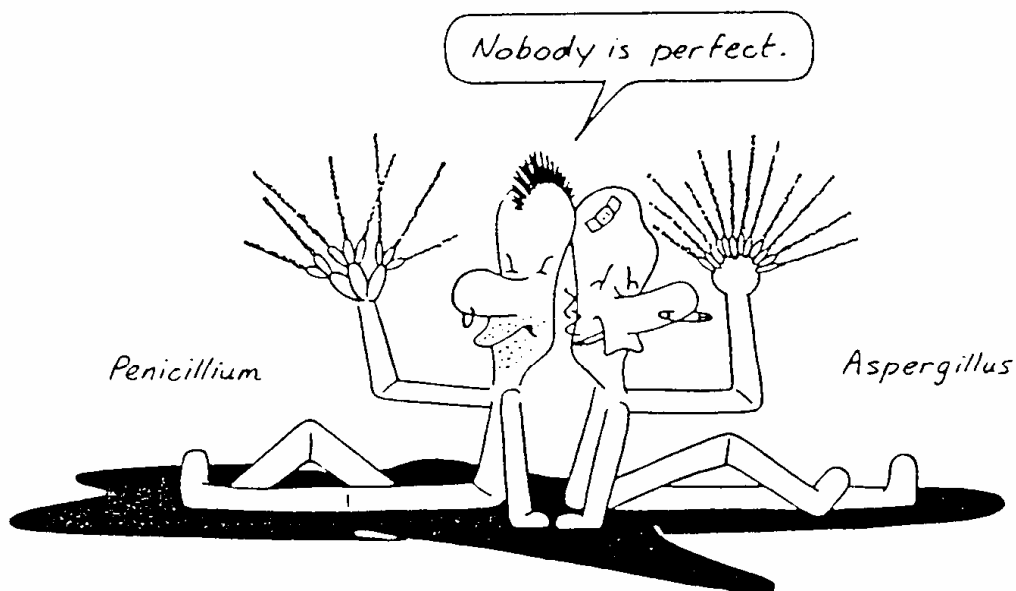
Das Ausstreichen von zu dicken Suspensionen hat keinen Zweck, da man dann keine isolierten Kolonien erhält.

Nach dem Ausstreichen wird die Platte **umgekehrt (Deckel nach unten)** in den Brutschrank gestellt.

Die Platten werden unter definierten Bedingungen (Zeit, Temperatur) inkubiert.

Wenn die Zellen angewachsen sind, wird mikroskopisch festgestellt, ob der zu isolierende Organismus tatsächlich in der Kolonie vorhanden ist. Diese Kolonie wird mit einer Öse erneut ausgestrichen. Wenn auf dieser Platte nur Kolonien des gewünschten Organismus vorhanden sind, dann betrachtet man die Kultur als rein.

Eine dieser Kolonien wird dann mit einer Öse auf Schrägagar beimpft, indem man die Öse in Zick-Zack-Richtung auf dem Agar ausstreicht. Üblicherweise werden 2 Schrägagarröhrchen beimpft. Diese Reinkulturen werden unter definierten Bedingungen inkubiert und anschließend kühl aufbewahrt. Wenn man solche Reinkulturen später für Versuche benutzen will, dann ist es üblich, die Kultur erst auf einen neuen Schrägagar zu überimpfen.



The Fungi imperf^cti resist orderly classification.

(J. Czychos)

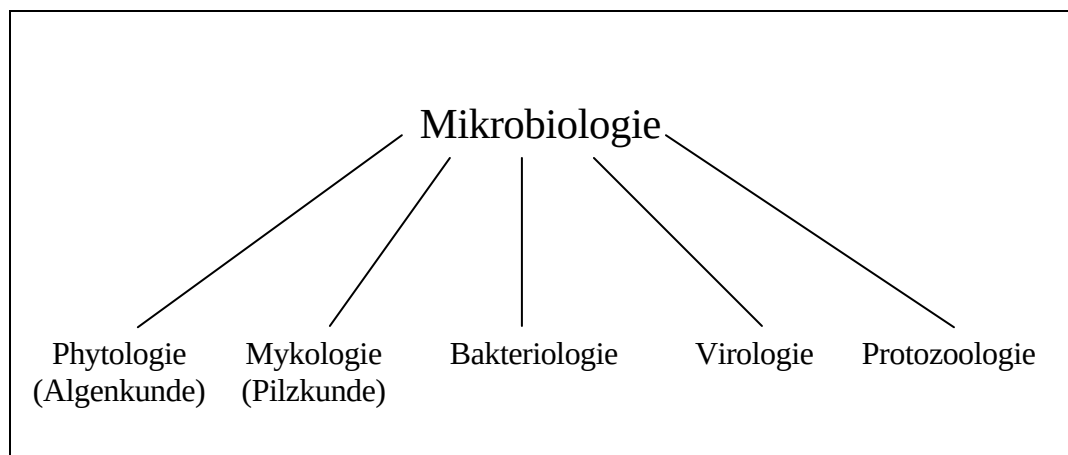
PRAKTIKUMSAUFGABEN

4. MORPHOLOGISCHER ÜBERBLICK

Einführung:

Die Bezeichnung Mikroorganismen beruht auf den geringen Abmessungen der Organismen; sie sind mit dem bloßen Auge nicht zu erkennen ($< 1 \text{ mm}$). Die geringen Abmessungen gaben nicht nur das ursprüngliche Motiv zur Abtrennung der Mikroorganismen von den Tieren und Pflanzen, sondern haben auch wesentliche Konsequenzen hinsichtlich der Morphologie, der Aktivität und der Flexibilität des Stoffwechsels und der ökologischen Verbreitung. Demnach erfaßt die Mikrobiologie neben den Bakterien sowohl die niederen Tiere (Protozoen) wie auch die niederen Pflanzen (Protophyten).

Die Einteilung kann wie folgt schematisiert werden:



Bakterien, Pilze und Viren gelten allgemein als repräsentative Objekte der Mikrobiologie. Wir arbeiten im Grundpraktikum ausschließlich mit Pilzen und Bakterien. Diese lassen sich aufgrund ihrer Zellstruktur (Eukaryot/ Prokaryot) und anderer Merkmale leicht voneinander unterscheiden.

Man kann bei den Bakterien drei morphologische Grundformen unterscheiden:

- Kokken = kugelförmige Bakterien
- Stäbchen = gestreckt zylinderförmige Bakterien
- gekrümmte Stäbchen = schraubenförmige Bakterien

Morphologische Formen verschiedener Bakterien:

 Kokken	 Tetraden  Sarcinen  Staphylokokken  Streptokokken	Diplokokken:  lanzettförmige  semmelförmige
 Stäbchenbakterien	 begeißelte Stäbchenbakterien  Kurzstäbchen  Langstäbchen  Corynebakterien  Sporenbildner	Enden von Stäbchenbakterien: 
 Schraubenbakterien	 Vibrionen  Spirillen	 Treponemen  Leptospiren

Benötigte Materialien pro Gruppe:

- je 1 Petrischale mit verschiedenen Organismen (werden gestellt)
- Objektträger
- Deckgläser
- Stereolupe
- Mikroskop
- Impföse
- Pinzette

Ausführung:

a) Makroskopische Beschreibung charakteristischer Merkmale der Kolonien:

Die Kolonien auf den einzelnen Agarplatten werden zuerst mit dem bloßen Auge und dann unter Zuhilfenahme einer Stereolupe betrachtet. Die Kolonien der verschiedenen Mikroorganismen haben ein charakteristisches Aussehen (Koloniemorphologie), das nach folgenden Gesichtspunkten beschrieben und beurteilt werden kann:

- Farbe
- Form der Kolonie
- Oberfläche der Kolonien

bei Bakterien: Art der Erhebung über dem Nährboden (Profil)

bei Pilzen: Luftmycel; vorhanden oder nicht vorhanden

- Geruch

Beschreibungsmöglichkeiten für Bakterienkolonien:

Ganze Kolonie	Rand	Erhebung	Aussehen
punkt- förmig 	ganz/ unversehrt 	flach 	glatt, schimmernd
kreis- förmig 	wellen- förmig 	erhaben 	rauh
"wurzel"- förmig 	lappig 	gewölbt 	runzelig, faltig, uneben
unregel- mäßig 		kissen- förmig 	trocken
faserig/ fadenartig/ fadenförmig 	kraus 	buckelig 	

b) Mikroskopische Untersuchungen der einzelnen Kolonien (Herstellung eines Lebendpräparates):

- **Kolonien ohne Mycel (Bakterien):** Man stellt sich eine Bakteriensuspension her, indem man mit einer sterilen Impföse etwas von einer Kolonie abstreift, in einem Tropfen dest. Wasser auf einem nicht entfetteten Objektträger möglichst gleichmäßig verrührt und soweit verdünnt, bis eine nur noch leicht getrübe Suspension entsteht. Von dieser Suspension wird eine Impföse voll auf einen Objektträger gebracht und mit

einem Deckglas bedeckt. Wenn das Präparat längere Zeit benutzt werden soll, muß die Verdunstung am Deckglasrand verhindert werden. Das erreicht man durch Umranden des Deckglases mit Vaseline, Deckglaskitt (nach König oder du Noyer) oder Nagellack.

- **Kolonien mit Mycel:** Von den Kolonien mit Mycel wird mit einer sterilen Impföse oder einer Pinzette ein Stück Mycel aufgenommen und auf einen Objektträger mit einem Tropfen Wasser aufgetragen. Beobachtungskriterien für Kolonien mit Mycel sind:
 - Sind Einzelzellen vorhanden?
 - Mycelfäden verzweigt/ unverzweigt?
 - Fortpflanzungsstadien vorhanden (Sporen?)
 - Form und Größe der Sporen (verglichen mit den Zellen)
 - Gibt es Sporenträgerzellen?

Protokoll:

Die Ergebnisse aller Untersuchungen (Auge, Stereolupe, Mikroskop) sollen tabellarisch aufgelistet werden. Von jedem mikroskopischen Präparat ist eine Skizze anzufertigen. Die Nummern an den Petrischalen sollen den verschiedenen Organismen zugeordnet werden. Die Artnamen stehen an der Tafel.



(J. Czichos)

5. FÄRBEMETHODEN IN DER MIKROBIOLOGIE

5.1. Gramfärbung

Einleitung:

1884 entwickelte ein dänischer Arzt Christian Gram eine Färbetechnik für Bakterien, mit der man leicht zwei große Bakteriengruppen unterscheiden kann. Diese Differenzierung in grampositiv und gramnegativ ist aus taxonomischen Gesichtspunkten außerordentlich wichtig.

Es hat sich herausgestellt, daß die Gramfärbung von der Zellwandstruktur (Aufbau) der Bakterien abhängt. Zwischen den Zellwänden von grampositiven und gramnegativen Bakterien bestehen sehr große chemische und ultramorphologische Unterschiede. **Das Stützskelett der Bakterienzellwand besteht aus einem Polymer des Peptidoglycans, dem Murein.** (Bei Pflanzen ist das Zellwandgerüst aus Cellulose und bei bestimmten Tiergruppen und einigen Pilzen aus Chitin aufgebaut.) **Gramnegative** Bakterien haben eine Zellwand, bei der das **Mureinnetz einschichtig** und gewichtsmäßig nur wenig an dem Gesamtgewicht der Zellwand beteiligt ist. An der Außenseite des Mureinnetzes sind große Mengen von Lipoproteinen, Lipopolysacchariden und anderen Lipiden angelagert. Sie machen den größten Anteil der Zellwand aus.

Grampositive Bakterien haben ein **Mureinnetz**, das **mehrschichtig** ist. Das Mureinnetz ist mit Aminosäuren verknüpft, die bei verschiedenen Arten unterschiedlich sein können. Im Gegensatz zu den gramnegativen, bei denen Diaminopimelinsäure Bestandteil der Zellwand ist, ersetzen grampositive diese Aminosäure häufig durch Lysin. Protein und Polysaccharide sind, wenn vorhanden, nur in geringem Maße anwesend.

Eubakterien (= einfache Bakterien wie Kokkus, Stäbchen, Spirillum) mit polaren Geißeln sind fast alle gramnegativ. Stabförmige Pseudomonaden, Vibrionen mit gekrümmten, stabförmigen Zellen, Spirillen, Caulobakter- Arten und alle photosynthetischen Bakterien sind gramnegativ.

Peritrich begeißelte Eubakterien sind entweder grampositiv oder gramnegativ. Die Hauptgruppen der grampositiven Eubakterien sind alle Actinomyceten, mehrere große Gruppen von unbeweglichen, stäbchenförmigen, nicht sporenbildenden Bakterien (z. B. *Lactobacillus* und die Propionsäurebakterien), alle stäbchenförmigen Bakterien, die

Endosporen bilden, und die meisten Kokken. Man sollte aber beachten, daß viele Bakterien gramvariabel sind, das heißt, einmal werden sie als grampositiv charakterisiert, ein anderes Mal als gramnegativ. Dies liegt in den meisten Fällen daran, daß man Material unterschiedlicher Wachstumsphasen genommen hat, und/ oder am Medium, das benutzt wurde. Wichtig ist, daß man für die Untersuchung eine junge Kultur nimmt, am besten am Ende der logarithmischen Phase.

Zwei Tatsachen, die eng mit dem Gramcharakter zusammenhängen, sind noch erwähnenswert. Grampositive Bakterien sind im allgemeinen empfindlich für das Enzym Lysozym (siehe auch Versuch mit den Tränen). Lysozym spaltet die glykosidische Bindung des Mureins zwischen dem C- Atom 1 der N-Acetylmuraminsäure und dem C-Atom 4 des N-Acetylglucosamins und baut die Mucopolysaccharide zu dem Disaccharid GlcNAc-MurNAc ab. Lysozym ist somit eine (N-Acetal-) Muramidase. Ist die Zellwand abgebaut, so platzt die Zelle infolge der Veränderung des osmotischen Drucks. Gramnegative Bakterien sind nicht so empfindlich, weil das Lysozym das Murein nicht angreifen kann. (An der Außenseite liegt eine dicke Lipoid-Schicht!)

Zur Erhaltung der Stabilität der Lipopolysaccharidschicht ist Ca^{++} notwendig. Wird Ca^{++} entfernt, (z. B. mit komplexbildenden Agenzien wie EDTA), sind auch gramnegative Bakterien empfindlich für Lysozym.

Das Antibiotikum Penicillin tötet hauptsächlich grampositive Bakterien ab. Penicillin greift in die Zellwandbildung ein, indem es die Quervernetzung über die Peptidketten im Mucopolysaccharid verhindert. Daher greift Penicillin auch nur wachsende, aber keine ruhenden Zellen an.

