

Praktikum Mikrobiologie
im Studiengang
Water Science (B.Sc.)
3. Semester

Name: _____ Matrikelnummer: _____
Gruppe: _____

I. VERSUCHSÜBERSICHT

Woche 1

Tag	Versuch	Seite
Montag, 1. Tag	1. Umgang mit Pipetten	1
	2. Mikroskopie	5
	• Einführung in die Handhabung des Mikroskops	
	• Mikroskopische Untersuchung von Teichwasser	
	3. Herstellung von Nährmedien	14
	• Ansetzen der Nährmedien	
	4. Direktisolierung von Mikroorganismen aus der Luft	20
	• Exposition der Luftkeimplatten	
	3. Herstellung von Nährmedien	18
	• Herstellung von Agarplatten und Schrägagarröhrchen	
Dienstag, 2. Tag	5. Gramfärbung	34
	6. Hemmhoftest	41
	• Versuchsdurchführung	
	4. Direktisolierung von Mikroorganismen aus der Luft	21
	• Auswertung	
• Einzelkolonieausstriche		
6. Hemmhoftest	43	
• Auswertung		
Mittwoch, 3. Tag	7. Zellzahlbestimmung von Bäckerhefe	49
	• Versuchsdurchführung	
	8. Bestimmung der Mutationsfrequenz	61
	• Versuchsdurchführung	
	9. MHK- und MBK-Bestimmung	68
• Versuchsdurchführung		
Donnerstag, 4. Tag	4. Direktisolierung von Mikroorganismen aus der Luft	22
	• Auswertung	
	• Weiterführende Einzelkolonieausstriche	
	8. Bestimmung der Mutationsfrequenz	63
	• Auswertung antibiotikafreie Nalidixinplatten	
9. MHK- und MBK-Bestimmung	71	
• Auswertung und MBK-Bestimmung		
10. Wachstumskurve	75	
• Versuchsdurchführung (Beginn des Experiments um 8:45 Uhr s.t. vor der Vorbesprechung!)		
Freitag, 5. Tag	4. Direktisolierung von Mikroorganismen aus der Luft	23
	• Auswertung	
	7. Zellzahlbestimmung von Bäckerhefe	55
	• Auswertung	
	8. Bestimmung der Mutationsfrequenz	63
• Auswertung antibiotikahaltige Nalidixinplatten		
9. MHK- und MBK-Bestimmung	71	
• Auswertung der Schrägagarröhrchen		
10. Wachstumskurve	78	
• Auswertung		

Woche 2

Tag	Versuch	Seite
Montag, 6. Tag	11. Koloniezahlbestimmung <ul style="list-style-type: none"> • Anlegen von Gussplatten 	85
	12. Nachweis von <i>E. coli</i> und Coliformen durch Flüssigkeitsanreicherung <ul style="list-style-type: none"> • Ansetzen der Primärkulturen 	92
	13. Nachweis von <i>E. coli</i> und Coliformen durch Membranfiltration <ul style="list-style-type: none"> • Ansetzen der Primärkulturen 	102
	14. Nachweis von <i>E. coli</i> und Coliformen mit dem Colilert-System <ul style="list-style-type: none"> • Ansetzen der Primärkulturen 	110
	15. Nachweis von <i>E. coli</i> mit einem Mikrotiterplattenverfahren <ul style="list-style-type: none"> • Ansetzen der Primärkulturen 	119
	12. Nachweis von <i>E. coli</i> und Coliformen durch Flüssigkeitsanreicherung <ul style="list-style-type: none"> • Anlegen von Subkulturen 	95
	13. Nachweis von <i>E. coli</i> und Coliformen durch Membranfiltration <ul style="list-style-type: none"> • Auswertung; Anlegen von Subkulturen 	104
	14. Nachweis von <i>E. coli</i> und Coliformen mit dem Colilert-System <ul style="list-style-type: none"> • Auswertung 	113
	16. Aktivitätsabnahme einer Bakterienkultur <ul style="list-style-type: none"> • Versuchsdurchführung 	125
	17. Hygiene im Alltag <ul style="list-style-type: none"> • Probennahme 	138
Dienstag, 7. Tag	11. Koloniezahlbestimmung <ul style="list-style-type: none"> • Auswertung 	87
	12. Nachweis von <i>E. coli</i> und Coliformen durch Flüssigkeitsanreicherung <ul style="list-style-type: none"> • Bunte Reihe 	95/96
	13. Nachweis von <i>E. coli</i> und Coliformen durch Membranfiltration <ul style="list-style-type: none"> • Auswertung 	104
	15. Nachweis von <i>E. coli</i> mit einem Mikrotiterplattenverfahren <ul style="list-style-type: none"> • Auswertung 	122
	16. Aktivitätsabnahme einer Bakterienkultur <ul style="list-style-type: none"> • Auswertung 	127
	17. Hygiene im Alltag <ul style="list-style-type: none"> • Versuchsdurchführung 	141
	11. Koloniezahlbestimmung <ul style="list-style-type: none"> • Auswertung 	87
	12. Nachweis von <i>E. coli</i> und Coliformen durch Flüssigkeitsanreicherung <ul style="list-style-type: none"> • Auswertung, Ansetzen von Teststreifen 	97
	18. Identifizierung coliformer und anderer Bakterien mit einem standardisierten Testsystem <ul style="list-style-type: none"> • Ansetzen von Teststreifen 	147
	Mittwoch, 8. Tag	12. Nachweis von <i>E. coli</i> und Coliformen durch Flüssigkeitsanreicherung <ul style="list-style-type: none"> • Auswertung
12. Nachweis von <i>E. coli</i> und Coliformen durch Flüssigkeitsanreicherung <ul style="list-style-type: none"> • Auswertung 		97
17. Hygiene im Alltag <ul style="list-style-type: none"> • Auswertung 		142
Donnerstag, 9. Tag	12. Nachweis von <i>E. coli</i> und Coliformen durch Flüssigkeitsanreicherung <ul style="list-style-type: none"> • Auswertung 	97
	17. Hygiene im Alltag <ul style="list-style-type: none"> • Auswertung 	142
Freitag, 10. Tag	12. Nachweis von <i>E. coli</i> und Coliformen durch Flüssigkeitsanreicherung <ul style="list-style-type: none"> • Auswertung 	97
	17. Hygiene im Alltag <ul style="list-style-type: none"> • Auswertung 	142

18. Identifizierung coliformer und anderer Bakterien mit einem
standardisierten Testsystem

148

- Auswertung
-

II. ALLGEMEINE ORGANISATION

A. PRAKTIKUMSZEITEN UND TERMINE

Die **Dauer des Praktikums** beläuft sich auf zwei Wochen: 1. Praktikumswoche: 26.02. - 01.03.2024, 2. Praktikumswoche: 04.03. – 08.03.2024.

Am 08.02.2024 findet von 12:00 Uhr bis 13:00 Uhr ein **schriftliches Antestat** in Raum S05V / S03 V00 E59 statt, dessen Bestehen Bedingung für die Zulassung zum Praktikum ist. Lesen Sie das Praktikumsskript, um sich auf das Antestat vorzubereiten. Sie können das Antestat einmal schriftlich wiederholen (Nachschreibetermin: 15.02.2024, 12:00 Uhr bis 13:00 Uhr, Raum S05V / S03 V00 E59). Sollten Sie bei einem Termin unentschuldigt fehlen, gilt dies als Fehlversuch.

Die **Sicherheitsunterweisung und allgemeine Vorbesprechung** zum Praktikum finden am 22.02.2024 um 12:00 Uhr (s.t.) in Raum S05V / S03 V00 E59 statt. Dieser Termin ist **Grundvoraussetzung** für die Teilnahme am Praktikum. **Bei Nichterscheinen oder Zuspätkommen ist eine Teilnahme am Praktikum nicht möglich.**

Als Vorbereitung für jeden Praktikumstag finden Vorbesprechungen um 09:00 Uhr (s.t.) in Raum S05 T03 B94 statt. In den Vorbesprechungen werden der tagesspezifische Ablauf und organisatorische Details besprochen, sowie die Ergebnisse bereits abgeschlossener Versuche diskutiert. Der Inhalt der Vorbesprechungen wird während des Praktikums stichprobenartig abgefragt und die Antworten fließen in die Bewertung ein. Das praktische Arbeiten beginnt im Anschluss an die Vorbesprechung in Labor S05 T02 A32 (Ende je nach Versuchsaufwand ca. 16:00 Uhr, Änderungen vorbehalten).

B. ZUGANGSVORAUSSETZUNGEN

Das Bestehen des Antestats und die Teilnahme an der Sicherheitsunterweisung sind Grundvoraussetzung für die Teilnahme am Praktikum.

C. ANWESENHEITSPFLICHT

Es gilt Anwesenheitspflicht im Labor. Die Anwesenheit wird durch die Betreuer kontrolliert. Maximal ein Fehltag, der durch ein ärztliches Attest entschuldigt werden muss, ist erlaubt. Bei mehr als einem entschuldigten Fehltag oder ab einem unentschuldigten Fehltag gilt das Praktikum als nicht bestanden.

D. VORBEREITUNG

Lesen Sie das Skript unbedingt **vor** Praktikumsbeginn! Es wird vorausgesetzt, dass Sie sich mit Hilfe des Skriptes vorbereitet haben und die am Arbeitsplatz vorzufindenden Materialien zuordnen und einsetzen können. Eine mündliche Überprüfung dieser Vorbereitung kann, sollte es nötig erscheinen, während des Praktikums durch die Betreuer vorgenommen werden.

Die tägliche Vorbesprechung ersetzt **nicht** die individuelle Vorbereitung mit Hilfe des Skripts!

E. LABORORDNUNG

Nichtbeachten der folgenden Regeln führt zu Punkteabzug (Endnote). Wiederholtes Nichtbeachten führt zum Ausschluss aus dem Praktikum.

i. Betreten und Verlassen des Labors

Vor Betreten des Labors sind persönliche Gegenstände, z.B. Taschen und Jacken, im Raum S05 V03 A79 (Archiv) abzulegen. Bitte nehmen Sie nur Ihre Praktikumsunterlagen mit ins Labor (Skript, Taschenrechner, Stifte, Laborjournal).

Das Betreten des Labors erfolgt erst auf das Signal der Betreuer.

Das Verlassen des Labors ohne die Erlaubnis eines Betreuers ist **untersagt**. Für jeden Praktikumstag gilt: Nach Beendigung aller Arbeiten ist der Arbeitsplatz aufzuräumen. Anschließend wird ein Betreuer um die Platzabnahme gebeten. Verläuft diese ohne Beanstandung, können Kittel und Schutzbrille abgelegt, die Hände desinfiziert, und der Praktikumsraum verlassen werden (in dieser Reihenfolge).

ii. Mitzubringen

Zum Arbeiten im Labor benötigen Sie einen Baumwollkittel, ein Laborjournal (siehe F), eine Schutzbrille, einen Taschenrechner, ein Feuerzeug, eine Rolle Küchenpapier pro Gruppe, ein Lineal, einen Bleistift, einen Kugelschreiber sowie einen **dünnen** wasserfesten Stift mit einer Linienbreite von 0,4 - 0,6 mm (z.B. „Staedler Lumocolor permanent F“, „edding permanent pen 141 F“, „Faber-Castell 1513 F“).

iii. Der Arbeitsplatz im Praktikum

Sie arbeiten in Einzelgruppen. Jede „Gruppe“ erhält einen vollständig eingerichteten Arbeitsplatz. Über dem Platz ist die entsprechende Gruppennummer angebracht. Zum Arbeitsplatz gehört eine Schublade, die ebenfalls mit der Gruppennummer versehen ist, und von Ihnen genutzt werden kann. Alle anderen Schränke und Schubladen dürfen nicht geöffnet werden!

Bitte prüfen Sie vor Beginn des praktischen Teils, ob Ihr Arbeitsplatz vollständig eingerichtet ist und alle Geräte funktionieren (Tab. II.1). Am letzten Praktikumstag hat eine Platzabgabe bei einem der anwesenden Betreuer zu erfolgen, bevor Sie das Labor verlassen. Fehlende Geräte müssen von Ihnen ersetzt werden.

Kolbenhubpipetten sind wichtige und teure Hilfsmittel im Labor. Gehen Sie bitte sorgsam damit um. Sollte durch Ihr Verschulden eine Pipette beschädigt werden, müssen Sie die Reparaturkosten übernehmen.

iv. Waschbecken

Zwei der fünf vorhandenen Waschbecken im Praktikumslabor sind **ausschließlich** Handwaschbecken. Die anderen Waschbecken sind Laborwaschbecken und dienen zur Entsorgung von wässrigen, **bakterienfreien** Abfällen sowie zum Ausspülen von Glasgeräten. Bitte achten Sie auf diese Trennung, die durch entsprechende Beschriftung kenntlich gemacht ist.

Tab. II.1. Liste der Materialien am Arbeitsplatz.

Gerät	Vorhanden
Tischmüllständer	
Pipettenständer	
Kolbenhubpipette, 100 - 1000 µl	
Kolbenhubpipette, 10 - 100 µl	
Kolbenhubpipette, 1 - 10 µl	
Pipettierhilfe	
Impfösenständer	
Impföse	
2 Drigalskipateln	
Stoppuhr mit Batterien	
Lupe (mit Batterien)	
Pinzette	
Bunsenbrenner mit Schlauch	
Glaspetrischale für Ethanol	
Sterile Pipettenspitzen 1000 µl	
Sterile Pipettenspitzen 100 µl	
Box mit sterilen Glaspipetten 10 ml	
Spritzflasche (1-2 pro Zeile)	
Ethanolflasche	
Vortex (2-3 pro Zeile)	
Reagenzglasständer	

v. Müllentsorgung

Ist Müll zu entsorgen, so muss zunächst zwischen kontaminiertem und bakterienfreiem Müll unterschieden werden. Kontaminiertes, also mikrobiell verunreinigtes Müll muss vor der endgültigen Entsorgung je nach Art des Mülls im Tauchbad desinfiziert oder im Autoklaven sterilisiert (121 °C für 20 min) werden, um die darin enthaltenen Mikroorganismen abzutöten. Bakterienfreier Müll wird nicht desinfiziert bzw. autoklaviert.

Mikrobiell kontaminiert Müll:

- Objektträger, Deckgläser und sonstige Geräte wie Pinzetten, die mit Mikroorganismen kontaminiert sind, werden in eine Wanne mit Desinfektionsmittel (Tauchbad) gegeben. Diese Wanne steht am Laborwaschbecken. (z.B. Objektträger und Deckgläser mit Luftkeimproben)
- Mikrobiell verunreinigte Einwegmaterialien (z.B. benutzte Pipettenspitzen) werden direkt in den Tischautoklavenbeutel gegeben.
- Feste Medien, die zur Anzucht von Mikroorganismen verwendet wurden, werden mitsamt der Petrischalen in einem großen Autoklavenbeutel gesammelt, der sich am bzw. auf dem Laborwagen befindet.
- Flüssige Medien, die zur Anzucht von Mikroorganismen verwendet wurden, sowie Verdünnungsreihen werden **nach Entfernung der Beschriftung** auf dem Laborwagen gesammelt.

Bakterienfreier Müll:

- Glasmüll, der nicht mikrobiell bzw. nur mit abgetöteten Mikroorganismen belastet ist (z.B. nach der Gramfärbung), wird im Behälter für Glasbruch entsorgt. (z.B. Pasteurpipetten, mit denen Wasser pipettiert wurde, Objektträger und Deckgläser mit Teichwasserproben)
- Handschuhe, die nicht in Kontakt mit Bakteriensuspensionen o.ä. gekommen sind, werden im Müleimer entsorgt.
- Alufolie wird in einer separaten Tüte gesammelt und nach Praktikumsende zum Recycling gegeben.

vi. Be- und Entschriftung von Arbeitsmaterialien

Verwenden Sie zum Beschriften stets einen dünnen, wasserfesten Stift (Ausnahme: Gramfärbung).

Zu bebrütende Nährmedien oder von Ihnen hergestellte Medien müssen stets mit der **Gruppennummer und den Initialen Ihres Namens** beschriftet sein, um sie bei dem Austeiln am nächsten Tag zuordnen und individuell bewerten zu können (Beispiel: Gr. 1 A.D.).

Damit Sie die einzelnen Medien den Versuchen wieder zuordnen können, sollte außerdem die **Versuchsnummer** und die **Verdünnungsstufe** oder eine weitere hilfreiche Beschriftung vorhanden sein (Beispiel: V3, 10⁻⁷). Weitere Beschriftungshinweise zu einzelnen Versuchen stehen im Skript in eckigen Klammern.

Reagenzgläser sind immer auf dem Glas zu beschriften; Flüssigmedien, die mit Alufolie versehen sind, auf der Alufolie selbst. Agarplatten werden auf der Unterseite entlang des Rands beschriftet.

Zu bebrütende Medien stellen Sie bitte **sortiert** (Temperaturangaben zur Bebrütung beachten) **oben** auf den entsprechenden Laborwagen, damit sie zu den vorgesehenen Brutschränken gebracht werden können.

Zu autoklavierende Suspensionen und Medien werden mit etwas Ethanol und einem Tuch **entschriftet** und anschließend **unten** in den Laborwagen gestellt.

vii. Labordienst

An jedem Praktikumstag haben eine oder mehrere Gruppen Labordienst. Die Organisation des Labordienstes wird als Aushang im Praktikumsraum bekannt gegeben. Diese Gruppen sollten sich bereits während der Praktikumszeit melden, um evtl. Pausen zum Aufräumen zu nutzen.

Die Aufgaben des Labordienstes belaufen sich auf Spülen von Glasgeräten, Ein- bzw. Ausräumen von Brutschränken, Austeil von Arbeitsmaterialien, Autoklavieren von Flüssig- und Festmüll sowie Desinfektion der Laborbänke am Ende des Praktikumstags.

F. LABORJOURNAL UND SKRIPT

Das Skript dient zur Vorbereitung auf das Praktikum. Bitte lesen Sie es im Voraus.

Alle Studierenden haben ein Laborjournal zu führen. Nutzen Sie dazu bitte eine gebundene DIN-A5-Kladde mit kariertem Papier. Das Laborjournal dient zur Dokumentation von Versuchsabläufen und -ergebnissen während des Praktikums. Messdaten, Beobachtungen und weitere Ergebnisse werden während des Praktikums im Laborjournal, sowie in ggf. im Umlauf befindlichen Tabellen festgehalten. So wird vermieden, dass Ergebnisse verloren gehen. Im Zuge der Nachbereitung werden diese Daten in das Skript übertragen, bzw. ausgewertet. Diskutieren Sie Ihre Ergebnisse und beantworten Sie die Fragen mit Hilfe der Informationen aus den theoretischen Einführungen. **Wichtig: Einträge in Laborjournal und Skript können nur benotet werden, wenn sie mit einem dokumentenechten Stift gemacht wurden (z.B. Kugelschreiber)!**

G. BEWERTUNG DES PRAKTIKUMS

Die Bewertung des Praktikums setzt sich wie folgt zusammen:

- **Schriftliches Antestat: 10%** der Gesamtnote
- **Praktisches Arbeiten: 50%** der Gesamtnote (Bewertung der praktischen Arbeit durch die zuständigen Betreuer)
- **Skript: 30%** der Gesamtnote (Bewertung der im Skript vorgelegten Ergebnisse und Diskussionen durch die zuständigen Betreuer)
- **Laborjournal: 10%** der Gesamtnote

Laborjournal und Skript sind am 11.04.2024 zwischen 11:00 und 11:30 Uhr in Raum S05 V03 F23 abzugeben. Die bewerteten Skripte und Laborjournale können am 16.05.2024 zwischen 11:00 und 11:30 Uhr in Raum S05 V03 F23 wieder abgeholt werden.

H. ANSPRECHPARTNER

Dr. Verena Brauer, Tel.: 0201 183 6607, Email: verena.brauer@uni-due.de

1. UMGANG MIT MESS- UND KOLBENHUBPIPETTEN

1.1 Einführung

Pipetten sind essentielle Hilfsmittel im mikrobiologischen Laboralltag. Kleine Volumina (bis zu 5 ml) werden heute in der Regel nicht mit Glaspipetten sondern mit Kolbenhubpipetten pipettiert. Kolbenhubpipetten sind teuer und sehr empfindlich. Durch falsches Pipettieren kann es zur Beschädigung der Pipette kommen. Daneben führt die nicht sachgerechte Handhabung zum Pipettieren falscher Volumina, wodurch Versuchsergebnisse nicht auswertbar sind.

Daher ist stets auf die richtige Handhabung der Pipetten zu achten!

Um diese zu erlernen, zeigt Ihnen der Betreuer am ersten Praktikumstag die für das Praktikum relevanten Kolbenhubpipetten und den sachgerechten Umgang.

Jeder Arbeitsplatz verfügt über 3 Kolbenhubpipetten, die sich in ihren Pipettier-Volumina unterscheiden:

- 100 - 1000 µl (blaue Spitzen)
- 20 – 100/200 µl (gelbe Spitzen)
- 1-10/20 µl (klare Spitzen)

Größere Volumina werden in der Regel noch immer mit Glaspipetten überführt. Dazu nutzt man die Pipettierhelper, die man auf die Glaspipette setzt. Durch Zusammendrücken des Balges erzeugt man einen Unterdruck, der die zu pipettierende Flüssigkeit in die Pipette zieht. Darauf ist zu achten, keine Flüssigkeit in den Pipettierhelper zu ziehen. Das gewünschte Volumen liest man am unteren Meniskus mit Hilfe der Skalierung auf der Pipette ab.

1.2 Material

- 3 Kolbenhubpipetten
- Blaue, gelbe und klare Pipettenspitzen
- 10 ml-Messpipetten



Abb. 1.1. Dieses Bild zeigt die richtige Handhabung einer Kolbenhubpipette. Mit dem Daumen werden der Kolbenhub zum Aufziehen, bzw. Abgeben der Flüssigkeit (hier gezeigt), sowie die Abwurftaste zum Abwerfen der Einweg-Pipettenspitze bedient.

- Pipettierhelfer
- 1 Gefäß mit Wasser
- 1 leeres Gefäß
- 3 große leere Reagenzgläser
- 6 kleine leere Reagenzgläser
- 6 Eppendorf-tubes
- 2 Reagiergefäße mit 2 ml Farbstoff (Lebensmittelfarben)

1.3 Durchführung

1.3.1 VORGANG DES PIPETTIERENS MIT DER KOLBENHUBPIPETTE

1. Vorsichtig das gewünschte Volumen einstellen (Achtung: Minimales und maximales Volumen nicht über- bzw. unterschreiten! Dies beschädigt die Pipette!)
2. Sterile Pipettenspitze (gelb oder blau) aufnehmen
3. Bevor man in die zu pipettierende Lösung eintaucht die Pipettiertaste bis zum ersten Druckpunkt hinabdrücken und gedrückt halten
4. Dann erst Pipettenspitze in zu pipettierende Lösung eintauchen (sonst gibt es Blasen)
5. Pipettiertaste langsam, mit Gefühl loslassen (die zu pipettierende Lösung wird aufgenommen)
6. Pipette aus der Lösung nehmen und in Gefäß, in welches die aufgenommene Lösung pipettiert werden soll, halten
7. Aufgenommene Lösung durch Hinabdrücken der Pipettiertaste bis zum ersten und dann zum zweiten Druckpunkt abgeben (dabei Pipette NICHT in die Lösung eintauchen, die sich bereits in dem Gefäß befindet)
8. Pipettiertaste gedrückt halten und Pipette aus dem Gefäß entnehmen
9. Pipettiertaste langsam loslassen
10. Pipettenspitze durch Drücken der Abwurftaste in Autoklaviermüll (kleiner Müllbehälter am Arbeitsplatz) entsorgen

Üben Sie diesen Pipettievorgang mehrmals mit folgenden Volumina, bis Sie das Pipettieren beherrschen: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 550 µl, 820 µl und 1000 µl.

Unter keinen Umständen darf die zu pipettierende Lösung in die Kolbenhubpipette gelangen!

1.3.2 HERSTELLUNG EINER DEZIMALEN VERDÜNNUNGSREIHE

In der Mikrobiologie dienen Verdünnungsreihen z.B. dem Zählen von Bakterien, deren Konzentration, also ihre Anzahl in einer Lösung, durch die Verdünnungsreihe verringert wird.

So lassen sie sich auch stark konzentrierte Bakteriensuspensionen leicht auszählen. Das Ergebnis wird anschließend unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors auf die ursprüngliche Konzentration zurückgerechnet. Auch beim Ausplattieren von Bakteriensuspensionen auf Nährböden ist die Verdünnungsreihe ein wichtiges Hilfsmittel. In diesem Versuch soll jeder von Ihnen einen unverdünnten Farbstoff (entspricht der Verdünnungsstufe 10^0) mit Hilfe einer dezimalen Verdünnungsreihe um den Faktor 1000 verdünnen (entspricht der Verdünnungsstufe 10^{-3}). Da jeder Verdünnungsschritt die Konzentration um den Faktor 10 verringert, muss in drei Schritten verdünnt werden.

Für große Reagenzgläser:

- Reagenzgläser beschriften (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3})
- Mit einer unter sterilen Bedingungen entnommenen Messpipette in jedes Reagenzglas 9 ml Wasser pipettieren
- Kolbenhubpipette auf 1000 μ l einstellen
- Pipettenspitze steril entnehmen (blau)
- 1 ml eines Farbstoffes aufnehmen
- Volumen in die erste Verdünnung (10^{-1}) abgeben **ohne** die Spitze einzutauchen
- Pipettenspitze abwerfen
- erste Verdünnung auf dem Vortex gut durchmischen
- **neue** Pipettenspitze entnehmen
- 1 ml von der ersten Verdünnung (10^{-1}) entnehmen und in die zweite Verdünnung (10^{-2}) pipettieren
- usw.

Für kleine Reagenzgläser:

- Reagenzgläser beschriften (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3})
- Mit einer unter sterilen Bedingungen entnommenen Messpipette in jedes Reagenzglas 4,5 ml Wasser pipettieren
- Kolbenhubpipette auf 500 μ l einstellen
- Pipettenspitze steril entnehmen (blau)
- 500 μ l eines Farbstoffes aufnehmen
- Volumen in die erste Verdünnung (10^{-1}) abgeben **ohne** die Spitze einzutauchen
- Pipettenspitze abwerfen
- erste Verdünnung auf dem Vortex gut durchmischen
- **neue** Pipettenspitze entnehmen
- 500 μ l von der ersten Verdünnung (10^{-1}) entnehmen und in die zweite Verdünnung (10^{-2}) pipettieren
- usw.

Für Reagiergefäße (Eppendorf):

- Eppendorf-Gefäße beschriften (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3})
- Kolbenhubpipette auf 900 μ l einstellen
- Pipettenspitze steril entnehmen
- In jedes Eppendorf-Gefäß 900 μ l Wasser pipettieren
- Kolbenhubpipette auf 100 μ l einstellen (gelbe Spitzen verwenden)

- Pipettenspitze steril entnehmen
- 100 µl eines Farbstoffes aufnehmen
- Volumen in die erste Verdünnung (10^{-1}) abgeben **ohne** die Spitze einzutauchen
- Pipettenspitze abwerfen
- erste Verdünnung auf dem Vortex gut durchmischen
- **neue** Pipettenspitze entnehmen
- 100 µl von der ersten Verdünnung (10^{-1}) entnehmen und in die zweite Verdünnung (10^{-2}) pipettieren usw.
- Anschließend noch eine weitere Verdünnungsreihe (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) mit einem Gesamtvolumen von 100 µl ansetzen (90 µl Wasser + 10 µl Farbstoff oder verdünnter Farbstoff; für 10 µl die klaren Spitzen verwenden)

Lassen Sie Ihre Verdünnungsreihen vom zuständigen Betreuer bewerten.

1.4 Frage (5 Punkte)

Eine Bakterienkolonie, die $3,4 \times 10^7$ Zellen enthält, wird in 5 ml deionisiertem Wasser suspendiert. Eine dezimale Verdünnungsreihe wird durchgeführt, um die Bakterienkonzentration zu verringern. Berechnen Sie die BakterienKonzentration in der Verdünnungsstufe 10^{-4} (mit ausführlicher Rechnung).

2. MIKROSKOPIE

2.1 ZIELE

Dieser Versuch soll die Grundlagen der Hellfeld- und Phasenkontrastmikroskopie vermitteln:

- Was kann mit einem Hellfeld- und Phasenkontrastmikroskop sichtbar gemacht werden?
- Erlernen der korrekten Bedienung und Nutzung des Mikroskops einschließlich der theoretischen Hintergründe.
- Unterscheidung zwischen prokaryotischen und eukaryotischen Zellen.

2.2 THEORETISCHE EINFÜHRUNG

Die Größe von Mikroorganismen, Zelleinschlüssen und Anhängen wie Flagellen bestimmt, welche Art der Mikroskopie notwendig ist. Ein Lichtmikroskop ist die minimale Ausstattung für die Untersuchung von nahezu allen Mikroorganismen.

Das **Lichtmikroskop** setzt sich aus zwei verschiedenen optischen Systemen zusammen, die das zu untersuchende Objekt in zwei Stufen vergrößern:

1. aus einem Projektor, dem **Objektiv**, das ein vergrößertes, seitenverkehrtes, reelles Projektionsbild des Objektes, das sogenannte Zwischenbild, erzeugt (erste Vergrößerungsstufe);
2. aus einer Lupe, dem **Okular**, mit dessen Hilfe das Zwischenbild zum virtuellen Endbild nachvergrößert wird (zweite Vergrößerungsstufe).

Ein drittes Linsensystem, der Kondensor, dient der Abbildung des Lichts der Projektionslampe in die Öffnung des Objektivs.

Eigenschaften und Qualität des mikroskopischen Bildes werden vor allem von drei Faktoren bestimmt:

- Vergrößerung
- Auflösungsvermögen
- Kontrast

2.2.1 Vergrößerung

Die Stärke des Objektivs drückt man aus durch seine Maßstabszahl, die angibt, in welchem Größenverhältnis eine bestimmte Strecke im Zwischenbild zur entsprechenden Strecke im Präparat steht.

Das Ausmaß der Nachvergrößerung wird durch die Luppenvergrößerung des Okulars bestimmt.

Die Gesamtvergrößerung eines Mikroskops erhält man durch die Multiplikation der Maßstabszahl des Objektivs mit der Lupenvergrößerung des Okulars.

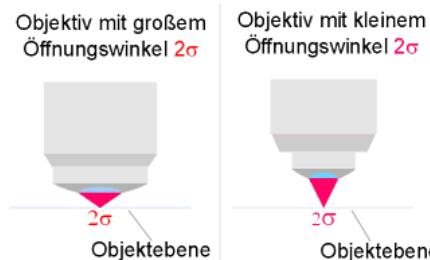
2.2.2 Auflösungsvermögen

Unter dem Auflösungsvermögen eines optischen Systems versteht man den kleinsten Abstand d , den zwei Punkte haben dürfen, um gerade noch voneinander getrennt wahrgenommen zu werden.

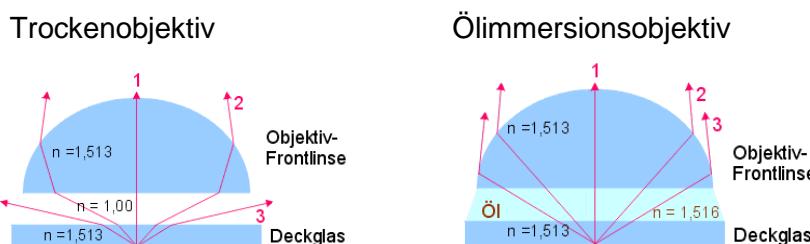
Das Auflösungsvermögen ist abhängig von der Wellenlänge λ des zur Beobachtung verwendeten Lichtes und von der numerischen Apertur A des Systems, hier des Objektivs und des Kondensors:

$$d = \frac{\lambda}{(A_{Obj.} + A_{Kond.})} \quad A_{Obj.} = A_{Kond.} \rightarrow \quad d = \frac{\lambda}{(2 \cdot A)}$$

Unter dem Begriff Apertur versteht man die Öffnungsweite einer Optik durch welche die Lichtstrahlen empfangen werden. Die numerische Apertur A (andere mögliche Formelzeichen: NA oder n.A.) des Objektivs ist das Produkt aus dem Brechungsindex n des Mediums zwischen Präparatoberfläche und Objektivfrontlinse und dem Sinus des halben Öffnungswinkels 2σ des Objektivs: $A = n \cdot \sin\sigma$



Bei Trockenobjektiven befindet sich Luft (Brechungsindex $n = 1,0$) zwischen Deckglas und Objektiv; bei Ölimmersionsobjektiven wird dort ein Immersionsöl aufgebracht, welches einen größeren Brechungsindex ausweist. Dadurch gelangen auch stärker geneigte Lichtstrahlen noch in das Objektiv



Die numerische Apertur des Kondensors wird als Beleuchtungsapertur bezeichnet und kann durch die Aperturblende stufenlos verstellt werden. Die beste Auflösung erreicht man, wenn

die Aperturen von Objektiv und Kondensor etwa gleich sind. Wird die Aperturblende zu weit geschlossen, so kann die numerische Apertur des Objektivs nicht ausgenutzt werden und das Auflösungsvermögen nimmt ab. Ist die Beleuchtungsapertur jedoch größer als die numerische Apertur des Objektivs, so kommt es zu deutlichen, kontrastmindernden Überstrahlungen. Beim farbmarkierten Kondensor korrespondiert die Farbmarkierung am Kondensor mit den Farbringern der Objektive. Beim Objektivwechsel kann eine geeignete Aperturblendeneinstellung dadurch gefunden werden, dass die Aperturblende auf die entsprechende Farbmarkierung gestellt wird.

2.2.3 Kontrast

Auch bei ausreichend starker Gesamtvergrößerung und guter Auflösung ist ein mikroskopisches Objekt für den Betrachter nur dann sichtbar, wenn es genügend Kontrast besitzt. Mikroorganismen sind oft sehr kontrastarm und damit im Hellfeld fast nicht zu erkennen.

2.2.4 Phasenkontrastmikroskopie

Das Phasenkontrastverfahren ermöglicht durch Eingriffe in den Strahlengang des Mikroskops eine kontrastreiche Darstellung durchsichtiger, kontrastärmer Objekte, z.B. lebender Bakterien, ohne dass die Objekte durch die Kontrastierung abgetötet und in ihren Strukturen verändert werden, was bei Anfärungsverfahren meist der Fall ist. Das Phasenkontrastmikroskop verwandelt die an solchen Objekten auftretenden, für das Auge nicht wahrnehmbaren Phasenunterschiede in deutlich sichtbare Helligkeitsunterschiede.

2.3 MATERIAL

- Leica DMLS Mikroskope mit Phasenkontrastkondensor und Objektiven
- Objektträger und Deckgläser
- Immersionsöl
- Teichwasserproben
- Fusselfreie Tücher
- Isopropanol

2.4 DURCHFÜHRUNG

Bitte vorsichtig und achtsam mit den Mikroskopen umgehen!

Mikroskope sind präzise und teure Geräte. Berichten Sie jedes Problem mit dem Mikroskop sofort einem Betreuer.

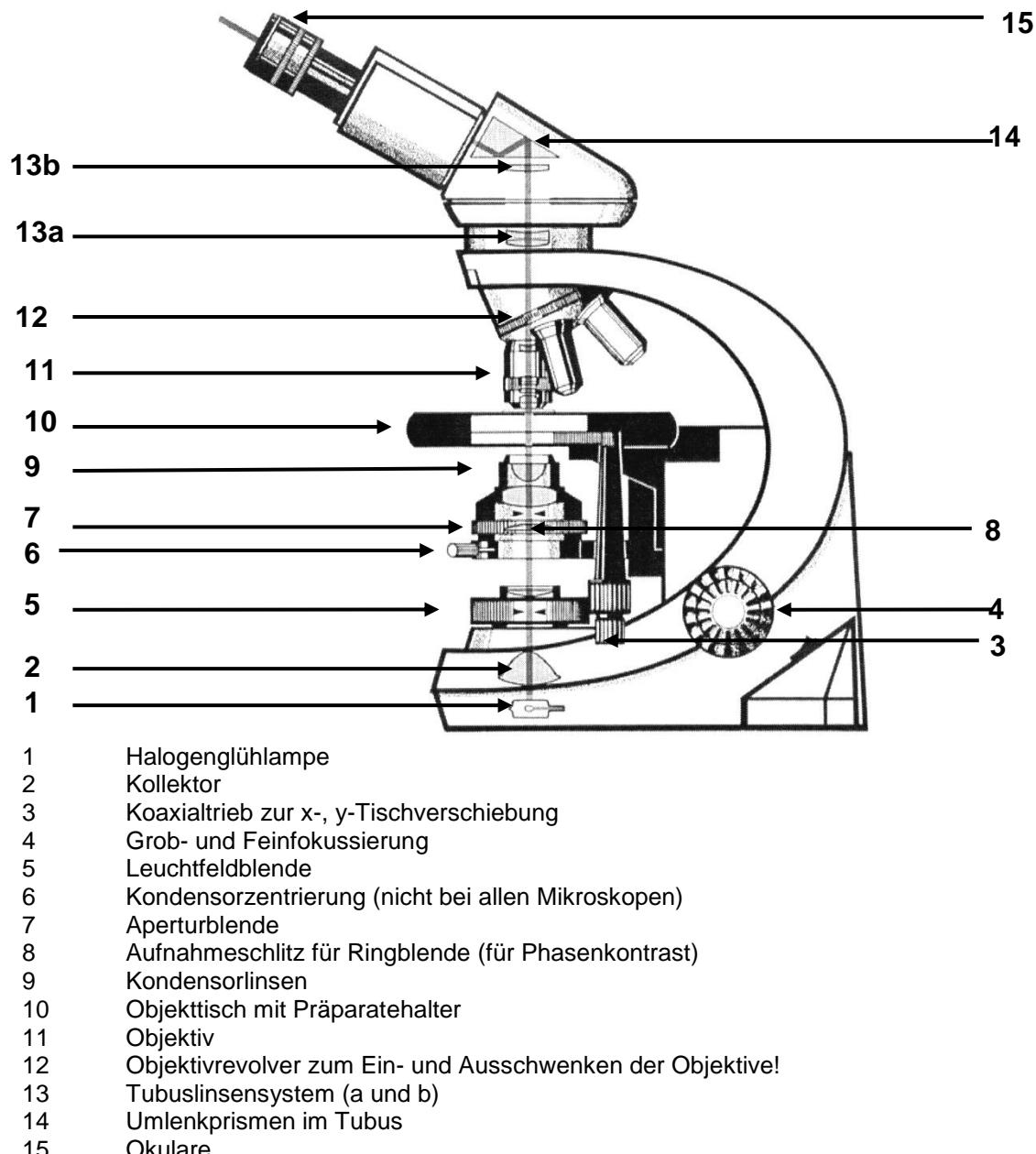
Außerdem:

- Niemals das Mikroskop über den Labortisch ziehen. Die Mikroskope werden nicht von Kursteilnehmern an einen anderen Ort gestellt!

- Nach jeder Benutzung das Mikroskop reinigen. Immersionsöl vorsichtig mit einem geeigneten Tuch von der Linse entfernen und mit einem in Isopropanol getränkten Tuch nachreinigen.
- Wenn die Arbeiten am Mikroskop beendet sind, bitte stets den Objekttisch ganz runter drehen und den Objektivrevolver so einstellen, dass kein oder das kleinste Objektiv über dem Objekttisch ist.

Machen Sie sich mit Hilfe des folgenden Schemas mit dem Mikroskop vertraut.

Abb. 2.1. Schematische Darstellung eines Lichtmikroskops.



2.4.1 Hellfeldmikroskopie (für farbige, kontrastreiche Objekte)

Einstellen der Köhlerschen Beleuchtung („Köhln“)

1. Im Mikroskopfuß eingebaute **Lichtquelle** einschalten und auf eine mittlere Intensität einstellen. Die **Leuchtfeldblende** ist ganz geöffnet.
2. Präparat (Objektträger mit Schriftzug „Oben“, Beschriftung muss nach oben zeigen!) auf dem Objekttisch befestigen und in den Strahlengang (Lichtfleck) bringen.
3. **Objektiv 1:10** einschwenken und Präparat scharfstellen. **Leuchtfeldblende** im Mikroskopfuß schließen bis der Rand der Blende in der Präparatebene erscheint
4. Mit der **Kondensorhöhenverstellung** (Kunststoffschrauben zwischen Fokushandrad und Objekttisch) den Kondensor verstehen bis der Rand der Leuchtfeldblende scharf abgebildet wird
5. (Bei einigen Mikroskopen: Bild der Leuchtfeldblende durch Drehen der beiden Zentrierschrauben des Kondensors genau in die Mitte des Sehfeldes bringen. Das lässt sich am besten kontrollieren, wenn die Blende fast bis zum Sehfeldrand geöffnet ist.) Bei den Mikroskopen im Praktikum ist der Kondensor bereits werkseitig zentriert. In einigen Fällen kann jedoch eine Nachzentrierung des Kondensors nötig sein. Überprüfen Sie deshalb die Kondensorzentrierung und wenden Sie sich gegebenenfalls an einen Betreuer.
6. **Leuchtfeldblende** so weit öffnen, dass ihr Rand gerade aus dem Sehfeld verschwindet.
7. Mit jedem Objektivwechsel Öffnung der **Leuchtfeldblende** der **Sehfeldgröße anpassen** und jeweils so verändern, dass die Blende gerade hinter dem Sehfeldrand verschwindet.

