

Bachelor-Studiengang Water-Science

Praktikum Biochemie Teil A: Stoffwechsel-Biochemie (AG Sand)

WS 2014/2015

Inhaltsverzeichnis

1	Vorwort	3
2	Leistungsnachweise	4
2.1	Versuchsprotokolle	4
2.2	Referate	6
2.3	Klausur	6
2.4	Benotung	6
3	Allgemeines	7
3.1	Sicheres Arbeiten im Labor	7
3.2	Steriles Arbeiten in der Mikrobiologie	8
3.3	Zeitlicher Ablauf im WS 2014/15	8
4	Versuche zum Stickstoffkreislauf	10
4.1	Denitrifikation (dissimilatorische Nitratreduktion)	12
4.1.1	Bestimmungsmethoden	14
4.1.2	Auswertung	16
4.2	Fixierung von molekularem Stickstoff	16
4.2.1	Tuschepräparat	17
4.2.2	Auswertung	18
5	Versuche zur Biotechnologie	18
5.1	Isolierung Antibiotika-produzierender Streptomyceten	19
5.2	Isolierung und Charakterisierung von Granaticin	21
5.2.1	Anzucht von <i>Streptomyces violaceoruber</i> Tü 22	22
5.2.2	Extraktion des Antibiotikums aus dem Kulturmedium	23
5.2.3	Bestimmung der antibiotischen Wirksamkeit von Granaticin	23
5.2.4	Antagonistischer Effekt von Leucin auf die antibiotische Wirkung von Granaticin gegen <i>Bacillus subtilis</i>	25
5.3	Gesamtauswertung	27
6	Versuche zur unvollständigen Oxidation	28
6.1	Zellanzucht	29
6.2	Acetoinbestimmung	30
6.3	Gesamtauswertung	31
7	Vermehrung des Bakteriophagen T₄	32
7.1	Titerbestimmung eines T ₄ -Phagenlysates	33
7.2	Bestimmung der Dauer eines Vermehrungszyklus	35
8	Anhang	36
8.1	Benutzung der Laborgeräte	36
8.2	Lichtmikroskopische Techniken	37
8.2.1	Bedienung des Lichtmikroskops	37
8.2.2	Verwendung von Ölimmersionsobjektiven	39
8.2.3	Mikroskopische Beobachtungen am "hängenden Tropfen"	39
8.3	Techniken zur Anreicherung und Isolierung von Bakterien	40
8.3.1	Kulturmedien	41
8.3.2	Herstellung von Nähragarplatten	41

1 Vorwort

Der Kurs hat das Ziel grundlegende Techniken der Biochemie zu vermitteln. Eine sorgfältige Kenntnis der Grundmethoden ist die Voraussetzung, um die neuesten Entwicklungen und Arbeitstechniken in modernen Disziplinen wie Biotechnologie oder Gentechnik zu verstehen und anwenden zu können. Darüber hinaus soll ein breiter Überblick über biochemische Themen gegeben werden.

Die im Rahmen dieses Praktikums durchzuführenden Versuche sind gruppenweise zu bearbeiten. Es ist nötig die Versuche in den Gruppen vorab sorgfältig zu planen und Arbeitsschritte ggf. parallel durchzuführen um den zeitlichen Ablauf der Versuche kursübergreifend zu ermöglichen. Daher werden einige Versuche auch blockweise durchgeführt. Die für die nachfolgend beschriebenen Versuche vorgestellten Geräte- und Materialangaben sind jeweils für eine Gruppe ausgelegt. Die Gruppengröße beziffert sich auf 2 Personen, die sich spätestens am ersten Kurstag gefunden haben sollten. Von jedem Kursteilnehmer sind ein Kittel und eine Schutzbrille sowie ein Laborjournal Taschenrechner, ein wasserfester schwarzer Filzstift und ein Feuerzeug mitzubringen. Weitere mitzubringende Materialien zu den Versuchen sind hier im Skript beschrieben. Ohne selbstständige Vorbereitung mit diesem Skript ist eine sinnvolle Teilnahme am Praktikum und erfolgreiche Versuchsdurchführung nicht möglich und dies würde entsprechend benotet werden.

Wir wünschen Ihnen viel Erfolg im Praktikum!

2 Leistungsnachweise

Als Übung für die Kursteilnehmer und zur Kontrolle der Versuche werden Versuchsprotokolle erstellt, die die Verläufe und die Ergebnisse der durchgeführten Experimente dokumentieren. Die einzelnen Protokolle werden drei Wochen nach Ende des Praktikumsblocks eingesammelt und benotet. Es muss von jeder Gruppe für jeden Versuch ein Protokoll vorliegen, dessen Inhalt allen Gruppenmitgliedern bekannt sein soll! Beginnen Sie frühzeitig mit dem Protokoll, eine Verlängerung der Abgabefrist aufgrund von Zeitnot wird nicht gewährt. Es empfiehlt sich, die Protokolle direkt schon während der Versuchswochen (natürlich nach Beendigung des jeweiligen Versuchstages) zu schreiben.