Benötigte Materialien pro Gruppe:

- Junge Kulturen (weniger als 24 Stunden alt) von *E. coli* und *B. megaterium* auf Schrägagar (Nutrient-Agar) oder in Flüssigkultur
- 0.5 %ige Lösung von Kristallviolett (pH 7,5) oder Karbolgentianaviolett (!DNA-Schäden!) (filtriert!), gebrauchsfertig
- JKJ-(Lugol)-Lösung (1 g Jod und 2 g K-Jodid in wenig Wasser lösen und dann auffüllen bis 300 ml), gebrauchsfertig
- 0.5 % Lösung von Safranin oder Fuchsin (carcinogen?), gebrauchsfertig
- 1 Färbeschale
- Spritzflasche mit Aqua dest.
- Spritzflasche mit 96 % Alkohol, Handschuhe, Reagenzglaszange

Ausführung:

Ausstrich-Präparate werden mit einer **wässrigen Lösung** eines **Triphenylmethanfarbstoff** gefärbt (z. B. Kristallviolett) und danach mit **JKJ-Lösung** behandelt. Dabei bildet sich eine **intrazelluläre Kristallviolett-Jod-Verbindung**, die sich von Kristallviolett durch ihre geringe Löslichkeit in Ethanol unterscheidet. Werden die mit Kristallviolett gefärbten und mit Jod behandelten Präparate mit **Ethanol gespült, so behalten grampositive Mikroorganismen die violettschwarze Farbe. Gramnegative werden entfärbt.** Die Ethanolkonzentration ist sehr wichtig für die Entfärbung: Bei Konzentrationen unter 96 % werden grampositive Mikroorganismen ebenfalls entfärbt. Schwach grampositive Bakterien entfärben schnell, auch bei nur geringfügig erniedrigter Ethanolkonzentration. **Gramnegative Mikroorganismen werden mit Hilfe einer Nachfärbung (Safranin oder Fuchsin) sichtbar gemacht.**

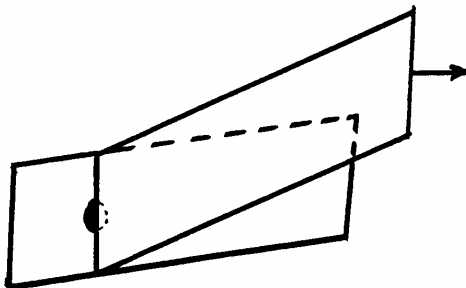
Jede Gruppe führt alle Färbungen durch:

1. Auf einem fettfreien Objektträger (mit etwas 96 % Ethanol reinigen, mit Kleenex Tuch trockenreiben) wird mit einer Öse ein sehr dünner Ausstrich gemacht.

Alternative (a): Material aus einer Flüssigmedium-Kultur gleichmäßig auf Objektträger ausstreichen (in ca. Pfennigstückgröße).

Alternative (b): Von einem festen Nährboden wird sehr wenig Zellmaterial auf einem Objektträger in einem Tropfen Wasser suspendiert und über eine sehr große Oberfläche ausgestrichen. Ratsam ist, mehrere Präparate gleichzeitig zu machen.

Herstellen eines Ausstrichpräparates:



2. Die Präparate werden an der Luft getrocknet.
3. Flammenfixierung: Trockenen Ausstrich mit der **beschichteten Seite nach oben (!)** 3 - 4 mal in Abständen von 1 - 2 sec. schnell durch die Bunsenbrennerflamme ziehen.
4. Eine wässrige Kristallviolett- oder Karbolgentianaviolettlösung wird auf das Präparat gebracht; 1 Minute einwirken lassen. Das Präparat wird danach mit der **Unterseite nach oben** mit Aqua dest. aus der Spritzflasche über der Färbefbank abgespült.
5. Lugolsche Lösung (Jodlösung) auftropfen und 1 Minute auf das Präparat einwirken lassen. Anschließend die Lösung mit Aqua dest. abspülen und an der Luft trocknen lassen.
6. Zur Entfärbung **96 %iges Ethanol** auftropfen und den Objektträger 30 sec. lang leicht schwenken.
7. Zur Gegenfärbung 10 sec. lang Safraninlösung oder Fuchsinlösung einwirken lassen. Den Farbstoff mit Aqua dest. abspülen und das Präparat an der Luft trocknen lassen.
8. Die Präparate werden **ohne Deckgläschen** mit Oelimmersion mikroskopiert. Die Objektive des Mikroskops werden danach mit Linsenpapier gesäubert.
9. Es werden Präparate von *E. coli*, *B. megaterium* und einer Mischung von beiden hergestellt. Protokolliere das Gramverhalten beider Organismen.

Auswertung:

Gram-positive Bakterien = dunkelblau bis violett

Gram-negative Bakterien = hellrot

5.2. KOH-Test

Einleitung:

Für die Charakterisierung von unbekannten Mikroorganismen ist es wichtig, ihr Gramverhalten zu kennen. Dazu ist eine **schnelle** und **zuverlässige Methode** erforderlich. Routinemäßig wird als Methode die Gramfärbung genommen (siehe Gramfärbung). Die Gramfärbung hat aber einige Nachteile:

- a) Wie jede Färbung muß sie sehr genau und sorgfältig ausgeführt werden. Alle Lösungen müssen von guter Qualität sein, um aussagekräftige und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.
- b) Die Kulturen müssen jung sein, bis zur früh-stationären Phase (siehe Wachstumskurve).
- c) Einige Kulturen sind bekannt als Gramvariabel, was die Charakterisierung nicht vereinfacht.

Der KOH-Test ist weniger aufwendig: Die Zellen werden in einer **sehr alkalischen KOH-Lösung** suspendiert. **Gramnegative Organismen lysieren (Zellen platzen), grampositive Organismen nicht.** Auch dieser Unterschied wird durch die unterschiedliche Struktur der Zellwand von gramnegativen und grampositiven Organismen bewirkt.

Durch die Lyse wird DNS (= DNA) freigesetzt. DNS ist ein Makromolekül und **erhöht**, frei in Lösung, die **Viskosität** der Lösung, die dadurch schleimig wird. Die Viskosität der Suspension ist für den Test entscheidender Parameter.

Benötigte Materialien pro Gruppe:

- Junge Kulturen (weniger als 6 Stunden alt) von *E. coli* (Med 1) und *B. megaterium* Med 1) verwenden. Kulturen sind auf Festmedium (Platte).
- 3 %ige KOH-Lösung (ätzend!)

Ausführung:

Ein bis zwei Tröpfchen 3 %ige KOH-Lösung werden auf einen Objektträger gebracht. Eine große Kolonie oder mehrere kleine Kolonien (möglichst viel Zellmaterial; es muß eine weißliche Suspension sein) werden mit einer Öse von einem festen Nährboden in der

KOH-Lösung gelöst. Diese Suspension wird dann noch 5 - 10 sec. mit der Öse gerührt.

Die Öse wird dann **langsam** aus der Suspension gezogen. Dabei wird gegen einen dunklen Hintergrund beobachtet, ob die Suspension mit der Öse mitgezogen wird (viskos ist) oder nicht. Als positive Reaktion wird bezeichnet, wenn ein Schleimfaden 0.5 - 2.0 cm aus der Suspension hochgezogen wird. Bleibt die Suspension wässrig, (kein Schleimfaden an der Öse) so ist die Reaktion negativ.

Gramnegative Bakterien zeigen eine positive Reaktion, grampositive Bakterien zeigen eine negative Reaktion.

Benutze als Test-Organismen *E. coli* und *B. megaterium* und vergleiche die Ergebnisse mit denen der Gramfärbung. Teste weitere Organismen. **Jeder Student führt den Test aus.**

5.3. Zahnflorapräparat (Negativ-Färbung)

Einleitung:

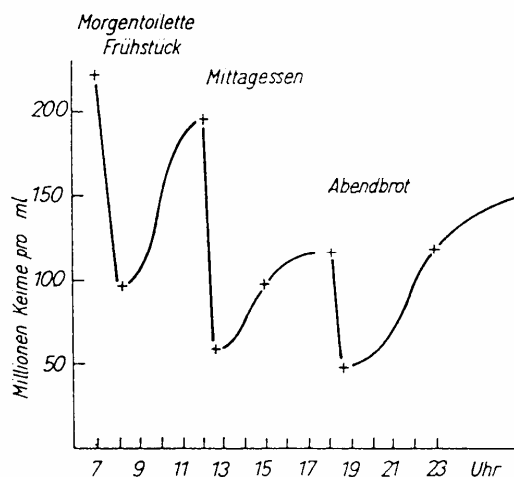
Mikroorganismen studiert man unter dem Lichtmikroskop am besten in einer wässrigen Suspension im Phasenkontrast. (Warum soll man für Mikroorganismen ein Phasenkontrastmikroskop benutzen? Soll man das grundsätzlich immer machen? Wie ist das mit den angefärbten Präparaten?) Der Nachteil von Farbpräparaten ist, daß man immer tote Organismen mikroskopiert, und daß mit der Färbung auch unerwünschte Mißbildungen auftreten können (=Artefakte).

Bestimmte Strukturen wie z. B. Polysaccharidkapseln, die an der Außenseite der Zellwand liegen, sind im Wasserpräparat oft nicht sichtbar.

Solche Strukturen kann man sichtbar machen, indem die Organismen in einer undurchsichtigen Flüssigkeit, die in die Zellen nicht eindringen, suspendiert. Dazu verwendet man z. B. Nigrosin oder Tinte. Danach wird die Suspension sehr dünn auf einem Objektträger ausgestrichen. Beim Mikroskopieren sieht man dann die lichtdurchlässigen Strukturen gegen einen dunklen Hintergrund.

Man nennt diese Technik Negativ-Färbung. Dies ist eine irreführende Bezeichnung: Es handelt sich nicht um eine Färbung im eigentlichen Sinne. Zum Kennenlernen dieser Methode wird ein Präparat der eigenen Mundflora hergestellt.

Tagesverlauf der Keimdichte im Speichel:



Angaben zur Zahnflora:

Corynebakterien	oft Krankheitserreger, gerade oder leicht gekrümmte Stäbchen; Enden können spitz zulaufen oder wie ein "Peitschengriff" aussehen; Zellen können winklig angeordnet sein; ("Chinesische Buchstaben: V-Form"); Gram +; pleomorph
Campylobacter	schraubenförmig gekrümmte Stäbchen (vibroid); 0,2 - 0,5 µm breit; 0,5 - 8 µm lang; Commensalen oder pathogen; Energiegewinn durch Atmung; Gram -
Streptococcen	<i>Streptococcus salivarius</i> bildet Levan als extracelluläres Polysaccharid ---> Karies ---> Milchsäurebakterien; Gram +
Spirochäten	0,1 - 0,5 µm breit, 5 - 40 µm lang und mehr schraubenähnlich gewundene Fadenform, sehr flexibel; im Gegensatz zu den größeren und polar begeißelten Spirillen haben Spirochäten keine starre konstant bleibende Gestalt; besitzen keine Geißeln; Gram -
Bewegungsfähigkeit	beruht auf Vorhandensein von Fibrillen und Fibrillenbündeln (nur im Elektronenmikroskop sichtbar), die einen Zytoplasmazyylinder umschlingen
Fortbewegung	typische Schraubenform; durchläuft Veränderungen, die durch Beugung, Streckung oder Rotation um die Längsachse hervorgerufen werden.

Bakterien aus dem Zahnbelag:

1. *Corynebacterium matruchotii*
2. *Corynebacterium matruchotii*
- (1. + 2. vormalig als 2 Arten angesehen)
3. *Campylobacter sputorum*
4. Micrococci u. Streptococci
5. Spirochäten (z. B. *Treponema dentium*)

Benötigte Materialien pro Gruppe:

- Zahnstocher
- Nigrosinlösung gesättigt und filtriert, gebrauchsfertig

Ausführung:

Ein Objektträger wird entfettet (siehe Gramfärbung). Danach wird an eine schmale Seite des Objektträgers ein Tröpfchen Nigrosinlösung und ein Wassertröpfchen gebracht. In das letztere suspendiert man mit einem Zahnstocher etwas Zahnbelag. Zahnbelag aus den Zwischenräumen der hinteren Zähne entnehmen. Danach mischt man beide Tröpfchen und streicht die Flüssigkeit sehr dünn aus. Nach dem Trocknen an der Luft wird das Präparat mit Oelimmersion mikroskopiert.

Beschreibe das Ergebnis und zeichne die verschiedenen Organismen.

5.4. Sporenfärbung

Einleitung:

Die Fähigkeit, mehr oder weniger thermoresistente Sporen zu bilden, ist mit wenigen Ausnahmen auf eine Gruppe von **peritrich begeißelten Stäbchen** beschränkt. Sie sind **grampositiv**. Die aeroben und fakultativ anaeroben Stäbchen sind in der Gattung *Bacillus*, die anaeroben in den Gattungen *Clostridium* und *Desulfotomaculum* zusammengefaßt.

Die Sporen entstehen im Innern der Bakterienzelle: Die Sporenbildung beginnt mit einer Ansammlung von proteinhaltigem Material. Das Lichtbrechungsvermögen des Sporenbereichs nimmt zu (was bedeutet das für die Beobachtung im Mikroskop?). Unter Verwertung von vorhandenen Speicherstoffen (Poly- β -hydroxybuttersäure bei Aerobiern oder Polysacchariden bei Anaerobiern) erfolgen zahlreiche Stoffumwandlungen. Während der ersten fünf Stunden der Sporenbildung werden 75 % der Proteine der Mutterzelle abgebaut. Als sporenspezifische Substanz wird dabei Dipicolinsäure (Pyridin-2,6--dicarbonsäure) gebildet.

Nicht immer sind die Sporen in einem normalen Präparat leicht zu erkennen. Außerdem ist es aus taxonomischen Gesichtspunkten sehr wichtig, die Form und die Lage der Spore in der Zelle zu erkennen. Aus diesem Grunde führt man Sporenfärbungen durch.

Lage von Sporen in der bakteriellen Zelle:



zentral



terminal



terminal (Sporenmutter
zelle angeschwollen)

Benötigte Materialien pro Gruppe:

- Flüssigkultur von *B. subtilis* wird gestellt
- Lösung von 5 % Malachitgrün (carcinogen?), gebrauchsfertig
- Lösung von 0.5 % Safranin (carcinogen?), gebrauchsfertig
- 1 Färbeschale
- 1 Reagenzglaszange
- Handschuhe

Ausführung:

Bakteriensporen sind sehr wenig durchlässig für Farbstoffe. Bei Erhitzung können sie jedoch angefärbt werden. Wird das Präparat nach der Färbung gespült, bleiben die Sporen gefärbt, während sich das Cytoplasma entfärbt. Durch eine Nachfärbung macht man das Cytoplasma sichtbar.