2.4.2 Phasenkontrastmikroskopie (für kontrastarme Objekte, z.B. Bakterien)

1. Mikroskop entsprechend der Köhlerschen Beleuchtung (s. 2.4.1) einstellen.
2. Wählen Sie den **Phasenkontrastring** aus, der mit den Angaben auf dem Objektiv übereinstimmt. Schieben Sie die entsprechende **Platte** in die entsprechende Vorrichtung (s. Abb. 2.1 Nummer 8).
3. Die **Aperturblende** muss vollständig geöffnet sein (ganz nach rechts drehen)!

Nach jedem Objektivwechsel:

- Zum Objektiv passenden Phasenkontrastring auswählen und einlegen.
- Am Regeltransformator Helligkeit nachregulieren.
- Am Feintrieb Schärfe nachstellen.
- Öffnung der Leuchtfeldblende der Sehfeldgröße anpassen.

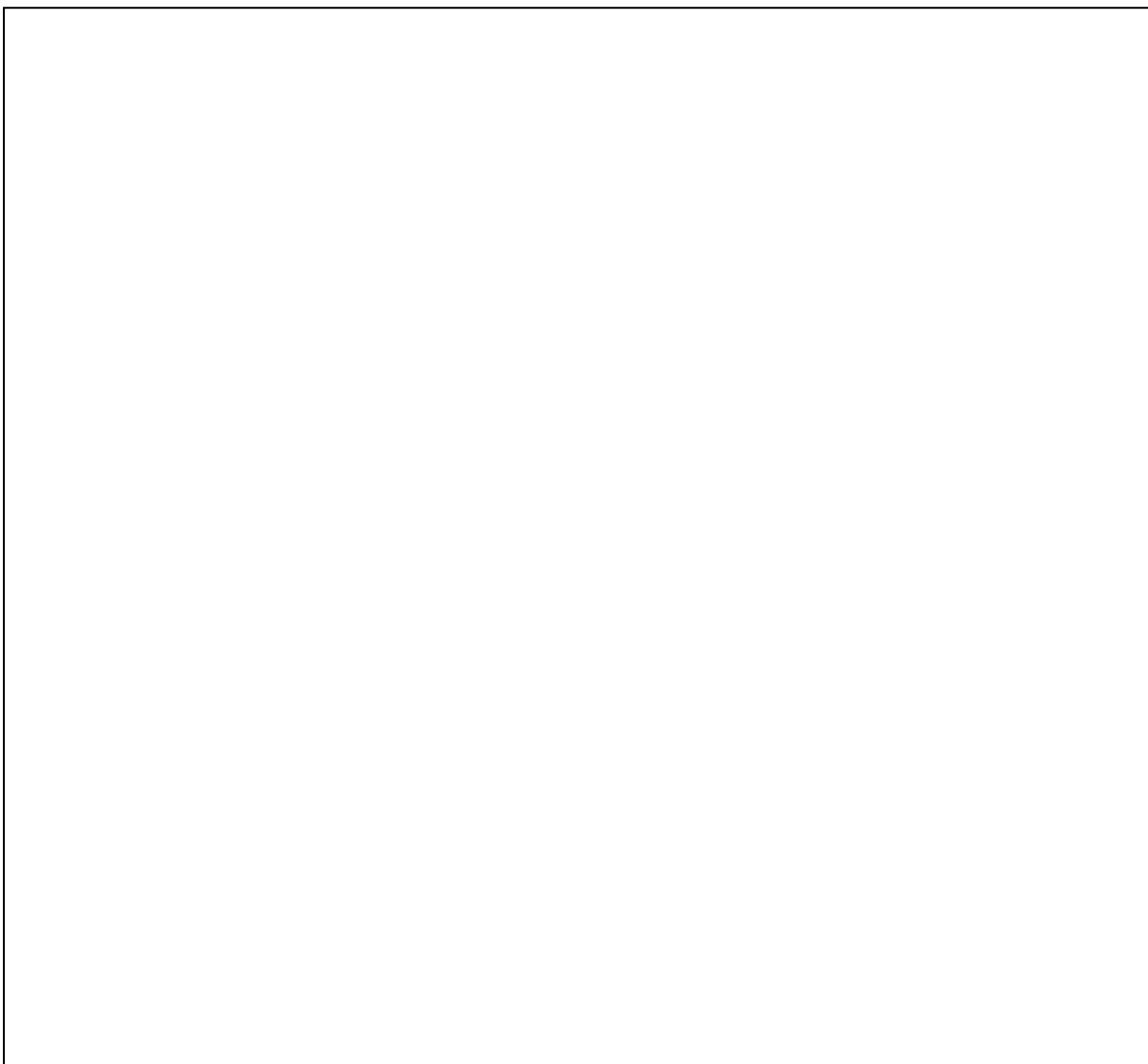
2.4.3 Nach Beendigung der Mikroskopie

- Den Objekttisch ganz nach unten drehen
- Den Objektrevolver so einstellen, dass sich kein oder das kleinste Objektiv über dem Objekttisch befindet.

- Mikroskop reinigen (Immersionsöl mit Tuch und Isopropanol entfernen)

2.5 EXPERIMENTE

1. Bereiten Sie Teichwasser für die Mikroskopie vor, indem Sie einen kleinen Tropfen Teichwasser (mit Hilfe einer Pasteurpipette) auf einen sauberen und trockenen Objektträger geben und darauf ein Deckglas legen. Vermeiden Sie dabei die Bildung von Luftblasen.
2. Betrachten Sie die Probe sowohl mit einer geringen Vergrößerung (10x) als auch mit einer mittleren Vergrößerung (40x).
3. Beobachten Sie die Gesamterscheinung der Organismen und halten Sie diese in beschrifteten Zeichnungen (Vergrößerung, Anhänge, innere Strukturen, Beweglichkeit, etc.) fest.



$$1 \text{ nm} = 10^{-3} \mu\text{m} = 10^{-9} \text{ m}$$

$$1 \text{ mm} = 10^{-3} \text{ m}$$

2.5.1 Übungen (5 Punkte)

1. Berechnen Sie das Auflösungsvermögen für jedes Objektiv des Lichtmikroskops (Formel siehe 2.2.2). Die Wellenlänge des Lichtes soll als 500 nm angenommen werden. Die numerische Apertur A ist auf den Objektiven neben der Maßstabszahl angegeben.

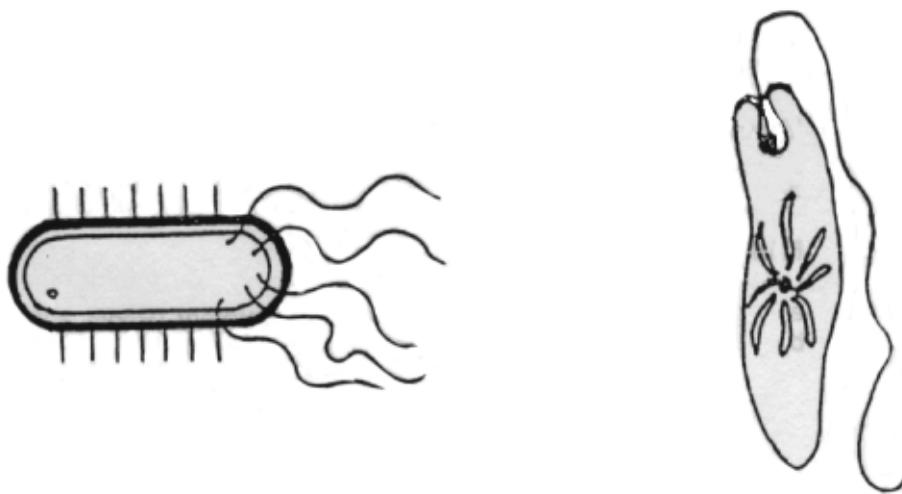
Geringes Auflösungsvermögen, (x10) Objektiv:

Mittleres Auflösungsvermögen, (x40) Objektiv

Auflösungsvermögen mit Immersionsöl, (x100) Objektiv:

(5 Punkte)

2. Die folgenden Schemata zeigen typische Strukturen der Prokaryoten (*Bacillus*) und der Eukaryoten (*Euglena*). (Die Schemata entsprechen nicht der realen oder relativen Größe zueinander.)

Abb. 2.2. Typische Strukturen von Pro- und Eukaryoten.

Bacillus		Euglena	
Gesamte Zelle	5 μm x 1.5 μm	Gesamte Zelle	50 μm x 20 μm
Flagellum	70 μm x 20 nm	Flagellum	50 μm x 0.4 μm
Granulum	0.2 μm Durchmesser	Stigma	4 μm Durchmesser
Zellwand	20 nm	Cytoplasma- membran	0.02 μm
Pilus	85 nm x 20 nm	Granulum	0.1 μm Durchmesser

Tragen Sie in die folgende Liste ein, welche Struktur mit den drei Objektiven theoretisch sichtbar bzw. nicht sichtbar ist, indem Sie die berechneten Werte des Auflösungsvermögens der Objektive mit den Größenangaben in der Tabelle vergleichen.

Tab. 2.1. Ergebnisse der Mikroskopieübung.

Struktur	Sichtbar mit dem Objektiv (ja = +/nein = -)		
	x10	x40	x100
Bacillus	d=	d=	d=
	Gesamte Zelle		
	Flagellum		
	Granulum		
	Zellwand		
Euglena	Pilus		
	Gesamte Zelle		
	Flagellum		
	Stigma		
	Plasmalemma		
	Granulum		

(5 Punkte)

2.5.2 Fragen

- Welchen Effekt auf die Bildauflösung und den –kontrast kann man beobachten, wenn man die Aperturblende öffnet und schließt? Füllen Sie die Tabelle 2.2 aus.

Tipp: Am Besten wählen Sie dazu einen kleinen Zelle oder eine kleine Struktur in der Zelle, um die Effekte zu beobachten. Verwechseln Sie nicht Kontrast (Dunkelheit des Bildes) mit Auflösung (unscharfes Bild).

Tab. 2.2. Effekte der Kondensorblende.

Verfahren	Beobachteter Effekt (mehr/weniger) auf: Auflösungsvermögen	Kontrast
Schließen der Kondensorblende		
Öffnen der Kondensorblende		

(5 Punkte)

3. HERSTELLUNG VON NÄHRMEDIEN

3.1 ZIELE

- Herstellung fester Medien
- Gießen von Agarplatten
- Herstellen von Schrägagarröhrchen

3.2 THEORETISCHE EINFÜHRUNG

Zur Kultivierung von Mikroorganismen, d.h. zu ihrer Anzucht unter Laborbedingungen, braucht man geeignete Nährböden (Synonyme: Nährmedien, Kulturmedien).

Ein Nährmedium muss alle für das Wachstum der zu kultivierenden Mikroorganismen notwendigen Stoffe enthalten. Dies sind besonders kohlenstoff-, stickstoff-, phosphat- und schwefelhaltige Verbindungen sowie anorganische Ionen wie Calcium, Magnesium, Natrium und Kalium. Daneben sind in geringen Mengen sogenannte Spurenelemente notwendig, wie Zink, Eisen, Kobalt, Kupfer, Molybdän und Mangan. Diese Metalle sind in vielen Proteinen und anderen Molekülen der Mikroorganismen komplex gebunden, z.B. als Co-Faktoren in Enzymen. Da diese Elemente als Verunreinigungen in handelsüblichen Salzen enthalten sind, erübrigt sich ihr Zusatz häufig.

Mikroorganismen unterscheiden sich bezüglich ihrer Nährstoffansprüche und Kulturbedingungen teilweise ganz extrem. Im allgemeinen gilt, dass die Kulturbedingungen möglichst gut an die Verhältnisse, die an der Isolierungsstelle des Mikroorganismus (=MO) herrschen, angepasst werden sollten, und zwar bezüglich:

- der Nährstoffe (z. B. chemoorganotrophe, chemolithotrophe, photolithotrophe MOs)
- des pH-Wertes (z. B. acidophile bzw. alkaliphile MOs)
- der Osmolarität (z. B. halophile MOs)
- der Bebrütungstemperatur (z. B. psychophile, mesophile, thermophile MOs)
- der Zusammensetzung der Gasphase (z. B. aerobe, mikroaerophile, anaerobe MOs)

Im Laufe der Zeit ist eine große Zahl von Nährböden beschrieben worden, die sich nach **Art** und **Verwendungszweck** in mehrere Gruppen unterteilen lassen:

- Nach der Konsistenz unterscheidet man **flüssige** und **feste Nährmedien**. Zur Herstellung fester Medien setzt man der Nährlösung ein Verfestigungsmittel, meist Agar, zu.
- Nach der Zusammensetzung unterteilt man **komplexe** (oder undefinierte) und **synthetische** (oder definierte) **Nährmedien**.

In einem **komplexen Nährmedium** sind ein oder mehrere organische Bestandteile enthalten, deren chemische Zusammensetzung nicht genau bekannt ist (z.B. Hefeextrakt, Fleischextrakt,

Pepton (enzymatisch verdaute pflanzliche oder tierische Proteine)). Diese Produkte können aufgrund ihrer Zusammensetzung als Kohlenstoff- und Stickstoffquellen eingesetzt werden. Zudem besitzen sie durch Peptide und Aminosäuren eine gewisse Pufferkapazität und enthalten meist ausreichend viele Spurenelemente und Vitamine.

Ein **synthetisches Nährmedium** enthält ausschließlich chemisch exakt definierte Bestandteile in bekannter Konzentration. Als Kohlenstoffquelle können in reiner, chemisch definierter Form Zucker, Stärke, Alkohole, Fettsäuren etc. verwendet werden. Der Stickstoffbedarf kann durch Ammoniumverbindungen, Aminosäuren oder Nitrat gedeckt werden. Zu diesen Medienbestandteilen müssen dann noch Mineralsalze, Puffersubstanzen und Spurenelemente eingewogen werden. Die Pufferung ist besonders bei diesen Medien notwendig, um zu verhindern, dass die an das Kulturmedium abgegebenen, sauren bzw. basischen Stoffwechselprodukte den zunächst optimal eingestellten pH-Wert des Mediums verändern.

Enthält ein synthetisches Medium nur die für das Wachstum des betreffenden Organismus unbedingt nötigen Stoffe (das „Existenzminimum“), so spricht man von einem **Minimalmedium**. Die Entwicklung eines Minimalmediums setzt voraus, dass die Nährstoffansprüche des Organismus genau bekannt sind.

Ein **Vollmedium** enthält dagegen noch weitere Verbindungen, die nicht unbedingt lebensnotwendig sind, das Wachstum jedoch fördern. Ein komplexer Nährboden ist immer ein Vollmedium.

Zusätzlich lassen sich diese Medien unterscheiden in **Universalnährmedien**, d.h. komplexe Nährmedien, die einer Vielzahl von Mikroorganismen das Wachsen ermöglichen und **Selektivnährmedien**, die das Wachstum eines bestimmten Mikroorganismus oder einer Organismengruppe begünstigen und das Wachstum anderer, unerwünschter Organismen unterdrücken (selektives Anreicherungs- bzw. Isolierungsmedium).

Viele Selektivnährmedien sind gleichzeitig **Differentialnährmedien** (Indikatornährmedien). Sie enthalten Zusätze, z.B. Farbstoffe, die bestimmte, diagnostisch wichtige Stoffwechselleistungen von Mikroorganismen sichtbar machen, indem sie mit den Stoffwechselprodukten reagieren, die in diesem Medium nur von bestimmten Organismen gebildet werden. Dabei kommt es zu einer Veränderung (z.B. Verfärbung) des Mediums oder der Kolonien. Auf diese Weise ist eine Unterscheidung (Differenzierung) verschiedener Mikroorganismenarten möglich.

3.3 MATERIAL

- Waage (Station)
- Trichter und Löffel (bei der Waage)
- 250 ml Erlenmeyerkolben ohne Schliff (1 pro Gruppe)

- 300 ml Erlenmeyerkolben mit Schliff (1 pro Gruppe)
- 250 ml Messzylinder
- Wasserbad 95 °C
- Magnetrührer mit Rührfisch
- Autoklav
- CASO-Agar (Firma Merck)
- Nähragar (NA, Firma Merck)
- deionisiertes Wasser
- Bunsenbrenner
- 20 ml Kippautomat (steril, 1 pro Gruppe)
- 10x sterile Petrischalen (pro Gruppe)
- 10x 20 ml Reagenzgläser (pro Gruppe)
- Schläuche (zur Ablage der Schrägagar-Röhrchen)
- 10 ml Glaspipetten (steril) mit Pipettierhilfe (pro Gruppe)
- Wasserbad 50 °C

3.3.1 Rezepte der herzustellenden Medien (Angaben der Hersteller)

CASO-Agar

Typische Zusammensetzung (pro Liter):

15,0 g Pepton aus Casein, 5,0 g Pepton aus Sojamehl, 5,0 g Natriumchlorid, 15,0 g Agar-Agar,
pH 7,3 ± 0,2 bei 25 °C

Zubereitung:

40 g Fertiggranulat (Merck) werden in 1 Liter entionisiertem Wasser durch Erhitzen im
siedenden Wasserbad gelöst und anschließend autoklaviert (15 min bei 121 °C).

Nähragar (NA)

Typische Zusammensetzung (pro Liter):

3,0 g Fleischextrakt, 5,0 g Pepton, 12,0 g Agar-Agar

pH 6,8 ± 0,2 bei 25 °C

Zubereitung:

20 g Fertiggranulat (Merck) werden in 1 Liter entionisiertem Wasser durch Erhitzen im
siedenden Wasserbad gelöst und anschließend autoklaviert (15 min bei 121 °C).

3.4 DURCHFÜHRUNG

Bitte tragen Sie beim Einwiegen der Medien **Einweg-Atemschutzmasken**.

Die Kolben werden ausschließlich auf der **Alufolie** beschriftet (Gruppennummer und Medium), nicht auf dem Glas.

Bitte beschriften Sie auch alle Platten auf der Unterseite und alle Reagenzgläser im oberen Bereich vor dem Gießen mit der Gruppennummer.

3.4.1 CASO-Agar

Montag, 1. Tag:

Pro Gruppe sollen 250 ml des CASO-Agars angesetzt werden.

- Berechnung der benötigten Menge des Fertiggranulates (siehe Rezept) für 250 ml
- Einwaage des Fertiggranulates in 300 ml Erlenmeyerkolben mit Schliff
- Zugabe von 250 ml deionisierten Wassers (Messzylinder) und einem Rührfisch
- Rühren des Agars auf dem Magnetrührer
- Im 95 °C heißen Wasserbad den Agar so lange kochen, bis er vollständig gelöst ist (zwischendurch rühren)

Dienstag, 2. Tag:

- Autoklavieren der Erlenmeyerkolben für 15 min bei 121 °C (durch die Betreuer)
- Agar im Wasserbad auf 50 °C abkühlen lassen
- Agar zu 20 ml in Petrischalen gießen
- Steril arbeiten!
- Zügig arbeiten, da der Agar bei 45 °C fest wird!
- Agar aus dem Wasserbad nehmen, das Gefäß von außen mit einem Tuch trocknen und kurz rühren (auf kleiner Stufe, damit keine Luftblasen entstehen)
- Kippautomat steril auf den Erlenmeyerkolben setzen
- Agar in Petrischalen gießen (darauf achten, dass Öffnung des Kippautomaten immer in der Nähe der Bunsenbrennerflamme ist; Deckel der Petrischale nur seitlich anheben und immer über der Platte halten)
- Nach der letzten Petrischale die Kipp-Pipette und den Erlenmeyerkolben unverzüglich am Laborwaschbecken spülen, da sich sonst der Agar in der Pipette bzw. dem Kolben verfestigt.
- Agar in den Petrischalen aushärten lassen (~ 30 min)

3.4.2 Nähragar (NA)

Montag, 1. Tag:

Pro Gruppe sollen 120 ml NA angesetzt werden.

- Berechnung der benötigten Menge des Fertiggranulates (siehe Rezept) für 120 ml
- Einwaage des Fertiggranulates in 250 ml Erlenmeyerkolben ohne Schliff
- Zugabe von 120 ml deionisierten Wassers (Messzylinder) und einem Rührfisch
- Rühren des Agars auf dem Magnetrührer
- Im 95 °C heißen Wasserbad den Agar so lange kochen, bis er vollständig gelöst ist (zwischendurch rühren)

Dienstag, 2. Tag:

- Autoklavieren der Erlenmeyerkolben für 15 min bei 121 °C (durch die Betreuer)
- Agar im Wasserbad auf 50 °C abkühlen lassen
- Herstellung von Schrägagarröhrchen
 - Steril arbeiten!
 - Zügig arbeiten, da der Agar bei 45 °C fest wird!
 - Agar aus dem Wasserbad nehmen, das Gefäß von außen mit einem Tuch trocknen und kurz rühren (auf kleiner Stufe, damit keine Luftblasen entstehen)
 - 10 ml Agar mit steriler Glaspipette abmessen und ohne Luftblasen in sterile 20 ml-Reagenzgläser füllen
 - Reagenzgläser so auf das bereitliegende Schlauchstück legen, dass Schrägagarröhrchen entstehen
 - möglichst große Oberfläche des Agars, wobei am oberen Rand des Reagenzglases ca. 5 cm frei bleiben sollen
 - Nach dem letzten Schrägagarröhrchen die Messpipette und den Erlenmeyerkolben **unverzüglich** am Laborwaschbecken **spülen**, da sich sonst der Agar in der Pipette bzw. dem Kolben verfestigt.
 - Agar in den Röhrchen aushärten lassen (~ 60 min)

3.5 FRAGEN

- Welche Stoffklassen muss ein Nährmedium auf jeden Fall enthalten? (5 Punkte)

- Warum sind in den meisten Nährmedien Puffersubstanzen enthalten? **(5 Punkte)**

- Wenn man einen aus der Umwelt isolierten Mikroorganismus im Labor kultivieren will, sind geeignete Kulturbedingungen zu finden. Worauf muss man achten? **(5 Punkte)**

4. DIREKTISOLIERUNG VON MIKROORGANISMEN AUS DER LUFT

4.1 ZIELE

- Quantitative und qualitative Erfassung von Mikroorganismen in Luft
- Notwendigkeit sterilen Arbeitens

4.2 THEORETISCHE EINFÜHRUNG

Die uns umgebende Luft enthält eine Vielzahl verschiedenster Mikroorganismen, vor allem Bakterien und Hefen. Zu den typischen „Luftkeimen“ zählen Vertreter der Gattungen *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium* und *Nocardia*, sowie die Hefe *Rhodotorula*. Auf sogenannten „Luftplatten“ treten häufig farbige Kolonien auf. Es überwiegen dabei gelbe, orange und rote Farbtöne, die von Carotinoiden herrühren. Diese Pigmente sind in der Cytoplasmamembran lokalisiert und bieten den Mikroorganismen Schutz gegenüber den Strahlen des sichtbaren und des nahen ultravioletten Lichts. Die abtötende Wirkung des sichtbaren Lichts erfolgt dabei in Gegenwart von Luftsauerstoff und beruht auf einer Photooxidation. An den Licht ausgesetzten Standorten (Staub, Stroh) werden farblose Bakterien rascher abgetötet als pigmentierte.

Die Pigmentierung ist in vielen Fällen abhängig von der Zusammensetzung des Nährbodens und von der Bebrütungstemperatur. Häufig wird die Bildung solcher Pigmente durch Licht induziert.

Die ständige Anwesenheit von Mikroorganismen in unserer unmittelbaren Umgebung, also auch am Arbeitsplatz im Labor, erfordert besondere Arbeitstechnik beim mikrobiologischen Arbeiten, um Verunreinigungen durch normalerweise unerwünschte Luftbakterien zu vermeiden.

4.3 MATERIAL

Montag, 1. Tag:

- 8 NA-Platten/Gruppe
- Stoppuhr
- Brutschrank 28°C

Mittwoch, 3. Tag:

- 3 NA-Platten/Person
- Phasenkontrastmikroskop
- Objektträger/Deckgläschchen
- Immersionsöl

- Impföse
- Bunsenbrenner
- Pasteurpipette

Donnerstag, 4. Tag:

- 3 NA-Platten/Person
- Phasenkontrastmikroskop
- Objektträger/Deckgläschchen
- Immersionsöl
- Impföse
- Bunsenbrenner
- Pasteurpipette
- Gramfärbung

4.4 DURCHFÜHRUNG**Montag, 1. Tag: Exposition der Luftkeimplatten**

- Pro Gruppe werden 8 Petrischalen mit Agar benötigt (jede Petrischale wurde mit je 25 ml des Vollmediums NA befüllt)
- Die Platten werden auf der Unterseite der Petrischale beschriftet [Gruppe #, Versuch #, Expositionsdauer, Expositionsort]
- Die Platten werden sowohl im Laborraum [L] bzw. im Freien [F] für jeweils 2, 7, 15 und 30 min der Luft ausgesetzt
- Die Platten werden verschlossen und mit dem Deckel nach unten für 48 h bei 28 °C im Brutschank bebrütet
- Die Auswertung der Luftkeimplatten erfolgt am übernächsten Tag (Mittwoch).

Mittwoch, 3. Tag: Versuchsauswertung & Herstellung von Einzelkolonieausstrichen**Quantitativ**

- Zählen Sie auf jeder Platte die vorhandenen makroskopisch sichtbaren Kolonien; dabei gezählte Kolonien auf der Plattenunterseite punktförmig mit einem wasserfesten Stift markieren.
- Tragen Sie Ihre Ergebnisse in Tabelle 4.1 und in die im Umlauf befindliche Ergebnistabelle ein. Die im Umlauf befindliche Tabelle umfasst die Ergebnisse aller Gruppen und wird Ihnen für Ihre Unterlagen und die Auswertung zur Verfügung gestellt.
- Nehmen Sie eine graphische Auswertung Ihrer Versuchsergebnisse und der Ergebnisse des gesamten Kurses (Mittelwerte) vor, indem Sie je eine Kurve

(Koloniezahlen in Abhängigkeit der Expositionszeit) für den Standort „Labor“ und „im Freien“ zeichnen (= insgesamt vier Kurven in einem Diagramm).

Qualitativ

- Wählen Sie 3 Kolonien (pro Person) aus, die sich makroskopisch unterscheiden (z.B. in Koloniefarbe, Struktur, Größe) und beschreiben Sie die Koloniemorphologie anhand der Liste „Kriterien für eine Koloniebeschreibung“ (Anhang 4.9.2). Dokumentieren Sie Ihre Ergebnisse mit Hilfe der Tabelle 4.2
 - Nutzen Sie u.U. eine Lupe.
- Mikroskopieren Sie Material von diesen 3 Kolonien mit Phasenkontrast und achten Sie dabei auf Zellform, Zellgröße und Zellaggregate. Tragen Sie Ihre Ergebnisse in Tabelle 4.3 ein. Dazu:
 - Auf einen sauberen, vorher durch Hitze entfetteten Objektträger wird mit einer Pasteurpipette mittig 1 Tropfen Wasser gegeben.
 - Mit einer vorher ausgeglühten Impföse wird etwas Zellmaterial von einer Kolonie entnommen.
 - Das Zellmaterial wird mit Hilfe der Impföse in dem Wassertropfen suspendiert (Impföse anschließend wieder ausglühen).
 - Vorsichtig (ohne Luftblasen) ein Deckgläschen drauflegen.
 - Im Phasenkontrast bei 1000-facher Vergrößerung mikroskopieren; bei der kleinsten Vergrößerung anfangen und hocharbeiten, erst bei 1000-facher Vergrößerung Immersionsöl verwenden (Handschuhe tragen!).
- Zur Isolierung der gewählten Keime und zur Herstellung von Reinkulturen, fertigen Sie mit dem verbliebenen Material dieser drei Kolonien Einzelkolonieausstriche nach dem 3-Strich-Verfahren auf NA an (auf Sterilität achten, **siehe Anhang 4.9.1 auf S. 30**). Die Platten werden auf der Unterseite beschriftet [Gruppe #, Name, Kolonie #] und anschließend für 24 h bei 28 °C im Brutschrank bebrütet. Die Überprüfung der Einzelkolonieausstriche erfolgt am nächsten Tag.

Donnerstag, 4. Tag: Bewertung, Untersuchung und Weiterführung der Einzelkolonieausstriche

Überprüfen Sie die Einzelkolonieausstriche auf ihre Qualität, indem sie die folgenden Fragen mit ja oder nein beantworten:

	Isolat 1		Isolat 2		Isolat 3	
a) Sind Einzelkolonien gewachsen?	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
b) Befinden sich die Einzelkolonien auf den Ausstrichslinien?	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein

c) Ist die Farbe und Form der Kolonien einheitlich?	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
d) Sind Kontaminationen zu beobachten?	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
e) Handelt es sich um eine Reinkultur?	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein

(2 Punkte)

- Wählen Sie von den drei gewonnenen Reinkulturen jeweils eine Einzelkolonie zur Gramfärbung aus und führen Sie die Färbung entsprechend der Vorschrift (Versuch 5: Gramfärbung) durch. Die Ergebnisse tragen Sie ebenfalls in die Tabelle 4.3 ein.
- Zwei der drei gewonnenen Isolate sollen auf frischen NA überimpft werden. Wählen Sie jeweils eine Einzelkolonie von Ihren Reinkulturen aus und stellen Sie erneut Einzelkolonieausstriche nach dem 3-Strich-Verfahren her. Die Platten werden auf der Unterseite beschriftet [Gruppe #, Name, Kolonie #] und anschließend für 24 h bei 28 °C im Brutschrank bebrütet.

Freitag, 5. Tag: Überprüfung der Einzelkolonieausstriche

Überprüfen Sie die Einzelkolonieausstriche auf ihre Qualität, indem sie die folgenden Fragen mit ja oder nein beantworten:

	Isolat 1		Isolat 2		Isolat 3	
a) Sind Einzelkolonien gewachsen?	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
b) Befinden sich die Einzelkolonien auf den Ausstrichslinien?	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
c) Ist die Farbe und Form der Kolonien einheitlich?	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
d) Sind Kontaminationen zu beobachten?	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
e) Handelt es sich um eine Reinkultur?	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein

(2 Punkte)

4.5 ERGEBNISSE

Tab. 4.1. Bestimmung der Koloniebildenden Einheiten (KBE).

Zeit (min)	Anzahl der Koloniebildende Einheiten (KBE) Laborraum [L]	Im Freien [F]
2		
7		
15		
30		

(2 Punkte)

- Koloniebildende Einheiten aller Gruppen (wird Ihnen als Kopie zur Verfügung gestellt):
(2 Punkte)

Graphische Auswertung der Versuchsergebnisse:

(10 Punkte)

Tab. 4.2. Koloniemorphologie (Erläuterungen siehe Anhang 4.9.2).

	Kolonie 1	Kolonie 2	Kolonie 3
Farbe			
Koloniegröße			
Oberfläche			
innere Struktur			
Profil			
Kolonieform			
Kolonierand			
Konsistenz			

(5 Punkte)

Tab. 4.3. Mikroskopische Untersuchung

	Kolonie 1	Kolonie 2	Kolonie 3
Zellform (zeichnen und benennen)			
Zellaggregate (zeichnen und benennen)			
Gramverhalten			

(5 Punkte)

4.6 DISKUSSION**(20 Punkte)**

Diskutieren Sie die Ergebnisse. Wo ist die KBE höher, im Laborraum oder im Freien? Warum? Entsprechen die Ergebnisse Ihren Erwartungen? Falls nein, welche Erklärung gibt es dafür?

Haben Sie farbige Kolonien auf Ihren Nähragarplatten gesehen? Falls nein, warum nicht (mögliche Erklärungen)? Funktion der Pigmente?

4.7 FRAGEN

Welche Grundformen lassen sich bei Bakterienzellen unterscheiden und in welchen Zellverbänden können diese Grundformen auftreten?

Zeichnen und benennen Sie diese.

(5 Punkte)

Was versteht man unter einer koloniebildenden Einheit (KBE)?

(5 Punkte)

Welche prinzipiellen Unterschiede bestehen zwischen einer Bakterien- und einer Hefezelle?

Tab. 4.4. Unterschiede zwischen Bakterien- und Hefezelle.

(5 Punkte)

4.8 LITERATUR

- Bast, E. 2001. Mikrobiologische Methoden. Spektrum Akademischer Verlag.
 - Schlegel, H.G. 1992. Allgemeine Mikrobiologie. Thieme Verlag.

4.9 ANHANG

4.9.1 Herstellen eines Einzelkolonieausstriches (Verdünnungsausstrich)

4.9.1.1 Ziel

- Gewinnung von Reinkulturen aus einer Mischpopulation
- Verdünnung von Zellmaterial auf einer Agarplatte zu Einzelkolonien mit Hilfe des 3-Strich-Verfahrens

4.9.1.2 Theoretische Einführung

Will man gezielte mikrobiologische oder biochemische Versuche durchführen, so ist es notwendig, mit einer ganz bestimmten Bakterienart, oft sogar mit einem ganz bestimmten Bakterienstamm, zu arbeiten. Diese Art bzw. dieser Stamm darf nur Bakterien mit dem gleichen Erbgut enthalten. Es gibt mehrere Methoden, solch eine **Reinkultur** herzustellen, bzw. eine einmal hergestellte Reinkultur reinzuhalten. Die endgültige Isolierung einer Reinkultur von Mikroorganismen erfolgt, bis auf wenige Ausnahmen, auf oder in festen Nährböden. Sie beginnt mit der Abtrennung einer Zelle aus einer Zellpopulation und erfordert, dass die aus der Zelle hervorgehende Kolonie von den anderen Zellen getrennt bleibt (→ Einzelkolonien).

4.9.1.3 Durchführung

Grundregeln:

1. Auf steriles Arbeiten achten! Alle Arbeiten sind möglichst nah an einer Bunsenbrenner-Flamme durchzuführen.
2. Die zu bestreichenden Agarplatten müssen ausreichend trocken sein, da sonst Kolonien durch den Flüssigkeitsfilm auf der Agaroberfläche zusammenfließen.
3. Die Impföse ist durch Ausglühen in der Bunsenbrenner-Flamme zu sterilisieren, und zwar vor und nach jeder Benutzung!
4. Das Abkühlen der Impföse nach der Sterilisation erfolgt entweder in der Nähe der Flamme, oder durch Aufdrücken auf den Agar am Rand der Petrischale (nicht die Petrischale berühren, da sonst das Plastik schmilzt).
5. Die Öse wird „liegend“, nicht hochkant, vorsichtig auf dem Agar aufgesetzt und ohne Druck über die Agaroberfläche geführt. Zu hoher Druck beschädigt die Agaroberfläche.
6. Petrischalen sind immer gut zu beschriften [Art des Mediums, Mikroorganismus, Datum, Name]. Die Platten sind auf der Unterseite zu beschriften, da ein Deckel leicht vertauscht werden kann.

7. Zur Bebrütung werden die Petrischalen mit dem Deckel nach unten in den Brutschrank gelegt, damit eventuell im Deckel vorhandenes/entstehendes Kondenswasser nicht auf den Agar tropft (siehe Punkt 2).

Durchführung des Ausstrichverfahrens (3-Strich-Verfahren)

1. Entnahme von Zellmaterial
 - a. Mit einer sterilisierten und anschließend abgekühlten Impföse wird eine winzige, kaum sichtbare Menge Zellmaterial von einer gut isolierten Einzelkolonie entnommen.
2. Ausstreichen des Zellmaterials
 - a. Den Deckel einer unbeimpften Petrischale einseitig leicht anheben und ständig über der Agarplatte halten (siehe Abbildung 4.1)
ODER
Alternativ die Agarplatten Überkopf in der unmittelbaren Umgebung des Brenners auf der Laborbank lagern. Zum Ausstreichen wird nun die Agarplatte in die Hand genommen und die Agaroberfläche in die Nähe der Flamme gedreht, der Deckel verbleibt auf der Laborbank. Vorteil: Kondenswasser aus dem Deckel läuft nicht auf die Agaroberfläche und man sieht besser die Ausstriche.
 - b. 1. Ausstrich: Die Impföse mit dem Zellmaterial am äußeren Rand der Petrischale ansetzen und das Zellmaterial auf etwa $\frac{1}{4}$ der Agaroberfläche durch hin und her wischen der Impföse gleichmäßig verteilen (siehe Abbildung 4.2). Die Impfstriche sollten fast bis zum gegenüberliegenden Schalenrand reichen, ohne ihn zu berühren. Der 1. Ausstrich muss unbedingt sehr dicht und überlappend sein, um die Zellen der Kolonie voneinander zu trennen.
 - c. Impföse ausglühen, dabei die Petrischale schließen.
 - d. Petrischale um etwa 90° drehen und Impföse abkühlen.
 - e. 2. Ausstrich: Etwa im rechten Winkel zum vorherigen Strich, den 2. Strich ziehen. Dabei in Ausstrich 1 ansetzen und hindurchziehen, um Zellmaterial aufzunehmen. Das Zellmaterial durch hin und her wischen der Impföse auf etwa $\frac{1}{3}$ der Oberfläche gleichmäßig verteilen, dabei die Striche aber nicht mehr überlappen, um einen deutlichen Verdünnungs- und Vereinzelungseffekt zu erhalten.
 - f. Bei diesem, wie auch beim weiteren Strich wird kein neues Material mehr entnommen, sondern lediglich das bereits auf der Platte befindliche Zellmaterial weiter verteilt!
 - g. Impföse ausglühen, dabei die Petrischale schließen.
 - h. Petrischale um etwa 90° drehen und Impföse abkühlen.

- i. 3. Ausstrich: Beginnend beim Ende von Strich 2 den letzten Strich ziehen. Dabei wieder unmittelbar etwas Material aus dem 2. Ausstrich mitnehmen und auf dem gesamten verbliebenen Rest der Agaroberfläche verteilen.
- j. Petrischale verschließen.
- k. Impföse ausglühen.

Der Ausstrich muss nicht bis zum letzten Strich bewachsen sein; Ziel des Ganzen ist es, Einzelkolonien zu erhalten.

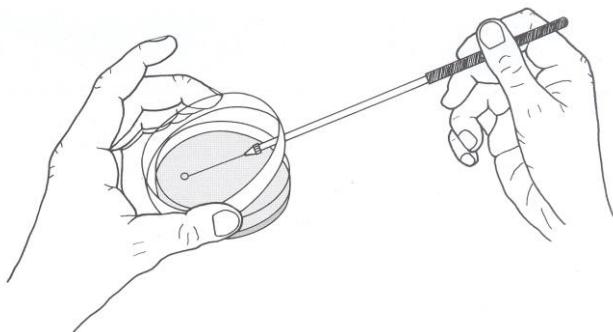


Abb. 4.1. Ausstreichen von Mikroorganismen mit der Impföse auf einer Agarplatte.

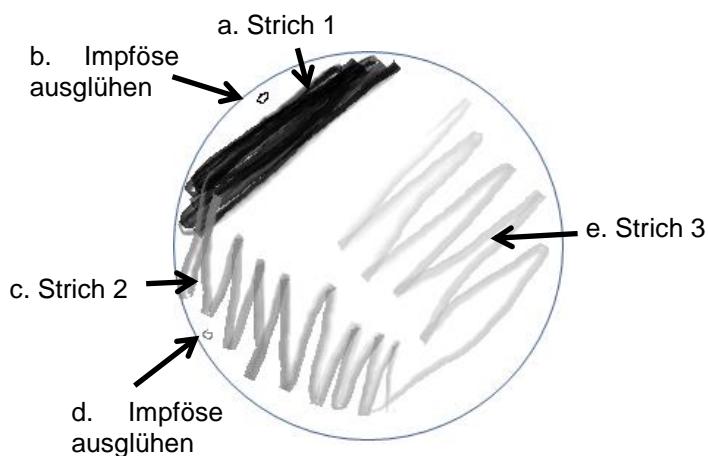


Abb. 4.2. Agarplatte mit Verdünnungsausstrich nach dem 3-Strich-Verfahren

4.9.2 Kriterien für eine Koloniebeschreibung (Koloniemorphologie)

Farbe

- z.B. farblos, beige, gelb, rot
- Pigmente wasserlöslich (von der Kolonie an die Umgebung abgegeben)

- Pigmente an die Zelle gebunden (nicht ins Medium ausgeschieden)

Koloniegröße

- klein (punktformig)
- mittelgroß (Durchmesser ca. 1-2 mm)
- groß (Durchmesser > 2mm)

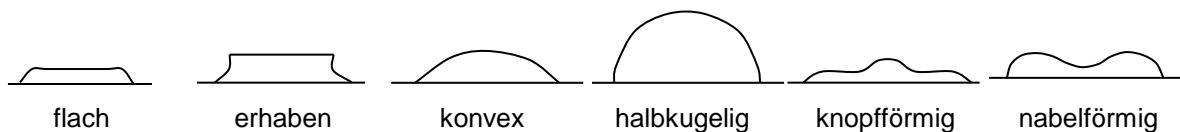
Oberfläche

- durchsichtig, undurchsichtig, glänzend, stumpf, glatt, rau, fädig, watteartig, granuliert, wellig, radial gefurcht, mit konzentrischen Ringen

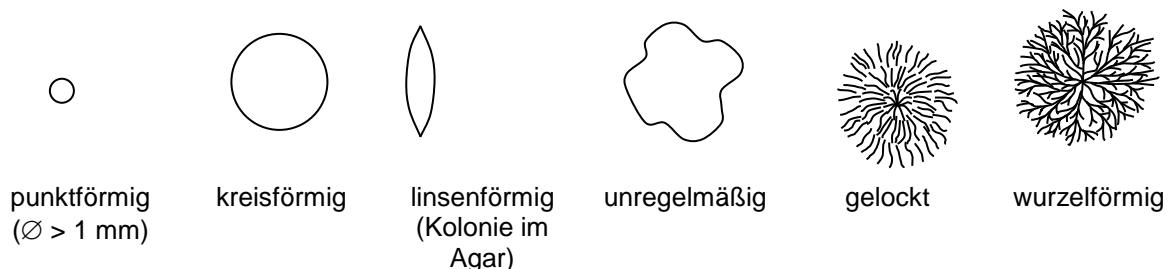
Innere Struktur

- keine, feinkörnig, grobkörnig, klumpig

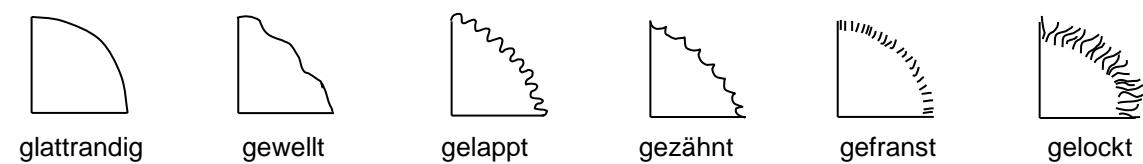
Profil



Kolonieform



Kolonierand



Konsistenz

- (Prüfung mit der Impföse)
- schleimig, zäh, knorpelig, bröckelig, flaumig, watteartig

5. GRAMFÄRBUNG

5.1 ZIEL

- Erlernen der Gramfärbung

5.2 THEORETISCHE EINFÜHRUNG

Die Gramfärbung, 1884 von H.C.J. Gram entdeckt, ist eine Differentialfärbung und das wichtigste mikrobiologische Färbeverfahren überhaupt. Sie ist gewöhnlich einer der ersten Tests bei der Identifizierung unbekannter Bakterienisolate. Durch die Gramfärbung werden die (Eu-)Bakterien (Bacteria) in zwei große Gruppen, die grampositiven und gramnegativen Bakterien eingeteilt. Verantwortlich für das Verhalten der Bakterien bei der Gramfärbung ist die Zellwandstruktur.