Wichtig: Die Erfahrung zeigt, dass es nicht möglich ist, sich alle den Versuch betreffenden Fakten, die nicht oder abgewandelt im Skript aufgeführt sind, bis zur Erstellung des Protokolls zu merken. Es ist deshalb unerlässlich, dass **jedes** Gruppenmitglied ein eigenes Laborjournal führt, das alle wichtigen Daten zu den Versuchen enthält. Diese Vorgehensweise erleichtert die spätere Auswertung erheblich! Dieses Laborjournal muss zu jeder Zeit den Betreuern vorzuzeigen sein, nur so sind Fehler im Versuchsablauf nachvollziehbar! Kein Laborjournal gibt Punktabzug.

2.1 Versuchsprotokolle

Allgemeines

Namen von Bakterien werden kursiv, die Gattung groß, die Art kleingeschrieben; z.B. *Escherichia coli* oder *E. coli*. Werden Abkürzungen verwendet, müssen diese entweder im Text eingeführt werden, z.B. *Escherichia coli* (*E. coli*), oder in einem Abkürzungsverzeichnis aufgelistet werden (optional, nur bei Verwendung vieler verschiedener Abkürzungen).

Struktur der Protokolle

1. Titelblatt:

Jedes Teilprotokoll wird mit einem Titelblatt versehen, auf dem das jeweilige Versuchsthema als Überschrift, die Name und Matrikelnummern der Gruppenmitglieder sowie die Gruppennummer angegeben sind.

2. Einleitung:

Das Protokoll beginnt mit einer kurzen Einleitung (0,5 Seiten). Diese enthält den für das Verständnis der Versuche notwendigen theoretischen Hintergrund und soll dem Leser den nötigen Hintergrund zum Versuch geben. Es soll klar dargestellt werden, mit welchem Ziel der Versuch durchgeführt wurde. Am Ende der Einleitung werden die Ziele des Versuchs stichpunktartig aufgeführt.

3. Material und Methoden:

Hier kann auf das Skript verwiesen werden. Abweichungen von den hier aufgeführten Materialien und Methoden sollen allerdings angegeben werden, das können z.B. andere Bakterienstämme, Abweichungen in der Methode, Probenahmeort, etc. sein.

4. Ergebnisse:

Die Ergebnisse sollen in einer für den Leser klaren, eindeutigen Form dargestellt werden. Dabei muss davon ausgegangen werden, dass der Leser nicht im Detail mit den einzelnen Versuchen vertraut ist. Grundsätzlich sollen die Ergebnisse grafisch **oder** tabellarisch dargestellt werden (meist ist eine grafische Darstellung für den Leser vorteilhafter). Die einzelnen Ergebnisse sollten mit einem einleitenden Satz eingeführt werden. Alle Tabellen und Grafiken werden durchnummeriert, zusätzlich bekommen Tabellen eine Überschrift und Abbildungen erhalten eine Bildunterschrift mit Erläuterungen. Hier sollten auch kurz die Eckdaten der jeweiligen zu den Ergebnissen führenden Methode aufgeführt sein. Eine Bildunterschrift zu einer Wachstumskurve könnte also wie folgt aussehen:

Abb. 1: Wachstum von *E. coli* bei 30 °C in Glycerin-Medium, photometrisch ermittelt durch Messung der OD bei 578 nm.

Sollten mehrere Graphen / Ansätze in einer gemeinsamen Grafik dargestellt werden, müssen die Legendeneinträge eindeutig und verständlich sein. Informationen wie „Ansatz 1“, „Ansatz 2“, „Ansatz 3“ usw. sind unzureichend. Entweder muss in solch einem Fall in der Bildunterschrift erläutert werden, worin sich die einzelnen Ansätze unterscheiden oder die Legende muss entsprechend deutlich benannt werden, z.B. „Ansatz 1: Glycerin-Medium ohne Zugabe von Lactose“. Wurden Mehrfachbestimmungen durchgeführt (z.B. bei einer Kalibrierung), muss klar erkenntlich sein, wie die gezeigten Mittelwerte zustande kamen und aus wie vielen Einzelwerten diese bestehen, z.B. „dargestellt sind Mittelwerte aus n=3 Messungen“. Werden Zeichnungen als Ergebnis verlangt, müssen diese klar und deutlich beschriftet werden, die verschiedenen Objekte in der Zeichnung müssen klar gekennzeichnet werden. Wurde mikroskopiert, muss in der Zeichnung der Vergrößerungsfaktor angegeben werden.