Jeder Teilnehmer der Gruppe führt die Färbung durch:

- Fixierung der Kultur wie bei der Gramfärbung.
- Gieße die Malachitgrün-Lösung über das Präparat. Laß den Farbstoff 5 Minuten einwirken. Dabei muß das Präparat erwärmt werden, bis sich Dampf über dem Präparat zu entwickeln beginnt. Es soll **nicht** kochen! Achte darauf, daß das Präparat nicht austrocknet: Immer mit Farbstoff naß halten. Danach wird mit Wasser gespült und mit Safranin nachgefärbt (30 Sek.).
- Präparat spülen und trocknen lassen
- Mit Oelimmersion mikroskopieren (Objektiv wieder reinigen).
- Mehrere Präparate machen.
- Beschreibe das Ergebnis und mache eine Zeichnung.

Sollte die beschriebene Sporenfärbung nicht eindeutig gelingen, so können folgende Alternativfärbungen durchgeführt werden:

1. nach Schröder:

- a) Fixierung wie bei der Gramfärbung
- b) Malachitgrün-Lösung aufbringen, **vorsichtig(!)** eindampfen, so daß keine gelbe Kruste, sondern ein grüner metallischer Glanz entsteht.
- c) Abspülen mit Wasser.

- d) Objektträger 4 - 5 min in ein wassergefülltes Becherglas stellen.
- e) Dann 10 min mit Safranin-Lösung (siehe Gramfärbung) nachfärben.
- f) Mit Wasser spülen und an der Luft trocknen lassen. Man kann das Präparat auch vorsichtig !!! mit einem Kleenex-Tuch abtupfen.

2. nach Janke-Dickscheit (Kaltfärbung!):

- a) Fixierung wie bei der Gramfärbung
- b) Malachitgrün-Lösung aufbringen, und 10 min **kalt(!)** stehen lassen.
- c) Spülen bis keine "Farbwolken" mehr auftreten.
- d) Dann 15 sec. mit Safranin nachfärben.
- e) Mit Wasser spülen und an der Luft trocknen lassen. Man kann das Präparat auch vorsichtig !!! mit einem Kleenex-Tuch abtupfen

6. GEWINNUNG VON REINKULTUREN

6.1. Hefeisolierung von Rosinen

Einleitung:

Dieser Versuch ist gedacht als Beispiel dafür, wie man bestimmte Organismen anreichern kann. Hefen kann man unter natürlichen Bedingungen dort finden, wo es Zucker gibt, z. B. auf Früchten und in honigreichen Blüten. Beim Anreichern macht man häufig davon Gebrauch, daß Hefen bei niedrigem pH-Wert wachsen und hohe Konzentrationen nicht dissoziierter organischer Säuren ertragen können. Viele Hefearten sind außerdem in der Lage, sich unter anaeroben Bedingungen zu vermehren, so daß in vielen Fällen Anreicherungskulturen in Flaschen mit Gummistopfen (Gärverschuß) (Stopfflaschen) angesetzt werden können. Hefen sind eukaryotische Pilze (Ascomyceten).

Benötigte Materialien pro Gruppe:

- 1 Flasche mit Deckel 100 ml (steril!)
- 1 x 120 ml Malzextrakt, mit Milchsäure auf pH 4.5 angesäuert; gebrauchsfertig; in Serumflasche
- Rosinen (ungeschwefelt) für alle Gruppen
- 12 x Malzagar (pH 5)
- 4 x Malzschrägagar pH 5
- 2 x 2 ml steriles Wasser

Ausführung:

a) Anreicherung von Hefen:

In eine Gärflasche werden einige Rosinen gefüllt. Die Flasche wird danach ganz mit Malzextrakt pH 4.5 gefüllt. Der Stopfen wird auf der Flasche angebracht, so daß sich keine Luft mehr unter dem Stopfen befindet. Die Flasche wird in einem Deckel einer Petrischale im Brutschrank bei 30 °C inkubiert (Frage: Wozu wird die Flasche in einen Deckel gestellt?).

b) Isolierung von Hefen:

Die Flüssigkeit wird nach 1 und nach 2 Tagen mikroskopiert. Sie wird auf Malzagar (pH 5) ausgestrichen, wenn Hefen vorhanden sind. Es wird entweder direkt oder über eine Suspension in 2 ml sterilem Wasser ausgestrichen. Das hängt von der Anzahl der vorhandenen Hefezellen ab. Jede Gruppe züchtet zwei Hefe-Reinkulturen.

6. 2. Anreicherung von *Lactobacillus* aus Hefe

Wenn man ein Bakterium aus einem Milieu isolieren will, wo neben diesem Bakterium noch viele andere Mikroorganismen vorkommen, ist es notwendig, erst das betreffende Bakterium anzureichern. Das Prinzip der Anreicherungskultur ist, daß man das Medium, die Probenbehandlung und die Inkubationsumstände so wählt, daß möglichst nur das zu isolierende Bakterium wachsen kann. Das Wachstum anderer Bakterien sollte dagegen unterdrückt werden. Voraussetzung ist natürlich, daß man die physiologischen Eigenschaften dieser Art ziemlich genau kennt. In solch einer Anreicherungskultur sollte das zu isolierende Bakterium nach einer bestimmten Inkubationszeit die übergroße Mehrheit der Mikroorganismen bilden.

Als Beispiel solch einer Anreicherungskultur versuchen wir ein Bakterium aus Bäckerhefe zu isolieren. Bakterien kommen in Bäckerhefe in nur so geringer Zahl vor, daß man unter dem Mikroskop lange suchen muß, um eines zu finden.

Die Isolierung derartiger Bakterien geschieht durch Überimpfen einer bestimmten Menge Bäckerhefe in ein Medium, in dem das Bakterium gut, die Hefe aber nicht wächst.

Benötigte Materialien pro Gruppe:

- Bäckerhefe: 2 Würfel für alle Gruppen
- 1 x 100 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml Bouillon-Medium pH 7
- 1 x Röhrchen mit 2 ml sterilem Wasser
- 6 x Bouillonagar-Platten pH 7
- 2 x Platten mit Chinablau-Latose Agar

Ausführung:

Impfe ca. 0.5 g Bäckerhefe in einen 100 ml Erlenmeyerkolben, gefüllt mit ca. 50 ml Bouillon (pH 7.0). Inkubiere den Kolben über Nacht bei 30 °C. **Ohne den Erlenmeyerkolben zu schütteln** (die Hefen sind aufgrund ihrer Größe auf den Boden gesunken, die Bakterien jedoch befinden sich in der Flüssigkeitssäule), wird am folgenden Tage eine Öse Bouillon aus dem Kolben genommen. Arbeite steril!

Wenn unter dem Mikroskop Bakterien zu sehen sind, wird auf Bouillonagar ausgestrichen. Ist die Zahl der Bakterien schon außerordentlich hoch, streicht man die Bakterien nicht direkt auf den Agar, sondern verdünnt zunächst mit sterilem Wasser. Dazu beimpft man ca. 2 ml steriles Wasser mit Hilfe einer Öse mit dem Bakterienmaterial. Daraus wird dann auf Bouillonagar ausgestrichen. Führe in den nächsten Tagen die fortschreitende Reinigung durch mehrfaches Überimpfen einzeln stehender Kolonien fort.

7. KEIMZAHLBESTIMMUNGSMETHODEN

Einführung:

Grundsätzlich können Bakterien auf zwei Arten gezählt werden. Einerseits kann die Partikelzahl bzw. -masse bestimmt werden und andererseits können Funktionen der lebenden Zellen (Vermehrungsfähigkeit) dazu benutzt werden. Es gibt eine Vielzahl von Zählmöglichkeiten, die in der nachfolgenden Abbildung dargestellt sind.

Methoden zur Keimzahlbestimmung:

Lebendzellzahl	- direkte Zählung	Gußplattenverfahren Spatelplattenverfahren Glasperlenverfahren Tropfverfahren Membranfilterverfahren Spiralierverfahren Most-probable-number-Methode (MPN-Methode)
	- indirekte Zählung	Bestimmung der Einbaurate isotoopenmarkierter Vorstufen, z.B. ^3H -Thymidin Messung der Konzentration von DNA, Protein, ATP und anderen für die Zelle essentiellen Molekülen Messung der metabolischen Aktivität pro Zeiteinheit über Änderung der Zusammensetzung des Kulturmediums Mikrokalorimetrie
Partikelzählung	- direkte Zählung	mikroskopische Zählung in geeigneten Zählkammern elektronische Zählung mit dem Coulter Counter
	- indirekte Zählung	Trübungsmessung im Photometer Gewichtsbestimmung (Trockengewicht, Feuchtgewicht)

Zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl (alle in einer Probe vorhandenen Mikroorganismen = Keime) werden wir zwei Methoden kennenlernen; zur Bestimmung der Lebendkeimzahl werden wir die Mikroorganismen auf Nähragarplatten ausplattieren.

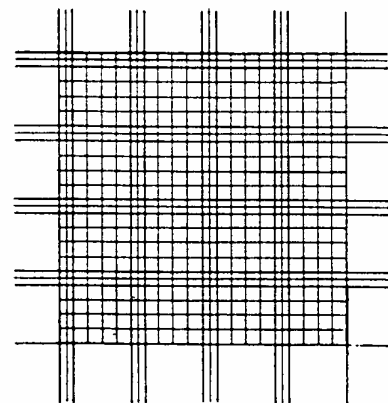
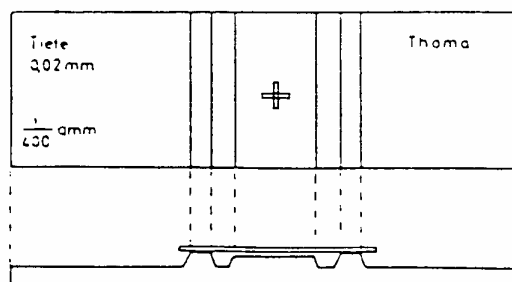
7.1. Bestimmung der Gesamtkeimzahl mit dem Zählkammerverfahren

Die Zählkammer ist im Prinzip ein dicker, plangeschliffener Objektträger, in dem in der Mitte ein von zwei Rinnen begrenzter Steg eingeschliffen ist. Zwei Kammern stehen zur Verfügung, die Thomakammer und die Bürger-Türk-Kammer. In den Steg ist ein (Bürger-Türk: zwei) Netzquadrat(e) eingätzt, das bei der Thomakammer in 16 oder 25 Großquadrate (b-Felder) unterteilt ist. Letztere setzen sich wiederum aus 16 Kleinquadraten (c-Felder) zusammen (siehe Abb.). Die Kantenlänge eines Kleinquadrates beträgt 0,05 mm, seine Fläche damit $1/400 \text{ mm}^2$. Dieser Wert ist auf der Zählkammer angegeben, ebenso wie die Tiefe der Kammer (= Abstand zwischen Oberseite des Steges und Unterseite des richtig aufgelegten plangeschliffenen Deckglases). Die Oberfläche des Steges liegt bei Kammern zum Zählen von **Bakterien 0,02 mm**, bei solchen zum Zählen von **Hefen** oder anderen Mikroorganismen ähnlicher Größe **0,1 mm** unter der Oberfläche der die Rinnen begrenzenden plangeschliffenen Teile des Objektträgers.

Hinweis: Bitte machen Sie sich das Prinzip der Zählkammer klar. Bitte vorher ohne Objekte mikroskopieren und die einzelnen Quadrate "abfahren".

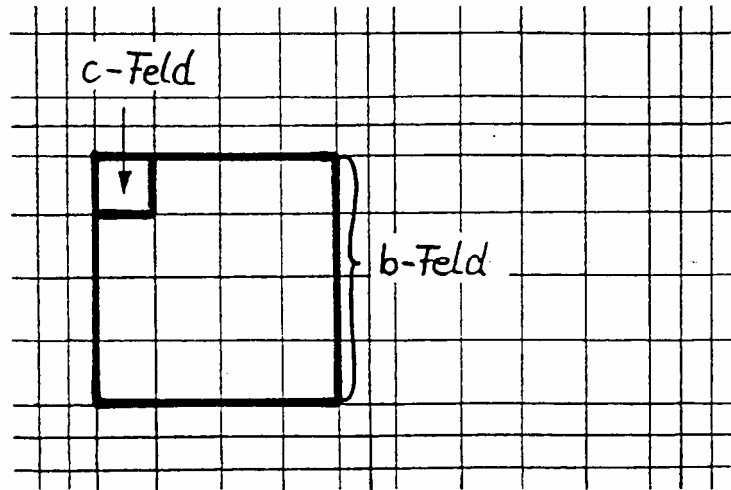
Zählkammer nach THOMA:

a) Auf- und Seitenansicht:



Wichtig: Auf die angegebene Tiefe auf der Zählkammer achten!

b) Ausschnitt aus der Fläche mit den eingetätzten Zählquadraten



Benötigte Materialien pro Gruppe:

- Bäckerhefe: nur 1 Suspension für alle Gruppen (5 g in 1 l Lösung, gebrauchsfertig)
- 1 Zählkammer

Ausführung:

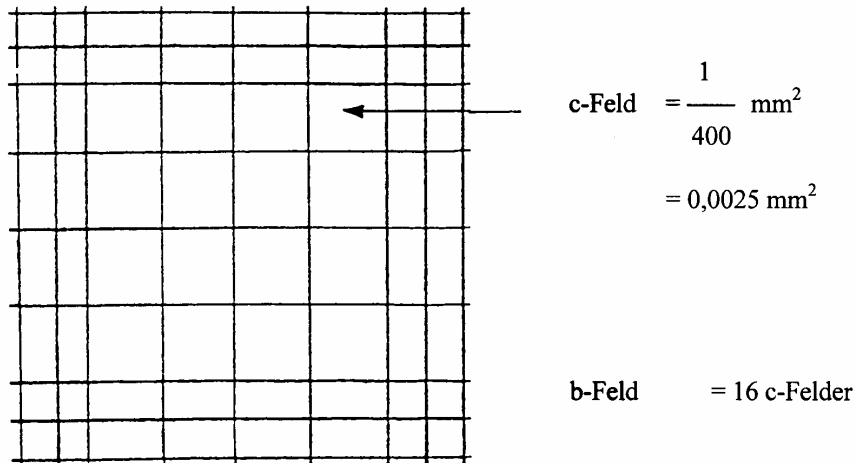
1. Zählkammer und dazugehöriges dickes Deckglas mit weichem Papier vorsichtig reinigen.
2. **Beschicken der Zählkammer:** Das Deckgläschen mit vorsichtigem aber kräftigem Druck auf die zuvor angehauchten Deckglasträger (Stege) aufschieben. Wenn es sich nur noch schwer bewegen läßt und sich die "Newtonschen Farbenringe" auf beiden Deckglasträgern zeigen, wird die Zählkammer beschickt.