Die Gramfärbung umfasst vier Schritte:

1. Die fixierten Bakterien werden mit **Kristallviolett** angefärbt. Bei Kristallviolett handelt es sich um einen Triphenylmethanfarbstoff. In Lösung liegt es dissoziiert vor und besitzt dann eine positive Ladung. Dieses Kation dringt in die Bakterien ein^[1] und kann mit zahlreichen Zellbestandteilen mittels ionischer Bindung, hydrophober Effekte oder Charge-Transfer-Komplexe reagieren^[2]. Beispiele von Zellbestandteilen, mit denen Kristallviolett reagiert sind unter anderem Kohlenhydrate, Lipide, Lipoproteine und Nukleinsäuren^[2]. Die Stabilität von Kristallviolett in Lösung wird durch Oxalat erhöht^[2].
2. Die Bakterien werden mit einer **Iod-Kaliumiodid-Lösung** (Lugol'sche Lösung) behandelt (gebeizt). Dabei bildet das Iodid mit dem Kristallviolett ein Fällungsprodukt in Form eines tiefblau-violetten, wasserunlöslichen Farbstoff-Iod-Komplexes (Farblack), welcher über das gesamte Zytoplasma verteilt vorliegt.
3. Die Zellen werden mit einem **organischen Lösungsmittel**, in unserem Fall mit einem Ethanol-Aceton-Gemisch, behandelt.

Durch das Lösungsmittel wird der Farbstoff-Iod-Komplex bei **gramnegativen** Bakterien wieder herausgeschwemmt: Dabei wird durch die Alkoholbehandlung die äußere Membran von der Zelloberfläche abgelöst, und in der darunterliegenden dünnen Peptidoglycan-Schicht treten Löcher auf. Der in Alkohol gelöste Farbstoff-Iod-Komplex kann daher die Zelle verlassen, die Bakterien werden entfärbt.

Bei den **grampositiven** Bakterien wird der Farbstoff-Iod-Komplex jedoch von der dicken (etwa 10-mal dicker als die Peptidoglycan-Schicht bei gramnegativen Bakterien) Peptidoglycan-Schicht der Zellwand in der Zelle zurückgehalten. Deshalb bleiben die grampositiven Bakterien blauviolett gefärbt.

4. Durch eine **Gegenfärbung**, z.B. mit Safranin oder Fuchsin, werden die gramnegativen Bakterien rot angefärbt und heben sich dadurch besser von den grampositiven Bakterien ab, die ihre Farbe nicht verändern.

Das Ergebnis der Gramfärbung ist somit davon abhängig, ob die **Zellwand** widerstandsfähig, das heißt **dick und intakt**, genug ist um den Farbstoff-Iod-Komplex in der Zelle zurückzuhalten. Das heißt aber auch, dass es aufgrund bestimmter Zellwandphänomene bzw. -defekte zu einem gramnegativen Ergebnis der Färbung kommen kann, obwohl die Bakterien eigentlich zu den grampositiven zu zählen sind. So spielt das Alter bzw. der physische Zustand einer Kultur beispielsweise eine Rolle; Bakterien in Autolyse neigen zu gramnegativen Färbeergebnissen^[2]. Es gibt aber auch sog. gramvariable Bakterien, bei denen es entweder während Phasen schnellen Wachstums dazu kommt, dass die Zellwand dünner und damit anfälliger für eine Beschädigung während der Gramfärbung wird oder die sich während der Zellteilung im Bereich der Zellteilungsstelle durch eine fragile Zellwand auszeichnen^[1].

[1] Beveridge, T.J. (2001): Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic & Histochemistry* 76, 111-118.

[2] Popescu, A., Doyle, R.J. (1996): The Gram stain after more than a century. *Biotechnic & Histochemistry* 71, 145-151.

5.3 MATERIAL

- Objektträger
- Cornet-Pinzette
- Kristallviolett-Oxalat-Lösung nach HUCKER in Tropffläschchen
 - Kristallviolett, 1,8%
 - Ethanol, 20%
 - Ammoniumoxalat, 0,8%
- Lugol-PVP-Komplex, stabilisiert, in Tropffläschchen
 - Iod, 1,3%
 - Kaliumiodid, 2%
 - PVP (Polyvinyl-Pyrrolydon), 10%
- Entfärbet in Tropffläschchen
 - Ethanol (96%, denaturiert), 50%
 - Aceton, 50%
- Safranin-Lösung in Tropffläschchen
 - Safranin, 0,24%
 - Ethanol (96%, denaturiert), 10%

- Wischtuch
- Stoppuhr
- Hellfeldmikroskop
- Junge Bakterienkultur auf Platte
- Bunsenbrenner

5.4 DURCHFÜHRUNG

Jeder führt diesen Versuch mit einer Reinkultur von *Escherichia coli* oder *Bacillus licheniformis* durch. Die dazu notwendige Bakterienkultur befindet sich auf einer Agarplatte auf der Laborbank.

5.4.1 Probenvorbereitung

1. Einen Objektträger mit Matrand mit der äußersten Ecke in eine Cornet-Pinzette einspannen.
2. Objektträger in der nichtleuchtenden Bunsenbrennerflamme entfetten.
3. Objektträger abkühlen lassen.
4. Einen Tropfen Wasser auf den Objektträger geben und in ihm mit Hilfe einer abgekühlten sterilen Impföse eine ausreichende Menge Zellmaterial suspendieren und anschließend über den Objektträger verteilen.
5. Den Objektträger auf dem Matrand mit Bleistift beschriften
6. Ausstrich an der Luft völlig trocknen lassen.
7. Hitzefixierung: Die Flamme des Bunsenbrenners mit der Luftregulierungshülse so einstellen, dass sie nicht leuchtet, aber auch nicht rauscht. Den absolut trockenen Ausstrich mit der Schichtseite nach oben in einer senkrechten Kreisbewegung von oben dreimal durch die Flamme ziehen.
8. Ausstrich abkühlen lassen.

5.4.2 Färbung

Bitte tragen Sie während des gesamten Färbungsvorgangs Handschuhe!

1. Den fixierten Ausstrich ganz mit **Kristallviolett-Oxalat-Lösung** bedecken; Farbstoff **1 min** einwirken lassen.
2. Färbelösung abgießen und vorsichtig mit einem weichen Wasserstrahl nachspülen, bis keine Farbe mehr abläuft.
3. Ausstrich mit **Lugol'scher Lösung** bedecken, Lösung **1 min** einwirken lassen.
4. Lugol'sche Lösung abgießen und vorsichtig mit einem weichen Wasserstrahl nachspülen.

5. Den **Objektträger schräg** halten und vom oberen Rand her tropfenweise das **Ethanol-Aceton-Gemisch** gleichmäßig verteilt über den Ausstrich laufen lassen, bis der abtropfende Alkohol farblos ist; jedoch nicht länger als **10 s**.
6. Anschließend sofort mit einem weichen Wasserstrahl spülen.
7. Ausstrich ganz mit **Safranin-Lösung** bedecken; Farbstoff **1 min** einwirken lassen.
8. Safranin-Lösung abgießen, und vorsichtig mit einem weichen Wasserstrahl nachspülen, bis keine Farbe mehr abläuft.
9. Den Objektträger vorsichtig mit einem Tuch trockentupfen.

Spülen und Differenzieren nur über dem Waschbecken!!

5.4.3 Auswertung

- Ausstrich im Hellfeld (keinen Phasenkontrast verwenden) mikroskopieren, um die Farbe zu bestimmen.
- Bei der Verwendung des 100X-Objektivs kann das Immersionsöl direkt auf den Objektträger gegeben werden (kein Deckglas nötig).
- Die selbst angefärbten Bakterien sowie die des Laborpartners mikroskopieren und Zellform zeichnen. Für die Bestimmung der Zellform kann der Phasenkontrast genutzt werden.
- Da die Bakterien während der Gramfärbung abgetötet werden, können die Proben nach der Mikroskopie im einfachen Glasmüll entsorgt werden.

5.5 ERGEBNISSE

Zeichnung

(Bitte mit Bakterienart und Ergebnis der Gramfärbung beschriften.)

(5 Punkte)

5.6 FRAGEN

- Welche Farbe würden die Bakterienzellen haben, wenn man sie nach den verschiedenen Schritten der Gramfärbung im Mikroskop betrachten würde?

Tab. 5.1. Färbung der Bakterienzellen während der Gramfärbung.

Schritt	grampositiv	gramnegativ
Anfärbung mit Kristallviolett		
Behandlung mit Iodlösung		
Behandlung mit Alkohol		
Gegenfärbung mit Safranin		

(5 Punkte)

- Warum beobachtet man die oben genannten Unterschiede? **(5 Punkte)**

- Zeichnen Sie schematisch die Zellwand von grampositiven und gramnegativen Bakterienzellen und beschriften Sie die einzelnen Bestandteile. Machen Sie dabei die Unterschiede deutlich. **(5 Punkte)**

- Was versteht man unter gramvariablen Bakterien? Nennen Sie Beispiele! **(5 Punkte)**

6. QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER ANTIOTIKA-EMPFINDLICHKEIT MITTELS HEMMHOFTEST

6.1 ZIEL

Ziel des Versuches ist es, die Empfindlichkeit eines *Escherichia coli*- und *Pseudomonas fluorescens*-Stammes gegenüber eines Antibiotikums zu bestimmen. Dabei soll der Hemmhoftest, auch Agardiffusionstest genannt, als eine Methode zur Empfindlichkeitsbestimmung erlernt werden.

6.2 THEORETISCHE EINFÜHRUNG

Antibiotika sind Substanzen biologischer Herkunft, die schon in geringer Konzentration das Wachstum von Mikroorganismen hemmen. Man unterscheidet zwischen hemmend wirkenden (Bakteriostatika) und abtötend wirkenden Substanzen (Bakterizide). Es gibt sowohl Pilze als auch Bakterien, die Antibiotika bilden.

Zu antibakteriellen Chemotherapeutika zählen neben den natürlichen Antibiotika auch synthetisch hergestellte Substanzen mit antibakterieller Wirkung.

Damit eine antibakteriell wirkende Substanz (im Folgenden als Antibiotikum bezeichnet, obwohl diese auch synthetisch hergestellte Substanzen umfasst) therapeutisch eingesetzt werden kann, muss sie das von Paul Ehrlich aufgestellte Prinzip der selektiven Toxizität erfüllen. Dieses Prinzip besagt, dass das Antibiotikum den Mikroorganismus schon in geringen Konzentrationen schädigen muss, ohne jedoch den Makroorganismus zu schädigen. Dieses Prinzip wird erfüllt, wenn die Zielstrukturen der Antibiotika nicht in eukaryotischen Zellen vorkommen bzw. sich die Moleküle der eukaryotischen Zellen strukturell von den prokaryotischen Zielstrukturen unterscheiden.

In der folgenden Tabelle sind einige wichtige antibakterielle Chemotherapeutika und deren Wirkungsmechanismen aufgelistet:

Tab. 6.1. Chemotherapeutika und deren Wirkungsmechanismen.

Substanzgruppe	Mechanismus, Zielstruktur
Sulfonamide	Kompetition mit p-Aminobenzoësäure als Substrat für die Dihydropteroïn-Synthetase; dadurch zuwenig Tetrahydrofolsäure
Trimethoprim (Diaminbenzyl-Pyrimidine)	Hemmung der Dihydrofolsäure-Reduktase; dadurch zuwenig Tetrahydrofolsäure
β-Lactame (Penicilline, Cephalosporine, Monobactame) Bsp. Ampicillin	Störung der Mureinbiosynthese
Rifamycin	Transkription: Blockierung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase
Aminoglykoside	Transkription: Falschablesen des genet. Codes u./o. Blockierung der A-Stellenbesetzung am Elongationsribosom durch Aminoacyl-tRNA
Chloramphenicol	Translation: Hemmung der Peptidyltransferase
Makrolide	Translation: Hemmung des Einfädeln der Polypeptidkette in den Ribosomen-Kanal
(Fluor-) Chinolone	Störung der DNA-Topologie

Nicht alle Bakterien reagieren empfindlich auf alle Antibiotika. Unempfindliche Bakterien werden als resistent bezeichnet. In der Medizin bezeichnet man mit dem Begriff Resistenz die Eigenschaft von Mikroorganismen, Konzentrationen von Antibiotika, die im Makroorganismus realisiert werden können, zu tolerieren. Man unterscheidet zwischen der natürlichen Resistenz und der erworbenen Resistenz. Die natürliche Resistenz ist ein Art- oder Gattungsmerkmal. Es gibt Antibiotika, die aufgrund ihrer Struktur gar nicht die äußere Membran Gram-negativer Bakterien passieren und damit nicht ihre Zielstrukturen, die z.B. im Cytoplasma liegen, erreichen können. Gegenüber solchen Antibiotika weisen Gram-negative Bakterien eine natürliche Resistenz auf. Erworbene Resistenz liegt vor, wenn Stämme empfindlicher Spezies durch Änderungen ihres Erbgutes Resistenz erwerben.

Es gibt drei Resistenzmechanismen:

- Produktion inaktivierender Enzyme
- Resistente Zielmoleküle
- Verringerte Akkumulation des Antibiotikums am Zielort durch verringerte Permeabilität u./o. erhöhten Efflux

Die zunehmende Resistenz bei Bakterien gegenüber Antibiotika ist ein großes Problem für die Humanmedizin.

6.3 MATERIAL

- Übernacht-Kulturen auf NA-Platten von *E. coli* DSM 13127 und *P. fluorescens* DSM 50090
- 2 Ampullen Verdünnungsmedium BioMérieux
- 2 sterile Wattestäbchen
- Sterile NaCl im Reagenzglas

- 2 NA-Platten
- Testblättchen mit verschiedenen Ampicillin-Beladungen (je 2 mit 0, 2, und 10 µg Ampicillin). Die unbeladenen Testblättchen müssen noch mit 25 µg Ampicillin beladen werden)
- 1x Ampicillin-Stammlösung mit 2,5mg/mL
- Wattestäbchen
- 1x 10 µL Kolbenhubpipette inkl. sterilen Spitzen; Ethanol im Becherglas
- Bunsenbrenner
- Pinzette
- Brutschrank bei 30 °C und bei 36 °C
Pro Laborzeile
- 1x McFarland Trübungsstandard 0,5 (die Ampulle NICHT aufbrechen!)

6.4 DURCHFÜHRUNG

6.4.1 Dienstag, 2. Tag:

- NA-Platten auf der Unterseite dritteln und beschriften [Gruppe #, Versuch #, Ampicillinkonzentration je Drittelpartie, Name]. Ampullen mit dem Namen des Bakteriums beschriften.
- Herstellen der Bakteriensuspension mit einer optischen Dichte nach McFarland PMS 0,5: Eine Einzelkolonie jedes Bakteriums mit einem sterilen Wattestäbchen abnehmen und in der Ampulle resuspendieren, dann mit dem Auge die Trübung mit dem McFarland Standard vergleichen. Wenn die Trübung zu stark ist, muss sterile NaCl hinzugegeben werden, bis Trübung dem Standard entspricht.
- Wattestäbchen steril aus der Packung nehmen und in die Bakteriensuspension eintauchen, dabei hängende Tropfen an der Innenwandung des Gefäßes abwischen. Den getränkten Watteteil nun in drei Richtungen (die Platte nach jeder Richtung um 1/3 drehen) auf einer frischen NA-Platte verteilen, dabei darauf achten, dass die gesamte Agaroberfläche mit der Bakteriensuspension bestrichen wird (siehe Abbildung 6.1)
- In die Mitte jedes Drittels der Agarplatte wird ein Testblättchen gelegt. Dazu Pinzette in Ethanol tauchen und durch Abflämmen, nicht Ausglühen!, desinfizieren. Dazu die Pinzette in Ethanol tauchen, das Ethanol an der Pinzette an der Flamme entzünden und es **neben** der Flamme verbrennen lassen. Mit dieser Pinzette (nach Abkühlen) ein Testblättchen aus Packung entnehmen, auf Agaroberfläche auflegen und vorsichtig andrücken

- Vorgang für die anderen beiden Ampicillinkonzentrationen wiederholen, dabei mit dem Abflammen der Pinzette beginnen
- Nun auf das unbeladene Testblättchen vorsichtig und tropffrei 10 µL der Ampicillin-Stammlösung pipettieren.
- Sofort die Platten mit der Unterseite nach oben über Nacht bei 30 °C (*P. fluorescens*) bzw. bei 36 °C (*E. coli*) bebrüten

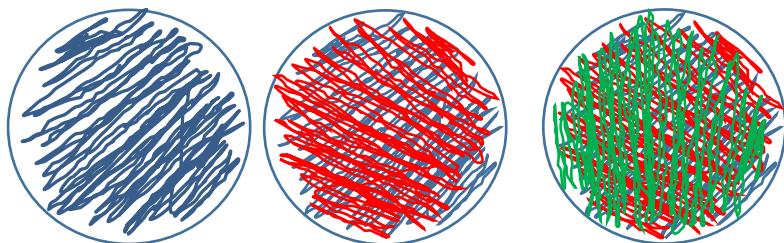


Abb. 6.1. Gleichmäßiges Aufbringen der Bakterienkultur in drei Richtungen auf der gesamten Agarplatte.

6.4.2 Mittwoch, 3. Tag:

- Platten betrachten und die Beobachtungen in Worte fassen (s. Ergebnisse; Beobachtungen)
- Ausmessen der drei Hemmhöfe mit dem Lineal und Durchmesser in die Ergebnistabelle eintragen (Beachte: Ist kein Hemmhof um das Testblättchen zu erkennen, wird der Durchmesser des Testblättchens mit ≤ 6 mm angegeben.)

6.5 ERGEBNISSE

Die Hemmhöfe werden mit dem Lineal ausgemessen und ihre Durchmesser in Millimeter angegeben. Kein sichtbarer Hemmhof ist mit ≤ 6 mm zu bezeichnen. Tragen Sie die Ergebnisse in die folgende Tabelle ein.

Tab. 6.2. Beobachtungen.

Ampicillin-Konz. [µg/ml]	Hemmhof-Ø [mm]	
	<i>E. coli</i>	<i>P. fluorescens</i>
2		
10		
25		

(2 Punkte)

6.6 DISKUSSION: (20 Punkte)

Bitte schließen Sie in die Diskussion die Informationen aus der theoretischen Einführung ein.

Welcher Stamm ist empfindlich gegen Ampicillin?

Ist ein Stamm resistent gegen Ampicillin?

Welcher Resistenzmechanismus kann vorhanden sein?

6.7 FRAGEN

- Was versteht man unter Antibiotika, was unter antibakteriellen Chemotherapeutika?
(5 Punkte)

Antibiotika:

Antibakterielle Chemotherapeutika:

- Wann können Antibiotika therapeutisch eingesetzt werden?
(5 Punkte)
- Nenne Sie drei Antibiotikagruppen und ihre Zielstrukturen.

Tab. 6.3. Antibiotikagruppen und ihre Zielstruktur.

Antibiotikagruppe	Zielstruktur

(5 Punkte)

- Beschreiben Sie den genauen Wirkmechanismus von Penicillin auf die Bakterienzelle.
(5 Punkte)
- Welche drei Resistenzmechanismen gegenüber Antibiotika können bei Bakterien auftreten?
(5 Punkte)

- Was versteht man unter natürlicher und erworbener Resistenz? **(5 Punkte)**

Natürliche Resistenz:

Erworbene Resistenz:

7. BESTIMMUNG DER ZELLZAHL VON BÄCKERHEFE

7.1 ZIEL

In diesem Versuch sollen verschiedene Methoden zur Bestimmung der Zellzahl erlernt werden. Der Versuch soll folgende Fragen beantworten: Wie viele Zellen enthält 1 g Bäckerhefe (Feuchtmasse)? Welche Ergebnisse liefern die verschiedenen Methoden? Wie sind diese unterschiedlichen Ergebnisse zu erklären?

7.2 THEORETISCHE EINFÜHRUNG

Hefen sind Eukaryonten. Ihr Zelldurchmesser beträgt 4-8 μm . Sie zählen zu den Pilzen und dort zu den Ascomyceten.

Hefen führen unter anoxischen Bedingungen Gärungen durch, während sie bei Sauerstoffanwesenheit atmen. Somit zählen sie zu den fakultativen Anaerobiern.

Ihre Zellwand besteht hauptsächlich aus den Polysacchariden Glykan (Polymere aus Glucose) und Manan (Polymere aus Manose), und im Vergleich zu anderen Pilzen aus sehr wenig Chitin. Im Cytoplasma sind Glykogen und Lipidtröpfchen als Energie- und Kohlenstoffspeicher enthalten. Daneben befinden sich im Cytoplasma Vakuolen mit Polyphosphatgranula. Diese dienen als Phosphatspeicher und ermöglichen der Zelle, auch bei Phosphatmangel noch einige Teilungszyklen zu durchlaufen.

Der Name „Ascomyceten“ weist auf das generative Vermehrungsstadium der Hefen, den sogenannten Ascus, hin. Der Entwicklungszyklus der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) ist in der folgenden Abbildung dargestellt:

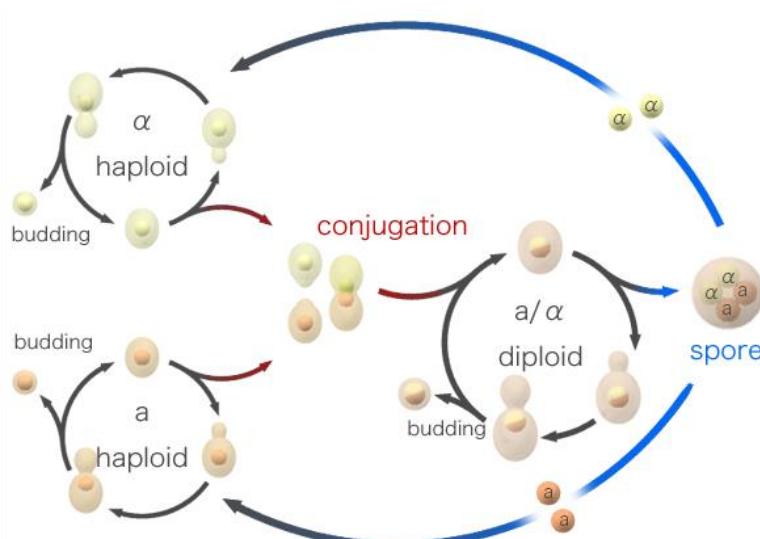


Abb. 7.1. Entwicklungszyklus der Bäckerhefe
(Quelle: <http://www.fsbio-hannover.de/oftheweek/191.htm>).

Die typische vegetative Vermehrung der Hefen ist die Sprossung. An der Mutterzelle bildet sich ein Auswuchs, in den nach der Kernteilung ein Kern einwandert. Der Auswuchs wird abgeschnürt. Wenn keine Abschnürung stattfindet, bilden sich Sprossmyzelien.

Bei der Ascosporen-Bildung entstehen in der Hefezelle vier haploide Kerne, woraus sich vier Ascosporen bilden. Verschmelzen zwei haploide Hefezellen zu einer Zygote, so gehen aus dieser wieder vegetative, diploide Hefezellen hervor.

7.2.1 Bestimmung der Zellzahl

In der Mikrobiologie ist die Zellzahl oder die Zellmasse oft eine essentielle Bezugsgröße für die korrekte Versuchsdurchführung und –auswertung.

In einer Population einzelliger Mikroorganismen kommen nebeneinander vermehrungsfähige und vermehrungsunfähige Zellen vor. Werden bei einer Zellzählung beide Sorten von Zellen zusammen erfasst, so ist das Ergebnis die **Gesamzellzahl**. Zählt man dagegen nur die vermehrungsfähigen Zellen, die in der Lage sind, sich durch Teilung zu vermehren und z.B. in oder auf einem geeigneten Nährboden Kolonien zu bilden, so erhält man die **Lebendzellzahl** in Form von koloniebildenden Einheiten (KBE).

Weitere Verfahren zur Bestimmung der Zellzahl und -masse werden Sie während des Praktikums noch in anderen Versuchen kennen lernen.

7.2.2 Gesamzellzahl

Mikroskopische Zellzählung in einer Thoma-Zählkammer

Die Thoma-Zählkammer ist eine dicke, plangeschliffene Glasplatte von Objektträgergröße, in deren Mitte quer zur Längsrichtung drei parallele Stege eingeschliffen sind, die durch Rinnen getrennt oder begrenzt werden. Die Oberfläche des mittleren breiteren Steges liegt um einen geringeren, genau festgelegten Betrag tiefer als die Oberfläche der beiden seitlichen Stege. Legt man ein plangeschliffenes, nicht zu dünnes Deckglas über die drei Stege, so ruht es nur auf den Seitenstegen, während über dem Mittelsteg ein seitlich offener Hohlraum (eine „Kammer“) entsteht, der eine bestimmte Tiefe aufweist.

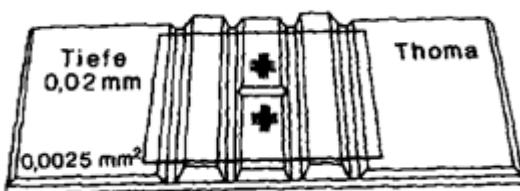


Abb. 7.2. Thomakammer (nach Bast, S. 283). Im Praktikum beträgt der Abstand zwischen Gitternetz und Deckglas 0.1 mm.

In die polierte Oberfläche des mittleren Steges sind mit hoher Präzision zwei durch eine Querrinne getrennte, feine, quadratische Liniennetze eingraviert. Das Netzquadrat (a-Feld) hat eine festgelegte Fläche und ist in gleich große Groß- oder Gruppenquadrate (b-Felder) und diese wiederum in Kleinquadrate (c-Felder) unterteilt; somit befindet sich über jedem Quadrat ein Raum mit einem bekannten Volumen. Füllt man diesen Raum mit einer Mikroorganismensuspension, zählt die in ihm enthaltenen Zellen aus und multipliziert mit einem Umrechnungsfaktor, so erhält man die Gesamtzellzahl/Volumen.

Das gesamte Netzquadrat (a-Feld) hat eine Fläche von 1 mm^2 und ist unterteilt in $4 \times 4 = 16$ durch dreifache Linien begrenzte Gruppenquadrate (b-Felder) zu je 16 Kleinquadrate (c-Felder).

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl werden in diesem Versuch 10 Großquadrate (b-Felder) ausgezählt, in denen jeweils zwischen 10 und 40 Zellen liegen sollten.

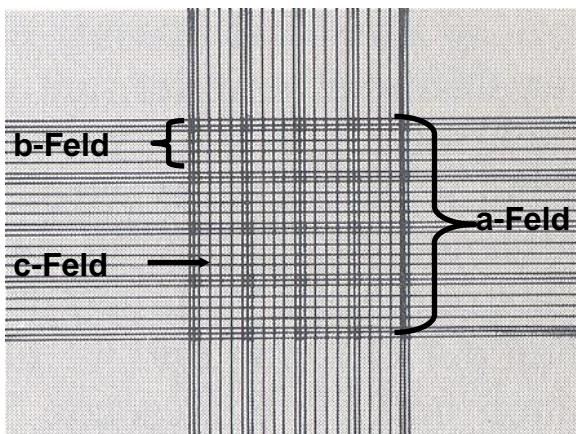


Abb. 7.3. a-Feld der Thomakammer aus Süßmuth et al., S. 27.

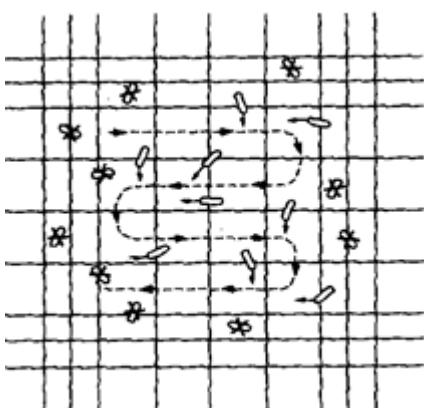


Abb. 7.4. Netzeinteilung nach Thoma, dargestellt ist ein b-Feld, welches aus 16 c-Feldern besteht.

Die Kleinquadrate (c-Felder) haben eine Seitenlänge von 0,05 (= 1/20) mm und somit eine Fläche von 1/400 mm². Zwischen dem korrekt aufgelegten Deckglas und dem Gitternetz besteht ein Abstand von 0,1 (= 1/10) mm. Es ergibt sich folgendes Volumen für ein Kleinquadrat:

$$1/400 \text{ mm}^2 \times 1/10 \text{ mm} = 1/4000 \text{ mm}^3$$

Die übliche Bezugsgröße für Zellzahlen ist 1 ml (= 1 cm³ = 1000 mm³). Das Volumen eines c-Feldes entspricht somit dem 4 x 10⁶ten Teil eines **Milliliters**. Daraus ergibt sich ein Kammerfaktor von **4 x 10⁶** (GZZ/ml bzw. 4 x 10⁹ für GZZ/l).

Für die Berechnung der Zellanzahl pro ml gilt also:

durchschnittliche Zellzahl pro c-Feld x Kammerfaktor x Verdünnungsfaktor

7.2.3 Lebendzellzahl (Bestimmung der koloniebildende Einheiten)

Plattengussverfahren

Die Lebendzellzahl von Bakterien und Hefen bestimmt man, indem man eine kleinere Menge einer (gegebenenfalls verdünnte) Zellsuspension über einen Agarnährboden in einer Petrischale verteilt und nach der Bebrütung, die auf oder in der Agarplatte entstandenen Kolonien zählt.

Beim klassischen „Kochschen Plattengussverfahren“ (Robert Koch, 1881) vermischt man 0,1 bis 1,0 ml Probensuspension mit 10 bis 20 ml eines bei 48°C flüssig gehaltenen Agarnährbodens, lässt das Gemisch in einer Petrischale erstarren und bebrütet.

7.3 MATERIAL

Für Alle:

- 1 l sterile 0,9%ige NaCl-Lösung (Rührfisch mitautoklavieren)
- 5 g frische Bäckerhefe
- Mikroskope
- Thomakammern mit 0,1 mm Kammertiefe
- Deckgläser 20 mm x 26 mm, ca. 0,4 mm dick, beiderseits plangeschliffen (**Mehrweg-Deckgläser, auf keinen Fall entsorgen!**)
- Wasserbäder bei 47-50°C mit Reagenzglaseinsatz
- Brutschrank bei 28°C

Für jede Gruppe:

- Kolben mit Hefesuspension
- 8 NaCl-Verdünnungsröhrchen (je 9 ml)
- 1000µl Kolbenhubpipette inkl. sterile Spitzen
- Vortexgerät
- 5 sterile Petrischalen pro Person
- 5 Reagenzgläser mit je ~15-20 ml steriles, flüssigem (frisch autoklaviertem oder erhitzen) Hefenährboden (Zusammensetzung s. u.) pro Person

Hefenährboden:

- Hefeextrakt 10 g
- Saccharose 30 g
- Agar 10 g
- ad 1000 ml H₂O
- pH 6,0

7.4 DURCHFÜHRUNG**7.4.1 Herstellen einer Verdünnungsreihe (eine Verdünnungsreihe pro Gruppe)**

Bevor die einzelnen Versuche zur Zellzahlbestimmung durchgeführt werden, wird eine dezimale Verdünnungsreihe einer Hefesuspension hergestellt. Diese Verdünnungsreihe wird dann für beide Versuchsteile genutzt.

Von den Assistenten werden 5 g Hefe (Feuchtmasse) in 1 l NaCl-Lösung suspendiert. Diese Suspension (10^0) wird aliquotiert und in Erlenmeyerkolben an die Studenten verteilt.

- Alle Arbeiten neben der Flamme durchführen; bei Bedarf Öffnungen der Reagenzgläser abflämmen (Wichtig: Bitte das Abflämmen vom Betreuer zeigen lassen!)
- 1 ml der Hefesuspension steril in 9 ml NaCl-Lösung pipettieren (Wichtig: Beim Abgeben der Lösung darf die Pipettenspitze nicht in die NaCl-Lösung eintauchen.)
- mit dem Vortexgerät gut mischen (Verdünnung 10^{-1})
- mit frischer Pipettenspitze aus Verdünnung 1 1 ml steril entnehmen und in 9 ml NaCl-Lösung pipettieren (Wichtig: Beim Abgeben der Lösung darf die Pipettenspitze nicht in die NaCl-Lösung eintauchen.)
- mit dem Vortexgerät gut mischen (Verdünnung 10^{-2})
- usw. bis zur Verdünnung 10^{-8}

7.4.2 Gesamtzellzahlbestimmung mit der Thoma-Kammer (jeder Teilnehmer)

- Zählkammer und zugehöriges dickes (Mehrweg-) Deckglas mit einem weichen, fusselfreien Tuch reinigen. Zählkammer und Deckglas nur seitlich an den Kanten anfassen, auf keinen Fall mit den Fingern ihre Flächen berühren!
- Zählkammer anhauchen und auf die Arbeitsfläche legen. Das Deckglas an den unteren Rand der Zählkammer legen und in Längsrichtung (am besten mit dem Daumen) vorsichtig über die beiden seitlichen Stege schieben. Wenn das Deckglas korrekt sitzt, zeigen sich auf den beiden seitlichen Stegen Newton'sche Farbringe. Erst dann ist der korrekte Abstand zwischen Kammer und Deckglas und somit das definierte Volumen über einem c-Feld gegeben.
- Verdünnung der Hefesuspension mit dem Vortexgerät nochmals gut mischen. (Wählen Sie eine Verdünnung aus, in der die Zellendichte nicht zu hoch ist, so dass Sie gut auszählen können; zwischen 10 und 40 Zellen pro b-Feld ist optimal. Erfahrungswert: Die Verdünnungen 10^{-1} und 10^{-2} lassen sich gut auszählen.)
- Sofort anschließend mit der Kolbenhubpipette maximal 10 μl Zellsuspension so dicht am Deckglasrand auf den mittleren Steg setzen, dass die Flüssigkeit kapillar zwischen Stegoberfläche und Deckglas gesaugt wird. Nur so viel Suspension zusetzen, dass der Raum zwischen Mittelsteg und Deckglas bis zur Querrinne gerade gefüllt ist.
- Zählkammer unter das Mikroskop legen, und mit dem schwächsten Objektiv im Phasenkontrast das Liniennetz mit der Zellsuspension einstellen.
- Auf das Trockenobjektiv 40:1 umschalten.
- Im Phasenkontrast mindestens 10 Großquadrate (b-Felder) auszählen. Die auf, bzw. über der oberen und rechten Begrenzungslinie jedes Kleinquadrate liegenden Zellen mitzählen, nicht jedoch, die auf der unteren und linken Linie liegenden Zellen und ebenfalls nicht die Zellen, die sich zwischen den Begrenzungslinien der Großquadrate befinden (s. Abb.2).
- Nach Beendigung des Auszählens Zählkammer und Deckglas unter fließendem Wasser abspülen, gut abtrocknen und wieder in die Dose legen.

7.4.3 Lebendzellzahl-Bestimmung (jeder Teilnehmer)

Arbeitsgang des Gussplattenverfahrens:

- Die leeren, sterilen Petrischalen mit wasserfestem Stift auf der Unterseite beschriften [Gruppen #, „KBE“, Verdünnungsstufe].
- Bunsenbrenner anstellen und gesamten Arbeitsvorgang in Flammennähe durchführen
- 1 ml-Kolbenhubpipetten mit sterilen Spitzen verwenden

- 1 ml von Verdünnung 4 ($= 10^{-4}$) entnehmen und unter sterilen Bedingungen in die entsprechende Petrischale pipettieren. Diesen Vorgang für die Verdünnungen 10^{-5} bis 10^{-8} wiederholen.
- Ein Reagenzglas mit dem im Wasserbad bei 48°C flüssig gehaltenen Hefenährboden holen. Das Wasser, das sich außen am Reagenzglas befindet, mit Hilfe eines Papiertuches abtrocknen. Das Reagenzglas neben der Flamme öffnen und die Öffnung **zügig** durch die Flamme ziehen. Die Petrischale an einer Seite öffnen und den Agar neben die Bakteriensuspension gießen. Deckel der Petrischale schließen und den Agar mit der Bakteriensuspension durch vorsichtiges Bewegen auf dem Tisch (achtformig) vermischen. (Zügiges Arbeiten ist erforderlich!)
- Der Laborpartner spült **sofort** das Reagenzglas aus, da der im Reagenzglas verbleibende Agar schnell erstarrt
- Petrischalen vorsichtig in den hinteren Bereich der Arbeitsfläche schieben und dort stehen lassen bis der Nährboden erstarrt ist (20-30 min).
- Platte mit der Unterseite nach oben 2 Tage im Brutschrank bei 28°C bebrüten.
- Wiederholen Sie die Arbeitsschritte für die anderen Verdünnungen.

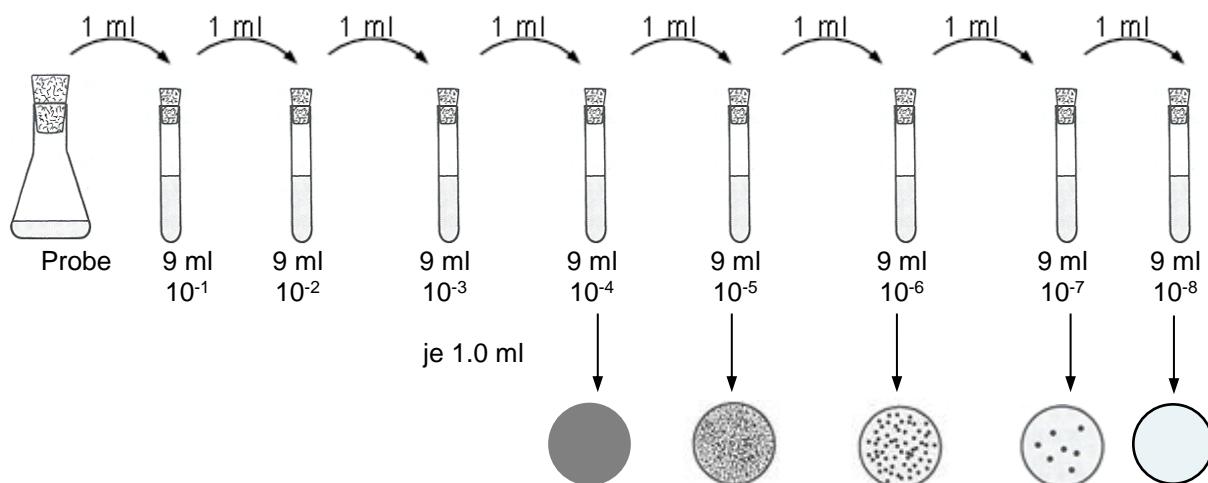


Abb. 7.5. Herstellung einer dezimalen Verdünnungsreihe.

7.4.4 Auswertung (am Freitag, 5. Tag):

- Bebrütete Platten mit der Unterseite nach oben auf eine dunkle Unterlage setzen (Platten geschlossen halten), und Hefekolonien in und auf dem Agar ohne Rücksicht auf Größe und Form auszählen. Gezählte Kolonien mit einem wasserfesten Stift auf der Plattenunterseite markieren und im Ergebnisteil den Wert notieren. Bitte lassen Sie sich auch die Ergebnisse Ihres Laborpartners geben, so dass das Endergebnis auf einer Doppelbestimmung beruht.

- Berechnung der KBE pro ml Ausgangssuspension (5g Hefe/l) und anschließender Berechnung der Lebendzellzahl pro g Bäckerhefe.
- Hefekolonien (und eventuelle Verunreinigungen) unter der Lupe betrachten; Koloniemorphologie beschreiben (s. Tabelle 7.3 im Ergebnisteil).
- Hefekolonien und -zellen (und eventuelle Verunreinigungen) mikroskopieren und zeichnen (s. Ergebnisse 7.4).

7.5 ERGEBNISSE

7.5.1 Bestimmung der Gesamtzellzahl in 1 g Bäckerhefe

Verwendete Verdünnungsstufe: **(2 Punkte)**

Tab. 7.1. Bestimmung der Gesamtzellzahl.

b-Feld	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Anzahl der c-Felder
Anzahl der Zellen											Gesamt- zellzahl
											(2 Punkte)

Rechnung:

Gesamtzellzahl in 1g Bäckerhefe:

(5 Punkte)

7.5.2 Bestimmung der Lebendzellzahl in 1 g Hefe (2 Punkte)**Tab. 7.2.** Berechnung der KBE.

Verdünnungsstufe	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
Anzahl der Kolonien					
Mittelwert der Koloniezahl					

Beziehen Sie sich zur Berechnung der KBE/ml auf das Rechenbeispiel auf Seite 88!