Von der Seite her mit einer **sterilen (!?)** Pasteur-Pipette so viel Hefesuspension am Rande des Deckglases auf den **mittleren** Steg bringen, daß der Raum unter dem Deckglas gerade gefüllt ist.

Auf keinen Fall darf auf den seitlichen Stegen Flüssigkeit unter das Deckglas gelangen!

Die Hefesuspension vor Entnahme mit der sterilen Pipette zur gleichmäßigen Verteilung der Zellen **kräftig schütteln!**

3. **Auszählen:** Zählkammer unter das Mikroskop legen und bei schwacher Vergrößerung (100-fach) Netzeinteilung suchen. Scharf einstellen und bei stärkerer Vergrößerung (400-fach) mindestens 8 Groß-Quadrate (b-Felder) auszählen.



Zellen, die auf den Begrenzungslinien der Klein-Quadrate (c-Felder) liegen, nur **1x** zählen und nur die Zellen auf den dicken Linien (oben und rechts) der oberen und rechten 4 Klein-Quadrate (c-Felder). Zwischen den Begrenzungslinien der Groß-Quadrate (b-Felder) liegende Zellen werden nicht mitgezählt.

4. Gezählte Zellen durch Zahl der ausgezählten Kleinquadrate (c-Felder) dividieren (Mittelwert Zellen pro c-Feld):

- Zellzahl/l nach folgender Formel* berechnen (für die Tiefe 0,02 mm):

$$1 \text{ Zelle/Klein-Quadrat (c-Feld)} = 4 \times 10^9 \text{ Zellen/l Suspension}$$

1 g Hefe enthält Zellen.

* Rechenweg:

$$\begin{aligned}
 & 1 \text{ Zelle / Klein-Quadrat (c-Feld)} \\
 &= 1 \text{ Zelle} / 0,05 \times 0,05 \times \mathbf{0,1} \text{ mm}^3 \\
 &= 1 \text{ Zelle} / 0,00025 \text{ mm}^3 \\
 &= 1\,000 \text{ Z.} / 0,25 \text{ mm}^3 \\
 &= 4\,000 \text{ Z.} / 1 \text{ mm}^3 && (1000 \text{ mm}^3 = 1 \text{ cm}^3 = 1 \text{ ml}) \\
 &= \mathbf{4\,000\,000 \text{ Z.} / 1 \text{ ml}} \text{ -----> wichtig für Versuch 7.2 (!)} \\
 &= 4\,000\,000\,000 \text{ Z.} / 1 \text{ l} \\
 &= 4 \times 10^9 \text{ Z.} / 1
 \end{aligned}$$

7.2. Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (Zellen) im Plattengußverfahren (Lebendkeimzahl)

Man kann die Zahl der Hefezellen auch dadurch quantitativ bestimmen, daß man eine geeignete Verdünnung der Hefesuspension auf Malzagar überimpft und dann die Zahl der Kolonien zählt, die aus diesen Zellen entstanden sind.

Von der benutzten Suspension werden 1 ml mit sterilem Wasser so verdünnt, daß sich in der Verdünnung ca. **30 - 300 Zellen pro ml** befinden. Diese Verdünnung berechnet man mit dem unter 7.1 gefundenen Wert. Zusätzlich werden noch eine höhere und eine niedrigere Verdünnung gemacht. Zum Beispiel: Ist die richtige Verdünnung 10^{-5} , so wird auch 10^{-4} und 10^{-6} ausplattiert. Es sollen immer nur homogene Suspensionen verdünnt werden, meist in 1 : 10 Vol/Vol. Von den drei Verdünnungen wird jeweils 1 ml in eine leere Petrischale pipettiert, und dann wird gerade noch flüssiger (45 °C) Malzagar (pH 7) in die Schalen gegossen. Nicht zu dick gießen! Es wird sofort gut durchgemischt, und man läßt den Agar fest werden. Selbstverständlich wird dies dreifach gemacht (warum?). Die Platten werden jetzt 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Dann werden die Kolonien gezählt. Auch hieraus wird die Zahl der Hefezellen pro Gramm Bäckerhefe berechnet. Vergleiche dieses Ergebnis mit der direkten Zellzählung. Ergibt es einen Unterschied? Wenn ja, suche eine Erklärung dafür!

Benötigte Materialien pro Gruppe:

- Bäckerhefe: nur 1 Suspension für alle Gruppen (5 g in 1 l Lösung, gebrauchsfertig)
- 200 ml Malzagar, gerade flüssig, 45 °C (pH 7)
- 9 Petrischalen
- 7 Reagenzgläser
- Steriles Wasser

8. HERSTELLUNG VON NUTRIENT-AGARPLATTEN

Einleitung:

Kulturmedien sind Lösungen, die alle für das Wachstum der betreffenden Organismen erforderlichen Bestandteile enthalten. Mengenmäßig Hauptbestandteil jedes Kulturmediums ist Wasser, da das Wachstum von Mikroorganismen immer an das Vorhandensein von Wasser gebunden ist. Verwendet wird Aqua dest. oder entionisiertes Wasser.

Es gibt verschiedene Typen von Medien:

- a) **Vollmedien** enthalten neben den unbedingt erforderlichen essentiellen Nährstoffen auch Verbindungen, die dieser Organismus selbst herstellen kann, deren Zusatz das Wachstum jedoch beschleunigt.
 - definierte (synthetische) Kulturmedien
 - komplexe Medien mit nicht genau definierten Bestandteilen wie z. B. Hefe- und Malzextrakt, Peptone und Säfte.
- b) **Minimalmedien** enthalten nur Bestandteile, die die Mindestanforderungen des Organismus erfüllen. Es handelt sich hierbei ausschließlich um definierte Medien.

Neben flüssigen Kulturmedien werden auch gelartige **feste Kulturmedien** verwendet. Gebräuchliche Geliermittel in der Mikrobiologie sind Agar, Gelatine und Kieselsäure.

Agar ist ein Polysaccharid aus Meeresalgen und wird je nach Reinheitsgrad den Medien in einer Konzentration von 10 - 18 g/l zugesetzt (Weichagar: 5 - 6 g/l). Agar schmilzt bei 95 - 100 °C, bleibt aber beim Abkühlen bis zu Temperaturen um 45 °C flüssig. Enthält ein Kulturmedium Agar, so muß es nach Einstellen des pH-Wertes vor dem Sterilisieren gelöst werden (durch Erhitzen auf etwa 95 °C). Vorsicht!! Das Medium schäumt leicht beim Sieden und der Agar neigt zum Anbrennen. Agar muß nur in Ausnahmefällen vor der Einstellung des pH-Wertes gelöst werden, weil der Zusatz von Agar im allgemeinen keinen großen Einfluß auf den pH-Wert hat.

Oft müssen bestimmte Komponenten des Mediums separat sterilisiert werden, weil es bei höheren Temperaturen zu Ausfällungen kommt. Ausfallende Verbindungen sind z. B. Eisenhydroxide, Calciumphosphat und Mg-Al-phosphate. Glucose kann in verdünnten Lösungen und in Anwesenheit von Phosphaten ebenfalls ausfallen, andererseits kann es

durch höhere Temperaturen zu Veränderungen der chemischen Struktur komplexer Substanzen kommen (z. B. Vitamine).

Benötigte Materialien pro Gruppe:

- Waage
- Spatel
- 1 x 500 ml Flasche mit Deckel oder Erlenmeyerkolben
- pH-Meter, Eichlösungen
- 1 N HCl
- 1 N NaOH
- 1 Rührfisch
- Alufolie
- Wasserbad (50 °C)
- leere Petrischalen

Ausführung:

Die Zusammensetzung des Nutrient-Agars befindet sich im Anhang. Substanzen abwiegen entsprechend ad 250 ml Aqua dest. Der verwendete Erlenmeyerkolben sollte ca. das doppelte Fassungsvermögen haben als die zu autoklavierende Menge, um ein Überkochen zu vermeiden. Die Substanzen werden unter Rühren gelöst, der pH-Wert eingestellt, der Kolben mit Alufolie verschlossen und 20 Min. bei 121 °C autoklaviert. Danach abkühlen lassen (Wasserbad 50 °C, ab und zu umschütteln), unter sterilen Bedingungen in sterile Petrischalen gießen, aufeinander stapeln (Vermeidung von Kondenswasserbildung), fest werden lassen.

8.1 Kontaminationen aus der Luft

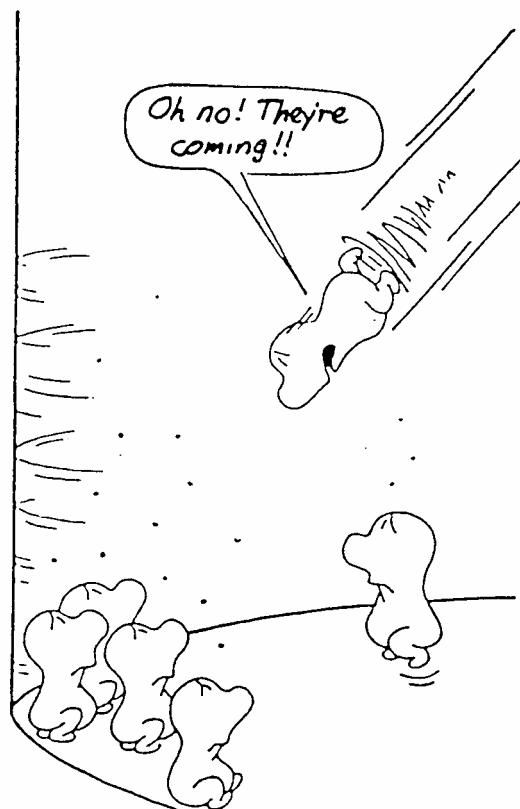
Die gegossenen Platten werden innerhalb der Gruppe sinnvoll aufgeteilt und zu Hause oder an anderer Stelle eine Stunde lang geöffnet aufgestellt. Die Platten werden dann wieder zugedeckelt und im Labor 48 Std. bei 30 °C inkubiert. Beschriftung nicht vergessen.

Protokoll:

Beschreiben Sie, ob auf den Nährböden mehr Pilz- oder Bakterienkolonien gewachsen sind.

Hinweis:

Es können sich evtl. pathogene Keime ansiedeln. Daher bitte vorsichtig damit umgehen und nicht an Orten aufstellen, an denen Krankheitserreger in größerer Zahl vermutet werden können, z. B. Toilette.



(J. Czichos)

9. EINFLUß VON LYSOZYM AUF BAKTERIELLES WACHSTUM

Lytische Wirkung von Lysozym aus Tränen und Hühnereiweiß

Einleitung:

Jede rezente Organismengruppe hat im Laufe der Evolution verschiedene Mechanismen entwickelt, die das Funktionieren des Organismus optimieren. Für höhere Organismen sind die größten Gefahren Infektionskrankheiten, die durch Mikroorganismen und Viren verursacht werden.

Pilze, Protozoen und Viren können bei Menschen Krankheiten verursachen. Mikroorganismen können die meisten Stellen des Körpers nicht erreichen (außer durch Wunden). Geöffnete Augen sind z. B. kaum gegen infektiöse Keime geschützt. Jeder weiß aber, wenn z. B. Staub ins Auge gelangt, das es zu tränen beginnt. Im allgemeinen nimmt man an, daß durch die Tränenflüssigkeit der Staub herausgeschwemmt werden soll. Zusätzlich handelt es sich aber um einen wichtigen antibakteriellen Schutzmechanismus.

Schon lange ist bekannt, daß die Tränenflüssigkeit das Enzym Lysozym in relativ hoher Konzentration enthält. **Lysozym ist eine Sammelbezeichnung für eine Klasse von Enzymen, die bestimmte Mucopolysaccharide abbauen können.** Mucopolysaccharide bilden den Hauptbestandteil der bakteriellen Zellwand grampositiver Mikroorganismen (siehe Gramfärbungsversuch). Durch den Abbau der Zellwand verliert die Zelle ihre Festigkeit und platzt. Lysozyme sind in höheren Organismen weit verbreitet. Hühnereier z. B. haben einen sehr hohen Gehalt an Lysozym. Dieses Lysozym ist sehr genau untersucht worden und auch kommerziell lieferbar.

Viele pathogene Mikroorganismen sind grampositiv. Deswegen ist es auch nicht erstaunlich, daß dieser Schutzmechanismus so effektiv ist.

Dieser Versuch hat das Ziel, den Einfluß von Tränen auf das Wachstum von grampositiven und gramnegativen Bakterien zu untersuchen.

Benötigte Materialien pro Gruppe:

- Oil of Olbas oder Japanisches Heilpflanzenöl und Zwiebeln; **Bitte selbst mitbringen!!**
- Junge Kulturen von *E. coli* und *B. subtilis* (flüssig, Nutrient-Agar) werden gestellt
- Drigalskispatel
- 96 % Ethanol zum Sterilisieren der Drigalskispatel
- Sterile Pasteurpipetten
- 8 frische Agarplatten, Medium 1, 1.5 %iger Agar
- 1 Gummihütchen
- 12 kleine sterile Röhrchen oder Reaktionsgefäße nach Eppendorf
- 2 x 30 ml steriles Wasser
- Lösung mit bekannter Lysozymkonzentration (2 g/ 10 ml); für **alle** Gruppen

Ausführung:

a) Mit einer sterilen Pasteurpipette werden 2 Tröpfchen der Bakteriensuspension auf die Agarplatten gebracht. Der Drigalskispatel wird in 96 % Ethanol getaucht und abgeflammt, d.h. kurz in die Flamme gehalten. Warte, bis das Ethanol abgebrannt und der Spatel abgekühlt ist (nicht mehr an Streichfläche anfassen!!!). Danach werden die 2 Tröpfchen Kultur gleichmäßig über die Agaroberfläche verteilt (nicht drücken, das Gewicht des Spatels genügt).

Vier Platten werden mit *E. coli* beimpft, vier mit *B. subtilis*. Vergiß nicht, die Platten entsprechend zu beschriften. Zwischen beiden Beimpfungen der Kulturen muß der Drigalskispatel neu sterilisiert werden, wie oben beschrieben.

Die beimpften Platten werden 1,5 Stunden bei 37 °C (mit dem Deckel nach oben!) zum Trocknen inkubiert.

b) Schneide jetzt die Zwiebel an und versuche Tränenfluß beim Partner zu induzieren.