Welchen der arithmetischen Mittelwerte benutzen Sie zur Berechnung der KBE/ml und warum? (2 Punkte)

Rechnung:

Lebendzellzahl pro 1g Bäckerhefe =

(5 Punkte)

7.5.3 Kolonienmorphologie

(5 Punkte)

Tab. 7.3. Kolonienmorphologie.

Kolonie-Nr.	1	2	3
Lage (bzgl. Agar)	Auf Agaroberfläche	Im Agar	Zwischen Agar und Boden der Petrischale
Durchmesser			
Form			
Rand			
Höhenentwicklung			
Oberfläche		-	-
Konsistenz		-	-
Transparenz		-	-
Farbe			
Innere Struktur		-	-

7.5.4 Zeichnungen

Koloniemorphologie der drei oben beschriebenen Kolonien

(5 Punkte)

(1)

Zeichnung des mikroskopischen Bildes von Hefezellen

(5 Punkte)

(2)

7.6 DISKUSSION**(20 Punkte)**

Betrachten Sie Ihre Ergebnisse der Gesamtzellzahl und Lebendzellzahl. Wie kann man die Differenz zwischen den beiden Ergebnissen erklären? Entspricht Ihr Ergebnis den Erwartungen? Falls nicht, diskutieren Sie mögliche Fehlerquellen.

7.7 FRAGEN

- Was versteht man unter der Gesamtzellzahl und der Lebendzellzahl (= Keimzahl) einer Population einzelliger Organismen? **(5 Punkte)**

Gesamtzellzahl:

Lebendzellzahl:

- Nennen Sie je eine Methode zur Gesamt- und Lebendzellzahlbestimmung! **(5 Punkte)**

Gesamtzellzahl:

Lebendzellzahl:

- Welchen Zellaufbau besitzt die Bäckerhefe? Zu welcher Organismengruppe gehört sie und wie vermehrt sie sich? **(5 Punkte)**

7.8 LITERATUR

- Bast, E. 2001. Mikrobiologische Methoden. Spektrum Akademischer Verlag.
- Süßmuth, R., Eberspächer, J., Haag, R. und Springer, W. 1998. Mikrobiologisch-Biochemisches Praktikum. Georg Thieme Verlag.

8. BESTIMMUNG DER MUTATIONSFREQUENZ

8.1 ZIEL

In diesem Versuch soll bestimmt werden, wie häufig Mutationen zur Antibiotikaresistenz in einem Bakterienstamm führen, wenn sie durch ein Antibiotikum als Mutagen induziert werden. Dazu wird die Mutationsfrequenz, die den Anteil der Mutanten an der Zahl der überlebenden Zellen (KBE) beschreibt, berechnet.

8.2 THEORETISCHE EINFÜHRUNG

Als Mutation bezeichnet man eine Veränderung der Erbanlagen, d.h. eine Veränderung in der Basensequenz der DNA. Dadurch kann die Struktur des von dem betroffenen Teil dieser DNA kodierten Proteins und die Syntheserate dieses Proteins verändert werden oder, im Falle eines Enzyms, auch seine Aktivität. Mutationen können Leistungsfähigkeiten des betroffenen Organismus vermindern (Mangel- oder Letal-Mutationen) oder - seltener - auch einen evolutionären Vorteil gegenüber den ursprünglichen Zellen mit sich bringen. Einige Mutationen haben keine Auswirkungen auf den Organismus (neutrale, stille Mutationen).

Man unterscheidet Punktmutationen, die nur eine oder wenige Basen betreffen, und Mutationen, die größere DNA-Bereiche betreffen. Bei Punktmutationen unterscheidet man zwischen folgenden drei Typen:

1. Basensubstitution: Austausch eines Basenpaares gegen ein anderes
2. Deletionsmutationen: Verlust eines oder mehrerer Basenpaare
3. Insertionsmutationen: Einbau zusätzlicher Basenpaare

Mutationen treten zufällig auf. Die Rate dieser Zufallsmutationen kann durch exogene Faktoren (Mutagene), wie chemische (alkylierende Agentien, salperte Säuren, Basenanaloga) oder physikalische Mutagene (UV-Strahlung, radioaktive Strahlung) erhöht werden. Spontane Mutationen beruhen auf endogenen Faktoren, z.B. zufälligem Fehleinbau einer Base bei der DNA-Replikation, fehlerhafter DNA-Reparatur oder dem Verlust bzw. Einbau von DNA-Bruchstücken (DNA-Rekombinationseignis). Die Seltenheit spontaner Mutationen bedingt, dass ihr Auftreten nur in großen Populationen quantitativ erfassbar ist. Die Häufigkeit von Mutationen folgt statistischen Gesetzen.

8.3 MATERIAL (PRO BANK)

- 50 ml ÜN-Kultur von *E. coli* DSM 13127 in Nährbouillon
- 8 NA-Platten mit 15 µg/ml Nalidixinsäure (NA₁₅)
- 8 NA-Platten mit 100 µg/ml Nalidixinsäure (NA₁₀₀)
- 8 NA-Platten ohne Nalidixinsäure (NA)
- Drigalskispatel

- Ethanol zum Abflämmen
- 5 ml Nährbouillon (NB)
- 1 Zentrifugenröhrchen
- Zentrifuge (vorgekühlt)
- Kolbenhubpipette 100 -1000 μL inkl. sterile blaue Spitzen
- Kolbenhubpipette 10 -100 μL inkl. sterile gelbe Spitzen
- 50 ml sterile NaCl in 100 ml Erlenmeyerkolben (für Verdünnungsreihe)
- sterile 10 ml Glaspipetten inkl. Pipettierhilfe
- 9 sterile 15 ml-Reagenzgläser (mittelgroße)

8.4 DURCHFÜHRUNG

Diesen Versuch führt eine Laborbank gemeinsam durch.

8.4.1 Mittwoch, 3. Tag:

- Eine *E. coli* Übernacht-Flüssigkultur wird 20:1 konzentriert:
 - 45 ml Kultur steril in ein Zentrifugenröhrchen überführen (Flüssigkeitstand etwa bis zur Maximalmarke des Zentrifugenbechers)
 - Zellen durch Zentrifugation für 15 min bei 4000 x g und 4°C (wichtig: Zentrifuge vorkühlen) sedimentieren
 - **Vor der Zentrifugation müssen die Zentrifugenbecher austariert werden!**
Dies erfolgt zusammen mit einem Betreuer!
 - Überstand wird vorsichtig dekantiert und in einem Becherglas gesammelt
 - Zellpellet in einem entsprechend geringerem Volumen (2.25 ml) Nährbouillon durch vorsichtiges Vortexen resuspendieren
- Jeweils 100 μl der konzentrierten Bakterienkultur auf einer Agarplatte mit Antibiotikum (8 Agarplatten mit 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Nalidixinsäure und auf 8 Agarplatten mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Nalidixinsäure) ausplattieren
 - Platten für 2 Tage bei 37°C bebrüten
- Von der restlichen konzentrierten Bakteriensuspension (~0.65 ml) wird eine Verdünnungsreihe in Verdünnungsschritten 1:10 bis zur Verdünnung 10^{-9} hergestellt
 - Zur Herstellung der benötigten Verdünnungsröhrchen stehen jeder Gruppe 50 ml sterile NaCl-Lösung in einem Erlenmeyerkolben und 9 leere sterile Reagenzgläser zur Verfügung.
 - Beachte: Nach dem Ausplattieren von je 0.1 ml der konzentrierten Bakteriensuspension auf insgesamt 16 antibiotikahaltigen Nährmedien stehen nur noch 0.65 ml dieser Suspension zur Verfügung, um eine Verdünnungsreihe herzustellen → 0.5 ml Suspension + 4.5 ml NaCl-Lösung

- Von den Verdünnungen 10^{-6} bis 10^{-9} je 100 µl auf einer antibiotikafreien NA-Platte ausspateln. Es wird eine Doppelbestimmung durchgeführt.
 - Platten für 18 h bei 37°C bebrüten

8.4.3 Donnerstag, 4. Tag

- Die Kolonien auf den antibiotikafreien Platten werden zur KBE-Bestimmung ausgezählt (s. Tab. 8.1). Beim Auszählen darauf achten, dass ALLE Kolonien gezählt werden, d.h. sowohl die großen als auch die ganz kleinen.

8.4.4 Freitag, 5. Tag

- Die Kolonien (große und kleine!) auf den antibiotikahaltigen Platten werden ausgezählt (s. Tab. 8.2)
- Berechnung der Mutationsfrequenz

8.5 ERGEBNISSE (2 Punkte)

Tab. 8.1. Koloniezahlbestimmung: Anzahl KBE auf antibiotikafreien NA-Platten.

Verdünnungsstufe	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
Anzahl der Kolonien				
Mittelwerte				
KBE/ml				

Berechnung der KBE/ml: (5 Punkte)

Tab. 8.2. Mutanten-Selektion: Anzahl antibiotikaresistenter Mutanten auf antibiotikahaltigen NA-Platten.

Platte	Nal 15 µg/ml	Nal 100 µg/ml
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
Durchschnittliche Koloniezahl:		
Mutationsfrequenz:		

(2 Punkte)

Berechnung der Mutationsfrequenz: (5 Punkte)

Allgemeine Formel: Mutationsfrequenz = Mutanten/ml : KBE/ml

8.6 DISKUSSION**(20 Punkte)**

Bitte schließen Sie in die Diskussion die Informationen aus der theoretischen Einführung ein (In welchem Gen liegt bei den Mutanten die Mutation? Warum und wie macht diese Mutation die Bakterien resistent gegenüber dem Antibiotikum? Welche Konzentration an Antibiotikum ist als Mutagen besser geeignet und warum?).

8.7 FRAGEN

- Definieren Sie den Begriff "Mutation". (5 Punkte)
- Was versteht man unter selektierbaren und nicht selektierbaren Mutationen? Nennen Sie je ein Beispiel. (5 Punkte)

- Welche drei möglichen Auswirkungen können Basenpaarsubstitutionen auf den Phänotyp eines Bakteriums haben? Versuchen Sie Ihre Antwort in einem Fließdiagramm darzustellen. **(5 Punkte)**

- Angenommen spontane Mutationen treten mit einer Häufigkeit von 10^{-9} Mutationen pro Basenpaar der DNA pro Generation auf, und ein Gen umfasst 1000 bp. Mit welcher Häufigkeit tritt dann eine spontane Mutation in diesem Gen auf (mit Rechnung)?
(5 Punkte)

9. MHK- UND MBK-BESTIMMUNG VON DESINFEKTIONSMITTELN

Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) und der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) von Desinfektionsmitteln mittels Mikrodilutionsverfahren.

9.1 ZIEL

Ziel des Versuches ist es, die Empfindlichkeit von *Escherichia coli* DSM 13127 gegenüber sieben verschiedenen Desinfektionsmitteln zu bestimmen. Dabei soll eine weitere Methode zur Empfindlichkeitsbestimmung erlernt werden, die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration im Mikrodilutionsverfahren.

9.2 THEORETISCHER HINTERGRUND

Die Bestimmung von antibakteriellen Aktivitäten mit dem Verdünnungstest kann in flüssigen Medien oder auf Agar erfolgen. Beiden Methoden ist gemeinsam, dass das zu testende Desinfektionsmittel dem jeweiligen Medium in einer abgestuften Konzentration (= geometrische Verdünnungsreihen) zugegeben wird. Die desinfektionsmittelhaltigen Verdünnungsreihen sowie eine wirkstofffreie Kontrolle werden mit dem zu untersuchenden Bakterienstamm beimpft und bebrütet. Die niedrigste Konzentration, die das Auswachsen des Inokulums innerhalb von 18 ± 2 h verhindert, wird als **minimale Hemmkonzentration (MHK)** bezeichnet. Die Bakterien können bei dieser Konzentration entweder nur am Auswachsen gehindert (bakteriostatische Wirkung) oder aber bereits abgetötet worden sein (bakterizide Wirkung). Von bakterizider Wirkung wird gesprochen, wenn mindestens 99,9 % des Inokulums abgetötet wurden. Meist ist die **minimale bakterizide Konzentration (MBK)** – sofern das untersuchte Desinfektionsmittel überhaupt eine bakterizide Wirkung besitzt – jedoch höher als die MHK.

MHK und MBK werden von der Größe und der Wachstumsphase des Inokulums sowie der Bebrütungszeit beeinflusst. Auch das verwendete Nährmedium mit seiner Zusammensetzung, seiner Osmolalität und seinem pH-Wert hat Einfluss auf die Ergebnisse. Deshalb wurden nationale und internationale Standardmethoden eingeführt, die einen Vergleich der Ergebnisse aus verschiedenen Instituten und Kliniken zulassen.

9.3 MATERIAL (pro Gruppe, wird teilweise an der Sterilbank bereitgestellt)

- 1 Reagenzglas mit 9 ml 0,9% NaCl-Lösung
- Übernachtkultur von *E. coli* (auf Agar)
- 10 ml 2x konz. Nährbouillon in 20 ml-Reagenzglas
- 7 Desinfektionsmittel
- Mehrkanalpipette und Spitzen (steril)
- 100/200 μ l Kolbenhubpipette mit sterilen Spitzen

- sterile Mikrotiterplatten (mit 96 Kavitäten) inkl. Deckel
- Photometer
- Vortexgerät
- Brutschrank bei 37°C
- Impföse/Impfnadel

9.4 DURCHFÜHRUNG

9.4.1 Mittwoch, 3. Tag

Herstellen einer geeigneten Bakteriensuspension

Diese Arbeiten erfolgen am eigenen Arbeitsplatz bzw. an der Station OD-Messgerät.

- Mehrere Kolonien von *E. coli* werden mit einer abgeflammten Impföse entnommen und in steriler 0,9%iger NaCl-Lösung durch Vortexen suspendiert.
- Die optische Dichte (OD) dieser Lösung wird (bei 600 nm) photometrisch bestimmt. Es wird eine $OD_{600} = 0,2 \pm 0,03$ benötigt. Sollte der Wert bei der ersten Messung zu niedrig liegen, wird noch weiteres Zellmaterial resuspendiert; sollte der Wert zu hoch liegen, wird NaCl-Lösung zugegeben. Es wird solange variiert und wieder photometrisch überprüft bis die richtige OD erreicht ist.
- 100 μL der eingestellten Bakteriensuspension werden in 10 ml 2x konzentrierte Nährbouillon pipettiert.

Die weiteren Arbeitsschritte erfolgen unter der Sterilbank (Vorbereitungsraum). Nur mit der fertigen Bakteriensuspension in 2x Nährbouillon zur Sterilbank kommen!

Herstellen von geometrischen Verdünnungsreihen der verschiedenen Desinfektionsmittel direkt in der Mikrotiterplatte

- Hände und Arbeitsfläche desinfizieren
- Eine sterile Mikrotiterplatte wird vorsichtig der Packung entnommen und auf die desinfizierte Arbeitsfläche unter der Sterilbank gestellt.
- Die Platte am Seitenrand und auf dem Deckel mit dem Namen beschriften.
- Deckel so legen, dass möglichst nur die Kavitäten offen liegen, die man bearbeitet.
- In die ersten Kavitäten (A1 – G1 = Spalte 1) je 100 μl des jeweiligen Desinfektionsmittels pipettieren (für jedes Desinfektionsmittel eine neue Spitze verwenden!). In Kavität H1 100 μl NaCl-Lösung pipettieren (siehe Plattenbelegungsschema).
- In die anderen Kavitäten mit der Mehrkanalpipette je 50 μl sterile NaCl-Lösung pipettieren.
- Mit der Mehrkanalpipette je 50 μl der unverdünnten Desinfektionsmittel aus der ersten Spalte in die zweite Spalte pipettieren. Durch nochmaliges Aufziehen mit der Pipette

werden die 50 µl Desinfektionsmittel und die vorgelegten 50 µl NaCl-Lösung vermischt (→ 1:2 Verdünnung).

- Anschließend, ohne die Spitzen zu wechseln je 50 µl aus der zweiten Spalte in die dritte Spalte pipettieren. Wiederum mischen (→ 1:4 Verdünnung).
- So weiter verfahren, bis Spalte Nr.12 (→ 1:2048 Verdünnung). Aus Spalte 12 je 50 µl raus pipettieren und verwerfen.
- Platte möglichst bedeckt halten während des Vorganges und sofort wieder mit dem Deckel verschließen.

Tab. 9.1. Plattenbelegungsschema (Endkonzentrationen nach Zugabe von jeweils 50 µl Bakterien-suspension (in 2-fach konzentrierter Nährbouillon) zu 50 µl Desinfektionsmittel (DM)).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DM1 1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
B	DM2 1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
C	DM3 1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
D	DM4 1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
E	DM5 1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
F	DM6 1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
G	DM7 1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
H	sterile NaCl	50 µl	—	—	—	—	—	—	—	—	—	→

Verwendete Desinfektionsmittel

- DM1: Sterillium classic pure (Hand-Desinfektionsmittel; 1:10 verdünnt)
- DM2: Bacillol® AF (Flächen-Desinfektionsmittel; 1:10 verdünnt)
- DM3: Korsolex® basic (Instrumenten-Desinfektionsmittel; 1:10 verdünnt)
- DM4: Mucasol (Reinigungsmittel; 1:10 verdünnt)
- DM5: 3,0 % H₂O₂
- DM6: 2,5 % HCl
- DM7: 100 % Ethanol

Zugabe des Inokulums zu den Verdünnungsreihen der Desinfektionsmittel

- Die in 2x konzentrierter Nährbouillon verdünnte Bakteriensuspension wird in eine sterile Plastikwanne gegossen.
- In jede Kavität der Mikrotiterplatte 50 µl der Bakteriensuspension pipettieren (mittels Mehrkanalpipette).
- Platte mit Deckel verschließen. [Der Deckel muss seitlich mit der Gruppennummer beschriftet sein.]
- Für 18 h ± 2 h bei 37°C bebrüten.

9.4.2 Donnerstag, 4. Tag

- Platte auf schwarzen Untergrund stellen und evtl. Deckel abnehmen (Vorsicht: Kontaminationsgefahr) oder die geschlossene Platte von unten gegen Deckenlicht betrachten und auf Trübung ablesen.
- In der Ergebnistabelle die erste Kavität markieren, in der pro Zeile kein Bakterienwachstum (=Trübung) mehr sichtbar ist. Die dazu gehörige Desinfektionsmittelkonzentration (in Prozent) ermitteln und als MHK-Wert angeben.
- Jede Gruppe soll den MBK von einem Desinfektionsmittel bestimmen.
 - Reagenzgläser mit Schrägagar Verdünnungsstufe beschriften.
 - mit der vorher ausgeglühten Impföse aus den nicht bewachsenen Kavitäten Material entnehmen und auf jeweils ein NA-Schrägagarröhrchen aufbringen.
 - Zur positiven Kontrolle auch ein Röhrchen mit Material aus einer bewachsenen Kavität beimpfen.
 - für 24 h bei 37°C bebrüten.

9.4.3 Freitag, 5. Tag

- Die Schrägagarröhrchen auf Bewuchs untersuchen.
- Die Desinfektionsmittelkonzentration (in Prozent), bei der gerade noch kein Wachstum vorliegt, ist als MBK-Wert anzugeben.

9.5 ERGEBNISSE

Tab. 9.2. MHK: Beurteilung des Wachstums (+ = Wachstum; +/- = leichtes Wachstum; O = kein Wachstum).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

(5 Punkte)

Tab. 9.3. MBK: Beurteilung des Wachstums (+ = Wachstum; +/- = leichtes Wachstum; O = kein Wachstum).

DM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

(2 Punkte)

Tab. 9.4. MHK- und MBK-Werte.

DM-Nr.	Desinfektionsmittel	MHK-Wert (%)	MBK-Wert (%)
DM1	Sterillium		
DM2	Bacillol		
DM3	Korsolex		
DM4	Mucasol		
DM5	H ₂ O ₂		
DM6	HCl		
DM7	Ethanol		

(5 Punkte)

9.6 DISKUSSION**(20 Punkte)**

Ist der Versuch auswertbar? Waren die Wachstumskontrollen in Ordnung? Gibt es ein Desinfektionsmittel gegenüber dem *E. coli* besonders empfindlich und eins gegen das es resistent ist?

Wie sind die Desinfektionsmittel in ihrer Wirkung in Bezug auf die praxisrelevanten Konzentrationen einzuschätzen?

9.7 FRAGEN

- Wie wirken bakteriostatische und wie bakterizide Substanzen? (5 Punkte)

- Was versteht man unter der „minimalen Hemmkonzentration“? (5 Punkte)

10. WACHSTUMSKURVE VON *ESCHERICHIA COLI*

10.1 ZIEL

- Erstellung einer Wachstumskurve von *E. coli* DSM 13127
- Verwendung von zwei verschiedenen Methoden zur Bestimmung von bakteriellem Wachstum

10.2 EINLEITUNG

Werden Bakterien in eine Nährlösung eingeimpft, so wachsen sie im Allgemeinen so lange, bis ein Wachstumsfaktor ins Minimum gerät und das Wachstum begrenzt. Werden während dieses Vorgangs keine Nährstoffe zu- oder Stoffwechselprodukte abgeführt, so bezeichnet man das Wachstum in diesem vorgegebenen Lebensraum als statische Kultur.

Das bakterielle Wachstum in einem derartigen „geschlossenen System“ gehorcht Gesetzmäßigkeiten und beinhaltet eine lag-, eine log- oder exponentielle, eine stationäre und eine Absterbephase (Abbildung 10.1). Wenn Bakterien von einer Umgebung in eine andere gebracht werden, müssen sie sich zunächst an die neuen Bedingungen anpassen. Das passiert innerhalb der lag-Phase oder Anlaufphase. Die Dauer der Anlaufphase ist insbesondere von der Vorkultur und dem Alter des Impfmaterials sowie von der Eignung der Nährlösung abhängig. Die anschließende log-Phase ist durch eine konstante minimale Generationszeit charakterisiert. Die Bakterien teilen sich in einer konstanten Rate und die Zeit zwischen den Teilungen erreicht ihr kürzestes Intervall. Die Generationszeit in der log-Phase ist eine für jede Bakterienart spezifische, milieuabhängige Größe. Die stationäre Phase stellt sich ein, wenn die Zellen nicht mehr wachsen, bzw. die Teilungsrate der Zellen ebenso hoch ist wie die Absterberate, so dass die Zellzahl in dieser Phase nahezu konstant bleibt. Neben Substratmangelbedingungen können auch hohe Populationsdichten, Sauerstoffmangel und die Ansammlung von toxischen Stoffwechselprodukten die stationäre Phase einleiten. In der Absterbephase ist die Rate des Zelltodes höher als die Zellteilungsrate, so dass die Anzahl der lebenden Zellen abnimmt.

Um das Wachstum von Bakterien mathematisch zu beschreiben, hilft folgende Überlegung. In einer wachsenden Bakterienkultur nehmen die Zellzahl bzw. die Biomasse exponentiell zu. Da sich jede Bakterienzelle in zwei Tochterzellen aufspaltet, vervielfältigt sich die Anzahl Bakterienzellen mit jeder Generation um den Faktor zwei. Angenommen man beginnt mit nur einer Zelle in der Kultur, so hat man zum Zeitpunkt Null $2^0 = 1$ Zelle, nach einer Generation 2^1 Zellen, nach zwei Generation 2^2 Zellen, usw. Nach n Generationen erhält man also 2^n Zellen. Allerdings teilen sich die Zellen in einer Kultur normalerweise nicht synchron. Das heißt, die Zellzahl, und vor allem die Biomasse, nimmt nicht ruckartig entsprechend den Zweierpotenzen zu, sondern kontinuierlich. Bei kontinuierlichem Zuwachs werden die

Zeitintervalle zwischen zwei Wachstumsphasen unendlich klein, und der Zuwachsfaktor ist nicht mehr 2, sondern nähert sich der Eulerschen Zahl e an, die die Basis der natürlichen Exponentialfunktion bildet.

Bei kontinuierlichem Wachstum wird der momentane Zuwachs (d.h. der Zuwachs in einem unendlich kleinen Zeitintervall) an x (Biomasse, Zellzahl) zu einem Zeitpunkt t geschrieben als dx/dt und hängt von der aktuell vorhandenen Menge an x und der Wachstumsrate μ ab. Er wird beschrieben durch:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad [10.1]$$

Gleichung 10.1 ist eine Differentialgleichung, ihre Lösung wird beschrieben durch

$$x_t = x_0 e^{\mu(t-t_0)} \quad [10.2]$$

Die Zustandsvariable x (Biomasse, Zellzahl) zum Zeitpunkt t , x_t , hängt also von der Zustandsvariablen zum Zeitpunkt Null, x_0 , ab und steht zudem in exponentiellem Zusammenhang mit dem Produkt von Wachstumsrate μ und der Zeit $t-t_0$, die seit Beginn des Wachstums verstrichen ist. Unter Verwendung des natürlichen Logarithmus erhält man

$$\ln(x_t) = \ln(x_0) + \mu(t - t_0) \quad [10.2]$$

Will man aus einem gemessenen Zuwachs die Wachstumsrate bestimmen, kann die logarithmische Form der Gleichung folgendermaßen umgeformt werden:

$$\mu = \frac{\ln(x_t - x_0)}{t - t_0} = \frac{\ln(x_t) - \ln(x_0)}{t - t_0} \quad [10.4]$$

Für die Verdopplungszeit t_d (die Zeit $t-t_0$, für die $x_t/x_0 = 2$ ist) ergibt sich einfach:

$$\mu = \frac{\ln(2)}{t_d} \quad [10.5]$$

bzw. $t_d = \frac{\ln(2)}{\mu} \quad [10.6]$

Dies besagt z.B., dass bei kontinuierlichem Zuwachs die Biomasse bzw. die Zellzahl in einer Kultur sich bei einer Wachstumsrate von 1 h^{-1} bereits nach $\ln(2) = 0.693 \text{ h}$ verdoppelt.

Um das Wachstum in einer Flüssigkultur zu messen, existieren sowohl direkte als auch indirekte Methoden. Eine indirekte Methode ist die Messung der Trübung oder optischen Dichte (OD) der Kultur. Die Messung der Trübung entspricht der Messung von Lichtstreuung durch die in der Suspension vorhandenen Zellen. In diesem Experiment wird ein Photometer genutzt, um das nicht gestreute, transmittierte Licht zu bestimmen. Eine erhöhte Trübung entspricht einer erhöhten Zellzahl. Allerdings gibt diese Methode keinerlei Information über die Anzahl und die Lebensfähigkeit der Zellen. Zur Ermittlung der Anzahl an Zellen und der Lebensfähigkeit der Kultur, sprich der koloniebildenden Einheiten pro Milliliter (KBE/ml), muss ein Aliquot aus der Kultur entnommen und auf einem festen Nährmedium ausplattiert werden.

Nach der Bebrütung können die Kolonien auf der Platte gezählt und die KBE/ml berechnet werden. In der log-Phase kann dann die maximale Wachstumsrate der Kultur nach Gleichung 10.4 und die Verdopplungszeit nach Gleichung 10.6 berechnet werden.

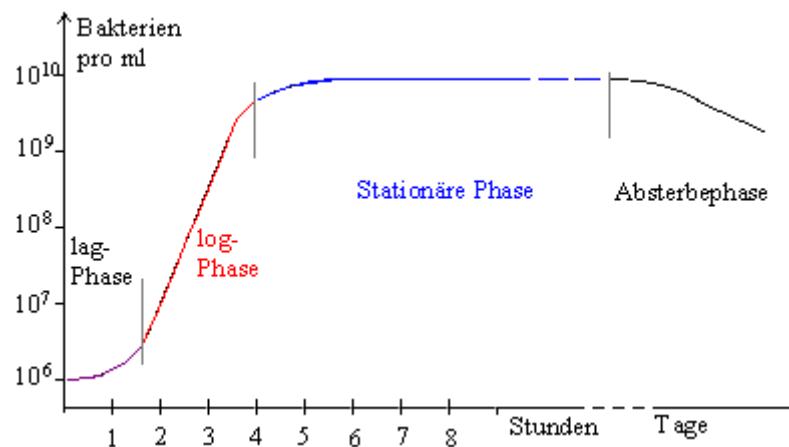


Abb. 10.1. Wachstumskurve einer Bakterienkultur.

10.3 MATERIAL (pro Bank)

- 100 ml LB Medium in 250 ml Erlenmeyerkolben
- 20 ml LB-Medium im Schraubglas (für Nullabgleich)
- Übernacht-Kultur von *E. coli* in LB Medium
- Photometer
- Einweg-Plastikküvetten
- 1 ml Pipette und sterile Spitzen
- 100 μ l Pipette und sterile Spitzen
- 57 x Reagenzgläser mit je 9 mL 0.9% NaCl-Lösung
- 48 x NA-Platten
- Drigalskispatel

10.4 DURCHFÜHRUNG

10.4.1 Donnerstag, 4. Tag

Treffen um 8:45 im Labor! Dieser Versuch wird gemeinsam von einer Laborbank durchgeführt. Bitte auf die Beschriftung aller Gefäße und Platten (Gr., Name, Versuch, Zeitpunkt) achten! Möglichst jeder einzelne Praktikumsteilnehmer macht zu mindestens einem Zeitpunkt alleine eine Verdünnungsreihe und spatelt sie aus. Dieser Versuch muss um 9:00 Uhr noch vor der Vorbesprechung gestartet werden!

Zum Zeitpunkt $t = 0$ h werden 100 ml LB-Medium in einem 250 ml Erlenmeyerkolben mit 1 ml einer Übernacht-Kultur von *E. coli* angeimpft. Anschließend wird die Kultur in einen Schüttelinkubator bei 150 Upm und 37 °C gebracht und das Wachstum von *E. coli* über acht Stunden verfolgt.

Zu den Zeiten $t = 0$ h; 2 h; 3 h; 4 h; 5 h und 6 h (siehe Tabelle 10.2) soll die Anzahl der koloniebildenden Einheiten der Kultur bestimmt werden.

- Dazu wird 1 ml der Kultur steril entnommen und direkt zur Verdünnung in ein mit 9 ml NaCl-Lösung gefülltes Reagenzglas pipettiert
 - Anschließend wird eine Verdünnungsreihe erstellt. Die benötigten Verdünnungsstufen sind Tabelle 10.2 zu entnehmen.
 - Von den entsprechenden Verdünnungen sind jeweils 100 μ l auf NA auszuplattieren. Dabei wird jeweils eine Doppelbestimmung vorgenommen.
- Inkubation 37°C / Übernacht.

Zu den Zeiten $t = 0$ h; 1 h; 1,5 h; 2 h; 2,5 h; 3 h; 3,5 h; 4 h; 4,5 h; 5 h; 5,5 h; und 6 h (siehe Tabelle 10.1) soll die **Trübung** der Kultur bei 600 nm mittels eines Photometers ermittelt werden (Bitte den Umgang mit den Geräten und Küvetten vom Betreuer zeigen lassen).

- Dazu wird 1 ml der Kultur steril entnommen und direkt in eine Plastik-Küvette pipettiert.
- Der gemessene Wert wird in Tabelle 10.1 festgehalten
- Beachte:
 - Ab einer optischen Dichte von $OD = 0,5$ muss die Kultur in LB-Medium verdünnt werden (dezimale Verdünnungen herstellen). Diese Verdünnung stellen Sie bitte direkt in der Küvette her (z.B.: 100 μ l Kultur + 900 μ l LB-Medium = 10^{-1})
 - Gemessen wird gegen steriles LB-Medium (Nullabgleich)
 - Nach der Messung wird die Kulturflüssigkeit aus der Küvette in das am Messgerät stehende Gefäß für Flüssigabfälle entsorgt. Die Küvette wird im Tischautoklavenbeutel entsorgt.

10.4.2 Freitag, 5. Tag

Auswertung der Spatelplatten und Berechnen der KBE.

10.5 ERGEBNISSE

Tab. 10.1. Absorption.

Probenahmezeiten	Uhrzeit	Absorption bei 600 nm
0 h	9:00 Uhr	
1.0 h (Betreuer)		
1.5 h		
2.0 h		
2.5 h		
3.0 h		
3.5 h (Betreuer)		
4.0 h		
4.5 h		
5.0 h		
5.5 h		
6.0 h		

(5 Punkte)

Tab. 10.2. Koloniezahlen pro Verdünnungsstufe.

Probenahmezeiten	Anzahl der Kolonien			KBE/ml
0 h	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	
2 h	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	
3 h	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	
4 h	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	
5 h	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	
6 h	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	

(2 Punkte)

Bitte tragen Sie Ihre Ergebnisse auch in die im Umlauf befindliche Tabelle ein.

- Erstellen Sie ein Diagramm, das den Verlauf der Absorption (1. y-Achse) und den Verlauf der KBE/ml (2. y-Achse, logarithmisch) gegen die Zeit darstellt.
- Bestimmen Sie graphisch die Wachstumsrate und die Verdopplungszeit. **(10 Punkte)**

10.6 DISKUSSION**(20 Punkte)**

Es gibt verschiedene Wege um eine bakterielle Wachstumskurve darzustellen. Ein Weg ist die graphische Darstellung der Absorption gegen die Zeit. Ein anderer Weg ist die Darstellung der logarithmischen Messung der KBE/ml gegen die Zeit.

Diese beiden Methoden ergeben leicht unterschiedliche Wachstumsraten und Verdopplungszeiten. Warum kommen diese zustande?

MIKROBIOLOGISCHE WASSERUNTERSUCHUNGEN: EINFÜHRUNG ZU DEN VERSUCHEN 11 BIS 15 UND VERSUCH 18

Seit über 100 Jahren ist bekannt, dass Krankheitserreger unter bestimmten Umständen durch Trinkwasser in der menschlichen Bevölkerung verbreitet werden können und dadurch die Gefahr von trinkwasserbedingten Epidemien besteht [1]. Die Erkenntnis der Zusammenhänge zwischen wasserbezogenen Gesundheitsgefahren durch Krankheitserreger und der Wasserqualität haben zur Entwicklung von mikrobiologischen Untersuchungsmethoden geführt, die eine hygienische Bewertung des Wassers erlauben und zur Sicherstellung einer einwandfreien Beschaffenheit von Trinkwasser beitragen.

Aus heutiger Sicht gilt als Basis für eine hygienisch sichere und nachhaltige Trinkwasserversorgung das Vorhandensein eines mehrstufigen Qualitätssicherungssystems. Dieses Multi-Barrieren-System besteht aus folgenden Komponenten:

- Konsequenter und nachhaltiger Schutz der Trinkwasserressourcen (Gewässerschutz); diese sind im wesentlichen Grund- und Quellwässer sowie Oberflächenwässer, welche als Rohwasser für die Aufbereitung von Trinkwasser dienen.
- Gewinnung, Aufbereitung, Transport und Verteilung des Trinkwassers nach anerkannten Regeln der Technik. In Deutschland beziehen private Haushalte, kommunale Einrichtungen wie Schulen, Behörden, Krankenhäuser und kleinere Gewerbebetriebe ihr Trinkwasser von mehr als 6.000 Unternehmen der Öffentlichen Wasserversorgung. Fast alle privaten Haushalte sind an Verteilungssysteme der öffentlichen Wasserversorgung angeschlossen; 99 % der Bevölkerung werden auf diesem Weg mit Trinkwasser beliefert.
- Fachgerechte Planung, Einrichtung und fachgerechter Betrieb von Trinkwasser-Installationen in Gebäuden.

Ebenso wichtig ist die staatliche Kontrolle durch Gesundheitsämter. Dazu gehören unter anderem regelmäßige Untersuchungen der physikalischen, chemischen und mikrobiologischen Beschaffenheit des Wassers durch amtlich zugelassene Untersuchungsstellen.

Für unterschiedliche Wasserarten bzw. je nach Nutzung des Wassers existieren verschiedene nationale und internationale Regelungen hinsichtlich der Anforderungen an die physikalische, chemische und mikrobiologische Qualität der jeweiligen Wässer wie z. B. für Trinkwasser oder Badegewässer.

Für den Bereich des Trinkwassers gilt in Deutschland die Trinkwasserverordnung ("Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch ") [2]; sie dient zugleich der Umsetzung der Europäischen Richtlinie 98/83/EG des Rates über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch vom 3. November 1998 [3]. In der Trinkwasserverordnung sind spezielle Anforderungen an die Beschaffenheit des Trinkwassers

und des Wassers für Lebensmittelbetriebe sowie an die Trinkwasseraufbereitung festgeschrieben. Die Trinkwasserverordnung enthält Bestimmungen über die Beschaffenheit des Trinkwassers, die Pflichten des Betreibers einer Wasserversorgungsanlage und die Überwachung des Betreibers durch Gesundheitsämter in hygienischer Hinsicht. In der Trinkwasserverordnung sind Grenzwerte für hygienisch-relevante Mikroorganismen (z. B. *Escherichia coli*, coliforme Bakterien, Enterokokken) und gesundheitsschädliche Stoffe (z. B. Schwermetalle, Nitrat, organische Verbindungen) sowie Umfang und Häufigkeit von Wasseruntersuchungen festgeschrieben. Die Grenzwerte für mikrobiologische, chemische und physikalische Parameter in der Trinkwasserverordnung sind so ausgelegt, dass bei lebenslanger Aufnahme des Trinkwassers keine schädlichen Folgen für den Menschen zu erwarten sind.

Neben dem Trinkwasser werden auch natürliche Mineralwässer, Quellwässer und Tafelwässer zum Trinken verwendet. Natürliche Mineralwässer und Quellwässer sind durch ihre Herkunft aus bekannten, unterirdischen und vor Verunreinigungen geschützten Vorkommen charakterisiert. Die Anforderungen an die Beschaffenheit dieser Wässer und die mikrobiologischen Nachweisverfahren zur Untersuchung der Wässer sind in der Mineral- und Tafelwasserverordnung festgelegt [4].

Wasserarten, die zu Freizeitaktivitäten genutzt werden und die prinzipiell zur Übertragung von Infektionskrankheiten führen können, werden ebenfalls hygienisch-mikrobiologisch überwacht. Dazu gehören Schwimm- und Badebeckenwasser und auch Badegewässer. So werden geeignete Oberflächengewässer als freie Badegewässer an Flussläufen, Binnenseen oder im Küstenbereich der Meere genutzt. Um das Erkrankungsrisiko so gering wie möglich zu halten, werden offizielle Badegebiete in Deutschland behördlich auf Länderebene wasserhygienisch überwacht. Grundlage dafür sind entsprechende Landesverordnungen, in denen die Bundesländer die Europäische EU-Richtlinie über die Qualität der Badegewässer (vom 15. Februar 2006) [5] umsetzen. Diese Richtlinie enthält Bestimmungen für die Überwachung, Bewertung und Einstufung von Badegewässern, für die Bewirtschaftung der Badegewässer hinsichtlich ihrer Qualität und für die Information der Öffentlichkeit über die Badegewässerqualität.

Grundvoraussetzung jeder Wasserentnahme für mikrobiologische Untersuchungen ist, dass die entnommene Probe nicht sekundär durch äußere Einflüsse verunreinigt wird. Außerdem soll es sich um repräsentative Proben handeln. Deshalb kommt der Auswahl einer geeigneten Probenahmestelle und der fachgerechten Entnahme der Wasserprobe eine herausragende Bedeutung im Rahmen der mikrobiologischen Wasseranalytik zu. Für die Vorbereitung und Durchführung der Entnahme von Wasserproben für mikrobiologische Untersuchungen existiert eine internationale Norm [6]. In der Praxis werden die Proben nach ihrer Entnahme lichtgeschützt und gekühlt ($5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) ins Labor transportiert. Der Beginn der Untersuchung

im Labor sollte möglichst noch am gleichen Tag innerhalb von maximal 8 Stunden zwischen Entnahme der Wasserproben und Ansatz der Proben erfolgen.

Im Allgemeinen werden im Rahmen von hygienisch-mikrobiologischen Trinkwasseruntersuchungen die Koloniezahlen bei 22 °C und bei 36 °C sowie die Konzentrationen von coliformen Bakterien, *E. coli* und Enterokokken bestimmt, während bei entsprechenden Untersuchungen von Badegewässern lediglich die Konzentrationen von *E. coli* und intestinalen Enterokokken ermittelt werden. Dabei gelten *E. coli* und intestinale Enterokokken als Organismen, die mit großer Wahrscheinlichkeit aus dem Darm von Mensch oder Tier stammen und somit eine entsprechende fäkale Verunreinigung des Wassers anzeigen. Die Nachweismethoden für hygienisch-mikrobiologische Wasseruntersuchungen im Rahmen von gesetzlichen Regelungen sind streng festgelegt. Es handelt sich um Konventionalmethoden, d. h., die mikrobiologischen Parameter sind durch die jeweils vorgeschriebenen Verfahren definiert.

Im Praktikum werden Versuche zum quantitativen Nachweis und zur Identifizierung von hygienisch-relevanten Bakterien in Wasserproben durchgeführt. Es werden Nachweismethoden verwendet, die auf verschiedenen mikrobiologischen Grundtechniken beruhen und für hygienisch-mikrobiologische Wasseruntersuchungen in der Routine der Wasserpraxis üblich sind.

LITERATUR

- [1] Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., Clark, D. P. (2013): Brock Mikrobiologie, 13., aktualisierte Auflage, Pearson. Kapitel 35: Abwasserbehandlung, Wasseraufbereitung und mit dem Wasser übertragene Krankheiten, S. 1487-1512.
- [2] Neufassung der Trinkwasserverordnung (Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch – TrinkwV 2001) vom 10. März 2016. Bundesgesetzblatt Teil I Nr. 12, 16. März 2016, S. 459-491. Zuletzt geändert durch Artikel 1 der Verordnung vom 3. Januar 2018 (Bundesgesetzblatt Teil I Nr. 2, S. 99-114).
- [3] Richtlinie 98/83/EG des Rates über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch vom 3. November 1998. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften Nr. L 330/S. 32 ff.
- [4] Mineral- und Tafelwasser-Verordnung vom 01.08.1984. BGBl. I, S. 1036-1046. Änderung vom 22.10.2014, BGBl. I, S. 1633-1634.
- [5] Richtlinie 2006/7/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 15. Februar 2006 über die Qualität der Badegewässer und deren Bewirtschaftung und zur Aufhebung der Richtlinie 76/160/EWG. Amtsblatt der Europäischen Union L 64/S. S. 37-51.
- [6] DIN EN ISO 19458 (2006): Wasserbeschaffenheit – Probenahme für mikrobiologische Untersuchungen. Beuth Verlag GmbH, Berlin.

11. BESTIMMUNG DER KOLONIEZAHL

11.1 AUFGABE

Die Koloniezahlen von zwei unterschiedlichen Wasserproben (Oberflächenwasser aus der Ruhr, Essener Trinkwasser) sind mit Hilfe des Plättengussverfahrens in Anlehnung an die Methode nach der DIN EN ISO 6222 [1] und DIN EN ISO 8199 [2] zu ermitteln.

11.2 EINFÜHRUNG

Wasser jeglicher Art enthält eine Vielzahl von Mikroorganismen, die aus verschiedenen Quellen stammen; einerseits handelt es sich um Mikroorganismen, deren natürlicher Lebensraum das Wasser ist (autochthone Mikroflora), andererseits können standortfremde (allochthone) Mikroorganismen von außen eingetragen werden, wie zum Beispiel aus dem Boden, der Vegetation oder durch Kläranlagenabläufe. Die Bestimmung ihrer Anzahl gibt nützliche Hinweise für die Beurteilung und die Überwachung der Wassergüte. Natürliche Mischpopulationen von Mikroorganismen enthalten in der Regel sowohl kultivierbare als auch nicht kultivierbare Zellen. Bei der Zählung der Organismen im Mikroskop werden unabhängig von ihrem Zustand alle Zellen erfasst und das Ergebnis wird als **Gesamtzellzahl** bezeichnet. Werden dagegen nur die in bzw. auf geeigneten Nährmedien vermehrungsfähigen Zellen quantifiziert, so wird das Ergebnis als **Lebendzellzahl**, **Keimzahl** oder **Koloniezahl** bezeichnet.

Die **Koloniezahl** im Rahmen von Wasseruntersuchungen kann allgemein definiert werden als die Zahl der mit dem Auge oder mit einer bestimmten Vergrößerung sichtbar werdenden Kolonien, die sich aus einer definierten Wassermenge bei festgelegtem Nährstoffangebot, festgelegter Bebrütungstemperatur und innerhalb einer bestimmten Zeit in oder auf einem Agarnährmedium entwickeln. Es handelt sich um eine kulturelle Methode zur Bestimmung der **Lebendzellzahl**; es wird ermittelt, wie viele Mikroorganismen in einer Probe auf einem Agarnährmedium Kolonien bilden können [3, 4, 5]. Aus diesem Grund wird die Bestimmung der Lebendzellzahl auch als "Bestimmung der Koloniezahl" bezeichnet.

Koloniezahlen können für die Beurteilung der Unversehrtheit von Grundwasservorkommen und der Wirksamkeit der Wasseraufbereitung, wie z. B. der Flockung und der Filtration, und der Desinfektion verwendet werden, und sie geben Hinweise auf die Sauberkeit und die Dichtheit von öffentlichen Trinkwasserverteilungssystemen und von Trinkwasser-Installationen in Gebäuden. Sie können auch dazu benutzt werden, um die Eignung einer Wasserversorgung für die Herstellung von Nahrungsmitteln und Getränken zu beurteilen, bei der das Wasser nur wenige Mikroorganismen enthalten sollte, um zu verhindern, dass das Produkt mit Verderbnisorganismen verunreinigt wird.

Die wesentliche Bedeutung der Koloniezahldeterminierung liegt in der Feststellung von unerwarteten Veränderungen, basierend auf einer häufigen und langfristigen Überwachung des Wassers. Jeder plötzliche Anstieg der Koloniezahldeterminierung kann eine frühe Warnung vor bedenklichen Verunreinigungen sein und erfordert eine sofortige weitergehende Untersuchung. Die Koloniezahldeterminierung einer Wasserprobe gibt somit Auskunft über die allgemeine mikrobielle Belastung und damit über die hygienische Beschaffenheit eines Wassers. Die Verwendung der Koloniezahldeterminierung zur Überwachung der Trinkwasserqualität beruht auf der empirischen Feststellung, dass in Zeiten häufiger Epidemien keine Seuchengefahr bestand, wenn der Ablauf eines Langsamsandfilters weniger als 100 Kolonien pro ml aufwies. Es existieren unterschiedliche Methoden der Koloniezahldeterminierung in Wasserproben [3]. Als Referenzmethode für die Koloniezahldeterminierung in Wasser für den menschlichen Gebrauch wird in der EG-Trinkwasserrichtlinie und entsprechend umgesetzt in der Trinkwasserverordnung ein genormtes Verfahren angegeben (DIN EN ISO 6222) [1]. Es handelt sich um ein festgelegtes Verfahren für den quantitativen Nachweis von kultivierbaren Mikroorganismen im Wasser durch Zählung der Kolonien, die sich auf Hefeextraktagar nach aerober Inkubation bei 36 °C für 44 h ± 4 h und bei 22 °C für 68 h ± 4 h bilden. Kultivierbare Mikroorganismen im Sinne der Norm sind definiert als alle aeroben Bakterien und Pilze (einschließlich Hefen), die unter den angegebenen Kultivierungsbedingungen sichtbare Kolonien bilden. Für die Koloniezahldeterminierung wird das Plattengussverfahren eingesetzt. Bei Verwendung des beschriebenen Verfahrens gilt nach der Trinkwasserverordnung die Anforderung, dass die Koloniezahlen im Trinkwasser keine anormalen Veränderungen (z. B. Anstieg) aufweisen dürfen. Trinkwasser weist in der Regel nicht mehr als einstellige Koloniezahlen in 1 ml auf.

Ein Vorteil der Koloniezahldeterminierung besteht darin, dass es sich um ein arbeitstechnisch einfaches und damit für Routineuntersuchungen geeignetes Verfahren handelt. Der Sinn der Anwendung dieses Verfahrens liegt in der Erfassung risikoreicher Veränderungen der mikrobiologischen Trinkwasserqualität bei der Gewinnung, Aufbereitung und Verteilung von Wasser für den menschlichen Gebrauch.

11.3 MATERIAL

- Glasflaschen mit je ca. 500 ml Ruhrwasser bzw. Trinkwasser (am Versuchstag entnommen)
- Glaspipetten 10 ml
- Kolbenhubpipetten
- sterile Petrischalen aus Polystyrol (92 mm Durchmesser)
- große sterile Reagenzgläser
- steriles Deionat (Verdünnungsmittel)

- Wasserbäder 100 °C und 47 °C
- Hefeextraktagar (pro L Deionat): 6,0 g Trypton (Pepton aus Casein), 3,0 g Hefeextrakt, 15,0 g Agar, pH 7,2; das Medium im 100 °C-Wasserbad lösen, in 12 ml-Portionen in große Reagenzgläser abfüllen, 15 min bei 121 °C autoklavieren und im Wasserbad auf 45 ± 1 °C abkühlen.
- Brutschränke: Kühlbrutschrank 22 °C, Brutschrank 36 °C

11.4 DURCHFÜHRUNG

Montag, 6. Tag:

- visuelle Beschreibung der Wasserproben: z. B. Färbung (farblos – schwach gefärbt – stark gefärbt, Farbton: z. B. gelblich – bräunlich usw.), Trübung (klar – schwach getrübt – stark getrübt); Beobachtungen in Tabelle 11.1 eintragen.
- Vor der Untersuchung: die Wasserproben durch kräftiges Schütteln gründlich mischen, um eine gleichmäßige Verteilung der Mikroorganismen zu erreichen.
- Die Trinkwasserprobe wird unverdünnt eingesetzt. Die Ruhrwasserprobe wird mit steriles Deionat dezimal bis 10^{-3} verdünnt; dazu dreimal je 9 ml steriles Deionat in große Reagenzgläser pipettieren, dann Verdünnungen anlegen: je 1 ml Ruhrwasser zu 9 ml Deionat (= 10^{-1} Verdünnung), nach kurzem Mischen daraus 1 ml in 9 ml Deionat (= 10^{-2} Verdünnung), nach kurzem Mischen daraus 1 ml in 9 ml Deionat (= 10^{-3} Verdünnung)
- von allen Verdünnungsstufen des Ruhrwassers (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) sowie vom Trinkwasser je 4 x 1 ml mit Kolbenhubpipette in sterile Petrischalen pipettieren.
- zügig 12 ml Hefeextraktagar (aus 47 °C-Wasserbad) zugeben und die Schale zur guten Durchmischung von Wasserprobe und Nähragar vorsichtig in Achterform bewegen.
- Petrischalen ruhig stehen lassen, bis der Agar erstarrt ist (ca. 10-15 min)
- nach Erstarren des Agars jeweils 2 Agarplatten pro Probe und Verdünnung (Doppelansätze) bei 22 °C und bei 36 °C in entsprechenden Brutschränken bebrüten.

Mittwoch, 8. Tag:

Kolonien der bei 22 °C und 36 °C bebrüteten Platten auszählen, dabei ausgezählte Kolonien auf der Plattenunterseite punktförmig mit schwarzem Filzstift markieren und danach Platten weiter bebrüten; Zählergebnisse in Tabelle 11.1 eintragen.

Donnerstag, 9. Tag:

Kolonien der bei 22 °C bebrüteten Platten auszählen; Zählergebnisse in Tabelle 11.1 eintragen.

Anmerkungen zur Zählung

Im Fall der Ruhrwasserprobe werden für die Zählung der Kolonien die Agarplatten mit bis 300 Kolonien berücksichtigt. Liegen Platten mit mehr als 300 Kolonien vor, so werden die Ergebnisse als "> 300" oder nur als Näherungswerte angegeben. Im Fall der Trinkwasserprobe werden alle Kolonien auf allen Agarplatten gezählt.

Anmerkungen zur Berechnung der Ergebnisse

Es wird angenommen, dass jede Kolonie aus einer Zelle oder aus einer einzelnen Ansammlung von Zellen hervorgegangen ist. Daher wird das Ergebnis als Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE), bezogen auf das Volumen der unverdünnten Wasserprobe (1 ml), angegeben.

Ruhrwasserprobe

Im Fall der Ruhrwasserprobe werden für die Berechnung alle Koloniezahlen zwischen 10 und 300 pro Platte berücksichtigt. Aus den Ergebnissen der Zählungen wird die Anzahl der KBE je ml der Wasserprobe für jeden Tag und jede Inkubationstemperatur folgendermaßen errechnet: $KBE/ml = Z/V_{tot}$

Z : die Summe aller gezählten Kolonien auf den Platten mit 10 bis 300 Kolonien

V_{tot} : das berechnete Gesamtvolumen der Originalwasserprobe in den ausgezählten Platten

Rechenbeispiel:

Verdünnung	Zählungen
10^{-2}	81 Kolonien (1. Platte) und 102 Kolonien (2. Platte)
10^{-3}	11 Kolonien (1. Platte) und 15 Kolonien (2. Platte)

Berechnung:

$$Z = 81 \text{ KBE} + 102 \text{ KBE} + 11 \text{ KBE} + 15 \text{ KBE} = 209 \text{ KBE}$$

$$V_{tot} = (2 \times 0,01 \text{ ml}) + (2 \times 0,001 \text{ ml}) = 0,022 \text{ ml}$$

Konzentration in der unverdünnten Ruhrwasserprobe = $209 \text{ KBE} / 0,022 \text{ ml} = 9.500 \text{ KBE/ml}$
 $(9,5 \times 10^3 \text{ KBE/ml})$

Trinkwasserprobe

Es wird der arithmetische Mittelwert der Anzahl Kolonien auf den jeweils zwei Platten pro Inkubationstemperatur für jeden Tag berechnet. Er entspricht den KBE/ml in der unverdünnten Trinkwasserprobe.

11.5 ERGEBNISSE

Tabelle 11.1. Koloniezahlen in einer Ruhrwasser- und Trinkwasserprobe in Abhängigkeit von der Bebrütungsdauer und Bebrütungstemperatur. (10 Punkte)

Ruhrwasser
visuelle Beschreibung:

Trinkwasser
visuelle Beschreibung:

11.6 FRAGEN

- Gibt es Unterschiede in den Koloniezahlen bei den Bebrütungstemperaturen von 22 °C und 36 °C? Welche Unterschiede liegen vor? Welche Erklärungen gibt es für die unterschiedlichen Koloniezahlen? **(5 Punkte)**
- Warum unterscheiden sich die Kolonien in ihrer Größe? **(5 Punkte)**
- Wie ist der Unterschied zwischen den Koloniezahlen im Ruhrwasser und im Trinkwasser zu erklären? **(5 Punkte)**
- Welche Information liefert die Methode der Koloniezahldeterminierung hinsichtlich der Mikroorganismen in einer Wasserprobe, und welche Informationen liefert sie nicht? **(5 Punkte)**

11.7 LITERATUR

- [1] DIN EN ISO 6222 (1999): Wasserbeschaffenheit - Quantitative Bestimmung der kultivierbaren Mikroorganismen – Bestimmung der Koloniezahl durch Einimpfen in ein Nähragarmedium, Beuth Verlag GmbH, Berlin.
- [2] DIN EN ISO 8199 (2008): Wasserbeschaffenheit – Allgemeine Anleitung zur Zählung von Mikroorganismen durch Kulturverfahren, Beuth Verlag GmbH, Berlin.
- [3] Feuerpfeil, I. (2008): Koloniezahl. In: Hygienisch-mikrobiologische Wasseruntersuchung in der Praxis. Feuerpfeil, I., Botzenhart, K. (Hrsg.), WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, S. 79-85.
- [4] Bast, E. (2014): Mikrobiologische Methoden. 3. Auflage, Springer Spektrum.
- [5] Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., Clark, D. P. (2013): Brock Mikrobiologie, 13., aktualisierte Auflage, Pearson. Kapitel 5.3: Messung des mikrobiellen Wachstums, S. 178-184.

12. NACHWEIS VON *ESCHERICHIA COLI* UND COLIFORMEN BAKTERIEN MIT DEM VERFAHREN DER FLÜSSIGKEITSANREICHERUNG

12.1 AUFGABE

Zwei unterschiedliche Wasserproben (Ruhrwasser, Trinkwasser) sind durch Flüssigkeitsanreicherung auf die Anwesenheit von *E. coli* und coliformen Bakterien zu untersuchen, welche in einer Bunten Reihe differenziert und identifiziert werden.

12.2 EINFÜHRUNG

Escherichia coli (umgangssprachlich auch als "Fäkalcoli" bezeichnet) und andere coliforme Bakterien (Coliforme; häufig Arten der Gattungen *Citrobacter*, *Enterobacter* und *Klebsiella*) sind gramnegative, unbewegliche oder durch peritrichen Begeißelung bewegliche, nicht-sporenbildende, Cytochromoxidase-negative, stäbchenförmige Bakterien, die den Zucker Lactose aerob und anaerob abbauen können. Lactose kann von coliformen Bakterien durch Gärung unter Säure- und Gasbildung verstoffwechselt werden. Coliforme Bakterien einschließlich *E. coli* gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae* [1].

E. coli kommt in hoher Zahl in Warmblüterfäkalien menschlichen und tierischen Ursprungs vor und zeigt sicher eine fäkale Verunreinigung von Wasser an. Beim Auftreten von anderen coliformen Bakterien als *E. coli* im Wasser ist die Herkunft aus dem Darm von Mensch und Tier ebenfalls möglich; es gibt aber auch sogenannte „Umweltcoliforme“ aus anderen Quellen als vom Menschen oder Tieren, zum Beispiel von Pflanzen oder aus dem Boden. Die Anwesenheit von Coliformen im Trinkwasser wird als eine unerwünschte Verunreinigung bewertet [2]. "Coliforme" ist kein taxonomischer Begriff, sondern eine Bezeichnung der angewandten Bakteriologie. Der Begriff "Coliforme" wird in Abhängigkeit vom Untersuchungsgegenstand (z.B. Trinkwasser, Mineralwasser, Badegewässer) durch entsprechende Nachweisverfahren und gesetzliche Regelungen unterschiedlich definiert [2]. Die Trinkwasserverordnung unterscheidet konventionsgemäß zwischen der Diagnose "*Escherichia coli*" und "coliforme Bakterien" nach festgelegten Nachweismethoden. Nach einer älteren Fassung der Trinkwasserverordnung war Trinkwasser für amtlich vorgeschriebene Analysen von *E. coli* und coliformen Bakterien mittels der Flüssigkeitsanreicherung zu untersuchen. Nach der aktuellen Trinkwasserverordnung ist dieses Verfahren für amtliche Trinkwasseruntersuchungen nicht mehr zugelassen; an seine Stelle sind neue Verfahren getreten, welche in den Praktikumsversuchen Nr. 13 und Nr. 14 vorgestellt werden. Für andere Wasseruntersuchungen (z.B. Untersuchung von Mineral-, Quell- und Tafelwasser) kann das Verfahren der Flüssigkeitsanreicherung allerdings weiterhin verwendet werden. Es handelt sich um ein genormtes Verfahren (DIN 38 411 Teil 6), mit dem der qualitative Nachweis (Anwesenheit oder Abwesenheit) von *E. coli* und coliformen Bakterien in einem bestimmten

Wasservolumen ermittelt wird [3, 4]. Für die Identifizierung von *E. coli* und coliformen Bakterien mit Hilfe dieses Verfahrens sind insgesamt drei Schritte notwendig: 1. Flüssigkeitsanreicherung in Lactose-Pepton-Bouillon, 2. Subkultur auf Endo-Agar, 3. biochemische Identifizierung verdächtiger Einzelkolonien mittels einer sogenannten Bunten Reihe [3, 4, 5].

Im ersten Nachweisschritt erfolgt eine Flüssigkeitsanreicherung der Bakterien aus einer Wasserprobe in Lactose-Pepton-Bouillon, die für maximal $44\text{ h} \pm 4\text{ h}$ bei $36\text{ }^\circ\text{C}$ bebrütet wird. Bei Gas- und Säurebildung in der Kultur werden daraus Einzelkolonieausstriche auf Endo-Agar angelegt, die für 24 h bei $36\text{ }^\circ\text{C}$ bebrütet werden. Verdächtige Bakterienkolonien (fuchsinglänzend, rote und rosarote Kolonien) werden anschließend in der sogenannten Bunten Reihe anhand von 5 Stoffwechselreaktionen differenziert (Tabelle 12.1). Die Bezeichnung "Bunte Reihe" basiert auf den verschiedenen Farbreaktionen, die man zum Nachweis unterschiedlicher Stoffwechseleigenschaften von Bakterien auswertet.

Tabelle 12.1. Reaktionen von *E. coli* und coliformen Bakterien in der Bunten Reihe nach DIN 38411 Teil 6. ^a in Klammern: seltene Reaktionen.

Nachweisreaktion	<i>E. coli</i>	Coliforme
Säure- und Gasbildung in Lactose-Bouillon ($36\text{ }^\circ\text{C}$, 44 h)	+	+
Oxidasereaktion	-	-
Indolbildung in Tryptophan-Bouillon ($36\text{ }^\circ\text{C}$, 24 h)	+	- (+) ^a
Säure- und Gasbildung in Glucose- oder Mannit-Bouillon ($44\text{ }^\circ\text{C}$, 24 h)	+	-
Citratverwertung	-	+ (-) ^a

12.3 MATERIAL

für die Flüssigkeitsanreicherung und Subkultur:

- Glasflaschen mit je ca. 500 ml Ruhrwasser bzw. Trinkwasser (am Versuchstag entnommen)
- sterile Milchflaschen, graduiert (250 ml) mit Durham-Röhrchen (Gärröhrchen)
- doppelt konzentrierte Lactose-Pepton-Bouillon (pro L): 20 g Pepton aus Fleisch, 10 g NaCl, 20 g Lactose, 0,02 g Bromkresolpurpur, pH 7,2; das gelöste Nährmedium zu je 100 ml in die sterilen Milchflaschen abgefüllt
- Endo-Agar (pro L): 10 g Fleischextrakt, 10 g Pepton aus Fleisch, 5 g NaCl, 10 g Lactose, 0,5 g Fuchsin, 2,5 g Natriumsulfit, 20 g Agar, pH 7,0; alternativ: 58 g DEV Endo-Agar als Fertigmedium

für die Bunte Reihe:

- kleine Reagenzgläser mit 1 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung (0,85 %)
- Impfösen
- Kovacs-Indolreagenz (4-Dimethylaminobenzaldehyd, n-Butanol, Salzsäure)
- Teststäbchen zum Cytochromoxidase-Nachweis (Bactident® Oxidase)
- Glucose-Bouillon (pro L): 10 g Pepton aus Fleisch, 3 g Fleischextract, 5 g NaCl, 10 g D-Glucose, 0,02 g Bromkresolpurpur, pH 7,2, alternativ: 28 g DEV Glucose-Bouillon als Fertigmedium; zu je 10 ml in große Reagenzgläser mit Durham-Röhrchen abfüllen
- Lactose-Bouillon (pro L): 10 g Pepton aus Fleisch, 3 g Fleischextract, 5 g NaCl, 10 g Lactose, 0,02 g Bromkresolpurpur, pH 7,2; alternativ: 28 g DEV Lactose-Bouillon als Fertigmedium; zu je 10 ml in große Reagenzgläser mit Durham-Röhrchen abfüllen
- Tryptophanbouillon (pro L): 10 g Pepton aus Fleisch, 1 g DL-Tryptophan, 5 g NaCl, pH 7,2; alternativ: 16 g DEV Tryptophan-Bouillon als Fertigmedium; zu je 10 ml in große Reagenzgläser abfüllen
- Citratagar (pro/L): 0,2 g Ammoniumdihydrogenphosphat, 0,8 g Natriumammoniumhydrogenphosphat, 5 g NaCl, 2 g Natriumcitrat, 0,2 g Magnesiumsulfat, 0,08 g Bromthymolblau, 15 g Agar, pH 6,8; alternativ: 23,5 g SIMMONS-Citratagar als Fertigmedium
- Nähragar (g/L): 10 g Pepton aus Fleisch, 10 g Fleischextract, 5 g NaCl, 15 g Agar, pH 7,3; alternativ: 40 g DEV Nähragar als Fertigmedium
- Brutschrank 36 °C
- Wasserbad 44 °C
- Reinkulturen auf Endo-Agar

Alle Nährmedien werden für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Der Endo-, Citrat- und Nähragar werden in große Petrischalen gegossen.

12.4 DURCHFÜHRUNG

Montag, 6. Tag: Ansatz der Flüssigkeitsanreicherung

- von jeder Wasserprobe (Ruhrwasser, Trinkwasser) 100 ml in eine Milchflasche geben, welche 100 ml doppelt konzentrierte Lactose-Pepton-Bouillon enthält (nicht schütteln!).
- die Ansätze für 24 h und 48 h bei 36 °C im Brutschrank bebrüten.

Dienstag, 7. Tag, und Mittwoch, 8. Tag: Ablesen der Reaktionen der Primärkulturen

- die Ansätze (Primärkulturen) nach 24 h und 48 h auf Trübung durch Bakterienwachstum, auf Gasbildung im Gärröhrchen und an der Flüssigkeitsoberfläche sowie auf Farbumschlag des Indikators Bromkresolpurpur von rot nach gelb (Säurebildung) ablesen.
- Ergebnisse in Tabelle 12.2 eintragen.

Tabelle 12.2. Auswertung der Reaktionen in den Primärkulturen der Flüssigkeitsanreicherung

Probe	Bebrütungs-dauer	Trübung	Farbumschlag (Säurebildung)	Gasbildung
Ruhrwasser	24 h			
	48 h			
Trinkwasser	24 h			
	48 h			

(2 Punkte)

Testprinzip

Trübung der Lactose-Pepton-Bouillon während der Bebrütung zeigt bakterielles Wachstum an. Der Lactoseabbau beginnt mit der Spaltung des Disaccharids Lactose in D-Glucose und D-Galactose durch das bakterielle Enzym β -Galactosidase. Glucose wird zu organischen Säuren (z.B. Lactat, Acetat, Formiat; Säurebildung) vergoren, die wie z.B. das Formiat enzymatisch zu Wasserstoff und Kohlendioxid weiter abgebaut werden (Gasbildung). Die Ansäuerung des Nährmediums wird durch Farbumschlag des Indikators Bromkresolpurpur (Umschlagbereich pH 5,2 – 6,8) von rot nach gelb sichtbar.

Dienstag, 7. Tag: Anlegen von Subkulturen

Zeigt die Kultur keine Gasbildung und keinen Farbumschlag, d. h. keinen Lactoseabbau, so sind in 100 ml des untersuchten Wassers keine *E. coli* und keine Coliformen enthalten (= negativer Befund). Bei Gas- und Säurebildung besteht zunächst der Verdacht auf die Anwesenheit von *E. coli* und/oder Coliformen. Daher muss in weiteren Untersuchungsgängen (Einzelkolonieausstriche aus der Primärkultur auf Endo-Agar, Bunte Reihe) die Anwesenheit dieser Bakterien überprüft werden, um den Verdacht zu bestätigen bzw. zu widerlegen.

Es werden 2 Subkulturen nur aus der Primärkultur mit Ruhrwasser angelegt.

- Mit einer sterilen Impföse aus der bewachsenen Primärkultur des Ruhrwassers Material entnehmen (ausgeglühte und abgekühlte Impföse kurz in die Kultur eintauchen) und damit Einzelkolonieausstriche auf Endo-Agar anlegen (2 Ansätze).

Beim Umgang mit Endo-Agarplatten Schutzhandschuhe tragen!

- die beimpften Endo-Agarplatten für 24 h bei 36 °C bebrüten.

Mittwoch, 8. Tag: Identifizierung von Einzelkolonien durch die Bunte Reihe

Unterschiedliche Kolonietypen auf Endo-Agarplatten sind anhand der Bunten Reihe zu identifizieren, wobei zwischen nicht-coliformen, coliformen und *E. coli*-Bakterien zu differenzieren ist. Es werden vier Kolonien aus der Ruhrwasseruntersuchung differenziert.

- Aussehen der Kolonien der Endo-Agar-Kulturen beschreiben und in Tabelle 12.3 notieren.

Beim Umgang mit Endo-Agarplatten Schutzhandschuhe tragen!

- von den Subkulturen auf Endo-Agar aus der Ruhrwasseruntersuchung viermal je eine Einzelkolonie wenn möglich mit unterschiedlichem Kolonietyp (z. B. metallisch glänzend, rot, rosa) in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung mit einer sterilen Impföse oder einer sterilen Pipette homogen suspendieren; diese 4 Suspensionen dienen zum Anlegen von insgesamt 4 Bunten Reihen wie folgt:
- mit 2-3 Tropfen (0,05 ml) der Bakteriensuspension die Glucose-, die Lactose- und die Tryptophan-Bouillon beimpfen (Ansätze dabei nicht schütteln!).
- mit einer sterilen Impföse die Suspension auf einer Nähragarplatte ausstreichen (Einzelkolonieaustrich).
- mit einer sterilen Impföse die Suspension auf einer Citrat-Agarplatte ausstreichen (ein Ausstrich über die gesamte Platte)
- Bebrütung der Ansätze:
 - a) Lactose-Bouillon, Tryptophan-Bouillon, Nähragar, Citratagar bei 36 °C für 24 h bzw. 44 h (Brutschrank)
 - b) Glucose-Bouillon bei 44 °C für 24 h (Wasserbad)

Tabelle 12.3. Reaktionen von Ruhrwasserisolaten in der Bunten Reihe (5 Punkte)

Reaktion	Isolat Nr. 1	Isolat Nr. 2	Isolat Nr. 3	Isolat Nr. 4
Kolonietyp auf Endo-Agar				
Oxidase-Test				
Lactose-Abbau	24 h			
	48 h			
Indolbildung	24 h			
Glucose-Abbau	24 h			
	24 h			
Citratabbau	48 h			
Ergebnis (<i>E. coli</i> , Coliforme oder Nicht-Coliforme)				

Donnerstag, 9. Tag: Auswertung der Bunten Reihe

Alle Ergebnisse der folgenden Ablesungen in Tabelle 12.3 eintragen:

- von der Nähragar-Platte Einzelkolonien mit einer sterilen Impföse auf einem Oxidase-Teststreifen verreiben; tritt innerhalb von 1 bis 2 min eine blauviolette Färbung ein, gelten die Bakterien als Cytochromoxidase-positiv; tritt keine Verfärbung oder eine gelbliche Färbung auf, so ist der Befund negativ zu bewerten; **die Kulturen auf Nähragar-Platten für Versuch Nr. 18 aufbewahren!**
- die Tryptophan-Bouillon mit Kovacs-Indolreagenz vorsichtig ca. 3 mm hoch überschichten (Reagenz an der Innenwandung des Glases ablaufen lassen, nicht frei in die Kultur eintropfen! **Schutzhandschuhe tragen!**) und für 2 min stehen lassen; wird das gelbe Reagenz an der Oberfläche der Bouillon kirschrot, gelten die Bakterien als Indol-positiv, bleibt das Reagenz gelb als Indol-negativ.
- die Glucose-Bouillon auf Säure- und Gasbildung ablesen; bei Gas- und Säurebildung (Farbumschlag) handelt es sich um Glucose abbauende Bakterien.
- die Lactose-Bouillon auf Säure- und Gasbildung ablesen; bei Gas- und Säurebildung (Farbumschlag) handelt es sich um Lactose abbauende Bakterien; bei fehlender Säure- und/oder Gasbildung, die Ansätze weitere 24 h bei 36 °C bebrüten.
- den Citratagar auf Wachstum und Farbumschlag von grün nach blau ablesen; findet Wachstum und Farbumschlag statt, handelt es sich um Citrat verwertende Bakterien; bei fehlendem Wachstum und Farbumschlag, Platten weitere 24 h bei 36 °C bebrüten

Freitag, 10. Tag: Auswertung der Bunten Reihe (Versuchsende)

- die Lactose-Bouillon erneut auf Säure- und Gasbildung ablesen; bei Gas- und Säurebildung (Farbumschlag) handelt es sich um Lactose abbauende Bakterien.
- den Citratagar erneut auf Bakterienwachstum und Farbumschlag von grün nach blau ablesen; findet Farbumschlag statt, handelt es sich um Citrat verwertende Bakterien
- die untersuchten Bakterien werden entsprechend ihren Reaktionen (Stoffwechselleistungen) anhand der Tabelle 12.4 differenziert und das Ergebnis (*E. coli*, Coliforme oder Nicht-Coliforme) in Tabelle 12.3 eingetragen.

Tabelle 12.4. Differenzierung zwischen (A) *E. coli*/Coliformen und Nicht-Coliformen und (B) zwischen *E. coli* und Coliformen.

A	<i>E.coli</i> /Coliforme	Nicht-Coliforme
Kolonietyp auf Endo-Agar	rote oder metallisch glänzende Kolonien	andere Kolonien
Oxidase-Test auf Nähragar	negativ	positiv
Reaktion in Lactose-Bouillon	Gas und Säure	kein Gas und keine Säure
B	<i>E. coli</i>	Coliforme
Indol-Test in der Tryptophan-Bouillon	positiv	negativ (in den meisten Fällen)
Reaktion in Glucose-Bouillon	Gas und Säure	kein Gas und/oder keine Säure
Wachstum auf Citratagar	keine Citratverwertung	Citratverwertung

Testprinzipien

Endo-Agar: Fuchsin und Natriumsulfit hemmen grampositive Begleitbakterien (*E. coli* und Coliforme sind gramnegativ). Fuchsin wird in den Bakterienkolonien akkumuliert und färbt sie rot (häufig bei Coliformen) oder führt zu metallischem Glanz, wenn Fuchsin auskristallisiert (häufig bei *E. coli*).

Oxidase-Reaktion: Oxidase-Reagenzien enthalten die Verbindungen Tetramethyl- oder Dimethyl-p-phenylenediamin, welche durch die Aktivität des bakteriellen Enzyms Cytochrom C-Oxidase zu einem blau-violetten Reaktionsprodukt reagieren. Im Praktikum werden Oxidase-Teststreifen verwendet, deren Reaktionszone als Oxidase-Reagenz das sogenannte NaDi-Reagenz enthalten, bestehend aus den Verbindungen N, N-Dimethyl-1,4-phenylenediammonium-dichlorid (0,1 µmol) und 1-Naphthol (1,0 µmol). Die Cytochromoxidase-Reaktion dient häufig als ein diagnostisches Merkmal zur Klassifizierung und Identifizierung von Bakterien.

Indolbildung (Tryptophan-Abbau): Die Aminosäure Tryptophan kann von Bakterien, die das Enzym Tryptophanase enthalten, zu Indol, Brenztraubensäure und Ammoniak abgebaut werden. Indol reagiert unter sauren Bedingungen mit 4-Dimethylaminobenzaldehyd zu einem dunkelroten Farbstoff (Abb. 12.1). Da auch noch vorhandenes Tryptophan der Bouillon mit dem Reagenz eine Farbreaktion ergibt, wird Indol selektiv durch das Butanol des Kovacs-Reagenzes aus der Bakteriensuspension extrahiert. Die Farbreaktion tritt daher nur in der Butanolphase (geringere Dichte als Wasser) auf.

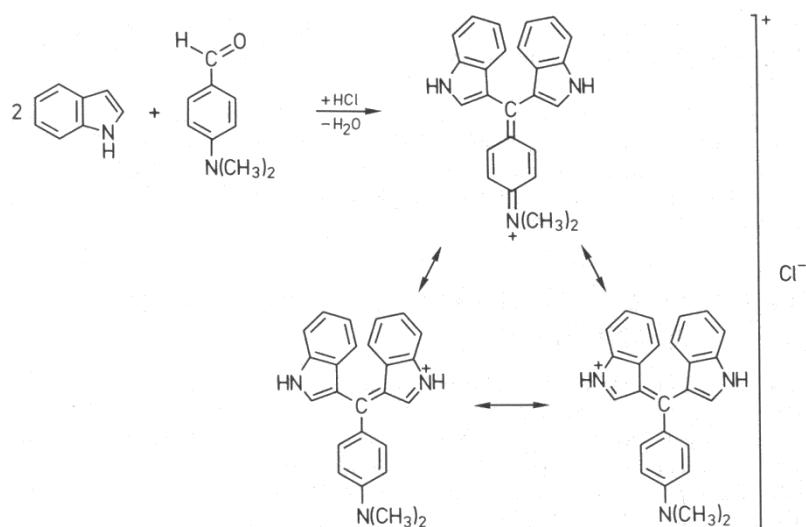


Abb. 12.1. Indolnachweis. 2 Moleküle Indol kondensieren mit 4-Dimethylaminobenzaldehyd unter sauren Bedingungen zum roten Farbstoff Rosindol [4].

Glucose- und Lactoseabbau: Wie in der Lactose-Bouillon als Primärkultur wird die Vergärung von Glucose und Lactose anhand von Säure- und Gasbildung untersucht. Im Gegensatz zu Coliformen ist für *E. coli* charakteristisch, dass diese Bakterien Glucose unter Säure- und Gasbildung bei 44 °C innerhalb von 24 h abbauen. Dieses Merkmal ist das entscheidende Kriterium für die Differenzierung zwischen *E. coli* und Coliformen.

Citratverwertung: In dem verwendeten Nährmedium stellt das Natriumcitrat die einzige Kohlenstoffquelle für Bakterien dar. Wachstum auf Citratagar erfolgt nur durch solche Bakterien, die Citrat als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle verwenden können. Der dabei ansteigende pH-Wert des Nährmediums wird durch den Farbumschlag des Indikators Bromthymolblau (Umschlagbereich pH. 6,0 – 7,6) von grün nach blau angezeigt.

12.6 FRAGEN

- Warum reichen die Merkmale Säure- und Gasbildung in der Primärkultur in Lactose-Bouillon alleine nicht aus, um *E. coli* und Coliforme eindeutig nachzuweisen? (5 Punkte)

- Was versteht man unter "Gärung"? **(5 Punkte)**
- Warum findet in den entsprechenden Bouillons eine Vergärung von Lactose bzw. Glucose unter Säure- und Gasbildung statt und keine vollständige Oxidation (Veratmung) der Zucker? **(5 Punkte)**

12.7 LITERATUR

- [1] Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., Clark, D. P. (2013): Brock Mikrobiologie, 13., aktualisierte Auflage, Pearson. Kapitel 17.3.5: Die Enterobakterien, S. 725-729.
- [2] Anonym (2009): Coliforme Bakterien im Trinkwasser. Empfehlung zur Risikoabschätzung und Maßnahmen bei systemischer Kontamination – Empfehlung des Umweltbundesamtes nach Anhörung der Trinkwasserkommission des Bundesministeriums für Gesundheit beim Umweltbundesamt. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 52, 474-482.
- [3] DIN 38 411 Teil 6: Nachweis von *Escherichia coli* und coliformen Keimen, 1991.
- [4] Schindler, P. (2008): *E. coli*-coliforme Bakterien (einschließlich pathogener Varianten). In: Hygienisch-mikrobiologische Wasseruntersuchung in der Praxis. Feuerpfeil, I., Botzenhart, K. (Hrsg.), WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, S. 85-115.
- [5] Süßmuth, R., Eberspächer, J., Haag, R., Springer, W.: Mikrobiologisch-biochemisches Praktikum. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1999.

13. NACHWEIS VON *ESCHERICHIA COLI* UND COLIFORMEN BAKTERIEN MIT DEM VERFAHREN DER MEMBRANFILTRATION

13.1 AUFGABE

Zwei unterschiedliche Wasserproben (Ruhrwasser, Trinkwasser) sind mit dem Verfahren der Membranfiltration auf die Anwesenheit von *E. coli* und coliformen Bakterien zu untersuchen.

13.2 EINFÜHRUNG

Nach der EG-Richtlinie über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (1998) sowie nach der Trinkwasserverordnung gilt für den Nachweis von *E. coli* und coliformen Bakterien in Trinkwasser ein genormtes Referenzverfahren (DIN EN ISO 9308-1) [1, 2]. Es handelt sich um ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien mit der Methode der Membranfiltration [3] unter Verwendung des Chromogenen Coliformen-Agars. Coliforme gelten als die Summe aller coliformen Bakterien, die nicht *E. coli* sind, und *E. coli*. Das bedeutet, dass zwei Parameter bestimmt werden: 1. coliforme Bakterien einschließlich *E. coli* und 2. *E. coli*.

In diesem Verfahren wird zunächst ein definiertes Volumen (z. B. 100 ml) des zu untersuchenden Wassers durch einen Membranfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert. Die Membran mit den darauf zurückgehaltenen Bakterien wird auf eine Platte mit dem Chromogenen Coliformen-Agar gelegt und die Agarplatten werden dann bei 36 °C für 21 (± 3) Stunden bebrütet. Das Agarnährmedium enthält zwei chromogene Substrate, aus denen nach Spaltung durch das Enzym β -D-Galactosidase ein roter Farbstoff bzw. nach Spaltung durch das Enzym β -D-Glucuronidase ein blauer Farbstoff freigesetzt wird. Rosa bis rote Kolonien werden als β -D-Galactosidase-positiv angesehen und werden als verdächtige coliforme Bakterien gezählt, die nicht *E. coli* sind, während dunkelblaue bis violette Kolonien β -D-Galactosidase- und β -D-Glucuronidase-positiv sind und als *E. coli* gezählt werden. Coliforme Bakterien und *E. coli* sind Cytochromoxidase-negativ. Um im Fall der rosa bis roten, verdächtigen coliformen Bakterien falsch-positive Ergebnisse, die durch Oxidase-positive Bakterien (z. B. *Aeromonas* spp.) verursacht werden können, auszuschließen, müssen verdächtige Kolonien durch eine negative Oxidase-Reaktion bestätigt werden. Dazu wird von rosa bis roten Kolonien direkt ein Oxidase-Test durchgeführt oder es werden zunächst von den verdächtigen Kolonien Subkulturen auf einem nicht selektiven Agarmedium (Trypton-Soja-Agar, CASO-Agar) angelegt, um nach Bebrütung bei 36 °C für 24 Stunden die Oxidase-Reaktion der gewachsenen Kolonien zu bestimmen. Die Gesamtzahl coliformer Bakterien ergibt sich nach diesem Verfahren aus der Summe aller Oxidase-negativen rosa bis roten Kolonien und aller dunkelblauen bis violetten Kolonien; die Menge von *E. coli* entspricht der Anzahl der dunkelblauen bis violetten Kolonien.

Gemäß der Trinkwasserverordnung gilt die Anforderung an Wasser für den menschlichen Gebrauch, dass *E. coli* bzw. coliforme Bakterien in 100 ml Wasser nicht vorhanden sein dürfen (Grenzwerte). Die Anwesenheit von *E. coli* in Trinkwasser ist zu beanstanden, da bei ihrem Nachweis auch mit dem Vorhandensein von Krankheitserregern fäkaler Herkunft zu rechnen ist, z. B. von pathogenen Bakterien wie *Salmonella enterica* oder *Shigella*-Arten.