Wenn das nicht gelingt, benutzt Olbas Öl. (An beiden bitte **nur** riechen!). Mit einem sterilen Reaktionsgefäß nach Eppendorf wird ein Tränentropfen aufgefangen. Diese konzentrierte Tränenflüssigkeit wird auf die beimpften Platten aufgetragen.

c) Von der konzentrierten Lysozymlösung wird folgende Verdünnungsreihe hergestellt:

unverdünnt

1 : 2

1 : 5

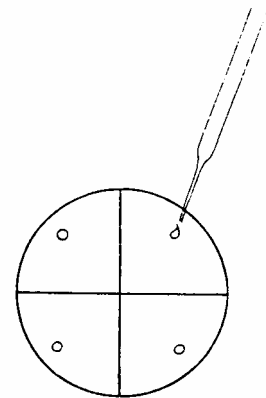
1 : 10

Die Verdünnungsreihe wird mit einer Pasteurpipette und sterilem Wasser in Reaktionsgefäßen nach Eppendorf erstellt.

Die Unterseite der Platte, welche zuvor mit Bakterien beimpft wurde, wird nun mit Strichen in 4 Sektoren aufgeteilt und beschriftet.

Jeder Versuch wird also **in duplo** ausgeführt (warum?).

Also: 2 Platten *E. coli* mit Tränen
 2 Platten *E. coli* mit Lysozymlösung
 2 Platten *B. subtilis* mit Tränen
 2 Platten *B. subtilis* mit Lysozymlösung



Von jeder Lysozym-Verdünnung wird mit einer sterilen Impföse oder einer ausgezogenen sterilen Pasteurpipette 1 Tropfen auf das entsprechende Feld der Agarplatte aufgebracht (je 2 Agarplatten). Der Tropfen sollte etwa in der Mitte des oberen Drittels des entsprechenden Segmentes aufgetragen werden (siehe Skizze). **Agar nicht mit der Öse verletzen!** Die Platten werden bei 37 °C inkubiert (**Platten nicht umdrehen!**).

Protokoll:

Am nächsten Tag Beobachtungen aufschreiben. Den Durchmesser des Hemmhofes ausmessen.

10. WIRKUNG VON SCHWERMETALLEN

Schwermetalle wirken unterschiedlich stark hemmend auf Mikroorganismen, wenn sie als Ionen in diese eindringen können. Kupfer-, Blei, Cadmium-, Silber- und Quecksilbersalze sind in hohen Konzentrationen Proteinkoagulantien, in niedrigen Konzentrationen wirken sie über die Bindung an Sulfhydrylgruppen (z. B. Cystein) von Proteinen und führen zu Stoffwechselstörungen, da es zur Inaktivierung von Enzymen kommt. Unter standardisierten Bedingungen kann man eine Toxizitätsreihe für Schwermetalle bzw. Schwermetallverbindungen aufstellen. Diese ist Stamm-spezifisch und besitzt **keine** Allgemeingültigkeit!

Im Versuch eingesetzte Schwermetalle: Al, Cu, Zn, Sn, Pb

Benötigte Materialien pro Gruppe:

- 20 ml Flüssigkultur von *E. coli* und/ oder *Bacillus subtilis*
- 4 Petrischalen mit Bakteriennähragar (LB-Medium)
- Gesättigte wäßrige Lösungen der zu testenden Schwermetallsalze:
Al mmol/l, Cu mmol/l, Zn mmol/l, Sn mmol/l, Pb mmol/l,
- sterile Pipetten (0,1 od. 0,5 ml), Drigalski-Spatel, Bunsenbrenner, Pinzette
- Autoklav oder Wärmeschrank
- sterile Filterplättchen

Ausführung:

Die Nähragarplatten werden mit 0,1 ml (bzw. 2 Tropfen aus der Pasteurpipette) der Flüssigkulturen bespatelt und 30 Min. bei Raumtemperatur angetrocknet. Danach wird der Boden der Petrischalen in Sektoren eingeteilt und beschriftet – pro Schwermetalllösung 1 Sektor. Pro Sektor wird steril (mit einer Pinzette) ein Filterpapierplättchen aufgebracht. Danach werden mit einer Pasteurpipette steril 2 Tropfen der entsprechenden Schwermetalllösung auf das jeweilige Filterplättchen aufgetropft. Die Platten werden anschließend 24 Std. bei 37 °C bebrütet (Platten nicht umdrehen!).

Charakteristik der eingesetzten Schwermetallverbindungen

Substanz	Summenformel	Mol-Gew. (g/mol)	Löslichkeit in Wasser (g/l)	Toxizität LD ₅₀	Ökotoxische Wirkung: Bakterientoxizität
Zinksulfat-Monohydrat	$\text{ZnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	179,45	~350	Oral Ratte: 2949 mg/kg (wasserfreie Substanz)	Bakterizid.
Quecksilber(II)-chlorid	HgCl_2	271,5	74	Oral Ratte: 1 mg/kg	EC ₅ : 0,01 mg/l/16h <i>Pseudomonas putida</i>
Nickel (II)-chlorid-hexahydrat	$\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	237,7	2540	Oral Ratte: 105 mg/kg (wasserfreie Substanz)	Mikrotox-Test (<i>Photobacterium phosphoreum</i>) EC ₅₀ : 23 mg/l/15 min.
Blei (II)-hydroxidcarbonat	$\text{Pb}_3\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_8$ (PbCO_3) ₂ * Pb(OH)_2	775,64	< 5	Keine Angaben	Toxisch ab 1,8 mg/l für <i>Pseudomonas putida</i>
Kupfer(II)-sulfat	CuSO_4	159,61	203	Oral Ratte: 300 mg/kg	< 1mg/l toxisch für Fische, Algen, Protozoen und Bakterien
Cadmiumchlorid-monohydrat	$\text{CdCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$	201,32	1400	Oral Ratte: 88 mg/kg (wasserfreie Substanz)	EC ₅₀ : 0,23 mg/l für <i>Pseudomonas putida</i> EC ₅ : 0,15 mg/l für <i>Escherichia coli</i>

Protokoll:

Der Grad der Hemmung des bakteriellen Wachstums durch die unterschiedlichen Metalle ist zu beurteilen. Der Durchmesser der sog. Hemmhöfe ist zu bestimmen. Diskutieren Sie die Ergebnisse!

11. UNTERSUCHUNG VON VERSCHIEDENEN MILCHSORTEN

Einleitung:

Die verschiedenen Milchsorten (Rohmilch, Frischmilch, H-Milch) weisen unterschiedliche Keimzahlen auf. Während des Melkens (insbesondere beim Handmelken) geraten Mikroorganismen in die Milch, die sich unter den gegebenen optimalen Bedingungen (Substrat, Temperatur) rasch vermehren. Rohmilch weist daher einen großen Total- und Colititer auf. Bei der handelsüblichen Normalmilch oder H-Milch wird zwecks Keimschädigung (und damit zur Erhöhung der Haltbarkeit) die Milch kurzzeiterhitzt bzw. ultrahoherhitzt. **Durch Pasteurisieren (Kurzzeiterhitzung 40 Sek. auf 71 - 74 °C, Hoherhitzung 15 Sek. bei 85 °C, Ultrahoherhitzung 2 - 3 Sek. bei 92 °C) werden 98 - 99 % der Keime abgetötet** (H.-J. Otte, 1974. Leitfaden der medizinischen Mikrobiologie).

Ausführung:

1. Der Methylenblau-Reduktionstest

Die in der Milch enthaltenen Mikroorganismen reduzieren Methylenblau und entfärben es dabei. Dieser Entfärbungsprozeß erfolgt um so rascher, je größer die Zahl der beteiligten Mikroorganismen ist, so daß die Schnelligkeit der Entfärbung als grobes Maß für die Keimzahl, d. h. für die Qualität der Milch gelten kann. Der Test kann mit allen Milchsorten durchgeführt werden; bei keimfreier Sterilmilch tritt keine Entfärbung ein.

10 ml verschiedener Milchsorten werden in Reagenzgläser pipettiert. Für jede Milchsorte sind 3 Reagenzgläser erforderlich: Der eigentliche Test, eine Kontrolle A (Erhitzung) und eine Kontrolle B (statt Methylenblau steriles Aqua dest. - nach dem Kochen). Die Kontrollgläser A und B werden für 10 Min. in ein Becherglas mit kochendem Wasser gestellt, um die reduzierende Milchflora zu zerstören.

Achtung: a) Der Wasserstand im Becherglas muß höher als der Flüssigkeitsstand in den Reagenzgläser sein.

b) Das Wasser im Becherglas muß 10 Min. **ständig** kochen.

Dem Teströhrchen und dem Kontrollglas A werden jeweils 1 ml Methylenblau zugesetzt (nach dem Kochen); dem Kontrollglas B 1 ml steriles Aqua dest. Nach guter Durchmischung mit Hilfe eines Whirlmix erfolgt über Nacht die Bebrütung im Wärmeschrank bei 37 °C.

Benötigte Materialien pro Gruppe:

- je 30 ml Rohmilch, Frischmilch und H-Milch
- 10 sterile Reagenzgläser
- Methylenblau
- Whirlmix
- Wasserbad

2. Bakteriologische Untersuchung von Milch:

Die Milch ist eine wäßrige Lösung von Eiweißen, Zuckern und Salzen mit emulgierten Fetttröpfchen. Während des Melkvorganges gelangen u. a. zwei Gruppen von Bakterien in die Milch: Milchsäurebakterien aus dem Strichkanal der Zitze und Schmutzkeime aus der Umgebung. Unter sauberen Bedingungen gewonnene Milch enthält etwa 500 Keime/ ml, Rohmilch 250.000 - 500.000 Keime/ ml.

Mit **allen Sorten von Milch** eine 1 : 5 Verdünnung (ca. 100 - 300 Keime/ Platte) herstellen und 0,1 ml bzw. 2 Tropfen mit einer sterilen (!) Pasteurpipette der unverdünnten **und** verdünnten Milch in duplo auf den **Chinablau- Lactose- Agar** (siehe Anhang) mit Hilfe eines Drigalskispatels ausplattieren. Zusätzlich eine Petrischale mit *Lactobacillus sp.* als positive Kontrolle beimpfen. Die Platten trocknen lassen und anschließend umgedreht 48 Std. bei 30 °C im Wärmeschrank inkubieren.

Benötigte Materialien pro Gruppe:

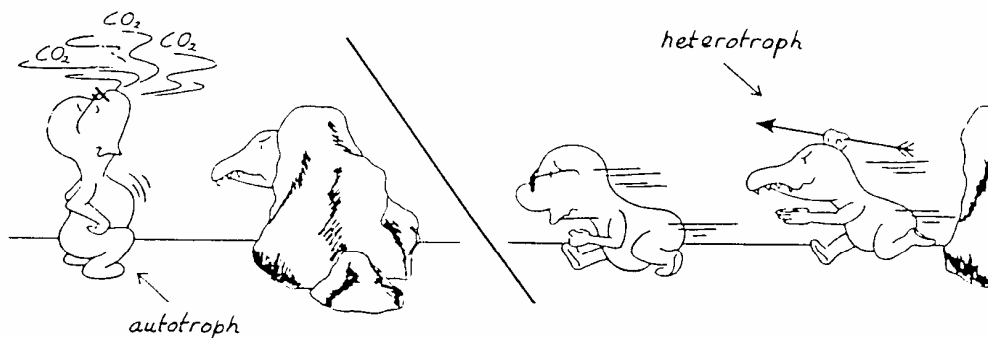
- Frischmilch
- 5 Platten Chinablau- Lactose- Agar
- eine junge Kultur von *Lactobacillus sp.* auf Schrägagar
- 2 sterile Reagenzgläser
- sterile Pasteurpipetten
- Drigalskispatel, 70 % Ethanol

Auswertung:

Milchsäurebakterien bilden auf dem blaßblauen Agar Kolonien mit hellblauer bis dunkelblauer Verfärbung des Nährbodens. Die beiden beteiligten Arten sind *Streptococcus lactis* (Kolonien: sehr klein, stecknadelspitzengroß) und *Lactobacillus lactis* (Kolonien größer, glänzend). Streptokokken sind in der Frischmilch am zahlreichsten, Lactobacillen in älterer Milch am stärksten vertreten. Die Nichtsäurebildner wachsen in Form weißgrauer Kolonien, ohne den Nährboden zu verfärben.

Protokoll:

Vergleichen Sie die Keimzahlen der Milch mit den anderen Gruppen, unterscheiden Sie Säurebildner und Nichtsäurebildner.



How nice to be an autotroph...

sometimes.

(J. Czichos)

12. STERILISATION (NACH DREWS, 1983)

Einleitung:

Das Arbeiten mit Reinkulturen setzt voraus, daß Kulturgefäße, Nährlösungen und Arbeitsgeräte steril sind, d. h. sie dürfen **keine** vermehrungs- oder infektions- und kontaminationsfähigen Partikel enthalten. Unter dem Vorgang der Sterilisation versteht man die Abtötung aller lebensfähigen Mikroorganismen in Lösungen oder an Gegenständen. Die Abtötung kann sowohl durch physikalische als auch chemische Methoden erfolgen. Die wichtigste Methode für die Sterilisation ist die Wärmebehandlung. So wie niedrige bzw. suboptimale Temperaturen zur Inaktivierung des Stoffwechsels führen, können hohe Temperaturen bei nicht thermophilen Organismen eine Denaturierung von Proteinen verursachen. Unterschieden wird die Sterilisation durch trockene Hitze und strömenden Wasserdampf. Dabei erweist sich die Wasserdampfsterilisation, aufgrund des höheren Wärmeinhalts und der besseren Penetrationsfähigkeit, wirksamer, als die Verfahren mit trockener Heißluft.

a) Sterilisation durch trockene Heißluft

Dieses Verfahren eignet sich nur für Geräte die hohe thermische Belastungen (≥ 180 °C) ohne Schaden überstehen. Gegenstände, die aus Material mit unterschiedlichen Ausdehnungskoeffizienten bestehen, dürfen während der Hitzebehandlung **nicht** fest miteinander verbunden sein, da sonst die Gefahr der Verformung oder des Bruchs besteht (z. B. metallische Schraubverschlüsse und Glasgefäße). Ausgerichtet ist die Sterilisationstemperatur nach der Hitzeresistenz des "gefährlichsten" infektiösen Materials, das sind die Endosporen von Clostridien und Bacillen. Es werden Temperaturen um 180 °C gewählt, da an Erde absorbierte Sporen durch ein 30-minütiges Erhitzen bei 160 °C teilweise noch überlebensfähig waren. Außerdem richtet sich die Dauer und die Temperatur auch nach der Masse und der Art des eingebrachten Sterilisierguts. Das gesamte Material muß nach Einschalten des Gerätes und Erreichen der gewählten Temperatur im Luftraum (Anheizzeit) erst durch Wärmeleistung diese Temperatur annehmen (Ausgleichszeit). Die Luftbewegung muß in einem geschlossenen Kreislauf erfolgen, Frischluftzufuhr während der Sterilisation ist zu vermeiden. Die erforderliche Zeit (Sterilisationszeit) für eine vollständige Abtötung des infektiösen Materials kann durch Einlegen einer Probe luftgetrockneter

Komposterde oder sog. Sporenstreifen (käuflich bei versch. Nährbodenherstellern) in den Sterilisationsraum und anschließender Überprüfung der Vermehrungsfähigkeit der Sporen ermittelt werden. Erfahrungsgemäß wird durch eine Sterilisationszeit von 30 Min. bei 180 °C eine sichere Sterilisation erreicht.

b) Wasserdampfsterilisation

Werden hitzeresistente Sporen mit Wasser benetzt, quellen sie. Ihre Thermoresistenz wird dadurch vermindert, ist aber noch wesentlich größer als die der gekeimten Sporen. So übersteht eine Suspension von Bacillus-Sporen mehrstündiges Erhitzen auf 100 °C, während keimende Sporen schon bei 70 °C abgetötet werden. Diese unterschiedliche Empfindlichkeit führte zur Entwicklung der sog. fraktionierten Sterilisation (Tyndallisation). Dabei werden die zu sterilisierenden Lösungen in bestimmten zeitlichen Intervallen (ca. 4 Std.) dreimal für jeweils 30 Min. auf 100 °C erhitzt. Das Verfahren ist aber nur dann erfolgreich, wenn die Sporen in den Standzeiten auch vollständig auskeimen. Ein deutlicher Nachteil dieses Verfahrens ist auch der hohe Zeitaufwand. Trotzdem findet das Verfahren Anwendung bei der Sterilisation hitzeempfindlichen Materials.