13.3 MATERIAL

- steriles Deionat
- sterile große Reagenzgläser
- Membranfilter aus Cellulosemischester (Porengröße 0,45 µm)
- Dreifach-Membranfiltrationsanlage aus Edelstahl
- Filterpinzette
- Chromogener Coliformen-Agar (pro L Deionat): 1,0 g enzymatisch verdautes Casein, 2,0 g Hefeextrakt, 5,0 g Natriumchlorid, 2,2 g Natriumdihydrogenphosphat x 2 H₂O, 2,7 g Di-Natriumhydrogenphosphat, 1,0 g Natriumpyruvat, 1,0 g Sorbit, 1,0 g Tryptophan, 0,15 g Natriumheptadecylsulfat (Tergitol® 7), 0,2 g 6-Chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (Salmon-Gal), 0,1 g 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-Glucuronsäure Cyclohexylammoniumsalz-Monohydrat (X-Gluc), 0,1 g Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid, 9 g bis 18 g Agar.
- Trypton-Soja-Agar (CASO-Agar) (pro L Deionat): 15 g Casein (tryptisch verdaut), 5 g Sojapepton, 5 g Natriumchlorid, 15 g Agar
- 36 °C Brutschrank
- Teststäbchen zum Cytochromoxidase-Nachweis (Bactident® Oxidase)

13.4 DURCHFÜHRUNG

Montag, 6. Tag:

- Trinkwasser unverdünnt einsetzen; Ruhrwasser parallel einmal unverdünnt und zweimal verdünnt einsetzen: für die Verdünnung einmal 10 ml steriles Deionat in großes Reagenzglas füllen und 1 ml Ruhrwasser zu den 10 ml Deionat geben, außerdem einmal 10 ml steriles Deionat in großes Reagenzglas füllen und 0,1 ml Ruhrwasser hinzugeben
- Von Trinkwasser 100 ml, von Ruhrwasser 10 ml, 1 ml, und 0,1 ml (mit 10 bzw. 100 ml Deionat verdünnt) in einem Membranfiltrationsgerät durch je einen bakteriendichten Membranfilter (Porengröße 0,45 µm) saugen.
 - Das Membranfiltrationsgerät verfügt über eine Skala, an der die 100 ml direkt abgelesen werden können.

- Bei den Ruhrwasserproben müssen 50 – 100 ml steriles Wasser vorgelegt werden.
- Membranfilter mit Oberseite (Netzgitter) nach oben mit einer Pinzette auf Chromogenen Coliformen-Agar auflegen.
- Platten bei 36 °C für 24 h bebrüten.

Dienstag, 7. Tag:

- Auswertung der Membranfilter: Auszählung a) aller rosa bis roten Kolonien und b) aller dunkelblauen bis violetten Kolonien; Zählergebnisse in Tabelle 13.1 eintragen. Bei den Membranfiltern werden, anders als bei Agarplatten, nur Kolonienzahlen zwischen 10 und 100 ausgewertet.
- Vier rosa bis rote Kolonien von dem Membranfilter eines Ruhrwasser-Ansatzes mit einer sterilen Impföse abnehmen und Einzelkolonieausstriche auf Trypton-Soja-Agar (CASO-Agar) anlegen.
- Bebrütung der vier Platten (Subkulturen) bei 36 °C für 24 h.

Mittwoch, 8. Tag:

- Von den Trypton-Soja-Agarplatten Einzelkolonien mit einer sterilen Impföse auf einem Oxidase-Teststreifen verreiben; tritt innerhalb von 1 bis 2 min eine blauviolette Färbung ein, gelten die Bakterien als Cytochromoxidase-positiv; tritt keine Verfärbung oder eine gelbliche Farbe auf, so ist der Befund negativ. Ergebnisse in Tabelle 13.2 eintragen.
- Alle rosa bis roten **und** alle dunkelblauen bis violetten Kolonien mit negativer Oxidase-Reaktion gelten als **coliforme Bakterien**; alle dunkelblauen bis violetten Kolonien gelten als ***E. coli*** (Tabelle 13.3). Rosa bis rote Kolonien mit positiver Oxidase-Reaktion gelten als nicht-coliforme Bakterien.
- Die Konzentrationen von *E. coli* und coliformen Bakterien pro 100 ml Trinkwasser und pro 100 ml Ruhrwasser (hochgerechnet) in Tabelle 13.4 eintragen.

13.5 ERGEBNISSE

TABELLE 13.1. AUSWERTUNG DER MEMBRANFILTER AUF DEM CHROMOGENEN COLIFORMEN-AGAR

Probe	Filtriertes Volumen (ml)	Rosa bis rote Kolonien (verdächtige coliforme Bakterien)	Dunkelblaue bis violette Kolonien (<i>E. coli</i>)
Trinkwasser	100		
Ruhrwasser	10		
Ruhrwasser	1		

(2 Punkte)

Tabelle 13.2. Differenzierung von rosa bis roten Kolonien (coliforme Bakterien außer *E. coli*)

Kolonie	Oxidase-Reaktion	Coliforme Bakterien
Nr. 1		
Nr. 2		
Nr. 3		
Nr. 4		

(2 Punkte)

Tabelle 13.3. Differenzierungsschema

Koloniefarbe	Oxidase-Reaktion	Bakterien
Rosa bis rot	+	Nicht-coliforme Bakterien
Rosa bis rot	-	Coliforme Bakterien, die nicht <i>E. coli</i> sind
Dunkelblau bis violett	-	<i>E. coli</i>
Rosa bis rot und dunkelblau bis violett	-	Gesamtzahl aller coliformen Bakterien

Tabelle 13.4. Konzentration von coliformen Bakterien und *E. coli* in Trink- und Ruhrwasser

Probe	coliforme Bakterien (KBE/100 ml)	<i>E. coli</i> (KBE/100 ml)
Trinkwasser		
Ruhrwasser		

(5 Punkte)

Testprinzip

Durch die Membranfiltration von Wasserproben werden Bakterienzellen aufgrund der geringen Porengröße (0,45 µm) des Filters zurückgehalten und dadurch auf der Membranoberfläche konzentriert. Die Kultivierung der Bakterien erfolgt auf dem Membranfilter, der auf die Oberfläche des Chromogenen Coliformen Agars (CCA) aufgelegt wurde. CCA ist ein selektives Differentialmedium, das durch die Kombination von zwei chromogenen Substraten die gleichzeitige Detektion, Differenzierung und Auszählung von *E. coli* und coliformen Bakterien in Wasserproben innerhalb von 24 Stunden ermöglicht.

Während der Bebrütung bei 36 °C über 24 Stunden bilden coliforme Bakterien, die nicht *E. coli* sind, auf der Oberfläche der Membranfilter rosa bis rote Kolonien, während *E. coli* dunkelblaue bis violette Kolonien bilden. Die Detektion coliformer Bakterien basiert auf der Spaltung des chromogenen Substrats Salmon-Gal durch das für coliforme Bakterien charakteristische Enzym β-D-Galactosidase, wobei durch den freigesetzten Farbstoff die rosa bis rote Färbung der Kolonien erfolgt. Die Detektion von *E. coli* beruht auf der Spaltung des Substrats X-Gluc durch das Enzym β-D-Glucuronidase und gleichzeitig des Substrats Salmon-Gal durch β-D-Galactosidase. Diese Enzymkombination ist charakteristisch für *E. coli*. Bei Vorliegen von *E. coli* werden beide chromogenen Substrate gespalten und die Kolonien nehmen im Gegensatz zur lachsroten Farbe anderer Bakterienkolonien eine dunkelblaue bis violette Farbe an. Nicht-coliforme Bakterienkolonien sind farblos oder in seltenen Fällen türkisfarben. Die Bestätigung von rosa bis roten Kolonien als coliforme Bakterien erfolgt aufgrund einer negativen Oxidase-Reaktion. Das Testprinzip des Nachweises von Oxidase ist in der Anleitung zum Versuch Nr. 12 "Nachweis von *Escherichia coli* und coliformen Bakterien mit dem Verfahren der Flüssigkeitsanreicherung" beschrieben.

Natriumheptadecylsulfat (Tergitol® 7) im Nährmedium hemmt weitgehend die Gram-positive Begleitflora und auch einige gram-negative Bakterien, hat aber keine negativen Auswirkungen auf das Wachstum von coliformen Bakterien einschließlich *E. coli*.

13.6 FRAGEN

- Wieso können Bakterien auf der Oberseite der Membranfilter zu Kolonien anwachsen? Wo kommen die Nährstoffe für das Wachstum her? **(5 Punkte)**

- Was ist ein Selektivmedium? Wieso handelt es sich bei dem Chromogenen Coliformen-Agar um ein Selektivmedium? **(5 Punkte)**

- Welche zusätzliche Information bietet die Methode der Membranfiltration zum Nachweis von *E. coli* und Coliformen im Vergleich zum Verfahren der Flüssigkeitsanreicherung (Versuch Nr. 12)? **(5 Punkte)**
- Weshalb sind *E. coli* und coliforme Bakterien in Ruhrwasser nachweisbar? **(5 Punkte)**

13.7 LITERATUR

- [1] DIN EN ISO 9308-1 (2014): Wasserbeschaffenheit - Zählung von *Escherichia coli* und coliformen Bakterien - Teil 1: Membranfiltrationsverfahren für Wässer mit niedriger Begleitflora. Beuth Verlag GmbH.
- [2] Lange, B., Strathmann, M., Oßmer, R. (2013) Performance validation of chromogenic coliform agar for the enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. Letters in Applied Microbiology 57, 547-553.
- [3] Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., Clark, D. P. (2013): Brock Mikrobiologie, 13., aktualisierte Auflage, Pearson. Kapitel 26.1.3: Sterilisation durch Filter, S. 1114-1117; Kapitel 35.1.1: Öffentliche Gesundheit und Wasserqualität, S. 1488-1491.

14. NACHWEIS VON *ESCHERICHIA COLI* UND COLIFORMEN BAKTERIEN MIT DEM COLILERT-SYSTEM

14.1 AUFGABE

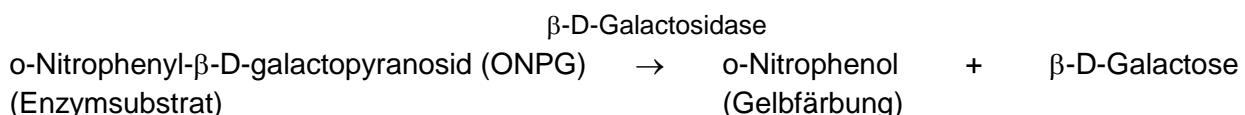
Untersuchung von zwei unterschiedlichen Wasserproben (Ruhrwasser, Trinkwasser) auf coliforme Bakterien und *E. coli* unter Verwendung der Methode Colilert®-18/Quanti-Tray®/2000.

14.2 EINFÜHRUNG

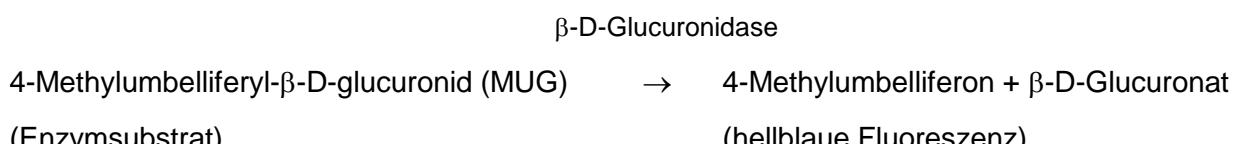
Eine neuere Entwicklung stellen mikrobiologische Schnellmethoden dar, mit denen der gleichzeitige Nachweis von coliformen Bakterien und *E. coli* in einem Untersuchungsschritt möglich ist, ohne dass bestätigende Untersuchungen notwendig sind. Das Testprinzip beruht auf dem Nachweis von art- oder gruppenspezifischen Enzymaktivitäten.

Ein Beispiel ist das kommerziell erhältliche Colilert-Testsystem. Coliforme Bakterien und *E. coli* werden in einer Flüssigkultur über den Nachweis der Enzyme β -D-Galactosidase und β -D-Glucuronidase bestimmt [1, 2]. Das Verfahren beruht auf der patentierten "Defined Substrate Technology®" der Firma IDEXX Laboratories. Zum Nachweis von *E. coli* und coliformen Bakterien werden die Verbindungen o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) und 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (MUG) als sogenannte Indikatornährstoffe verwendet. Es handelt sich um künstliche chromogene bzw. fluorogene Enzymsubstrate, deren Spaltprodukte einerseits die entsprechenden Enzymaktivitäten anzeigen und andererseits als Nährstoffe für das Wachstum der Bakterien zur Verfügung stehen. Coliforme Bakterien bewirken die enzymatische Spaltung des farblosen ONPG in das gelbe o-Nitrophenol und den Nährstoff Galactose durch das spezifische Enzym β -D-Galactosidase; *E. coli* spaltet zusätzlich mit Hilfe des spezifischen Enzyms β -D-Glucuronidase das farblose und nicht fluoreszierende MUG in das fluoreszierende 4-Methylumbelliferon und das Glucuronat.

Nachweis von coliformen Bakterien



Nachweis von *E. coli*



Für die Untersuchung mit dem System Colilert-18 wird die Wasserprobe mit einem abgepackten, pulverförmigen Trockenmedium, welches die Enzymsubstrate enthält, versetzt. Nach Zugabe des Colilert-Reagenzes zur Wasserprobe wird der Ansatz bei 36 °C für 18 Stunden bebrütet. Der Nachweis für coliforme Bakterien ist positiv, wenn die farblose Wasserprobe durch die Freisetzung von o-Nitrophenol aus ONPG gelb gefärbt ist; coliforme Bakterien sind somit in diesem System als β -Galactosidase-positive Organismen definiert. *E. coli* ist zusätzlich über die MUG-Spaltung charakterisiert, nachweisbar am Auftreten einer hellblauen Fluoreszenz in der Wasserprobe durch das abgespaltene 4-Methylumbelliferon unter langwelligem UV-Licht. *E. coli* ist somit definiert über die Bildung von β -D-Galactosidase **und** β -D-Glucuronidase.

Das endgültige Ergebnis liegt mit dieser Methode bereits nach 18 Stunden vor, ohne dass weitere bestätigende Tests notwendig sind. Es wird eine qualitative Aussage über die Anwesenheit bzw. Abwesenheit von coliformen Bakterien und *E. coli* in 100 ml Wasserprobe erhalten. Für quantitative Untersuchungen werden zusätzlich Folienträger, sogenannte "Quanti-Trays", angeboten. Quanti-Tray ist ein mit einer definierten Anzahl Vertiefungen versehenes Foliensystem zum einmaligen Gebrauch, in das eine 100 ml-Wasserprobe, die vorher mit dem Colilert-18-Pulver versetzt wurde, eingefüllt wird. Diese Mischung verteilt sich auf 97 Vertiefungen (System Quanti-Tray/2000), die dann mit einem Versiegelungsgerät verschweißt werden. Nach Bebrütung für 18 Stunden bei 36 °C erfolgt die Ablesung der Anzahl von Vertiefungen mit positiver Reaktion (Gelbfärbung bzw. Fluoreszenz). Die Auswertung der Anzahl von coliformen Bakterien bzw. *E. coli* erfolgt mit dem statistischen Verfahren der "wahrscheinlichsten Keimzahl" ("Most-Probable-Number, MPN"). Über die Anzahl der positiven (gelben bzw. fluoreszierenden) Vertiefungen wird mit Hilfe einer MPN-Tabelle die Konzentration von coliformen Bakterien bzw. *E. coli* in der Wasserprobe ermittelt (zum "Most-Probable-Number"-Verfahren, siehe auch Versuch Nr. 15). In unverdünnten Wasserproben können mit dem System Quanti-Tray/2000 bis zu 2419 MPN/100 ml ermittelt werden.

Die Methode Colilert-18/Quanti-Tray zum quantitativen Nachweis von *E. coli* und coliformen Bakterien in Trinkwasser ist als gleichwertig zum Referenzverfahren (DIN EN ISO 9308-1, Membranfiltration mit Chromogenen Coliformen Agar, siehe Versuch Nr. 13) anerkannt worden. Es wurde vom Umweltbundesamt in Deutschland in die Liste alternativer Testmethoden zum Nachweis von *E. coli* und coliformen Bakterien aufgenommen und kann somit für amtliche Trinkwasseruntersuchungen verwendet werden [3, 4]. Außerdem liegt das Verfahren auch als internationale Norm vor [5].

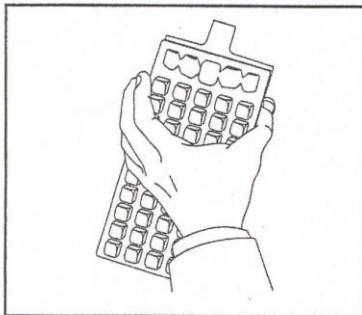
14.3 MATERIAL

- Glasflaschen mit je ca. 500 ml Ruhrwasser bzw. Trinkwasser
- Glasflasche mit ca. 250 ml steriles Deionat
- Sterile 100 ml-Kunststoffgefäße
- Colilert®-18 (Fa. IDEXX GmbH), Trockenmedium (2,8 g) für Wasserproben von 100 ml
- Sterile Folienträger Quanti-Tray/2000® (Fa. IDEXX GmbH)
- Quanti-Tray® Versiegelungsgerät, Modell 2X (Fa. IDEXX GmbH)
- UV-Handlampe (365 nm)
- Sichtkasten für UV-Handlampe
- Vergleichslösung (Farb- bzw. Fluoreszenz-Referenz), Quanti-Tray/2000-Comparator

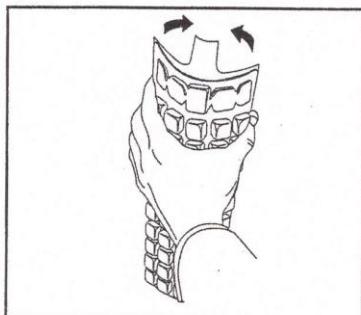
14.4 DURCHFÜHRUNG

Montag, 6. Tag:

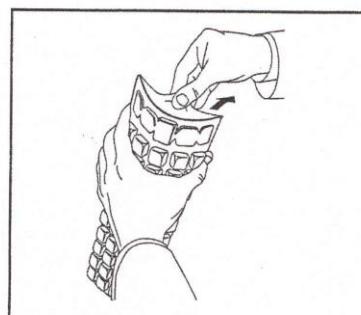
- Insgesamt 3 sterile Kunststoffgefäße mit Trinkwasser bzw. Ruhrwasser befüllen
 - Ansatz Nr. 1: 100 ml Trinkwasser
 - Ansatz Nr. 2: 100 ml Ruhrwasser
 - Ansatz Nr. 3: 10 ml Ruhrwasser in 90 ml steriles Deionat
- Packung Colilert-18-Reagenz beklopfen, um sicherzustellen, dass sich das gesamte Pulver unten in der Ampulle befindet; Ampulle durch Umknicken des Oberteils an der geriffelten Linie öffnen.
- Reagenz vollständig zur Wasserprobe zugeben und Gefäß mit Deckel verschließen.
- Das Gefäß bis zur vollständigen Auflösung des Reagenzes vorsichtig schütteln.
- Die gesamte Lösung vorsichtig in ein steriles Quanti-Tray/2000 gießen (Abb. 14.1). Durch leichtes Klopfen gegen die Quanti-Trays in vertikaler Position werden Luftblasen, die sich in den Vertiefungen angesammelt haben können, ausgetrieben.
- Das mit der Probe gefüllten Quanti-Tray/2000 auf eine Gummi-Trägerunterlage legen und mit einem Quanti-Tray-Versiegelungsgerät verschließen (Abb. 14.1).
- Die Ansätze bei 36 °C für 18 - 22 h im Brutschrank bebrüten.



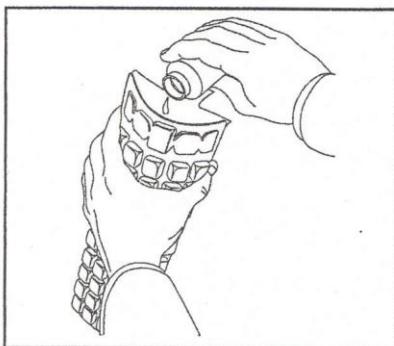
1. Quanti-Tray mit einer Hand fassen und senkrecht halten, wobei die Seite mit den Vertiefungen zur Handfläche zeigt.



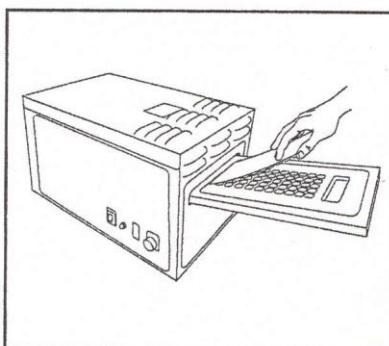
2. Den oberen Teil des Quanti-Trays zusammendrücken, so daß sich der Träger zur Handfläche hin biegt.



3. Quanti-Tray öffnen, indem die Folienlasche von der Seite mit den Vertiefungen abgezogen wird. Die Innenseite der Folie oder des Trays nicht berühren.



4. Die Mischung aus Probe und Reagenz direkt in einen Quanti-Tray gießen. Dabei eine Berührung der Folienlasche vermeiden. Seitlich 2-3 mal an die kleinen Vertiefungen klopfen, um eventuelle Luftblasen zu entfernen. Schaum einwirken lassen.



5. Den mit der Probe gefüllten Quanti-Tray auf die Gummi-Trägerunterlage des Quanti-Tray-Versiegelungsgeräts legen. Die Seite mit den Vertiefungen (Kunststoff) des Quanti-Trays muß dabei nach unten zeigen.

Abb. 14.1. Befüllung des Quanti-Trays

Dienstag, 7. Tag:

- Ablesung der Anzahl gelber und fluoreszierender Vertiefungen (Gelbfärbung: positiver Nachweis für coliforme Bakterien, hellblaue Fluoreszenz: positiver Nachweis für *E. coli*). Die Fluoreszenz wird geprüft, indem die Ansätze mit einer UV-Handlampe in einem Sichtkasten bestrahlt werden. Es ist darauf zu achten, dass das Licht der UV-Handlampe nicht auf die Augen gerichtet wird!
- Gelbfärbung und Fluoreszenz mit Referenzlösung (Comparator) vergleichen: ist die gelbe Farbentwicklung bzw. Fluoreszenz der Probe genauso intensiv oder intensiver als die Vergleichslösung, so ist die Probe positiv für coliforme Bakterien bzw. *E. coli*.

- Auswertung: Zur Angabe des Ergebnisses für coliforme Bakterien werden alle gelbgefärbten Vertiefungen gezählt; zur Angabe von *E. coli* werden alle gelben und fluoreszierenden Vertiefungen gezählt. Aus den MPN-Tabellen Quanti-Tray/2000 (siehe unten) wird die wahrscheinlichste Zahl (MPN/100 ml) für coliforme Bakterien und für *E. coli* abgelesen. In der ersten Spalte der MPN-Tabelle sucht man den Zahlenwert der jeweils positiven großen Vertiefungen und in der entsprechenden waagerechten Zeile den Wert der positiven kleinen Vertiefungen; dort, wo sich die Spalten treffen, ist die wahrscheinlichste Zahl der coliformen Bakterien bzw. für *E. coli* abzulesen.
- Ergebnisse in Tabelle 14.1 eintragen.

# Positiven Großen Vertiefungen	# Positiven Kleinen Vertiefungen																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
0	<1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0	13.0	14.0	15.1	16.1	17.1	18.1	19.1	20.2	21.2	22.2	23.2	24.3
1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.1	9.1	10.1	11.1	12.1	13.2	14.2	15.2	16.2	17.3	18.3	19.3	20.4	21.4	22.4	23.5	24.5	25.6
2	2.0	3.0	4.1	5.1	6.1	7.1	8.1	9.2	10.2	11.2	12.2	13.3	14.3	15.3	16.4	17.4	18.5	19.5	20.6	21.6	22.6	23.7	24.8	25.8	26.9
3	3.1	4.1	5.1	6.1	7.2	8.2	9.2	10.3	11.3	12.4	13.4	14.4	15.5	16.5	17.6	18.6	19.7	20.8	21.8	22.9	23.9	25.0	26.1	27.1	28.2
4	4.1	5.2	6.2	7.2	8.3	9.3	10.4	11.4	12.5	13.5	14.6	15.6	16.7	17.8	18.8	19.9	21.0	22.0	23.1	24.2	25.2	26.3	27.4	28.5	29.6
5	5.2	6.3	7.3	8.4	9.4	10.5	11.5	12.6	13.7	14.7	15.8	16.9	17.9	19.0	20.1	21.2	22.2	23.3	24.4	25.5	26.6	27.7	28.8	29.9	31.0
6	6.3	7.4	8.4	9.5	10.6	11.6	12.7	13.8	14.9	15.9	17.0	18.1	19.2	20.3	21.4	22.5	23.6	24.7	25.8	26.9	28.0	29.1	30.2	31.3	32.4
7	7.4	8.5	9.6	10.7	11.8	12.8	13.9	15.0	16.1	17.2	18.3	19.4	20.5	21.6	22.7	23.8	24.9	26.0	27.1	28.3	29.4	30.5	31.6	32.8	33.9
8	8.6	9.7	10.8	11.9	13.0	14.1	15.2	16.3	17.4	18.5	19.6	20.7	21.8	22.9	24.1	25.2	26.3	27.4	28.6	29.7	30.8	32.0	33.1	34.3	35.4
9	9.8	10.9	12.0	13.1	14.2	15.3	16.4	17.5	18.7	19.8	20.9	22.0	23.2	24.3	25.4	26.6	27.7	28.9	30.0	31.2	32.3	33.5	34.6	35.8	37.0
10	11.0	12.1	13.2	14.3	15.5	16.6	17.7	18.9	20.0	21.1	22.3	23.4	24.6	25.7	26.9	28.0	29.2	30.3	31.5	32.7	33.8	35.0	36.2	37.4	38.6
11	12.2	13.4	14.5	15.6	16.8	17.9	19.1	20.2	21.4	22.5	23.7	24.8	26.0	27.2	28.3	29.5	30.7	31.9	33.0	34.2	35.4	36.6	37.8	39.0	40.2
12	13.5	14.6	15.8	16.9	18.1	19.3	20.4	21.6	22.7	23.9	25.1	26.3	27.5	28.6	29.8	31.0	32.2	33.4	34.6	35.8	37.0	38.2	39.4	40.7	41.9
13	14.8	16.0	17.1	18.3	19.5	20.6	21.8	23.0	24.2	25.4	26.6	27.8	29.0	30.2	31.4	32.6	33.8	35.0	36.2	37.5	38.7	39.9	41.1	42.4	43.6
14	16.1	17.3	18.5	19.7	20.9	22.1	23.3	24.4	25.7	26.9	28.1	29.3	30.5	31.7	33.0	34.2	35.4	36.7	37.9	39.1	40.4	41.6	42.9	44.2	45.4
15	17.5	18.7	19.9	21.1	22.3	23.5	24.7	25.9	27.2	28.4	29.6	30.9	32.1	33.3	34.6	35.8	37.1	38.4	39.6	40.9	42.2	43.4	44.7	46.0	47.3
16	18.9	20.1	21.3	22.6	23.8	25.0	26.2	27.5	28.7	30.0	31.2	32.5	33.7	35.0	36.3	37.5	38.8	40.1	41.4	42.7	44.0	45.3	46.6	47.9	49.2
17	20.3	21.6	22.8	24.0	25.3	26.5	27.8	29.1	30.3	31.6	32.9	34.1	35.4	36.7	38.0	39.3	40.6	41.9	43.2	44.5	45.9	47.2	48.5	49.8	51.2
18	21.8	23.1	24.3	25.6	26.9	28.1	29.4	30.7	32.0	33.3	34.6	35.9	37.2	38.5	39.8	41.1	42.4	43.8	45.1	46.4	47.8	49.1	50.5	51.9	53.2
19	23.3	24.6	25.9	27.2	28.5	29.8	31.1	32.4	33.7	35.0	36.3	37.6	39.0	40.3	41.6	43.0	44.3	45.7	47.1	48.4	49.8	51.2	52.6	54.0	55.4
20	24.9	26.2	27.5	28.8	30.1	31.4	32.8	34.1	35.4	36.8	38.1	39.5	40.8	42.2	43.6	44.9	46.3	47.7	49.1	50.5	51.9	53.3	54.7	56.1	57.6
21	26.5	27.8	29.2	30.5	31.8	33.2	34.5	35.9	37.3	38.6	40.0	41.4	42.8	44.1	45.5	46.9	48.4	49.8	51.2	52.6	54.1	55.5	56.9	58.4	59.9
22	28.2	29.5	30.9	32.3	33.6	35.0	36.4	37.8	39.1	40.5	41.9	43.3	44.7	46.2	47.6	49.0	50.4	51.8	53.4	54.8	56.3	57.8	59.3	60.7	62.2
23	29.9	31.3	32.7	34.1	35.4	36.8	38.2	39.7	41.1	42.5	43.9	45.4	46.8	48.3	49.7	51.2	52.7	54.2	55.6	57.1	58.6	60.2	61.7	63.2	64.7
24	31.7	33.1	34.5	35.9	37.3	38.8	40.2	41.6	43.1	44.6	46.0	47.5	49.0	50.5	51.9	53.4	55.0	56.5	58.0	59.5	61.1	62.6	64.2	65.8	67.3
25	33.5	35.0	36.4	37.9	39.3	40.8	42.2	43.7	45.2	46.7	48.2	49.7	51.2	52.7	54.3	55.8	57.3	58.9	60.5	62.0	63.6	65.2	66.8	68.4	69.9
26	35.5	36.9	38.4	39.9	41.3	42.8	44.3	45.9	47.4	48.9	50.4	52.0	53.5	55.1	56.7	58.2	59.8	61.4	63.0	64.7	66.3	67.9	69.6	71.2	72.9
27	37.4	38.9	40.4	41.9	43.5	45.0	46.5	48.1	49.6	51.2	52.8	54.4	56.0	57.6	59.2	60.8	62.4	64.1	65.7	67.4	69.1	70.8	72.5	74.2	75.9
28	39.5	41.0	42.6	44.1	45.7	47.2	48.8	50.4	52.0	53.6	55.2	56.9	58.5	60.1	61.8	63.5	65.2	67.0	68.6	70.3	72.0	73.7	75.5	77.3	79.0
29	41.6	43.2	44.8	46.4	48.0	49.6	51.2	52.8	54.5	56.1	57.8	59.5	61.2	62.9	64.6	66.3	68.0	69.8	71.5	73.3	75.1	76.9	78.7	80.5	82.3
30	43.9	45.5	47.1	48.7	50.4	52.0	53.7	55.4	57.1	58.8	60.5	62.0	64.0	65.7	67.5	69.3	71.0	72.8	74.7	76.5	78.3	80.2	82.1	84.0	85.9
31	46.2	47.9	49.5	51.2	52.9	54.6	56.3	58.1	59.8	61.6	63.3	65.1	66.9	68.7	70.5	72.4	74.2	76.1	78.0	79.9	81.8	83.7	85.7	87.6	89.6
32	48.7	50.4	52.1	53.8	55.6	57.3	59.1	60.9	62.7	64.5	66.3	68.1	70.0	71.9	73.8	75.7	77.6	79.5	81.5	83.5	85.4	87.5	89.5	91.5	93.6
33	51.2	53.0	54.7	56.5	58.3	60.1	62.0	63.8	65.7	67.6	69.5	71.4	73.3	75.2	77.2	79.2	81.2	83.2	85.2	87.3	89.3	91.4	93.5	95.7	97.8
34	53.9	55.7	57.6	59.4	61.3	63.1	65.0	66.9	70.8	72.8	74.8	76.8	78.8	80.8	82.9	85.0	87.1	89.2	91.4	93.5	95.7	97.9	100.1	102.4	107.3
35	56.8	58.6	60.5	62.4	64.4	66.3	68.3	70.3	72.3	74.3	76.3	78.4	80.5	82.6	84.7	86.6	89.1	91.3	93.5	95.7	98.0	100.1	102.6	105.0	107.3
36	59.8	61.7	63.7	65.7	67.7	69.7	71.7	73.8	75.9	78.0	80.1	82.3	84.5	86.7	88.9	91.2	93.5	95.8	98.1	100.5	102.9	107.7	110.2	112.7	115.9
37	62.9	65.0	67.0	69.1	71.2	73.3	75.4	77.6	79.8	82.0	84.2	86.5	88.8	91.1	93.4	95.8	98.2	100.6	103.1	105.6	108.1	110.7	113.3	115.9	118.6
38	66.3	68.4	70.2	72.4	74.6	76.6	78.9	81.3	83.6	86.0	88.4	90.9	93.3	95.9	98.4	101.0	103.6	106.3	109.0	111.8	114.5	117.4	120.3	123.2	125.0
39	69.9	72.0	74.4	76.6	78.9	81.3	83.6	86.0	88.4	90.9	93.3	95.9	98.4	101.0	103.6	106.3	109.0	111.8	114.5	117.4	120.3	123.2	126.1	129.2	132.2
40	73.8	76.2	78.5	80.9	83.3	85.7	88.2	90.7	93.3	95.9	98.5	101.2	103.9	106.7	109.5	112.4	115.3	118.2	121.2	124.2	127.3	130.5	133.7	137.0	140.3
41	78.0	80.5	83.0	85.5	88.0	90.6	93.3	95.9	98.7	101.4	104.3	107.1	110.0	113.0	116.0	119.1	122.2	125.4	128.7	132.0	135.3	138.8	142.3	145.9	149.5
42	82.6	85.2	87.8	90.5	93.2	96.0	99.0	101.9	105.0	108.1	111.2	114.5	117.6	121.1	124.6	128.1	131.7	135.4	139.1	143.0	147.0	151.0	155.1	159.4	163.8
43	87.6	90.4	93.2	96.0	99.0</td																				

# Positiven Großen Vertiefungen	# Positiven Kleinen Vertiefungen											
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
0	25.3	26.3	27.4	28.4	29.5	30.5	31.5	32.6	33.6	34.7	35.7	36.8
1	26.6	27.6	28.7	29.7	30.8	31.9	32.9	34.0	35.0	36.1	37.2	38.2
2	27.9	29.0	30.0	31.1	32.2	33.2	34.3	35.4	36.5	37.5	38.6	39.7
3	29.3	30.3	31.4	32.5	33.6	34.7	35.7	36.8	37.9	39.0	40.1	41.2
4	30.7	31.7	32.8	33.9	35.0	36.1	37.2	38.3	39.4	40.5	41.6	42.8
5	32.1	33.2	34.3	35.4	36.5	37.6	38.7	39.8	41.0	42.1	43.2	45.5
6	33.5	34.6	35.8	36.9	38.0	39.1	40.3	41.4	42.6	43.7	44.8	46.0
7	35.0	36.2	37.3	38.4	39.6	40.7	41.9	43.0	44.2	45.3	46.5	47.7
8	36.5	37.7	38.9	40.0	41.2	42.3	43.5	44.7	45.9	47.0	48.2	49.4
9	38.1	39.3	40.5	41.6	42.8	44.0	45.2	46.4	47.6	48.8	50.0	51.2
10	39.7	40.9	42.1	43.3	44.5	45.7	46.9	48.1	49.3	50.6	51.8	53.0
11	41.4	42.6	43.8	45.0	46.3	47.5	48.7	49.9	51.2	52.4	53.6	55.7
12	43.1	44.3	45.6	46.8	48.1	49.3	50.5	51.8	53.1	54.3	55.6	57.4
13	44.9	46.1	47.4	48.6	49.9	51.2	52.4	53.7	55.0	56.3	57.6	59.8
14	46.7	48.0	49.3	50.5	51.8	53.1	54.4	55.7	57.0	58.3	59.6	61.9
15	48.6	49.9	51.2	52.5	53.8	55.1	56.4	57.8	59.1	60.4	61.8	64.0
16	50.5	51.8	53.2	54.5	55.8	57.2	58.5	59.9	61.2	62.6	64.0	65.3
17	52.5	53.9	55.2	56.6	58.0	59.3	60.7	62.1	63.5	64.9	66.3	67.7
18	54.6	56.0	57.4	58.8	60.2	61.6	63.0	64.4	65.8	67.2	68.6	70.0
19	56.8	58.2	59.6	61.0	62.4	63.9	65.3	66.7	68.2	69.7	71.1	72.5
20	59.0	60.4	61.9	63.3	64.8	66.3	67.7	69.2	70.7	72.2	73.7	75.2
21	61.3	62.8	64.3	65.8	67.3	68.8	70.3	71.8	73.3	74.9	76.4	78.8
22	63.7	65.3	66.8	68.3	69.8	71.4	72.9	74.5	76.1	77.6	79.1	80.6
23	66.3	67.8	69.4	71.0	72.5	74.1	75.7	77.3	78.9	80.5	82.1	83.7
24	68.9	70.5	72.1	73.7	75.3	77.0	78.6	80.2	81.9	83.6	85.2	86.8
25	71.7	73.3	75.0	76.6	78.3	80.0	81.6	83.3	85.0	86.8	88.5	90.2
26	74.6	76.3	78.0	79.7	81.4	83.1	84.8	86.6	88.4	90.1	91.9	93.7
27	77.6	79.4	81.1	82.9	84.6	86.4	88.2	90.0	91.9	93.7	95.5	97.3
28	80.8	82.6	84.4	86.2	88.1	89.9	91.8	93.7	95.6	97.5	99.4	101.3
29	84.2	86.1	87.9	89.8	91.7	93.6	95.6	97.5	99.5	101.5	103.5	105.5
30	87.8	89.7	91.7	93.6	95.6	97.6	99.6	101.6	103.7	105.7	107.5	109.5
31	91.6	93.6	95.6	97.7	99.7	101.8	103.9	106.0	108.2	110.3	112.5	114.7
32	95.7	97.7	99.9	102.0	104.2	106.3	108.5	110.7	113.0	115.2	117.5	120.5
33	100.0	102.2	104.4	106.6	108.9	111.2	113.5	115.8	118.2	120.5	122.9	125.3
34	104.7	107.0	109.3	111.7	114.0	116.4	118.9	121.3	123.8	126.3	128.8	131.4
35	109.7	112.2	114.6	117.1	119.6	122.1	124.7	127.3	129.9	132.6	135.6	138.0
36	115.2	117.8	120.4	123.0	125.7	128.4	131.1	133.9	136.7	139.5	142.4	145.3
37	121.3	124.0	126.8	129.6	132.4	135.3	138.2	141.2	144.2	147.2	150.3	153.5
38	127.9	130.8	133.8	136.8	139.9	143.0	146.1	149.3	152.6	155.9	159.2	162.6
39	135.3	138.5	141.7	145.0	148.3	151.7	155.1	158.6	162.1	169.4	173.1	177.0
40	143.7	147.1	150.6	154.2	157.8	161.5	165.3	169.1	173.0	177.0	181.1	185.2
41	153.2	157.0	160.9	164.8	168.9	173.0	177.2	181.1	185.8	190.3	194.8	199.5
42	164.3	168.6	172.9	177.3	181.9	186.5	191.3	196.1	201.1	206.2	211.4	216.7
43	177.5	182.3	187.3	192.4	197.6	202.9	208.4	214.0	219.8	225.8	231.8	238.1
44	193.6	199.3	205.0	211.0	217.2	223.5	230.0	236.7	243.6	250.7	258.1	265.6
45	214.1	220.9	227.9	235.1	242.7	250.4	258.4	266.7	275.3	284.1	293.2	302.6
46	241.5	250.0	268.2	277.8	287.7	298.1	308.8	319.9	331.4	343.3	355.5	368.1
47	280.9	292.4	304.4	316.0	330.0	343.6	357.8	372.5	387.7	403.4	419.8	436.6
48	344.1	360.9	378.4	396.8	416.0	436.0	456.9	478.6	501.2	524.7	549.8	574.8
49	461.1	488.4	517.2	547.5	579.4	613.1	648.8	686.7	727.0	816.4	866.4	920.8

14.5 ERGEBNISSE

Tabelle 14.1. Nachweis von coliformen Bakterien einschließlich *E. coli* mit der Methode Colilert-18/Quanti-Tray/2000

Probe	Vertiefungen gelb (groß/klein)	Vertiefungen gelb und Fluoreszenz (groß/klein)	Coliforme Bakterien (MPN/100 ml)	<i>E. coli</i> (MPN/100 ml)
Ruhrwasser 100 ml				
Ruhrwasser 10 ml *				
Trinkwasser				

* bitte bei der MPN-Angabe auf 100 ml Ruhrwasser hochrechnen.

(5 Punkte)

14.6 FRAGEN

- Was versteht man allgemein unter chromogenen und fluorogenen Enzymsubstraten?
(5 Punkte)
- Im Colilert-System spaltet das Enzym β -Galactosidase das künstliche Substrat ONPG. Welches ist das natürliche Substrat der β -Galactosidase? Welche Produkte entstehen bei der enzymatischen Spaltung dieses Substrates?
(5 Punkte)

14.7 LITERATUR

- [1] Schindler, P. (2008): *E. coli* - coliforme Bakterien (einschließlich pathogener Varianten). In: Hygienisch-mikrobiologische Wasseruntersuchung in der Praxis. Feuerfeil, I., Botzenhart, K. (Hrsg.), WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, S. 85-115.
- [2] Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., Clark, D. P. (2013): Brock Mikrobiologie, 13., aktualisierte Auflage, Pearson. Kapitel 35.1.1: Öffentliche Gesundheit und Wasserqualität, S. 1488-1491.
- [3] Anonym (2002): Bekanntmachung des Umweltbundesamtes. Mikrobiologische Nachweisverfahren nach TrinkwV 2001, Liste alternativer Verfahren gemäß § 15 Abs. 1 TrinkwV 2001. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz 45, 1018.
- [4] Anonym (2004): Hinweise zu mikrobiologischen Parametern/Nachweisverfahren nach TrinkwV 2001, Nachtrag zur Liste alternativer Verfahren gemäß § 15 Abs. 1 TrinkwV 2001. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 47, 714-715.
- [5] DIN EN ISO 9308-2 (2014): Wasserbeschaffenheit – Zählung von *Escherichia coli* und coliformen Bakterien - Teil 2: Verfahren zur Bestimmung der wahrscheinlichsten Keimzahl. Beuth Verlag GmbH, Berlin.

15. NACHWEIS VON *ESCHERICHIA COLI* MIT EINEM MIKROTITER-PLATTENVERFAHREN

15.1 AUFGABE

Quantitativer Nachweis von *Escherichia coli* in Ruhrwasser mit einem miniaturisierten Mikrotiterplattenverfahren im Most-Probable-Number-(MPN-)Format.

15.2 EINFÜHRUNG

Oberflächengewässer werden auf vielerlei Wegen mit Fäkalien und damit potenziell mit Krankheitserregern belastet. Dies ist von hygienischer Bedeutung, wenn es sich um freie Badegewässer an Flussläufen, Binnenseen und im Küstenbereich der Meere handelt. Derartige hygienische Probleme werden durch Einleitungen aus Kläranlagen und Mischwasserüberläufen sowie städtische und landwirtschaftliche Oberflächen-abschwemmungen verursacht. In Gebieten mit intensiven Freizeitaktivitäten spielen auch fäkal belastete Schmutzwassereinleitungen aus der Fahrgast- bzw. Freizeitschifffahrt eine Rolle. Ein natürlicher Eintrag erfolgt in geringem Maße durch Wasservögel und andere wildlebende Tiere. Schließlich werden über die Ausscheidungen von den Badenden selbst Krankheitserreger in die Badegewässer eingetragen. Erkrankungen der Badenden können die Folge sein. Diese Erkrankungen äußern sich im Allgemeinen mit Fieber, Durchfall und Erbrechen.

Um das Erkrankungsrisiko so gering wie möglich zu halten, werden offizielle Badegebiete behördlich auf Länderebene überwacht. Grundlage für die Überwachungsprogramme in Deutschland sind die entsprechenden Landesverordnungen, in denen die Bundesländer die EG-Richtlinie über die Qualität der Badegewässer vom 8.12.1975 [1] umgesetzt haben. Die in der EG-Richtlinie festgelegten "zwingenden Werte" (Grenzwerte) und "Leitwerte" (Richtwerte) sind von den Mitgliedsstaaten einzuhalten, um gesundheitliche Probleme beim Baden zu vermeiden oder zu vermindern. Eine Novelle dieser Badegewässerrichtlinie mit veränderten Anforderungen an die Qualität von Badegewässern wurde im Jahr 2006 veröffentlicht [2, 3]. Die Umsetzung dieser neuen Richtlinie hatte durch die Mitgliedsstaaten in Form entsprechender Rechts- und Verwaltungsvorschriften bis zum Jahr 2008 zu erfolgen.

Für die Überwachung von Badegewässern sind in der neuen EU-Badegewässerrichtlinie die mikrobiologischen Parameter *Escherichia coli* und intestinale Enterokokken angegeben; es handelt sich um Parameter, welche einen direkten Bezug zu gesundheitlichen Risiken haben, da sie fäkale Verunreinigungen in Badegewässern anzeigen. Die Einstufung von Badegewässern anhand der mikrobiologischen Parameter erfolgt in 4 Güteklassen (ausgezeichnet, gut, ausreichend, mangelhaft), wobei für Binnengewässer und Küstengewässer unterschiedliche Grenzwerte festgelegt sind (Tabelle 15.1). Die Bewertung der

Qualität eines Badegewässers erfolgt dabei auf Basis der Daten, die insgesamt über 4 Jahre (4 abgelaufene Badesaisons) gewonnen werden.

Tabelle 15.1. Einstufung von Badegewässern anhand der mikrobiologischen Parameter in der neuen EU-Badegewässerrichtlinie [2]

Parameter	Ausgezeichnete Qualität	Gute Qualität	Ausreichende Qualität
Binnengewässer			
Intestinale Enterokokken (KBE/100 ml)	200 ^a	400 ^a	330 ^b
<i>Escherichia coli</i> (KBE/100 ml)	500 ^a	1000 ^a	900 ^b
Küstengewässer und Übergangsgewässer			
Intestinale Enterokokken (KBE/100 ml)	100 ^a	200 ^a	185 ^c
<i>Escherichia coli</i> (KBE/100 ml)	250 ^a	500 ^a	500 ^c

^a auf Grundlage einer 95-Perzentilbewertung; ^b auf Grundlage einer 90-Perzentilbewertung; würde bei einer 95-Perzentilbewertung in etwa den Werten 660 und 1800 entsprechen; ^c auf Grundlage einer 90-Perzentilbewertung; würde bei einer 95-Perzentilbewertung in etwa den Werten 370 und 1000 entsprechen.

Für die Bestimmung der mikrobiologischen Parameter werden in der EU-Badegewässerrichtlinie internationale Normen als Referenzverfahren vorgegeben. Im Praktikumsversuch wird exemplarisch der Nachweis von *E. coli* in Oberflächenwasser durchgeführt. Für *E. coli* werden in der EU-Badegewässerrichtlinie zwei unterschiedliche Referenzverfahren angegeben, welche in den Normen DIN EN ISO 9308-3 [4] und DIN EN ISO 9308-1 [5] festgelegt sind. Bei der Nachweismethode gemäß DIN EN ISO 9308-3 handelt es sich um ein Mikrotiterplattenverfahren, bei der alternativen Methode gemäß DIN EN ISO 9308-1 um ein Membranfiltrationsverfahren (siehe Praktikumsversuch Nr. 13). Im Praktikumsversuch wird das Mikrotiterplattenverfahren eingesetzt; es wird als geeigneter für die Untersuchung von Badegewässern angesehen als das Membranfiltrationsverfahren, welches eher für die Untersuchung von sauberem Trinkwasser zu verwenden ist [3, 6].

Das Mikrotiterplattenverfahren beruht auf einer Flüssigkeitsanreicherung in miniaturisierter Form nach dem MPN-Prinzip [6]. Allgemein handelt es sich bei der MPN-Methode um ein statistisch abgesichertes Schätzverfahren, das z. B. bei der Qualitätskontrolle in der Wasser- und Lebensmittelhygiene benutzt wird. Die unverdünnte Wasserprobe und geeignete Verdünnungen davon werden einer Nährlösung zugesetzt. Um die Sicherheit der berechneten Konzentrationen der Zielorganismen zu erhöhen, werden je nach Ausführung der Methode mehrere Ansätze in Röhrchen bzw. Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gleichzeitig bebrütet (Parallelansätze). Nach Bebrütung werden alle Röhrchen bzw. Vertiefungen auf Trübung

(Wachstum) und auf bestimmte Reaktionen (Gasbildung, Farbentwicklung, Fluoreszenz) abgelesen, die spezifische physiologische Aktivitäten der Bakterien anzeigen. Aus der relativen Häufigkeit der positiven Ansätze kann aus MPN-Tabellen die wahrscheinlichste Zahl der Zielorganismen in der unverdünnten Probe abgelesen bzw. berechnet werden.

Zur Bestimmung von *E. coli* in Badegewässern mit dem Mikrotiterplattenverfahren werden unterschiedlich verdünnte Wasserproben in eine festgelegte Anzahl von Mikrotiterplatten-Vertiefungen gegeben, welche ein getrocknetes Nährmedium enthalten. Das Medium enthält das fluoreszierende Substrat 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronid (MUG), welches während einer Bebrütungsdauer von mindestens 36 h und maximal 72 h bei 44 °C von *E. coli* zu dem hellblau fluoreszierenden 4-Methylumbelliferon und β-D-Glucuronat mit Hilfe des Enzyms β-D-Glucuronidase hydrolysiert wird (Testprinzip siehe auch Versuch Nr. 14). Die Anwesenheit von *E. coli* wird somit durch blaue Fluoreszenz, abgelesen unter UV-Licht bei 366 nm, in den entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterplatten angezeigt. *E. coli* sind mit diesem Verfahren definiert als β-D-Glucuronidase-positive Bakterien, die bei Kultivierung bei 44 °C in dem MUG-haltigen Flüssigmedien wachsen. Im Praktikumsversuch wird mit dem Mikrotiterplattenverfahren die Konzentration von *E. coli* in Ruhrwasser bestimmt.

15.3 MATERIAL

- Ruhrwasserprobe in Glasflasche
- DSM Spezialverdünnungspuffer (Bio-Rad): 22,5 g synthetisches Meersalz pro l Deionat, pH 7,0; autoklaviert und in Portionen zu je 9 ml in große Reagenzgläser abgefüllt
- MU/EC Mikrotiterplatten, *E. coli*, opak (Bio-Rad) mit Trockenmedium MUG/EC
- Zusammensetzung des MUG/EC-Mediums (pro l Deionat): 40 g Trypton, 1 g Salizin, 1 g Triton X 100, 0,1 g 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronid (MUG), pH 6,9
- große Reagenzgläser
- sterile Glaspipetten 10 ml
- 1000 µl Kolbenhubpipette
- Mehrkanalpipette (8-Kanalpipette)
- Sterile Kunststoffwannen
- UV-Handlampe

15.4 DURCHFÜHRUNG

Montag, 6. Tag:

- Anlegen von 2 Verdünnungsstufen (1/2- und 1/20-Verdünnung):
 - Wasserprobe kräftig schütteln und sofort 9 ml der Ruhrwasserprobe zu 9 ml Verdünnungspuffer in Reagenzglas pipettieren (1/2-Verdünnung), diesen Ansatz

schütteln und 1 ml daraus zu einem zweiten Reagenzglas mit 9 ml Verdünnungslösung pipettieren (1/20-Verdünnung).

- Animpfen der Mikrotiterplatte: Es werden 64 Vertiefungen mit der 1/2-Verdünnung und 32 Vertiefungen mit der 1/20-Verdünnung gefüllt.
- Die 1/2-Verdünnung und die 1/20-Verdünnung in sterile Wannen aus Kunststoff überführen und mit einer Mehrkanalpipette mit 8 sterilen Spitzen je 200 µl der 1/2-Verdünnung in 64 Vertiefungen und der 1/20-Verdünnung in 32 Vertiefungen pipettieren.
- die Mikrotiterplatte mit Folie verschließen und bei 44 °C für 2 d bebrüten.

Mittwoch, 8. Tag:

- Ablesung der Vertiefungen auf hellblaue Fluoreszenz mit einer UV-Handlampe (Wellenlänge 366 nm). Alle Vertiefungen mit blauer Fluoreszenz werden als positiv gezählt und für jede Verdünnung wird die Anzahl der positiven Vertiefungen notiert.
- Bestimmung der charakteristischen Zahl; Beispiel:
 - 1/2-Verdünnung 32 positive Vertiefungen von 64
 - 1/20-Verdünnung 5 positive Vertiefungen von 32
 - Daraus ergibt sich als charakteristische Zahl: 32/5
- Mit Hilfe einer im Labor ausliegenden Statistiktafel wird anhand der charakteristischen Zahl die wahrscheinlichste Zahl in "MPN/100 ml" abgelesen. Zusätzlich sind die der wahrscheinlichsten Zahl zugeordneten Werte für die untere Grenze (UG) und obere Grenze (OG) des Konfidenzintervalls von 95 % abzulesen.
- Ergebnisse in Tabelle 15.2 eintragen.

15.5 ERGEBNISSE

Tabelle 15.2. Auswertung der Mikrotiterplatte

Verdünnung	Vertiefungen mit blauer Fluoreszenz
1/2	positive von 64 Vertiefungen
1/20	positive von 32 Vertiefungen
Charakteristische Zahl	
Wahrscheinlichste Zahl (MPN/100 ml)	
Untere Grenze (MPN/100 ml)	
Obere Grenze (MPN/100 ml)	

(2 Punkte)

Testprinzip

Die Fluoreszenz entsteht durch die Spaltung von 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (MUG) und der Freisetzung des mittels seiner Fluoreszenz nachweisbaren 4-Methylumbelliferons. Die Spaltung von MUG wird durch das Enzym β -D-Glucuronidase katalysiert; die Fluoreszenz ist somit ein Nachweis des Enzyms β -D-Glucuronidase, welches unter den Testbedingungen charakteristischerweise von *E. coli* gebildet wird.

Mit der hier durchgeführten Methode erfolgt die Erfassung von *E. coli* (MUG-positiv) mittels MUG-enthaltenden Nährmedien in der Mikrotiterplatte in einem Schritt ohne eine anschließende Differenzierung. Diese Methode wird nach heutigem Kenntnisstand als ein geeignetes Verfahren zur Untersuchung von Badegewässern gemäß der Europäischen Badegewässerrichtlinie [2] angesehen.

15.6 FRAGEN

- Würde es sich bei dem ermittelten Wert für *E. coli* in der untersuchten Ruhrwasserprobe um einen Durchschnittswert über 4 Jahre handeln, wie wäre die Qualität der Ruhr auf Basis dieses Werts nach der EU-Badegewässerrichtlinie einzustufen (siehe Tabelle 15.1)? **(5 Punkte)**
- Welche Komponente ist für den Nachweis der Fluoreszenz in dem Nährmedium zum Nachweis von *E. coli* mit dem Mikrotiterplattenverfahren enthalten? **(5 Punkte)**

- Vergleichen Sie die Konzentrations-Werte für *E. coli* in Ruhrwasser aus diesem Versuch mit den quantitativen Angaben für *E. coli*, welche mit dem Verfahren Colilert-18/Quant-Tray-Verfahren (Versuch Nr. 14) für das Ruhrwasser erhalten wurden. Gibt es deutliche Abweichungen in den Werten? Wenn ja, welche möglichen Erklärungen gibt es dafür?

(5 Punkte)

15.7 LITERATUR

- [1] Richtlinie des Rates über die Qualität der Badegewässer vom 8. Dezember 1975 (76/160 EWG). Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften Nr. I 31/S. 1-7.
- [2] Richtlinie 2006/7/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 15. Februar 2006 über die Qualität der Badegewässer und deren Bewirtschaftung und zur Aufhebung der Richtlinie 76/160/EWG. Amtsblatt der Europäischen Union I 64/S. 37-51.
- [3] Szewzyk, R., Knobling, A. (2007): Umsetzung der neuen EG-Badegewässerrichtlinie in Deutschland. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 50, 354-358.
- [4] DIN EN ISO 9308-3 (1998): Nachweis und Zählung von *Escherichia coli* und coliformen Bakterien in Oberflächenwasser und Abwasser. Teil 3: Miniaturisiertes Verfahren durch Animpfen in Flüssigmedium (MPN-Verfahren). Beuth Verlag GmbH, Berlin.
- [5] DIN EN ISO 9308-1 (2001): Nachweis und Zählung von *Escherichia coli* und coliformen Bakterien. Teil 1: Membranfiltrationsverfahren. Beuth Verlag GmbH, Berlin.
- [6] Schindler, P. (2008): *E. coli*-coliforme Bakterien (einschließlich pathogener Varianten. In: Hygienisch-mikrobiologische Wasseruntersuchung in der Praxis. Feuerfeil, I., Botzenhart, K. (Hrsg.), WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, S. 85-115.

16. AKTIVITÄTSABNAHME EINER BAKTERIENKULTUR

16.1 ZIEL

Mikroorganismen werden in Lebensmitteln, in pharmazeutischen Produkten aber auch in der Umwelt durch verschiedene Bedingungen inaktiviert bzw. gezielt aus ihnen entfernt. In diesem Versuch soll an Bakterienstämmen, die unterschiedliche Temperaturtoleranzen aufweisen, die Inaktivierung durch eine Temperatur von 55 °C mittels Bestimmung der koloniebildenden Einheiten verfolgt werden.

16.2 THEORETISCHE EINFÜHRUNG

Bakterien sind an die unterschiedlichsten und extremen Umweltbedingungen angepasst. So wachsen Bakterien in sehr unterschiedlichen Temperaturbereichen. Es gibt Bakterien, die beispielsweise zwischen -5 °C und 20 °C ihr Wachstumsoptimum haben, sogenannte psychrophile Bakterien, und solche, die in heißen Quellen bei 80 °C bis 110 °C optimale Wachstumsbedingungen vorfinden, sogenannte hyperthermophile Bakterien. Die meisten Boden- und Wasserbakterien ebenso wie humanpathogene Bakterien sind jedoch mesophil; ihr Wachstumsoptimum liegt zwischen 20 °C und 42 °C. Eine Erhöhung der Temperatur über das Temperaturmaximum führt zum Absterben der Zellen, was man sich bei vielen Sterilisationsverfahren zu Nutze macht. Bei welcher Temperatur Bakterien absterben, ist sehr unterschiedlich und hängt u.a. von der optimalen Wachstumstemperatur ab und von der Fähigkeit temperaturresistente Sporen zu bilden. Viele Bakterien reagieren auf eine Erhöhung der Temperatur mit dem Übergang in den sogenannten VBNC-Zustand („viable but non-culturable“). In diesem Zustand leben die Zellen zwar noch, sind aber inaktiv und wachsen somit nicht mehr auf den üblichen Nährmedien zu Kolonien heran.

Endosporen sind Dauerformen bestimmter Bakterienarten. Sie sind dickwandige, ausdifferenzierte Zellen mit einer stark erhöhten Hitzeresistenz. Einige Endosporen vertragen sogar stundenlanges Kochen, wogegen die vegetativen Zellen innerhalb von 10 min bei 80 °C (Pasteurisieren) inaktiviert würden. Zur Bildung von Endosporen ist nur eine kleine Gruppe von Bakterien befähigt. Bis auf eine Ausnahme sind die endosporenbildenden Bakterien stäbchenförmige, Gram-positive Bakterien. Zu den Sporenbildnern zählen unter anderem die Gattungen *Clostridium* und *Bacillus*, deren Vertreter im Boden und Wasser vorkommen. Die Bildung der Sporen wird erst ausgelöst, wenn die Lebensbedingungen ungünstig werden, d.h. wenn zum Beispiel Nährstoffe fehlen, oder wenn sich Stoffwechselprodukte anhäufen. Die Sporenbildung ist einer der kompliziertesten Prozesse der Differenzierung, die eine Bakterienzelle durchmachen kann. Sie beginnt mit einer Anhäufung von proteinhaltigem Material innerhalb der vegetativen Zelle. Anschließend wird die sporenspezifische Substanz Dipicolinsäure gebildet (in vegetativen Zellen kommt diese nicht vor), welche in hohen

Konzentrationen Calcium-Ionen bindet. Außerdem wird eine mehrschichtige Sporenwand gebildet. Sie besteht aus mehreren Hüllen (Sporenrinde = Cortex; Sporenhülle; Polypeptidhülle = Exosporium), die zum Teil von der Mutterzelle und zum Teil von der Spore gebildet werden.

16.3 MATERIAL (pro Bank)

- 32 NaCl-Röhrchen für *P. fluorescens*
- 46 NaCl-Röhrchen für *Bacillus* spp. (jung, d.h. 3 Stunden alt)
- 34 NaCl-Röhrchen für *E. coli*
- 53 NaCl-Röhrchen für *Bacillus* spp. (alt, d.h. ÜN-Kultur)
- NA-Platten (29 für *E. coli*, 32 für *Bacillus* spp. Jung, 33 für *Bacillus* spp. alt, 32 für *P. fluorescens*)
- 100-1000 µl Kolbenhubpipetten inkl. sterile Spalten
- Stoppuhren (1 pro Bank)
- 100 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml Bakterien-Kultur (1 pro Bank)
- 100 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml Wasser (37 °C) als Referenzgefäß für die Temperaturmessung (1 pro Bank)
- Wasserbäder 55 °C
- Thermometer (1 pro Bank)
- Thomakammern

16.4 DURCHFÜHRUNG

Dieser Versuch wird pro Laborbank durchgeführt; jede Laborbank führt diesen Versuch mit nur einem der angegebenen Organismen durch. Dabei soll jede Gruppe zu mindestens einem Zeitpunkt ausplattieren!

Bitte beschriften Sie auch hier alle Platten und Gefäße [Verdünnungsröhrchen: Zeit, Verdünnung; Agarplatten: Gruppennummer, Versuchsnummer, Zeit, Verdünnung, Name des Durchführenden].

Tab. 16.1. Einteilung der Gruppen.

Gruppen in der Laborzeile	Organismus
Laborzeile 1	<i>Bacillus licheniformis</i> alt
Laborzeile 2	<i>E. coli</i> DSM 13127
Laborzeile 3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Laborzeile 4	<i>Bacillus licheniformis</i> (jung)
Laborzeile 5	<i>E. coli</i> DSM 13127

16.4.1 Dienstag, 7. Tag

Vor Versuchsbeginn werden alle Verdünnungsröhrchen und Agarplatten beschriftet (Bitte bei den Agarplatten an die Gruppennummer denken; s. 16.4).

Kulturen von *E. coli*, *P. fluorescens* und *B. licheniformis* (alt) wurden über Nacht in 50 ml Nährbouillon bei 37 °C (*P. fluorescens* bei 30 °C!) angezüchtet, die Kultur *B. licheniformis* (jung) dagegen nur für 3 Stunden. Die Kulturen werden zum Versuchsbeginn in ein Wasserbad mit 55 °C gebracht und folgende Messungen durchgeführt:

- Zum Zeitpunkt des Einbringens ($t=0$), nach 5 Minuten und dann alle 10 Minuten bis 60 Minuten wird die **Temperatur** in den Kulturen gemessen und sofort notiert.
 - Beachte: Die Temperaturmessung erfolgt in einem Referenzgefäß (gleiches Volumen eines Referenzmediums mit gleicher Anfangstemperatur) um Kontaminationen in den Kulturen zu vermeiden.
- Zu den gleichen Zeitpunkten erfolgt die **Bestimmung der Koloniezahl**. Dazu wird zum entsprechenden Zeitpunkt je 1 ml Bakterienkultur entnommen und in ein Reagenzglas mit 9 ml NaCl-Lösung gegeben. Von dieser Probe wird eine Verdünnungsreihe erstellt und von den in der unten stehenden Tabelle aufgeführten Verdünnungsstufen werden je 100 μ l auf einer NA-Platte ausplattiert. Es wird jeweils nur eine Einzelbestimmung durchgeführt (= pro Zeit und Verdünnung nur eine Platte).
 - Anschließend erfolgt die Bebrütung bei 37 °C für 24 h (**Achtung: *P. fluorescens* bei 30 °C!**).
 - Beachte: für jeden Stamm und für die verschiedenen Zeitpunkte werden unterschiedliche Verdünnungsstufen eingesetzt.
- Folgende Verdünnungen sollten ausplattiert werden:

Tab. 16.2. Auszuplattierende Verdünnungen.

Zeit [min]	<i>E. coli</i>	<i>B. licheniformis</i>		<i>P. fluorescens</i>
		jung	alt	
0	$10^{-4} - 10^{-7}$	$10^{-4} - 10^{-7}$		$10^{-4} - 10^{-7}$
5	$10^{-4} - 10^{-7}$	$10^{-4} - 10^{-7}$		$10^{-4} - 10^{-7}$
10	$10^{-4} - 10^{-7}$	$10^{-3} - 10^{-6}$	$10^{-4} - 10^{-7}$	$10^0 - 10^{-3}$
20	$10^{-1} - 10^{-4}$	$10^{-3} - 10^{-6}$	$10^{-4} - 10^{-7}$	$10^0 - 10^{-3}$
30	$10^0 - 10^{-3}$	$10^{-2} - 10^{-5}$	$10^{-3} - 10^{-7}$	$10^0 - 10^{-3}$
40	$10^0 - 10^{-2}$	$10^{-2} - 10^{-5}$	$10^{-3} - 10^{-6}$	$10^0 - 10^{-3}$
50	$10^0 - 10^{-2}$	$10^{-2} - 10^{-5}$	$10^{-3} - 10^{-6}$	$10^0 - 10^{-3}$
60	$10^0 - 10^{-2}$	$10^{-2} - 10^{-5}$	$10^{-3} - 10^{-6}$	$10^0 - 10^{-3}$

- Zum Zeitpunkt $t=0$ soll eine **Gesamtzellzahl-Bestimmung** mittels der Thoma-Zählkammer vorgenommen werden. Es sind 20 c-Felder auszuzählen und die Gesamtzellzahl pro ml aus dem Mittelwert zu berechnen (siehe S. 50 ff.).

- Beachte: Für die Zählung ist eine geeignete Verdünnung der Kultur zu wählen.
- In der Kultur von *B. licheniformis* sollen Sie zudem versuchen, die Anzahl an Endosporen zu bestimmen. Die Endosporen unterscheiden sich im Phasenkontrast (100x Objektiv, Immersionsöl benutzen!) aufgrund ihrer Zellwandverdickung deutlich von den vegetativen Zellen (s. Abb. 16.1). Nutzen Sie einen normalen Objektträger mit Deckglas, um das Verhältnis von vegetativen Zellen und Endosporen in der Kultur zu bestimmen, und berechnen sie die absoluten Konzentrationen beider Zelltypen mit Hilfe der Werte, die Sie mit der Thomakammer bestimmt haben.



Abb. 16.1. *Bacillus licheniformis* im Phasenkontrast (1000fache Vergrößerung). Vegetative Zellen sind länglich und schmal und erscheinen dunkel, Endosporen sind kürzer und runder und erscheinen durch die veränderte Lichtbrechung hell (Bildquelle: Herbert Seiler, Foto-Bibliothek für lebensmittelassoziierte aerobe Sporenbildner; <http://www.micbio.wzw.tum.de/cms/docs/Stammsammlung/Foto%20Bibliothek%20Bacillus.pdf>).

16.4.2 Mittwoch, 8. Tag

- Auszählen der KBE
- Berechnung der KBE/ml Kultur
- Berechnung der Absterberaten

16.5 ERGEBNISSE

Der Versuch wurde mit dem Organismus _____ durchgeführt.

(2 Punkte)

Tab. 16.3. Temperaturmessung

Zeit [min]	Temperatur [°C]
0	
5	
10	
20	
30	
40	
50	
60	

(2 Punkte)

Tab. 16.4. Gesamzellzahlbestimmung bei $t = 0$.

c-Feld	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Anzahl der Zellen																				
Mittelwert																				
Gesamzellzahl/ml																				

(2 Punkte)

Tab. 16.5. Koloniezahldeterminierung.

	0 min	5 min	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
10^0								
10^{-1}								
10^{-2}								
10^{-3}								
10^{-4}								
10^{-5}								
10^{-6}								
10^{-7}								

(2 Punkte)

Tab. 16.6. Aus den Koloniezahlen berechnete KBE/ml.

Zeit [min]	KBE/ml
0	
5	
10	
20	
30	
40	
50	
60	

(5 Punkte)

Bestimmung der Absterberate und der Dezimalreduktion

Aus der Gleichung $S = S^0 \times e^{-kt}$ soll die exponentielle Absterberate k berechnet werden. Dabei ist S^0 = Anzahl der KBE zum Zeitpunkt 0, S = Anzahl der KBE zu einer beliebigen Zeit, t = Zeit.

Durch Umwandlung der Formel erhalten wir

$$-k = \frac{2.303 \times \log(S/S^0)}{t} [\text{min}^{-1}]$$

Unter Zuhilfenahme der Formel

$$\log S = \frac{-k}{2.303} \times t + \log S^0$$

kann die Absterberate k auch graphisch aus der Steigung der Geraden (Geradengleichung!) ermittelt werden.

Die Halbwertszeit wird aus der folgenden Formel berechnet:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} [\text{min}^{-1}]$$

Achtung: Alle Berechnungen können nur in dem Zeitraum durchgeführt werden, in dem die grafische Darstellung der Abhängigkeit der KBE von der Zeit bei halblogarithmischer Auftragung eine Gerade ergibt. Für den Wert S sollte hier ein Zeitpunkt aus den Ergebnissen ausgewählt werden, der geeignet und repräsentativ erscheint. Die Rechnung muss keineswegs für alle Zeitpunkte der Messung durchgeführt werden!

Die Halbwertszeit kann ebenfalls graphisch dargestellt werden. Tragen Sie die ermittelten KBE in Abhängigkeit von der Zeit und die gemessenen Temperaturen in die Tabelle ein.

Stellen Sie die Ergebnisse graphisch dar (Excel benutzen!), indem Sie den \log KBE/ml (S) gegen die Zeit (t) auftragen. Ermitteln Sie k (graphisch und rechnerisch) und $t_{1/2}$ (graphisch und rechnerisch).

Anstelle der Absterberaten kann zur Kennzeichnung der Inaktivierung auch der sogenannte D-Wert (Dezimalreduktionswert) angegeben werden, d.h. die Zeit, welche zur Inaktivierung von 90% der Zellen notwendig ist.

Geben Sie anhand Ihrer Daten den experimentellen D-Wert für die jeweilige Kultur an.

Vergleichen Sie Ihre Ergebnisse mit den Ergebnissen der anderen Gruppen und diskutieren Sie die Gesamtergebnisse.

Damit ein Ergebnisvergleich im Diskussionsteil möglich ist, erhalten Sie die Ergebnisse aller Gruppen; verwenden Sie die Mittelwerte (ohne Ausreißer).

Tab. 16.7. Gesamtergebnisse aller Praktikumsteilnehmer.

Zeit [min]	KBE/ml		
	<i>E. coli</i>	<i>B. licheniformis</i> jung ...	<i>P. fluorescens</i>alt
0			
5			
10			
20			
30			
40			
50			
60			

(2 Punkte)

Dieser Teil der Auswertung soll selbstständig durchgeführt werden. Platz dafür steht auf den nächsten drei Seiten zur Verfügung. Bitte keine losen Blätter einlegen! Diagramme ausdrucken und einkleben.

(30 Punkte)

16.6 DISKUSSION**(20 Punkte)**

Bitte schließen Sie in Ihre Diskussion auch die Informationen aus der theoretischen Einführung ein.

Anregung: Welcher der untersuchten Bakterienstämme ist der thermotoleranteste? Warum?

16.7 FRAGEN

- Was versteht man bei Bakterien unter einer Endospore und welche Funktion hat sie?
(5 Punkte)

- Warum sind Endosporen resistent gegen Hitze?
(5 Punkte)

- Warum sind Endosporen schon im Phasenkontrastmikroskop ohne vorherige Kontrastfärbung zu erkennen? **(5 Punkte)**

- Wieso kann bei diesem Versuch nicht ohne Weiteres von einem **Absterbevorgang** gesprochen werden? **(5 Punkte)**

17. HYGIENE IM ALLTAG

17.1 ZIEL

Ziel des Versuches ist es, das Vorhandensein und das Spektrum der im Haushalt und der täglichen Umgebung vorkommenden Keime kennenzulernen. Zum Bakterienspektrum des Haushalts zählen auch potentielle Krankheitserreger, insbesondere *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp. und coliforme Keime, wie *Escherichia coli* und *Klebsiella* spp., die in diesem Versuch nachgewiesen werden sollen. Sie sollen eine Probenahme von Oberflächen durchführen, dokumentieren und die ersten Schritte mikrobiologischer Nachweisverfahren kennenlernen.

17.2 THEORETISCHER HINTERGRUND

Hygiene ist hierzulande eine ganz besondere Tugend, aber oft reinigen wir nur oberflächlich. Dabei geht es bei der Hygiene nicht nur um sichtbaren Schmutz, wie z.B. Staub, sondern vor allem um die meist nicht zu sehenden Mikroorganismen, da diese zum Teil pathogen (krankheitserregend) sein können.

Bakterien sind immer da, wo sie ausreichende Feuchtigkeit, Wärme und Nährstoffe finden. Im Haushalt finden sie insbesondere in der Küche und im Bad optimale Bedingungen, um sich zu vermehren. Die Mehrzahl der Mikroorganismen, die im Haushalt zu finden sind, ist für den Menschen völlig harmlos. Allerdings lassen sich auch immer wieder meist fakultativ pathogene Keime isolieren.

In Abflüssen von Waschbecken findet sich z.B. häufig *Pseudomonas aeruginosa*, ein fakultativ pathogener Keim, der in der Lage ist bei Pflanzen, Tieren und Menschen lokal akute oder systemische Infektionen zu verursachen. Vorgeschädigte Personen, wie immunsupprimierte Patienten, Personen mit Verbrennungen oder Atemwegserkrankungen, sind dabei besonders gefährdet.

Eine andere Gruppe von potentiellen Krankheitserregern, die man im Haushalt finden kann, sind die coliformen Keime. Hierzu zählen *Escherichia coli* und Vertreter der Gattungen *Enterobacter*, *Klebsiella* und *Citrobacter*, die als gemeinsames Merkmal die Fähigkeit zur Vergärung von Lactose besitzen.

E. coli ist ein Darmbewohner von Mensch und Tier und gilt deshalb als sicherer Indikator für fäkale Verunreinigungen. Im Haushalt findet man diesen vor allem im Bereich von Toiletten, besonders an Stellen, die von den gängigen Reinigungsmaßnahmen nicht erfasst werden, z.B. unter dem Toilettenrand. Nur einige *E. coli*-Stämme sind pathogen, vor allem für Menschen mit einer geschwächten Immunabwehr. Sie werden immer häufiger bei Harnwegsinfektionen, Diarrhöen und allgemeinem Fieber nachgewiesen. Ausschlaggebend für die Pathogenität von

E. coli ist das von ihnen produzierte Enterotoxin, welches für die Durchfallsymptome verantwortlich ist.

Coliforme Keime zählen zu der Familie der *Enterobacteriaceae* (enteron = Darm). Zu dieser Familie zählen auch die Gattungen *Salmonella* und *Shigella*. Diese beiden Gattungen sind von den coliformen Keimen abzugrenzen, da ihnen die Fähigkeit fehlt Lactose zu verwerten. *Salmonella* und *Escherichia* sind recht eng verwandt; die beiden Gattungen haben etwa die Hälfte ihrer Genomsequenz gemeinsam. Jedoch sind Mitglieder der Gattung *Salmonella* im Gegensatz zu *Escherichia* fast immer pathogen für Mensch und Tier. Nach molekularbiologischen Untersuchungen umfasst die Gattung *Salmonella* nur eine Art/Spezies. Die Spezies *Salmonella enterica* kann in sechs Subspezies unterteilt werden. Eine weitere Unterteilung der Salmonellen in Serovare erfolgt aufgrund der O- und H-Antigene; heute sind mehr als 2000 Serovare bekannt. Die Lipopolysaccharide (LPS) der Salmonellen zählen zu den wirksamsten Endotoxinen überhaupt und verursachen die Symptome der entsprechenden Krankheitsbilder. So verursacht *Salmonella enterica* subspecies *enterica* Serovar Typhimurium (kurz: *S. Typhimurium*) schwere Gastroenteritis (Lebensmittelvergiftung); *S. Typhi* ist der Erreger von Unterleibstyphus. Im Haushalt sind Salmonellen bes. in Geflügelprodukten zu finden und an Materialien, die damit in Berührung gekommen sind, wie z. B. Schneidebretter.

Andere Mikroorganismen, die man häufig aus Spül schwämmen oder Geschirrtüchern isolieren kann, sind die Keime, die zu der normalen Hautflora zählen, unter anderen auch *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* ist relativ resistent gegenüber Austrocknung. Einige Stämme von *S. aureus* gelten als Eitererreger, andere Stämme verursachen durch die Produktion von Toxinen, die sie z. B. während ihres Wachstums in ungekühlten Lebensmitteln ausscheiden, Nahrungsmittelvergiftungen.

Tab. 17.1. Mögliche Krankheitserreger im Haushalt und die von ihnen verursachten Krankheiten (Liste stellt keinen Anspruch auf Vollständigkeit)

Bakterienart	mögliche Erkrankungen
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Lungenentzündung, Harnwegsentzündung, Mittelohrentzündung, Hautentzündung
<i>Escherichia coli</i>	Diarrhöe Harnwegsentzündung
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Lungenentzündung
<i>Salmonella</i> Typhi	Typhus
<i>Salmonella</i> Typhimurium	Gastroenteritis
<i>Shigella dysenteriae</i>	Ruhr Diarrhöe
<i>Staphylococcus aureus</i>	Eitererreger Lebensmittelvergiftung

Als Nährböden werden Selektiv- und Differentialmedien verwendet. Durch den Zusatz von verschiedenen Hemmstoffen (z.B. Cetrimid, Malachitgrün-Oxalat,), die Wahl der Nährstoffe (z.B. Lactose im ENDO-Agar) und den Zusatz von Farbindikatoren (z.B. Substrat Salmon-GAL im Chromogener Coliformen-Agar) können verschiedene Bakterienspezies aufgrund ihrer unterschiedlichen Stoffwechselleistungen unterschieden werden. Bei Selektivmedien kann meist zwischen Wachstum/kein Wachstum (Hemmstoffe) unterschieden werden; bei Differentialmedien ist die Farbe der Kolonien ausschlaggebend für die Unterscheidung verschiedener Spezies. Häufig sind Medien, die sowohl selektive als auch differenzierende Eigenschaften aufweisen (z.B. Chromogener Coliformen-Agar).

Solche Medien geben allerdings nur vorläufige Befunde an. Positive Befunde müssen dementsprechend mit nachfolgenden genaueren Untersuchungen bestätigt.

Tab. 17.2. Verwendete Selektiv- bzw. Differentialmedien.

Selektiv- /Differentialmedium	Farbe der Kolonien	vorläufiger Befund
Nähragar	-	unspezifisch
ENDO-Agar	rosa, rot, grün-metallisch	Coliforme Keime <i>E. coli</i>
Chromocult Coliformen Agar	rosa-rot	Coliforme Keime (<i>Citrobacter</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Klebsiella</i>)
	dunkelblau-violett	<i>E.coli</i>
	farblos	andere <i>Enterobacteriaceae</i> (Salmonellen, Shigellen, <i>Proteus</i>)
	hellblau-türkise	z. B. Shigellen und Yersinien
Pseudomonas Agar F	gelb-grün	Pseudomonaden
	farblos	andere Bakterien
Cetrimid Agar	Wachstum, blau-grün	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Malachitgrün-Bouillon	Trübung, gelb	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

17.3 MATERIAL

- 4x sterile Wattetupfer
- 2x sterile NaCl-Lösung in Falcon tubes
- 2x NA
- 2x ENDO-Agar
- 2x Chromogener Coliformen-Agar (CCA)
- 2x Cetrimid Agar
- 2x Pseudomonas Agar F (PA-F)
- 1x 50 ml Malachitgrün-Bouillon in 100 ml Erlenmeyerkolben

17.4 DURCHFÜHRUNG

17.4.1 Dienstag, 7. Tag

Probenahme

- Probenahme-Protokolle ausfüllen (siehe Ergebnisteil)
- Mit einem sterilen, evtl. mit steriler NaCl befeuchteten, Wattetupfer eine geeignete Probenahmestelle (z. B. Toilette unter dem Rand, Abfluss eines Waschbeckens, Perlatoren, Oberflächen im Kühlschrank, Eierschalen, Schneidebretter, Spülschwämme etc.) mit sanftem Druck abreiben bzw. für 3 Sekunden leicht andrücken.
 - Verpackung des Wattetupfers nur an der unteren Seite etwas öffnen
 - Wattetupfer nur am unteren Ende anfassen (Sterilität!)
 - nach der Probenahme den Wattetupfer zum Transport wieder vorsichtig in die Verpackung stecken (Sterilität!)
 - Verpackung beschriften
 - Liegt zwischen Probenahme und Probenbearbeitung eine längere Zeitspanne (mehrere Stunden) Wattetupfer möglichst im Kühlschrank (4 – 8 °C) lagern.
 - Wird eine trockene Oberfläche beprobt, sollte der Wattetupfer vorher mit steriler NaCl-Lösung (Falcon tube) befeuchtet werden.

17.4.2 Mittwoch, 8. Tag

Probenbearbeitung

- Das mit den Wattetupfern gesammelte Probenmaterial auf den verschiedenen Agarmedien ausstreichen.
 - Reihenfolge beachten:
 1. NA
 2. Pseudomonas Agar F (PA-F)
 3. Cetrimid Agar
 4. ENDO-Agar
 5. Chromogener Coliformen-Agar (CCA)
 6. Malachitgrün-Bouillon
 - Von den verschiedenen Selektiv- bzw. Differentialmedien steht nur eine Platte pro Person (≡ zwei Wattetupfer) zur Verfügung.
 - Die Agarplatte vorher in zwei Hälften unterteilen (auf der Rückseite mit wasserfestem Stift markieren)

- Ausstrich entsprechend nur auf einer Hälfte der Platte (auf Rückseite beschriften)
- Die Malachitgrün-Bouillon animpfen.
 - Es steht pro Gruppe nur eine Malachitgrün-Bouillon zur Verfügung.
 - Für die Beimpfung der Malachitgrün-Bouillon nur **eine** Waschbeckenabfluss- bzw. Perlator-Probe verwenden!
 - Nach dem Ausstreichen der Probe auf den verschiedenen Agarmedien wird der Wattetupfer in die Bouillon geworfen.
 - Holzstiel so abbrechen, dass sich der Kolben schließen, der Tupfer sich später aber problemlos herausnehmen lässt
 - Wattetupfer in die Bouillon stellen
- Alle Medien, die mit dem Wattetupfer beimpft wurden, werden für 2 Tage bei 37°C bebrütet.

17.4.3 Freitag, 10. Tag

Auswertung

Die Platten auf Wachstum überprüfen und die Konzentration der Mikroorganismen abschätzen und in der Ergebnistabelle mit (-) für kein Wachstum, (+) für schwaches Wachstum, (++) für starkes Wachstum und (+++) für sehr starkes Wachstum notieren. Auf den verschiedenen Differentialmedien die Farbe der Kolonien überprüfen und in der Ergebnistabelle festhalten. Mittels Tabelle 17.2 (siehe theoretischer Hintergrund) vorläufigen Befund formulieren und in Ergebnistabelle festhalten.