Dampfdruck und Temperatur im Autoklaven:

Temperatur [°C]	Torr	Dampfdruck			Restluft [%]
		[atm]	[atü]	[kPa]	
100	760	1,0	0,0	101,32	0
112	1140	1,5	0,5	151,98	0
121	1520	2,0	1,0	202,65	0
134	2280	3,0	2,0	299,75	0
120		2,13	1,13		10
120		2,4	1,4		30

Die Sterilisation im gespannten Dampf geschieht im Autoklaven. Der Autoklav ist ein Behälter, der gasdicht geschlossen werden kann und einen Überdruck aushält. In ihm wird Wasser zum Sieden gebracht, so daß der Raum über dem Wasser mit gesättigtem Dampf erfüllt ist. Wird gesättigter Dampf weiter erhitzt, so steigt der Dampfdruck. Liegt ein

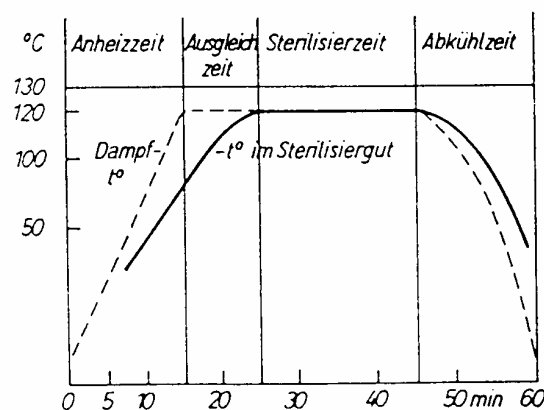
Dampf-Luft-Gemisch vor, so findet ein ungenügender Wärmeaustausch statt und der Druck des Gasgemisches ist nach dem Gesetz von Dalton gleich der Summe der Partialdrucke, d.h. der Partialdruck des Wasserdampfes ist geringer als der Gesamtdruck. Um den Autoklaven zu "entlüften", läßt man für einen bestimmten Zeitraum Dampf ab.

Die Betriebszeit für die Sterilisation richtet sich nach der Leistung des Autoklaven und der Masse des Sterilisiergutes. Der zeitliche Ablauf der Sterilisation ist in verschiedenen Phasen eingeteilt (Abb. s. u.).

- Anheiz- oder Steigezeit (Zeitspanne bis zum Erreichen der Betriebstemperatur)
- Ausgleichszeit (Zeitraum vom Erreichen der Betriebstemperatur bis zum Erreichen der Sterilisationstemperatur im gesamten Material)
- Sterilisierzeit (15 - 20 Min. bei 121 °C; 202,65 kPa)
- Abkühlzeit

Wenn das Sterilisiergut auf etwa 80 °C abgekühlt ist, wird der Autoklav **vorsichtig** belüftet und nach erfolgtem Druckausgleich **vorsichtig** geöffnet, um das Material zu entnehmen.

Zeitlicher Ablauf der Sterilisation:



c) Weitere Verfahren zur Sterilisation von Lösungen und Geräten:

Flüssiges Material kann durch Filtration entkeimt werden, Luft die zur Belüftung von Submerskulturen eingesetzt wird, kann durch Keramik-, Faserbett- oder Papierfilter keimfrei gemacht werden. Kunststoffe, die keine höheren Temperaturen vertragen, werden häufig mit Ethylenoxid behandelt. Die Desinfektion von Raumluft kann mit UV-Strahlung (210 - 290 nm) vorgenommen werden. Doch wird keine vollständige Abtötung der Keime erreicht, weil die Wirksamkeit der Strahlung mit dem Quadrat der Entfernung abnimmt und die Strahlung durch Glas und auch anderes Material absorbiert wird. γ -Strahlung wird ebenfalls, teilweise in der Lebensmittelindustrie, zur Sterilisation verwandt.

Ausführung:

Verschiedene, im theoretischen Teil erwähnte Verfahren sollen in den folgenden Versuchsanordnungen eingesetzt und hinsichtlich ihrer Wirksamkeit überprüft werden.

1. Wasserdampfsterilisation:

In sechs sterile Reagenzgläser wird ca. 10 ml klarer Apfelsaft pipettiert. zwei der Reagenzgläser werden nicht beimpft, zwei werden mit Hefe (selbstisolierte von den Rosinen oder gestellte Bäckerhefe) und zwei mit *Bacillus cereus* (wird gestellt) angeimpft. Stellen Sie hierfür je Organismus eine trübe Suspension mit sterilem Wasser her. Impfen Sie mit ca. 0,5 ml (oder 10 Tropfen aus der Pasteurpipette) der Suspensionen an.

Anschließend wird je Organismus ein Reagenzglas im Autoklaven für 20 Min. bei 121 °C autoklaviert. Danach werden alle sechs Reagenzgläser bei 30 °C inkubiert.

Beobachten Sie, in welchen Reagenzgläsern rübung auftritt, in welchen nicht. **Machen Sie eine mikroskopische Kontrolle!**

Benötigte Materialien pro Gruppe:

- steriles Wasser
- 6 leere sterile Reagenzgläser
- Apfelsaft (klar)
- Vorkulturen (*B. cereus*, Bäckerhefe)
- sterile Pipetten (10 ml, Pasteur)

2. Handdesinfektion:

Unterteile 4 Bouillonagar-Platten mit Hilfe eines Filzschreibers in **drei** gleiche Felder (auf der Unterseite deutlich beschriften).

Feld 1: Abdruck des **trockenen Zeigefingers**

Feld 2: Abdruck desselben Zeigefingers nach dem sehr gründlichen **Waschen** (2 Min.) mit **Seife** und **Bürste**. Schüttle vor dem Abdruck das überschüssige Wasser ab!

Feld 3: Abdruck desselben Fingers, nachdem man ihn **30 Sek.** in ein Schälchen mit **70 % Ethanol** gehalten hat.

Feld 4: **(2. Petrischale)** Abdruck desselben Fingers, nachdem man ihn **3. Min.** in **70 % Ethanol** gehalten und an der Luft getrocknet hat.

Feld 5: Abdruck desselben Fingers nach wiederholtem Waschen (siehe Feld 2).

Feld 6: Abdruck desselben Fingers nach Behandlung mit Ethanol (siehe Feld 4).

Inkubiere die Platte bei **37 °C**.

Staphylokokken erscheinen als weiße (*S. epidermidis*) oder als gelbe (*S. aureus*) Kolonien auf der Platte, *Microkokken* sind weiß.

Benötigte Materialien pro Gruppe:

- 4 Bouillonagar-Platten (2 Platten pro Person)
- Seife und Bürste
- 70 % Ethanol

13. STOFFWECHSELLEISTUNGEN VON MIKRO-ORGANISMEN

13.1 Verwertung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen durch Hefen (Auxanogramm)

Einleitung:

Häufig ist es notwendig, zu wissen, welche organischen Substrate durch ein isoliertes Bakterium als Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt werden können. Eine sehr schnelle Methode, um viele organische Verbindungen entsprechend zu testen, ist das Auxanogramm.

Benötigte Materialien pro Gruppe:

- Selbstisolierte Reinkulturen von Hefen (wenn nicht vorhanden, Bäckerhefe oder *S. carlsbergensis*)
- 4 Röhrchen mit 2 ml sterilem Wasser
- 150 ml Stickstoffagar (flüssig, 45 °C)
- Runde Scheibchen Filtrierpapier (steril)
- Pinzette (steril)
- Je 1 Röhrchen mit sterilen gesättigten Lösungen von Laktose, Glucose, Fructose, Saccharose, Glycerin

Ausführung:

a) Von jeder Hefekultur werden **deutlich sichtbare trübe Suspensionen** in Röhrchen mit 2 ml sterilem Wasser hergestellt. Diese Suspension wird in eine Petrischale pipettiert. Dann wird gerade noch flüssiger Stickstoffagar (45 °C) zugegeben und gründlich gemischt. Stickstoffagar ist ein Medium, das alle für das Wachstum von Hefen benötigten Nährstoffe beinhaltet, außer einer Kohlenstoffquelle. Diese Platte wird 1,5 Stunden bei 30°C getrocknet.

b) Nach dem Trocknen wird der Boden der Petrischalen in Sektoren eingeteilt und beschriftet – pro C-Quelle ein Sektor. Pro Sektor wird 1 Filterpapierplättchen steril (mit einer Pinzette) aufgelegt. Mit einer Pasteurpipette werden steril 2 Tropfen der entsprechenden C-Quelle auf das jeweilige Filterpapierplättchen aufgetragen. So werden alle fünf Kohlenstoffquellen auf den Agar aufgebracht. Der Abstand zwischen den Filterpapierplättchen soll so groß wie möglich sein. Vergiß nicht, die Platten endgültig zu beschriften!

Die Platten werden bei 30 °C inkubiert und nach 24 - 48 Stunden ausgewertet.

Protokolliere die Ergebnisse genau!

13.2 Infektion von Äpfeln mit pilzlichen Erregern (Kochsche Postulate)

Aus: R. Süßmuth, J. Eberspächer, R. Haag, W. Springer.

Biochemisch-mikrobiologisches Praktikum. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1987, 409 Seiten.

Robert Koch hat mit seinen bahnbrechenden Arbeiten über den Zusammenhang von Milzbrand und Milzbranderreger die methodischen und theoretischen Fundamente für die medizinische Mikrobiologie geschaffen. Mit dem Nachweis von Mikroorganismen als Ursache für eine große Zahl wichtiger Infektionskrankheiten - wie z.B. Tuberkulose, Typhus, Diphtherie, Cholera, Sepsis, Tetanus - war auch die Möglichkeit zu einer gezielten Bekämpfung dieser Krankheiten gegeben. Ausgehend von seinen Laboruntersuchungen, hat Robert Koch vier Forderungen aufgestellt, die erfüllt sein müssen, damit eine Krankheit zu Recht als eine mikrobiell verursachte Infektionskrankheit bezeichnet werden darf. Die vier Postulate lauten:

1. Der Erreger muß aus dem erkrankten Tier oder Menschen isolierbar sein.
2. Der Erreger muß außerhalb des Kranken auf Nährmedien in Reinkultur vermehrbar sein.
3. Der vom Nährmedium stammende Erreger muß in einem Versuchstier dieselben Krankheitssymptome hervorrufen wie im ursprünglichen Patienten.
4. Der Erreger muß aus dem erkrankten Versuchstier isolierbar sein.

Auch bei Pflanzenkrankheiten konnten in vielen Fällen Mikroorganismen als Krankheitserreger nachgewiesen werden: z. B. *Agrobacterium tumefaciens* als Ursache der Wurzelhalsgallen oder die den Flugbrand auf Getreide bewirkender Brandpilze. Die Kochsche Methode hat dort ihre Grenzen, wo sich die Erreger nicht in Reinkultur züchten lassen. Dies gilt für eine Reihe von phytopathogenen Pilzen, die als obligate Parasiten nicht auf Nährmedien kultiviert werden können.

Im ersten Versuch soll von einem verfaulten Apfel der Fäulniserreger isoliert und bestimmt werden. Phytomedizinisch ist die Isolierung und Bestimmung des Erregers aus zwei Gründen von Bedeutung: Einmal ist die Kenntnis des Erregers Voraussetzung für eine erfolgreiche Bekämpfung, und zum anderen weiß man heute aus vielen Untersuchungen, daß bestimmte Pilze gefährliche Mykotoxine produzieren können,

z. B. bildet *Aspergillus flavus* auf Erdnüssen das stark krebserregende Aflatoxin, oder *Fusarium sp.* bildet auf Getreide Zearalenon.

13.2.1 Isolierung und Bestimmung von Erregern der Apfelfruchtfäule

Material:

Gesunde und verfaulte („verschimmelte“) Äpfel, Impfnadel, Skalpell, Mikroskop, feuchte Kammer

Gemüsesaft-Agar: 200 ml Gemüsesaft (z. B. V-8-Gemüsesaft aus der Drogerie oder aus dem Reformhaus, ohne Zusatz von Konservierungsstoffen), 2 g CaCO₃, 20 g Agar, 800 ml dest. Wasser.

Alkohol (70%ig)

Ein verschimmelter oder leicht angefaulter Apfel aus dem Freiland oder vom Winterlager wird solange feucht gelagert - am besten in einer feuchten Kammer - bis sich auf dem faulen Fruchtfleisch ein fester oder polsterartiger weißer oder farbiger Belag ausgebildet hat. Vom Belag wird mit der Impfnadel vorsichtig etwas Material entnommen und bei 100- bis 400facher Vergrößerung mikroskopiert (Phasenkontrast ist nicht notwendig) und gezeichnet.

Auswertung:

Die Mehrzahl der Fälle von Apfelfruchtfäule wird durch einige wenige Pilze verursacht. Drei häufig vorkommende Vertreter sind aufgeführt. Sie sollten aufgrund der folgenden Angaben leicht zu bestimmen sein:

Monilia fructigena: Im Mikroskop sind längere, verzweigte, „wurstförmige“ Konidienketten zu sehen (Abb. 1 a), mit bloßem Auge auf der bräunlich bis schwarz verfärbten Schale in konzentrischen Ringen angeordnete gelbliche oder graue feste Polster.

Botrytis cinerea: Im mikroskopischen Bild verzweigt sich das Myzel zu den Sporenträgern mit büschel- oder bäumchenartig angeordneten Konidien (Abb. 1 b), auf der hell- bis dunkelbraun verfärbten Schale bräunlich-graue, staubende Beläge.

Penicillium sp.: Im Mikroskop kleine, pinselförmige Konidienträger mit perlschnurartig angeordneten Konidienketten (Abb. 13.2.1, c), die hellbraun bis braun verfärbte Schale zeigt bläuliche oder gelblichgrüne, schimmelartige Überzüge.

Weitere häufige Erreger der Apfelfruchtfäule sind *Gloeosporium*-Arten und *Phytophthora cactorum*.

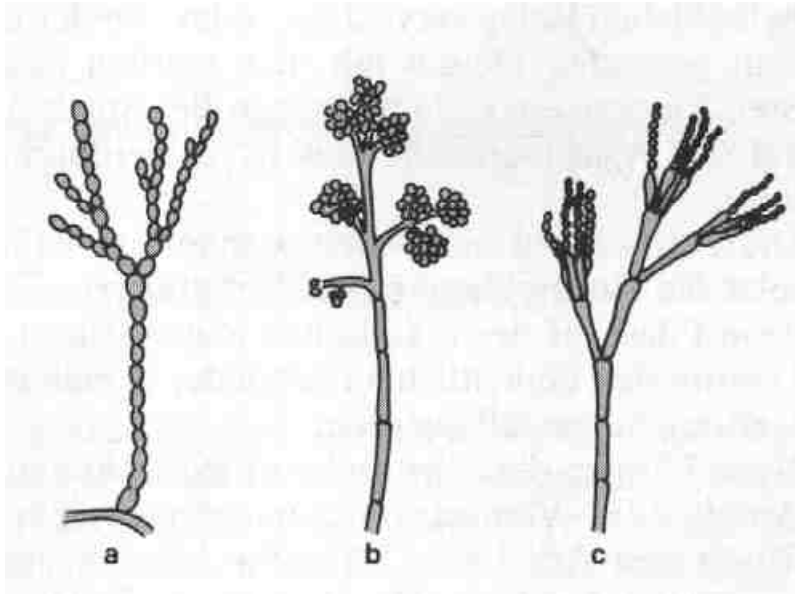


Abb. 13.2.1 Konidienträger bzw. Sporenträger von Erregern der Apfelfruchtfäule

13.2.2 Infektion von Äpfeln

- Zeitplan:*
- 1.Tag: Überimpfen des Schimmelbelags vom verfaulten Apfel auf Gemüsesaft-Agar
 - 7. Tag: Pilz von Gemüsesaft-Agar mikroskopieren und zeichnen.
Gesunden Apfel mit dem Pilz von der Agarkultur infizieren
 - 14. Tag: Entnahme des Schimmelbelags von infiziertem Apfel, mikroskopieren und zeichnen

Zeitbedarf: Jeweils ca. 30 min

Durchführung:

1. Vom Belag des verfaulten Apfels mit der sterilen Impfnadel etwas Pilzmaterial auf einer Gemüsesaft-Agarplatte ausstreichen. Als infektiöses Material entweder Konidien von dem auf dem faulen Fruchtfleisch befindlichen Belag verwenden, oder von der Übergangsstelle vom faulen zum gesunden Fleisch mit dem sterilen Skalpell nach oberflächlicher Sterilisierung ein etwa pfenniggroßes Stück Apfelfleisch ausstechen und auf der Agaroberfläche von 1 : 10 verdünntem Gemüsesaft-Agar auslegen.
2. Die Petrischalen bei Zimmertemperatur bebrüten. Nach 3 bis 4 Tagen setzt die Entwicklung einer Pilzkultur ein (2. Postulat). Sind verschiedene Pilze auf der Agarkultur angewachsen, dann sollten zuvor durch Überimpfen einheitlich aussehender Zonen auf Gemüsesaft-Agar Reinkulturen hergestellt werden.

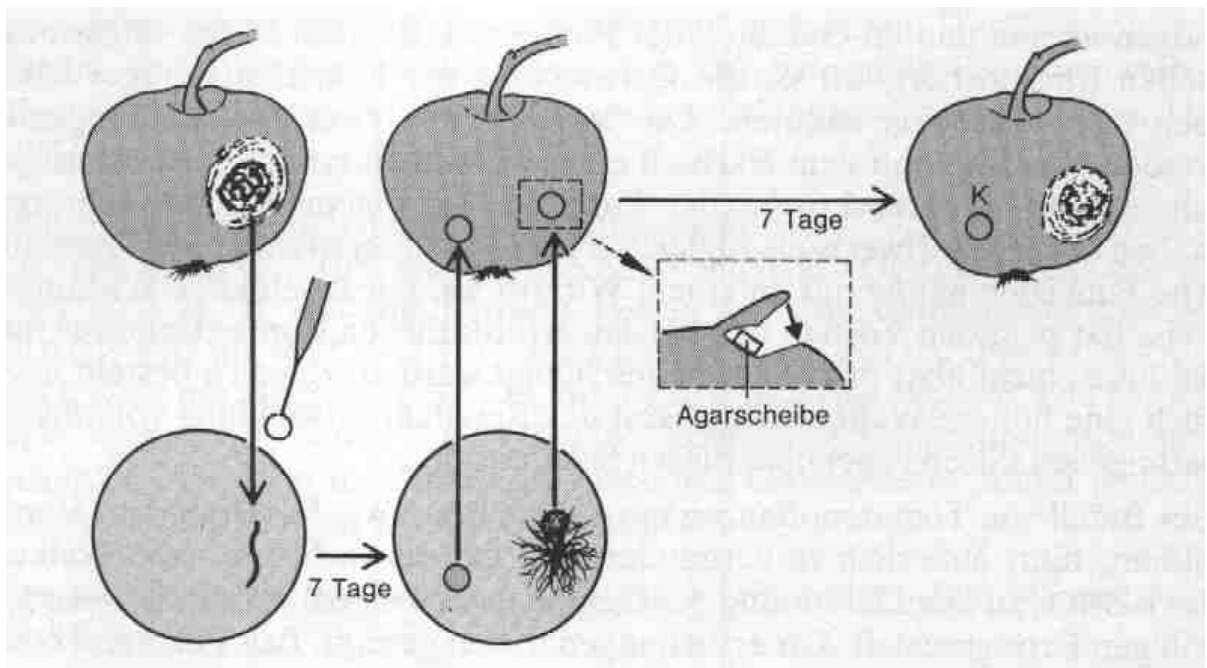


Abb. 13.2.2

3. Nach 7 Tagen die angewachsene Pilzkultur zur Infektion eines gesunden Apfels (des Versuchsobjektes gemäß dem 3. Postulat) verwenden. Zuvor den Apfel mit 70%igem Alkohol gut abreiben, dann mit dem sterilen Skalpell zwei Taschen ins Apfelfleisch schneiden. Das Skalpell schräg ansetzen und ein kreisrundes ca. pfenniggroßes Stück anschneiden, daß das Fruchtfleisch noch an einem Steg aus Apfelschale mit dem Apfel verbunden ist und hochgeklappt werden kann (Abb. 13.2.2).

Mit der Impfnadel einmal ein kleines Stück vom Rand der Pilzkultur mitsamt Agar ausschneiden, in die vorbereitete Tasche stecken und mit dem Fruchtfleischstück zudecken. Zur Kontrolle in die gegenüberliegende Tasche ein Stück Agar ohne Pilzbewuchs stecken. Die beiden Stellen markieren. Den infizierten Apfel 7 Tage bei ca. 20 °C in feuchter Kammer halten. Auf Infektion prüfen. Ist auch das 3. Koch'sche Postulat erfüllt, d. h. sind erneut die bekannten Fäulnissymptome zu erkennen, wiederum den Belag an der faulen Stelle mikroskopisch betrachten. An der mit bloßem Agar infizierten Stelle dürften nur die etwas bräunlich angelaufene Schnittstellen auftreten.

14. KOMPETITIVE HEMMUNG DURCH SULFONAMIDE (NACH H. SCHRÖDER)

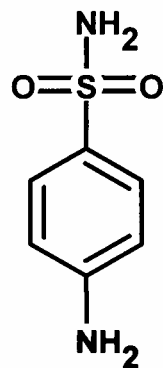
Einleitung:

Von der großen Anzahl der heute bekannten Antibiotika ist bisher nur von wenigen der Wirkungsmechanismus aufgeklärt. Keines der sogenannten großen Antibiotika wirkt - wie früher vermutet wurde - auf den Energiestoffwechsel der Mikroorganismen. Sie greifen vielmehr im Biosynthesestoffwechsel an: bei der Synthese der biogenen Polymeren und des zellulären Membransystems.

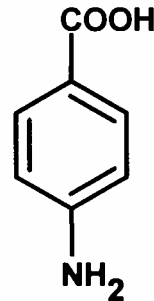
Die Entdeckung der Sulfonamide und ihrer therapeutischen Wirksamkeit durch DOMAGK 1932 bis 1935 geschah rein empirisch. Ihre selektive Wirksamkeit durch viele Mikroorganismen wurde erst viel später aufgeklärt. Man entdeckte, daß die selektive Hemmwirkung auf die Ähnlichkeit mit wichtigen Zellbausteinen zurückzuführen war. Bei Anwesenheit der Sulfonamide wurden diese anstelle des natürlichen Bausteins benutzt, was zu "falschen", inaktiven Verbindungen führte und den Stoffwechsel der Mikroorganismen destruierte. Nachdem dies aufgeklärt war, suchte man systematisch nach ähnlich gebauten, im Stoffwechsel wichtigen Verbindungen, die sich von den nativen nur in geringem Maße unterschieden. Eine Reihe solcher Strukturanaloge findet auch Anwendung (so hemmt z. B. Jodoxouridin die Nukleinsäuresynthese bei Herpes-Viren), jedoch hat keine dieser Verbindungen eine solche Bedeutung und breite Anwendung gefunden, wie dies bei den Sulfonamiden der Fall ist.

Sulfonamide haben eine ähnliche Struktur wie die p-Aminobenzoessäure (PABS), die vielen Bakterien als Wachstumsfaktor dient. PABS ist ein Bestandteil der wichtigen Folsäure (bestehend aus Glutaminsäure + PABS + Pteridin; Vorstufe vom Koenzym, welches u. a. bei der Synthese von einigen Aminosäuren, Purinen und Pyrimidinen mitwirkt). Viele Organismen, einschließlich der Säugetiere, benötigen Folsäure in ihrer Nahrung. Diese sind unempfindlich gegen Sulfonamide. Viele Bakterien bilden jedoch ihre Folsäure selbst aus PABS und den übrigen Bausteinen. Sulfonamide wirken bei ihnen giftig, da die Ähnlichkeit dieses Moleküls mit der PABS zum Einbau und damit zu "falscher" Folsäure führt. Eine Hemmung, bei der ein ähnlicher Molekülbau des Inhibitors zu Verwechslung und zur Bildung von inaktiven Produkten in der Zelle führt, bezeichnet man als kompetitive Hemmung.

Sulfanilamid



p-Aminobenzoessäure



Benötigte Materialien pro Gruppe:

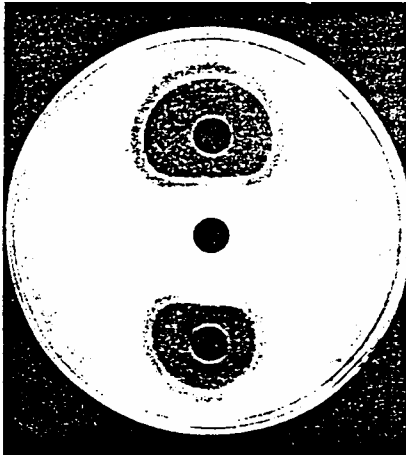
- Testkeim: 24 Std. alte Flüssigkeitskultur von *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (o. a. *Bacillus-subtilis*-Stamm, der im Vorversuch durch Resistenzbestimmung als Sulfonamid-empfindlich gefunden wurde).
- Sulfonamide: a) Sulfanilamid (0,5 %)
 - b) Sulfamerazin, Sulfanilsäure(0,1 %)

Sulfonamide sind im Wasser nur wenig löslich. Deshalb verfährt man z. B. bei der Herstellung der Sulfanilamid-Lösung wie folgt:
0,1 g Sulfanilamid + 0,5 ml Aceton lösen, auffüllen auf 10 ml mit Aqua dest. Diese 1 %ige Lösung wird für den Versuch weiter verdünnt auf 0,5 %.
- 1 x 100 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml Müller-Hinton-Agar (flüssig ca. 45 °C)
- 2 leere Petrischalen
- Lochstanzer (Korkbohrer)
- PABS (p-Aminobenzoessäure: 1 µg/ml)

Ausführung:

Da Sulfonamide durch peptonhaltige Nährböden inaktiviert werden, benutzt man entweder einen mineralischen Nähragar mit Zusatz von Hefe- und Fleischextrakt oder einen Nährboden zur Resistenzbestimmung (MUELLER-HINTON-Agar, erhältlich als Trockennährboden im Handel; siehe Anhang).

- a) Müller-Hinton-Agar bei ca. 45 °C mit *B. subtilis* ATCC 6633 beimpfen, 2 Platten gießen, erstarren lassen.
- b) 3 Löcher nebeneinander steril ausstanzen, so daß diese etwa 1,5 cm Zwischenraum haben.



Kompetitive Hemmung, bebrütete Platte.

Testkeim: *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Mittelloch: PABS 1 µg/ml,

oben Sulfanilamid 0,5 %,

unten Sulfamerazin 0,1 %.

- c) 1 - 2 Tropfen der Versuchslösungen werden in die Löcher getropft. In das mittlere Loch PABS (1 µg/ml), links und rechts daneben Sulfanilamid (0,5 %) und Sulfamerazin (0,1 %).
- d) Bebrüten im Wärmeschrank für 24 Std. bei 37 °C.

15. N₂-fixierende Clostridien: *Clostridium pasteurianum* (n. E. Bast)

Einleitung:

Clostridien sind weit verbreitet in Böden. Sie sind endosporenbildende, grampositive, meist anaerobe Bakterien. Unter dem Aspekt der bevorzugten C-Quelle, können Clostridien in zwei große Gruppen, die peptidolytischen (Spaltung von Eiweiß- und/oder Aminosäure) und die saccharolytischen (Spaltung von Zucker-, Cellulose-, Stärke) Clostridien eingeteilt werden. Als Hauptgärungsprodukte treten Buttersäure (Buttersäuregärung), Aceton und Butanol (Aceton-Butanol-Gärung) auf. Die saccharolytischen Clostridien (nicht jedoch Vertreter der übrigen Clostridiengruppen) sind in der Lage molekularen Stickstoff zu fixieren. Aktivster N₂-Fixierer der Gattung ist *Clostridium pasteurianum*.