17.5 ERGEBNISSE

Probenahmeprotokolle (Wachstum notieren mit: - / + / ++ / +++):

Probe Nr.: 1, Wattetupfer			
Probennehmer:			
Datum:		Uhrzeit:	
Ort der Probenahme:			
Stelle der Probenahme:			
Nährmedium	Wachstum	Farbe der Kolonien	vorläufiger Befund
NA			
ENDO-Agar			
CCA			
PA-F			
Cetrimid			
Malachitgrün			

(2 Punkte)

Probe Nr.: 2, Wattetupfer			
Probennehmer:			
Datum:		Uhrzeit:	
Ort der Probenahme:			
Stelle der Probenahme:			
Nährmedium	Wachstum	Farbe der Kolonien	vorläufiger Befund
NA			
ENDO-Agar			
CCA			
PA-F			
Cetrimid			
Malachitgrün			

(2 Punkte)

17.6 DISKUSSION**(20 Punkte)**

Wie schätzen Sie die „vorläufigen“ Befunde ein?

Wo haben Sie welche Keime in welcher Konzentration gefunden? Wie sind die vermutlichen Eintragswege der Mikroorganismen an dem Probenahmeort? Wie sind die Lebensbedingungen und Vermehrungsmöglichkeiten an dem Probenahmeort? Wie ist das Gefährdungspotential für Mensch und Tier einzuschätzen?

17.7 FRAGEN

- Was ist ein Selektivmedium? Wie wirkt es? Nennen Sie Beispiele. **(5 Punkte)**
- Was ist ein Differentialmedium? Wie wirkt es? Nennen Sie Beispiele. **(5 Punkte)**

18. IDENTIFIZIERUNG COLIFORMER UND ANDERER BAKTERIEN MIT EINEM STANDARDISIERTEN TESTSYSTEM

18.1 AUFGABE

Unbekannte Reinkulturen sollen mit Hilfe eines standardisierten Testsystems (API 20 E) identifiziert werden.

18.2 EINFÜHRUNG

Bei der Untersuchung bakterienhaltiger Proben, die unter Umständen Krankheitserreger enthalten können, soll in vielen Fällen möglichst schnell eine Identifizierung der Bakterien erfolgen. Dies wird in der Praxis durch die Anwendung verschiedener kommerzieller Testsysteme erleichtert. Es handelt sich dabei häufig um miniaturisierte Bunte Reihen [1, 2]. Die Identifizierung der Bakterien erfolgt anhand charakteristischer Reaktionen (Enzymaktivitäten, Substratverwertungen). Ein sinnvolles Resultat lässt sich allerdings nur mit Reinkulturen von Bakterien erhalten, die man durch vorgeschaltete Untersuchungsgänge, z.B. mit Hilfe von Selektivmedien, aus der zu untersuchenden Probe isoliert hat.

Am Beispiel des kommerziellen Systems API 20 E, das vor allem zur Identifizierung von Arten aus der Familie der *Enterobacteriaceae* eingesetzt wird, soll die Identifizierung von Reinkulturen durchgeführt werden.

18.3 MATERIAL

- Teststreifen API 20 E mit Zubehör (bioMérieux)
- Suspensionsmedium (steriles Wasser)
- Nachweisreagenzien VP 1, VP 2, TDA-Reagenz, James-Reagenz
(Sicherheitshinweise auf den Gefäßen beachten! Bei Verwendung der Reagenzien Schutzhandschuhe und Schutzbrille tragen!)
- Paraffinöl
- sterile Pipetten (Pspipetten)
- 36 °C-Brutschrank
- Analytischer Profilindex API 20 E

18.4 DURCHFÜHRUNG

Donnerstag, 9. Tag:

Es werden insgesamt die vier aus Ruhrwasser gewonnenen Reinkulturen aus Versuch Nr. 12 mit dem API 20 E-System identifiziert. Es werden dazu die Einzelkolonieausstriche auf Nähragar aus Versuch Nr. 12 verwendet.

Eine ausführliche Arbeitsanleitung des Herstellers befindet sich auf den Seiten 149ff.

- Inkubationswanne mit ca. 5 ml Deionat befeuchten und Teststreifen einlegen; die Wanne mit Deckel versehen und am Rand beschriften (Proben- und Gruppennummer).
- einige gut isolierte Einzelkolonien mit einer Pipette in einer Ampulle mit Suspensionsmedium homogen suspendieren.
- die Suspension mit der gleichen Pipette in die Becherchen des Streifens nach Angaben der Herstelleranleitung teilweise bzw. vollständig füllen; unterstrichene Ansätze mit Paraffinöl überschichten (siehe Herstelleranleitung).
- Streifen bei 36 °C für 24 h bebrüten.

Freitag, 10. Tag: Versuchsende

Die Auswertung der 20 Stoffwechselreaktionen erfolgt nach der Herstelleranleitung. Die 21. Reaktion besteht aus dem Oxidase-Test, der für alle Reinkulturen bereits vorher bestimmt wurde (siehe Versuch Nr. 12, Tabelle 12.3).

Die Ergebnisse werden in ein API 20 E-Ergebnisblatt und in Tabelle 18.1 eingetragen. Aus den Reaktionen wird ein 7-stelliges Zahlenprofil erhalten, anhand dessen im Analytischen Profilindex API 20 E das Ergebnis abgelesen wird.

18.5 ERGEBNISSE

Tabelle 18.1. Identifizierung mit dem API 20 E-System

Kultur	Identifizierung
Isolat aus Ruhr, Nr. 1	
Isolat aus Ruhr, Nr. 2	
Isolat aus Ruhr, Nr. 3	
Isolat aus Ruhr, Nr. 4	

(5 Punkte)

ANLEITUNG DES HERSTELLERS ZUR ANWENDUNG DES API 20 E-SYSTEMS

api 20 E*Für die in vitro Diagnostik*System zur Identifizierung von *Enterobacteriaceae* und anderer grammnegativer Stäbchen**VERWENDUNGSZWECK**

API 20 E ist ein miniaturisiertes System zur Identifizierung von *Enterobacteriaceae* und anderer nicht anspruchsvoller grammnegativer Stäbchen mit Hilfe von 21 standardisierten biochemischen Reaktionen und einer Datenbasis. Die komplette Liste der mit dem System identifizierbaren Mikroorganismen finden Sie in der Prozenttabelle am Schluss der Arbeitsanleitung.

PRINZIP

Der API 20 E Streifen besteht aus 20 Mikroröhrchen, die dehydrierte Substrate enthalten. Die Röhrchen werden mit der zu untersuchenden Bakteriensuspension beimpft, dadurch werden die Substrate gelöst. Die Stoffwechselprodukte, die während der Inkubation entstehen, bewirken Farbumschläge, entweder direkt während der Inkubation oder nach Zugabe entsprechender Reagenzen. Die Ablesung der Reaktionen erfolgt anhand der Ablestabelle, die Identifizierung erfolgt mit Hilfe des Analytischen-Profil-Index oder der Identifizierungssoftware.

REAGENZIEN**API 20 E Best.Nr. 20 100, Packungsinhalt (25 Tests):**

- 25 API 20 E Streifen
- 25 Inkubationswannen
- 25 Ergebnisblätter
- 1 Verschlussleiste
- 1 Arbeitsanleitung

API 20 E Best.Nr. 20 160, Packungsinhalt (100 Tests):

- 100 API 20 E Streifen
- 100 Inkubationswannen
- 100 Ergebnisblätter
- 1 Verschlussleiste
- 1 Arbeitsanleitung

Zusätzliche Produkte (nicht im Kit enthalten)

(* Produkte, die bei bioMérieux erhältlich sind.

Die Bestellnummer können Sie unserer Preisliste entnehmen oder direkt bei bioMérieux anfragen):

- NaCl 0,85 % Medium, 5 ml (*) oder Suspensionsmedium, 5 ml (*)
 - Zusatzreagenzien-Kit (*) oder Einzelreagenzien: TDA (*)
JAMES (*)
VP 1 (*)
VP 2 (*)
NIT 1 (*)
NIT 2 (*)
 - Zn Reagenz (*)
 - Oxidase (*)
 - Paraffinöl (*)
 - Pipetten oder PSIpetten (*)
 - Analytischer-Profil-Index API 20 E (*) oder Identifizierungssoftware (*)
 - Schutzhülle für Ampullen (*)
 - Ampullenständer (*)
- Sowie eventuell folgende Zusatzprodukte (nicht im Kit enthalten):**
- API OF Medium (*):
zur Untersuchung von oxidativem oder fermentativem Glukose-Abbau.
 - API M Medium (*):
für die Beweglichkeitsprüfung von aerob/anaeroben Bakterien.

Notwendiges Labormaterial:

- Brutschrank (35-37°C)
- Kühlschrank
- Bunsenbrenner
- Markierstift

ZUSAMMENSETZUNG DER MEDIEN UND REAGENZIEN

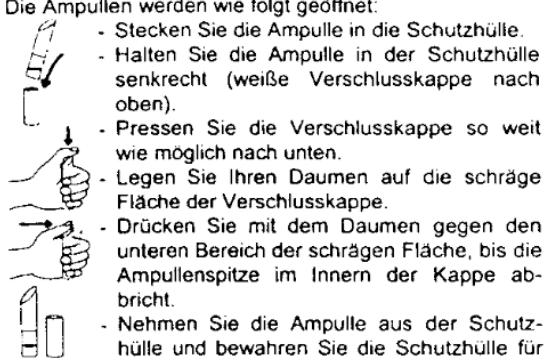
NaCl 0,85 % Medium 5 ml oder Suspensions- medium 5 ml	Natriumchlorid Demineraliertes Wasser 8,5 g 1000 ml Demineraliertes Wasser
TDA Reagenz 5 ml	Eisenperchlorid H ₂ O 3,4 g ad 100 ml
JAMES Reagenz 5 ml	Verbindung J 2183 HCl 1N 0,5 g ad 100 ml S24/25: Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden. Bei Berührung mit den Augen sofort mit viel Wasser mindestens 10 Minuten spülen. Bei Berührung mit der Haut gründlich mit Seife und viel Wasser abwaschen.
VP 1 Reagenz 5 ml	Kaliumhydroxid H ₂ O 40 g 100 ml ÄTZEND R35: Verursacht schwere Verätzungen. S2: Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen. S26: Bei Berührung mit den Augen sofort mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. S27: Beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen. S37/39: Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
VP 2 Reagenz 5 ml	α-Naphthol Äthanol 6 g 100 ml LEICHENTZÜNDLICH S7: Behälter dicht geschlossen halten. S16: Von Zündquellen fernhalten - Nicht rauchen.
NIT 1 Reagenz 5 ml	Sulfanilsäure Essigsäure H ₂ O 0,4 g 30 g 70 ml ÄTZEND R34: Verursacht Verätzungen. S2: Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen. S23: Dampf nicht einatmen. S26: Bei Berührung mit den Augen sofort mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.
NIT 2 Reagenz 5 ml	N-N-Dimethyl-1-Napthylamin Essigsäure H ₂ O 0,6 g 30 g 70 ml ÄTZEND R34: Verursacht Verätzungen. S2: Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen. S23: Dampf nicht einatmen. S26: Bei Berührung mit den Augen sofort mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.

→

Zn-Reagenz 10 g	Zinkpulver ENTZÜNDLICH R15 Reagiert mit Wasser unter Bildung hoch entzündlicher Gase. R17: Selbstentzündlich an der Luft. S7/8: Behälter trocken und dicht geschlossen halten. S43: Zum Löschen Metallbrandpulver, kein Wasser verwenden.
--------------------	---

VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik verwenden.
- Die Proben und Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren.
- Vermeiden Sie jeden Kontakt der Reagenzien mit der Haut, den Augen und der Kleidung.
- Reagenzien mit abgelaufenem Verfallsdatum nicht mehr verwenden.
- Nach der Entnahme aus dem Kühlschrank sollten die Reagenzien auf Raumtemperatur (20-30°C) gebracht werden.
- Die Ampullen werden wie folgt geöffnet:
 - Stecken Sie die Ampulle in die Schutzhülle.
 - Halten Sie die Ampulle in der Schutzhülle senkrecht (weiße Verschlusskappe nach oben).
 - Pressen Sie die Verschlusskappe so weit wie möglich nach unten.
 - Legen Sie Ihren Daumen auf die schräge Fläche der Verschlusskappe.
 - Drücken Sie mit dem Daumen gegen den unteren Bereich der schrägen Fläche, bis die Ampullenspitze im Innern der Kappe abbricht.
 - Nehmen Sie die Ampulle aus der Schutzhülle und bewahren Sie die Schutzhülle für einen späteren Gebrauch auf.
- **Ampulle ohne Tropfpiptette:**
 - Entfernen Sie vorsichtig die Verschlusskappe.
- **Ampulle mit Tropfpiptette:**
 - Drehen Sie die Ampulle um, und halten Sie sie senkrecht.
 - Drücken Sie seitlich auf die Verschlusskappe, so dass ein Tropfen Reagenz abgegeben wird (API 20 E Reagenzienkit) oder das gesamte Reagenz in die Tropfflasche läuft (andere Reagenzien).



- HINWEIS:** Durch den seitlichen Druck auf die Plastikkappe vor dem Umdrehen der Ampulle, wird das überschüssige Reagenz aspiriert und ein Auslaufen an der Außenseite der Plastikkappe vermieden.
- Beimpfte Produkte müssen als potenziell infektiös und unter Beachtung entsprechender Vorsichtsmaßnahmen sachgemäß behandelt werden.
 - Die Proben und Bakterienkulturen müssen als potenziell infektiös betrachtet und unter Beachtung geeigneter Vorsichtsmaßnahmen durch entsprechend qualifiziertes Fachpersonal sachgemäß behandelt werden. Während der gesamten Testdurchführung muss aseptisch gearbeitet werden. Für die zu untersuchende Bakteriengruppe sind außerdem entsprechende Vorsichtsmaßnahmen einzuhalten; siehe "NCCLS M29-A, Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue; Approved Guideline - December 1997". Weitere diesbezügliche Informationen finden Sie in "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, HHS Publication No. (CDC) 93-8395, 3rd Edition (May 1993)" oder in den entsprechenden nationalen gesetzlichen Vorgaben.

- Nach Ablesung und Interpretation des Tests müssen alle Proben, beimpfte und kontaminierte Produkte (Ampullen, Wannen, Pipetten und Streifen) autoklaviert, verbrannt oder mit einer bakteriziden Desinfektionslösung behandelt werden, bevor sie entsorgt werden.
- Die angegebene Performance dieses Tests wurde unter Berücksichtigung der vorliegenden Arbeitsanleitung ermittelt. Jede Abweichung von dieser Anleitung kann die Qualität der Ergebnisse beeinflussen.
- Die Interpretation der Testergebnisse sollte durch einen erfahrenen Mikrobiologen erfolgen. Dabei sind klinischer Hintergrund, Probenherkunft, Kolonien- und mikroskopische Morphologie sowie gegebenenfalls andere Testergebnisse, insbesondere das Antibiogramm, zu berücksichtigen.

LAGERUNG DER STREIFEN

Die Streifen sind in einem Aluminiumbeutel verpackt, der Trockenmittel enthält.

Legen Sie nach dem Öffnen des Beutels (*) die nicht benötigten Streifen zusammen mit den Trockenmitteln in den Aluminiumbeutel zurück und verschließen Sie diesen mit der (mitgelieferten) Verschlussleiste: das offene Beutelende zwischen die beiden Leisten legen und über die ganze Länge sorgfältig festklemmen. Die Streifen können auf diese Weise bis zu 10 Monate nach dem ersten Öffnen des Beutels bei 2-8°C gelagert werden (oder bis zu dem auf der Packung angegebenen Verfallsdatum, wenn dieses kürzer ist).

(*) Empfehlungen zum Öffnen des Beutels: Halten Sie den Beutel gerade und schneiden Sie ihn direkt unter der Schweißnaht auf, so dass die Trockenmittel nicht beschädigt werden.

LAGERUNG DER REAGENZIEN

Die Reagenzien müssen bei 2-8°C unter Lichtausschluss gelagert werden (außer TDA, VP 1 und NIT 1, die bei 2-30°C und Zn, das bei 8-30°C gelagert werden kann) und sind bis zu dem auf der Packung angegebenen Verfallsdatum haltbar.

Nach dem Öffnen der Ampullen (und Überführung der Reagenzien in Tropffäschchen), können die Reagenzien 1 Monat aufbewahrt werden (oder bis zum angegebenen Verfallsdatum, wenn dieses kürzer ist): Bitte notieren Sie das Datum, an dem die Ampullen geöffnet wurden, auf dem Etikett der Fläschchen oder Ampullen.

Das JAMES-Reagenz ist sehr lichtempfindlich: Umwickeln Sie das Fläschchen mit Aluminiumfolie und nehmen Sie es nur zum Gebrauch aus dem Kühlschrank. Achten Sie darauf, dass das Fläschchen nicht über längere Zeit auf dem Labortisch stehen bleibt.

GEBRAUCH DER REAGENZIEN

Die Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20-30°C) temperieren.

1. Reagenzien des API 20 E Kits:

- Die Reagenzienampullen öffnen, wie im Abschnitt "Vorsichtsmaßnahmen" beschrieben (Ampulle mit Tropfpiptette).

2. Reagenzien TDA, VP 1, VP 2, NIT 1, NIT 2:

- Die Reagenzienampullen öffnen und den Inhalt in Tropfflaschen überführen, wie im Abschnitt "Vorsichtsmaßnahmen" beschrieben (Ampulle mit Tropfpiptette).
- Einen Tropfen Reagenz abgeben.
- Die Flasche nach Gebrauch gut verschließen und lagern, wie im Abschnitt "Lagerung der Reagenzien" beschrieben.

3. JAMES Reagenz:

- Die Ampulle mit dem Lösungsmittel für das JAMES Reagenz öffnen, wie im Abschnitt "Vorsichtsmaßnahmen" beschrieben (Ampulle ohne Tropfipette).
- Den Ampulleninhalt mit einer trockenen Pipette entnehmen und die Flüssigkeit in die Tropfflasche (enthält die aktive Substanz) überführen.
- Die Tropfipette aufsetzen.
- Die Flasche gut verschließen.
- Schütteln.
- 5 bis 10 Min. bis zur vollständigen Auflösung der aktiven Substanz stehen lassen.
- Die Flasche mit dem gebrauchsfertigen Reagenz nach Gebrauch gut verschließen und lagern, wie im Abschnitt "Lagerung der Reagenzien" beschrieben.

4. Zn Reagenz:

- Das Fläschchen öffnen.
- Ca. 2-3 mg Pulver mit dem an der Verschlusskappe befestigten Spatel entnehmen und in den Reaktionsbecher geben.
- Das Fläschchen nach Gebrauch gut verschließen und lagern, wie im Abschnitt "Lagerung der Reagenzien" beschrieben.

5. Oxidase Test:

- Führen Sie den Test gemäß den Angaben des Herstellers durch.
- Notieren Sie das Ergebnis auf dem Ergebnisblatt.

HINWEIS: Der Oxidase-Test muss durchgeführt werden, da er die 21. Identifikationsreaktion darstellt.

ARBEITSANLEITUNG**Verarbeitung der Proben**

API 20 E darf nicht für die direkte Testung klinischer oder anderer Proben verwendet werden.

Die zu identifizierenden Mikroorganismen müssen zuerst gemäß den gängigen bakteriologischen Verfahren auf einem Kulturmedium isoliert werden, das für die Anzucht gramnegativer, nicht anspruchsvoller Stäbchen geeignet ist (z.B. MacConkey).

Vorbereitung des Streifens

- Eine Inkubationswanne mit Deckel bereitstellen und zur Herstellung einer feuchten Kammer ca. 5 ml destilliertes oder demineralisiertes Wasser [oder anderes Wasser ohne Zusätze bzw. Derivate, die Gase freisetzen können (z.B. Cl₂, CO₂)] in die Wanne geben.
- Die Referenznummer des Bakterienstammes auf dem dafür vorgesehenen seitlichen Abschnitt der Inkubationswanne notieren. (Die Referenznummer nicht auf dem Deckel notieren, da er während des Arbeitsablaufes verwechselt werden oder abhanden kommen kann).
- Den Streifen aus der Verpackung nehmen und in die Wanne legen.

ANMERKUNG: API 20 E ist nur zur Identifizierung gramnegativer, nicht anspruchsvoller Bakterien bestimmt. Anspruchsvolle Keime, bei deren Handhabung spezielle Vorsichtsmaßnahmen erforderlich sind (z.B. *Brucella* und *Francisella*), sind nicht in der API 20 E Datenbasis enthalten. Wir empfehlen, für den Ausschluss oder die Identifizierung dieser Keime andere Tests zu verwenden.

Vorbereitung des Inokulums

- Eine Ampulle NaCl 0,85% Medium (5 ml) oder eine Ampulle Suspensionsmedium (5 ml) öffnen, wie im Abschnitt "Vorsichtsmaßnahmen" beschrieben (Ampulle ohne Tropfipette) oder ein anderes Röhrchen mit 5 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung oder steriles Aqua dest. ohne Zusätze.

- Mit einer Pipette oder PSlipette eine gut isolierte Einzelkolonie vom Agarmedium abnehmen.
- Die Bakterien im Suspensionsmedium sorgfältig homogenisieren.

ANMERKUNG: Die meisten *Vibrio* Spezies sind halophil. Bei Verdacht auf *Vibrio*-Spezies die Bakteriensuspension mit NaCl 0,85% Medium herstellen.

Beimpfung des Streifens

- Die Bakteriensuspension mit derselben Pipette in die Mikroröhrchen pipettieren, mit der die Bakterien abgenommen wurden:
- Bei CIT, VP und GEL Becher und Röhrchen füllen.
- Für die anderen Reaktionen nur die Röhrchen und nicht die Becher füllen.
- Bei den unterstrichenen Reaktionen ADH, LDC, ODC, H₂S und URE die Becher mit Paraffinöl überschichten, so dass anaerobe Bedingungen entstehen.
- Die Inkubationswanne abdecken.
- 18-24 Stunden bei 35-37°C inkubieren.
- **Inkubation am Wochenende:** Der API 20 E Streifen muss nach 18-24 Std. Inkubation abgelesen werden. Ist nach 24 Std. Inkubation bei 35-37°C keine Ablesung möglich (z.B. am Wochenende) ist es unbedingt empfehlenswert, die Streifen aus dem Brutschrank zu nehmen und so lange bei 2-8°C (im Kühlschrank) zu lagern, bis die Tests abgelesen werden können.

Ablesung des Streifens

- Nach 18-24 Stunden Inkubation bei 35-37°C den Streifen mit Hilfe der Ablesetabelle ablesen.
- Alle Spontanreaktionen auf dem Ergebnisblatt notieren.
- Wenn 3 oder mehr Tests positiv reagieren (GLU-Test + oder -), notieren Sie das Ergebnis des GLU-Tests und prüfen Sie anschließend die Tests, die Reagenzienzugaben erfordern:
 - TDA-Test: 1 Tropfen TDA Reagenz zugeben. Eine **rötlich-dunkelbraune** Farbe zeigt eine **positive** Reaktion an. Notieren Sie das Resultat auf dem Ergebnisblatt.
 - IND-Test: 1 Tropfen JAMES Reagenz zugeben. Eine **rosa** Farbe, die im ganzen Becher diffundiert, zeigt eine **positive** Reaktion an. Notieren Sie das Resultat auf dem Ergebnisblatt.
 - VP-Test: Je 1 Tropfen VP 1 und VP 2 Reagenz zugeben. Mindestens 10 Min. warten. Eine **rosa** oder **rote** Farbe ist als **positiv** zu bewerten. Notieren Sie das Ergebnis auf dem Ergebnisblatt. Eine nach 10 Minuten auftretende schwache **rosa** Verfärbung wird als **negativ** bewertet.
 - NO₂-Test: Je 1 Tropfen NIT 1 und NIT 2 Reagenz in das GLU-Röhrchen pipettieren. 2 bis 5 Min. warten. Eine **rote** Färbung zeigt eine **positive** Reaktion an. Eine negative Reaktion (gelbe Farbe) kann auf eine eventuelle Stickstoffproduktion (gelegentlich durch Bildung kleiner Bläschen angezeigt) zurückgeführt werden; 2-3 mg Zn Reagenz in den GLU-Becher geben. Bleibt das Röhrchen nach 5 Minuten **gelb**, ist die Reaktion (N₂) **positiv** und wird auf dem Ergebnisblatt notiert. Wird es **orangerot**, ist die Reaktion **negativ**, da die im Becher noch vorhandenen Nitrate durch Zink zu Nitrit reduziert wurden.
- Diese Reaktion ist für gramnegative, oxidasepositive Stäbchen wichtig.

HINWEIS: Die Nitratreduktion und die Indolbildung müssen zuletzt geprüft werden, da diese Reaktionen Gase freisetzen und dadurch die Interpretation anderer Tests des Streifens beeinträchtigen können. Nach Zugabe dieser Reagenzien den Streifen nicht wieder abdecken.

- Beträgt die Anzahl positiver Tests (einschließlich des GLU-Tests) weniger als 3, werden die Reagenzien nicht hinzugegeben:
 - 2 Ampullen API OF Medium beimpfen, um den Glukosestoffwechsel zu prüfen.
 - Ein MacConkey-Medium beimpfen.
 - Die Beweglichkeit prüfen: 1 Ampulle API M Medium beimpfen oder mikroskopieren (Objektträger mit Deckglas).
 - Erneut 24 Stunden inkubieren.
 - Die Reagenzien wie oben angegeben hinzugeben.
 - Die Reaktionen und die Ergebnisse der Zusatztests mit Hilfe der Ablestabelle auswerten und auf dem Ergebnisblatt notieren.

Identifizierung

Die Identifizierung erhält man anhand des **numerischen Profils**.

- Bestimmung des numerischen Profils:

Die biochemischen Reaktionen auf dem Ergebnisblatt sind in 3-er Gruppen eingeteilt. Jede positive Reaktion erhält den Wert 1, 2 oder 4 je nach Position des Tests innerhalb der Gruppe (1., 2. oder 3. Test). Die Zahlenwerte jeder Gruppe werden addiert (negative Reaktion = 0), so erhält man 7 Zahlen, welche das numerische Profil ergeben. Die Oxidase-Reaktion stellt den 21. Test dar, ihr wird bei positiver Reaktion der Zahlenwert 4 zugeordnet.

Identifizierung:

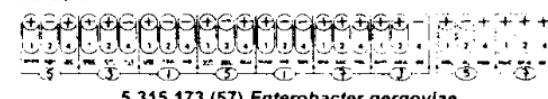
Die Identifizierung erfolgt:

- * mit Hilfe des Analytischen-Profil-Index:
 - Schlagen Sie das numerische Profil in der Profilliste nach.
- * mit Hilfe der Identifizierungssoftware:
 - Geben Sie über die Tastatur das 7-stellige numerische Profil ein.

In den Fällen, in denen das 7-stellige Zahlenprofil keine ausreichende Selektivität ergibt, müssen folgende Zusatzreaktionen durchgeführt werden:

- Nitratreduktion zu Nitrit (NO_2^-)
- Nitratreduktion zu Stickstoff (N_2)
- Beweglichkeit (MOB)
- Anzucht auf Mac Conkey-Agar (McC)
- Glukoseoxidation (OF-O)
- GlukoseFermentation (OF-F)

Diese zusätzlichen Tests, die im Analytischen-Profil-Index aufgeführt sind, können auch für die Erstellung eines mit der Software identifizierbaren 9-stelligen Profils verwendet werden.



5 315 173 (57) *Enterobacter gergoviae*

QUALITÄTSKONTROLLE

Die Medien, Streifen und Reagenzien unterliegen in den verschiedenen Stadien der Produktion systematisch durchgeführten Qualitätskontrollen. Die bakteriologische Qualitätskontrolle der API-Teststreifen im Labor kann vorzugsweise mit den folgenden Stämmen durchgeführt werden:

	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	NO ₃ ⁻
1.	+	-	V	-	V	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
3.	-	-	-	+	V	+	+	+	-	-	V	+	-	-	-	-	V	-	-	-	+
4.	+	-	+	-	+	-	V	-	-	V	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5.	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+

(1) *Stenotrophomonas maltophilia*

ATCC 51331

(4) *Klebsiella pneumoniae* ssp *pneumoniae*

ATCC 35657

(2) *Enterobacter cloacae*

ATCC 13047

(5) *Escherichia coli*

ATCC 25922

(3) *Proteus mirabilis*

ATCC 35659

ATCC: American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

- * Die Reduktion zu N_2 (+) kann mit dem Stamm ATCC 13047 nachgewiesen werden.
- * Profile nach 24-48 Stunden Inkubation für den ATCC Stamm 51331, nach Anzucht auf Trypcase-Soja-Blutagar.
- * Profile nach 18-24 Stunden Inkubation für die anderen Stämme, nach Anzucht auf Trypcase-Soja-Blutagar.
- * Mit NaCl 0,85% Medium hergestellte Bakteriensuspension.

LIMITIERUNGEN

- API 20 E ist nur zur Identifizierung der in der Datenbasis enthaltenen grammnegativen, nicht anspruchs-vollen Stäbchen bestimmt (siehe Prozenttabelle am Schluss der Arbeitsanleitung). Andere Mikroorganismen können weder identifiziert noch ausgeschlossen werden.
- Im Vergleich zu konventionellen Methoden können diskrepanz Ergebnisse beobachtet werden. Dies ist durch Unterschiede im Reaktionsprinzip bei der API-Methode bedingt. Außerdem können abweichende Prozentsätze festgestellt werden, die durch Substratveränderungen zu erklären sind.
- Bei einigen Spezies (z.B. *Klebsiella* oder *Proteus*) kann eine zunächst positive Reaktionen des Glukose-Tests negativ werden (Auftreten einer blau-grünen Färbung). In diesem Fall muss diese Reaktion negativ bewertet werden. Die in der Prozenttabelle enthaltenen Prozentwerte berücksichtigen dieses Phänomen.
- Bei Erhalt des Identifizierungsergebnisses *Salmonella* oder *Shigella* muss die bakterielle Identifizierung serologisch bestätigt werden.
- Es dürfen nur Reinkulturen verwendet werden.

ZU ERWARTENDE WERTE

Die für die verschiedenen biochemischen Reaktionen zu erwartenden Werte sind in der Prozenttabelle am Schluss der Arbeitsanleitung angegeben.

PERFORMANCE

7900 Stämme aus Klinik und Stammsammlung, die zu den Spezies der Datenbasis gehören, wurden getestet:

- 92,05% der Stämme wurden korrekt identifiziert (Zusatztests bei 46,57% der Stämme erforderlich).
- 5,08% der Stämme wurden nicht identifiziert.
- 2,87% der Stämme wurden falsch identifiziert.

METHODIK	S. I
PROZENTTABELLE	S. II
LITERATUR	S. IV

ABLESETABELLE

TESTS	SUBSTRATE	MENGE	REAKTIONEN/ENZYME	ERGEBNISSE	
				NEGATIV	POSITIV
ONPG	ortho-nitro-phenyl-β-D-Galaktozyranosid (ONPG) Isopropylthiogalaktozyranosid (IPTG)	0,23 mg 7,6 µg	beta-Galaktosidase	farblos	gelb (1)
ADH	Arginin	1,9 mg	Arginindihydrolase	gelb	rot / orange (2)
LDC	Lysin	1,9 mg	Lysindecarboxylase	gelb	rot / orange (2)
ODC	Ornithin	1,9 mg	Ornithindecarboxylase	gelb	rot / orange (2)
CIT	Natriumcitrat	0,83 mg	Citratverwertung	blassgrün / gelb	blau-grün / blau (3)
H2S	Natriumthiosulfat	76,0 µg	H2S-Bildung	farblos / gräulich	schwarzer Niederschlag
URE	Harnstoff	0,76 mg	Urease	gelb	rot / orange (2)
TDA	Tryptophan	0,38 mg	Tryptophan-desaminase	<u>TDA / sofort</u>	
IND	Tryptophan	0,19 mg	Indolbildung	farblos blassgrün / gelb	<u>JAMES / sofort</u> rosa
VP	Kreatin Natriumpyruvat	0,38 mg 1,9 mg	Aceloinbildung	farblos	rosa / rot (5)
GEL	Kohn Gelatine	0,17 mg	Gelatinase	keine Diffusion	Diffusion der schwarzen Tusche
GLU	Glukose	1,9 mg	Fermentation / Oxidation (4)	blau / blau-grün	gelb / gelb grau
MAN	Mannit	1,9 mg	Fermentation / Oxidation (4)	blau / blau-grün	gelb
INO	Inositol	1,9 mg	Fermentation / Oxidation (4)	blau / blau-grün	gelb
SOR	Sorbit	1,9 mg	Fermentation / Oxidation (4)	blau / blau-grün	gelb
RHA	Rhamnose	1,9 mg	Fermentation / Oxidation (4)	blau / blau-grün	gelb
SAC	Saccharose	1,9 mg	Fermentation / Oxidation (4)	blau / blau-grün	gelb
MEL	Melibiose	1,9 mg	Fermentation / Oxidation (4)	blau / blau-grün	gelb
AMY	Amygdalin	0,57 mg	Fermentation / Oxidation (4)	blau / blau-grün	gelb
ARA	Arabinose	1,9 mg	Fermentation / Oxidation (4)	blau / blau-grün	gelb
OX	(siehe Packungsbeilage des Oxidase-Tests)		Cytochromoxydase	(siehe Packungsbeilage des Oxidase-Tests)	
Nitrat-reduktion GLU Röhrchen	Kaliumnitrat	76,0 µg	NO ₂ Bildung Reduktion zu N ₂	gelb	rot
				orange rot	gelb
Zn / 5 Min					
MOB	API M Medium oder Mikroskop		Beweglichkeit	unbeweglich	beweglich
McC	MacConkey Medium		Kultur	kein Wachstum	Wachstum
OF-F OF-O	Glukose (API OF Medium)		Fermentation: unter Öl Oxidation: an der Luft	grün grün	gelb gelb

(1) Auch eine nur ganz leichte Gelbfärbung ist als positiv zu bewerten.

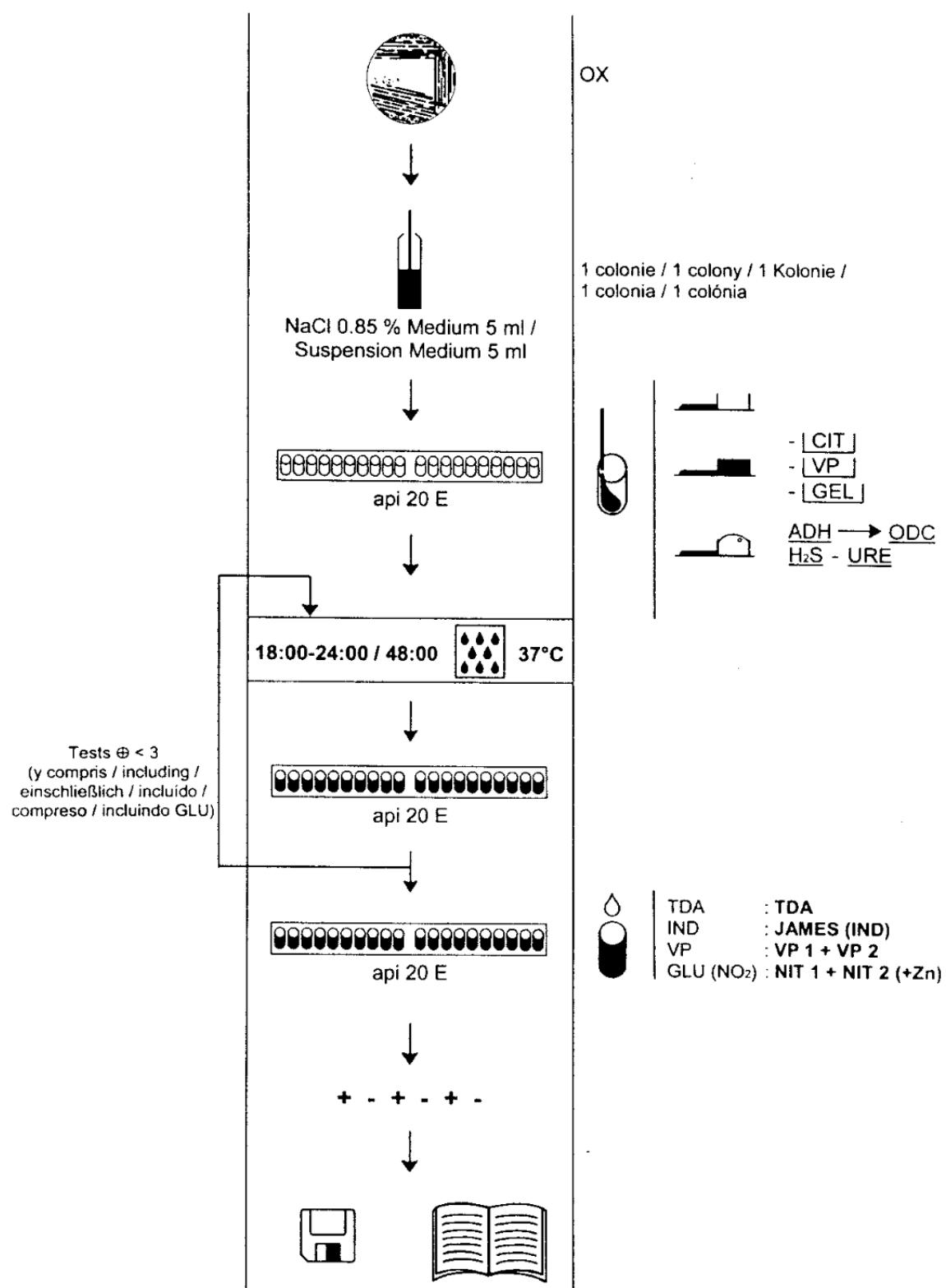
(2) Eine orange Verfärbung nach einer 36-48-stündigen Inkubation wird als negativ bewertet.

(3) Ablesung im Becher (aerober Bereich)

(4) Die Fermentation beginnt im unteren Teil der Röhrchens, die Oxidation im oberen Teil.

(5) Eine nach 10 Minuten auftretende schwache rosa Verfärbung wird als negativ bewertet.

METHODOLOGIE / PROCEDURE / METHODIK / TECNICA / PROCEDIMENTO



Testprinzip**API 20 E-System**

Substrate	Abkürzungen	Biochemische und analytische Grundlagen
o-Nitrophenyl- β -galactopyranosid	ONPG	Die Hydrolyse von ONPG durch β -Galactosidase setzt gelbes o-Nitrophenol frei.
Arginin	ADH	Arginindihydrolase wandelt Arginin in Ornithin, Ammoniak und CO_2 um. Durch pH-Anstieg kommt es zum Farbumschlag des Indikators Phenolrot von gelb nach rot oder orange.
Lysin	LDC	Lysin-decarboxylase setzt Lysin in Kadaverin um. Dieses basische Amin führt zu einem pH-Anstieg und einem Farbumschlag des Indikators Phenolrot von gelb nach rot oder orange.
Ornithin	ODC	Ornithin-decarboxylase setzt Ornithin in ein basisches primäres Amin um. pH-Anstieg führt zum Umschlag des Indikators Phenolrot von gelb nach rot oder orange.
Natriumcitrat	CIT	Verwertung von Citrat als einziger Kohlenstoffquelle führt zu pH-Anstieg. Bromthymolblau schlägt von grün nach blau um.
Natriumthiosulfat	H_2S	Aus Thiosulfat bildet sich Schwefelwasserstoff, der mit Eisensalzen schwarze Präzipitate bildet.
Harnstoff	URE	Urease setzt aus Harnstoff Ammoniak frei. pH-Anstieg führt zum Umschlag von Phenolrot von gelb nach rot.
Tryptophan	TDA	Tryptophan-decarboxylase bildet aus Tryptophan Indolbrenztraubensäure. Bei Zusatz von Eisen-III-chlorid entsteht eine rot-braune Färbung.
Tryptophan	IND	Der Abbau von Tryptophan führt zu Indol, das mit Kovacs-Reagenz eine rosarote bis rote Färbung zeigt.
Natriumpyruvat	VP	Voges-Proskauer: Aus Pyruvat entsteht Acetoin, das durch Bildung eines Farbkomplexes nachgewiesen werden kann. Bei positiver Reaktion nach Zusatz von KOH und α -Naphthol verstärkt Kreatin die rote Färbung.
Gelatine	GEL	Die Verflüssigung von Gelatine durch proteolytische Enzyme setzt Holzkohle frei, die sich im ganzen Röhrchen verteilt.
Glucose + Kaliumnitrat	GLU	
Mannit	MAN	
Inositol	INO	
Sorbit	SOR	
Rhamnose	RHA	
Saccharose	SAC	
Melibiose	MEL	
Amygdalin	AMY	
Arabinose	ARA	

18.5 AUFGABE

Stellen Sie anhand des Lehrbuchs „Brock Mikrobiologie“ bzw. „Brock Biology of Microorganisms“ kurz einige Informationen zu den identifizierten Bakterien-Arten zusammen, z.B. Stoffwechseleigenschaften, Vorkommen, medizinische Bedeutung, usw.: (10 Punkte)

18.6 LITERATUR

- [1] Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., Clark, D. P. (2013): Brock Mikrobiologie, 13., aktualisierte Auflage, Pearson. Kapitel 17.3.5: Die Enterobakterien, S. 725-729; Kapitel 31.1.2: Wachstumsabhängige Identifizierungsmethoden, S. 1302-1306.
- [2] Süßmuth, R., Eberspächer, J., Haag, R., Springer, W.: Mikrobiologisch-biochemisches Praktikum. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1999.