Um saccharolytische Clostridien anzureichern, werden selektive Bedingungen, die spezifisch das Wachstum dieser Gruppe fördern, eingestellt.

Selektive Bedingungen:

- Nährboden ohne gebundenen Stickstoff
- Nährboden mit 15 % (w/v) Saccharose
C. pasteurianum toleriert diese hohe Zuckerkonzentration, viele andere saccharolytische Clostridien dagegen nicht.
- Pasteurisieren des Impfmateri als oder der frisch beimpften Nährlösung
 Dieser Arbeitsgang hat den Ausschluß nicht sporenbildender N₂-Fixierer zum Ziel. Da die Endosporen mancher Clostridien nur eine mäßige oder geringe Hitzeresistenz besitzen, sollte man nicht höher als auf 60 °C (30 min) bis 70 °C (10 min) erhitzen oder das Probenmaterial mit 50%igem Ethanol behandeln, um in der Probe vorhandene vegetative Zellen abzutöten.
- anaerobe Bebrütung.

Kulturansatz / Ausführung:

Ein Kulturröhrchen $\frac{3}{4}$ voll (17-18 ml) mit Nährlösung füllen.

In das Röhrchen eine gehäufte Spatelspitze (ca. 0,5 g) feingepulvertes Calciumcarbonat geben.

Nährlösung mit einer kleinen Spatelspitze (ca. 0,1 – 0,2 g) luftgetrockneter, gesiebter Gartenerde beimpfen.

Sofort danach Nährlösung im Wasserbad 10 min auf 70 °C erhitzen und anschließend unter fließendem Wasser rasch abkühlen.

Röhrchen bis zu 14 Tagen bei 35 °C im Dunkeln bebrüten.

Bemerkungen zum Kulturansatz:

1. Die Nährlösung enthält Hefeextrakt (s. Anhang). Hefeextrakt dient als Lieferant von Vitaminen (Biotin, 4-Aminobenzoessäure), die von Clostridien zum Wachstum benötigt werden. In der verwendeten Konzentration beeinträchtigt Hefeextrakt nicht die Selektivität des Nährbodens für N₂-fixierende Bakterien.
2. Die Zugabe von Calciumcarbonat zum Nährmedium ist erforderlich, da Clostridien während der Zuckervergärung Säuren produzieren, zum Wachstum und zur Sporenbildung jedoch ein neutrales bis leicht alkalisches Milieu bevorzugen. Bei niedrigem pH-Wert bilden sie häufig keine Sporen.
3. Da der Nährboden nicht streng selektiv für *C. pasteurianum* ist, entwickeln sich unter Umständen auch andere N₂-fixierende saccharolytische Clostridien.

Auswertung / Ausführung:

Wenn sich in den Röhrchen Wandwachstum zeigt, wird die Kultur mikroskopisch überprüft. Dazu entnimmt man mit einer Pasteurpipette etwas Material vom Wandbelag aus der Tiefe des Röhrchens, wobei man beim Eintauchen in die Kulturflüssigkeit das obere Ende der Pipette mit dem Zeigefinger verschlossen hält und erst freigibt, wenn die Spitze der Kapillare den Wandbelag berührt.

Das Zellmaterial wird auf einen Objektträger aufgebracht und gefärbt.

- a) Es wird eine Gramfärbung durchgeführt.
- b) Es wird eine Sporenfärbung durchgeführt.
- c) Ein Präparat mit ungefärbten Zellen wird daraufhin betrachtet, ob es möglicherweise Speicher-/ Reservestoffe enthält.

Bemerkungen zur Auswertung:

Die Entwicklung N₂-fixierender Clostridien erkennt man an

- der Trübung der Nährlösung, meist zusammen mit einem dünnen, weißlichen Wandbelag im unteren Teil des Röhrchens;
- der Bildung von Gas (CO₂, H₂): Schaum auf der Flüssigkeitsoberfläche; beim Klopfen an das Röhrchen steigen aus dem Bodensatz Blasen auf;
- dem Geruch nach Buttersäure.

Vegetative Zellen (von *C. pasteurianum*) sind im frühen Kulturstadium grampositiv (werden in alten Kulturen gramnegativ); stäbchenförmig, gerade oder leicht gebogen, 0,5-1,3 µm breit, 2,7-13 µm lang; einzeln oder in Paaren. Unbeweglich oder beweglich durch peritriche Begeißelung.

Dauerformen: Die Endosporen sind oval geformt; liegen subterminal in der Sporenmutterzelle und sind breiter als die Mutterzelle. Diese ist daher keulenförmig angeschwollen.

Reservestoffe: Die Zellen enthalten häufig eine stärkeähnliche Substanz, die als Granulose bezeichnet wird. Granulose-Körnchen treten vor allem während der Sporulation auf.

ANHANG

Reagenzien und Medien:

Malzextrakt:	Malzextrakt	50 g
	Leitungswasser	1000 ml
	pH (einstellen mit Milchsäure)	4,5
Malz-Agar:	Malzextrakt	50 g
	Agar	30 g
	Leitungswasser	1000 ml
	pH: vor dem Autoklavieren	> 10
	nach dem Autoklavieren	~ 5
Bouillon-Medium:	Pepton	10 g
	Fleischextrakt	10 g
	NaCl	5 g
	Agar	15 g
	Aqua dest.	1000 ml
	pH	7 - 7,2
Nutrient-Agar:	Pepton	5 g
	Fleischextrakt	3 g
	Agar	15 g
	Aqua dest.	1000 ml
	pH	7,0
LB-Medium:	Pepton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
	Agar	20 g
	Aqua dest.	1000 ml

Chinablau- Lactose- Agar:	D+-Lactose	10 g
	Pepton aus Casein	5 g
	Fleischextrakt	3 g
	NaCl	5 g
	Chinablau	0,375 g
	Agar	12 g
	Aqua dest.	1000 ml
	pH (einstellen mit 2N NaOH)	7,0 - 7,2

Methylenblau-Lösung:	0,5 g Methylenblau in 1.000 ml Aqua dest. lösen
-----------------------------	---

Hefeextrakt-Trypton- Medium:	Bacto-Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	KH ₂ PO ₄ (extra autoklavieren)	5 g
	Glucose	1 g
	Agar	15 g
	Aqua dest.	1.000 ml

Paraffin-Stopfen:	Paraffin : Paraffinöl = 1 : 2,5
--------------------------	---------------------------------

Hefeextrakt-Stärke-Agar:	Stärke	20 g
	Hefeextrakt	5 g
	Agar	15 g
	Leitungswasser	1000 ml
	pH	7,0

Stickstoffagar:	Hefeextrakt	0,1 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
	K ₂ HPO ₄	1 g
	KH ₂ PO ₄	1 g
	Agar	15 g
	Vishniac-Spurenelementlsg.	1 ml
	Aqua dest.	1000 ml

Vishniac-Spurenelementlösung:	EDTA	10 g
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,44 g
	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	1,01 g
	CuCL ₂ x 6 H ₂ O	0,32 g
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,315 g
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O	0,22 g
	CaCL ₂	1,18 g
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	1 g
	Aqua dest.	1000 ml
	pH	4,0

Kulturmedium (Gärröhrchen):	Glucose	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	Pepton	15 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	4 g
	K ₂ HPO ₂	1 g
	KH ₂ PO ₄	1 g
	MgSO ₄	0.7 g
	NaCl	1 g
	Aqua dest.	1000 ml

Peptonwasser:	Pepton (mit Tryptophan)	10 g
	Leitungswasser	1000 ml

Citratmedium:	Na-citrat	3 g
	NaCl	5 g
	(NH ₄)HPO ₄	1 g
	K ₂ HPO ₄	1 g
	MgSO ₄	0,2 g
	Vishniac-Spurenelementlsg.	1 ml
	Aqua dest.	1000 ml
	30 Min. kochen	

Müller-Hinton- Agar:	Caseinhydrolysat	17,5 g
	Fleischextrakt	2,0 g
	Kartoffelstärke	1,5 g
	Agar	12,0 g
	Aqua dest.	1000 ml
	pH	7,2

Sporulationsmedium:	LB-Medium	
	MnSO ₄	0,001 %
	MgSO ₄	0,001 %

Nährlösung zur Anreicherung von *Clostridium pasteurianum*:

K ₂ HPO ₄	1,0 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,1 g
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,01 g
MnSO ₄ · H ₂ O	0,01 g
Hefeextrakt	0,01 g
Saccharose	150,0 g
Aqua dest.	1000 ml
Spurenelement-Lsg. mit EDTA	1,0 ml
pH 7,2	

Spurenelementlösung mit EDTA:

Substanz	Menge in 1 l Stammlösung	Endkonzentration im Medium ($\mu\text{mol/l}$)
EDTA	5,2 g	14,0
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2,0 g	7,2
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	150 mg	0,5
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	100 mg	0,5
H_3BO_3	62 mg	1,0
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	190 mg	0,8
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	17 mg	0,1
$\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	24 mg	0,1
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	36 mg	0,15

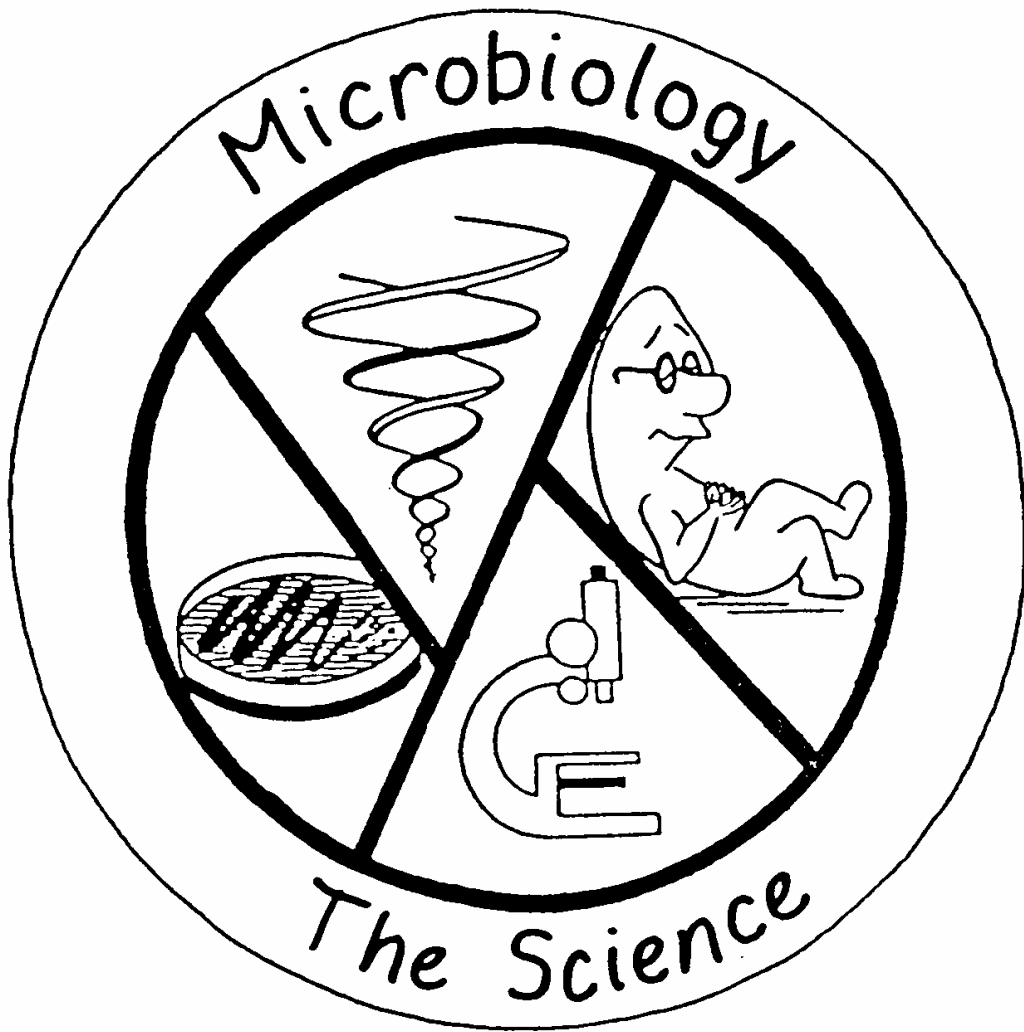
Man löst die Substanzen getrennt in Wasser, gibt sie in der angegebenen Reihenfolge zur EDTA-Lösung und füllt die Lösung mit dest. Wasser auf 1000 ml auf. Der pH-Wert der EDTA-Lösung wird vor Zugabe der Salze mit etwa 2 molarer Salzsäure auf ca. pH 3,0 eingestellt und vor dem Auffüllen des Gemisches n.e. überprüft. Die autoklavierte oder sterilfiltrierte Stammlösung bewahrt man in kleinen Portionen in möglichst voll gefüllten, mit Schraubdeckeln dicht verschlossenen Flaschen bei 4°C auf. Sie ist mehrere Monate haltbar.

Literaturhinweise:

- Bast, E.: Mikrobiologische Methoden – Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin 1999
- Brock and Madigan: Biology of Microorganisms, Prentice Hall, 1991
- Cypionka: Grundlagen der Mikrobiologie, Springer, 1999
- Dawid, W.: Experimentelle Mikrobiologie, 4. Auflage, Heidelberg 1981
- Drews, G.: Mikrobiologisches Praktikum, 4. Auflage, Berlin 1983
- Fritsche: Mikrobiologie, Spektrum, 1999
- Lengeler, Drews, Schlegel: Biology of the Prokaryotes, Thieme, 1999.
- Munk: Grundstudium Mikrobiologie, Spektrum, 2001
- Näveke, R., K.-H. Trepper: Einführung in die mikrobiologischen Arbeitsmethoden mit Praktikumsaufgaben, Stuttgart, New York 1979
- Otte, H.-J.: Leitfaden der medizinischen Mikrobiologie, 5. Auflage, Stuttgart, New York 1974
- Schlegel: Allgemeine Mikrobiologie, Thieme, 1992
- Süßmuth, R., J. Eberspächer, R. Haag und W. Springer: Biochemisch-mikrobiologisches Praktikum, Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1987
- Methodenbücher zur Mikrobiologie in der Bibliothek: selbst stöbern!

Zeichnungen:

- Aus dem Cartoonbuch “What's so funny about microbiology?” von Joachim Czichos (www.joachim-czichos.de)
- SCHRÖDER, H.: Mikrobiologisches Praktikum, Berlin 1977



(J. Czichos)