5. Diskussion:

Hier werden die Versuchsergebnisse interpretiert, mit den Erwartungen verglichen und mögliche Fehler (sinnvoll!) erörtert. Es können Vorschläge für weitergehende Experimente gemacht werden, mit denen sich aufgetretene Probleme genauer analysieren lassen. Unstimmige (oder aufgrund fehlgeschlagener Versuche fehlende) Ergebnisse sollten mit den Resultaten anderer Gruppen verglichen werden. Es sollen sinnige Hypothesen aufgestellt werden, warum Versuche möglicherweise fehlgeschlagen sind. Darüber hinaus wird erwartet, dass die Versuchsergebnisse auch anhand der Literatur diskutiert werden.

6. Literatur:

Zum Schluss wird die benutzte **Literatur** angeführt. Im Text sollten die Zitationen in der Form (Autor, Jahr) angegeben werden. Wikipedia ist keine Quelle! Die Literaturangaben sollen wie folgt aussehen.

Bücher: Verfassername, Vorname (**Jahr**): Titel. Nebentitel. Auflage (falls nicht 1. Aufl.). Ort: Verlag (= Reihentitel)

Artikel: Verfassername, Vorname (**Jahr**): Titel. Nebentitel. In: Zeitschriftentitel **Jahrgangsnummer**(Ausgabe): S. y-z.

2.2 Referate

Es werden gruppenweise Referate (sprich: Powerpoint-Präsentationen) zu verschiedenen, versuchsbezogenen Themen gehalten. Die Referate sollten nicht länger als 20 min (+5 min Diskussion) sein. Dabei sollte die Sprechzeit gleichmäßig unter allen Gruppenmitgliedern aufgeteilt werden. Bei jedem Referat soll ein Handout vorbereitet werden, das auf einen Blick die wichtigsten Punkte zusammen fasst und es dem Leser erleichtert, dem Vortrag zu folgen. Benotungsgrundlage sind Inhalt des Vortrags, Aufbau und Qualität der Powerpoint-Folien, Handout sowie die Qualität des mündlichen Vortrags (frei, abgelesen, usw.). Jedes Gruppenmitglied wird einzeln benotet.

2.3 Klausur

Am Ende des Praktikums wird eine Klausur zu den Versuchen, deren theoretischem Hintergrund und den Seminarthemen gestellt.

2.4 Benotung

Die Bewertung der Protokolle, Referate und Kolloquien erfolgt nach folgendem Punktesystem: 100%, 90%, 75%, 50% und 49 %, wobei man mit letzterer Punktzahl für diesen Versuch durchgefallen ist. Sollte die eine oder andere Gruppe im ersten Versuch durchfallen, darf das Kolloquium wiederholt, bzw. das Protokoll erneut abgegeben werden. Beim Zweitversuch können dann maximal 75% erreicht werden. Eine Wiederholung / Neuabgabe bei 50% oder mehr ist nicht möglich. Eine Wiederholung der Referate ist nicht möglich, hier gehen die erreichten Punkte direkt in die Endnote ein.

Die Endnote des Praktikums setzt sich wie folgt zusammen:

Teil A: Protokolle (AG Siebers)	20%
Teil A: Abtestat (AG Siebers)	20%
Referat	20%
Teil B: Protokolle (AG Sand)	20%
Teil B: Abtestat (AG Sand)	20%
Gesamt	100%

Viel Erfolg!

3 Allgemeines

3.1 Sicheres Arbeiten im Labor

Beim experimentellen Arbeiten in einem (mikrobiologischen) Labor müssen verschiedene Sicherheitsregeln beachtet werden die durch gesetzlich verankerte Unfallverhütungsvorschriften vorgeschrieben sind:

- Nicht essen, trinken oder rauchen.
- Türen und Fenster geschlossen halten, um Durchzug zu vermeiden (Gefahr der Aufwirbelung oder Verbreitung von Feinstäuben und Mikroorganismen).
- Laborkittel, Schutzbrille und falls nötig Handschuhe tragen.
- Bei Umgang mit giftigen und insbesondere flüchtigen Chemikalien im Abzug arbeiten.
- Verwendete Glasgefäße nach Benutzung in Sammelbehältern lagern und gegebenenfalls vor der Reinigung autoklavieren.
- Arbeitsplatz in Ordnung halten. Nicht benötigte Arbeitsmaterialien wegräumen.
- Hände vor und nach der Arbeit desinfizieren und waschen.
- Bei Unfällen wie Verschütten oder Verschlucken von Kulturen/Chemikalien, Verbrennungen, Schnittverletzungen oder Verätzungen sofort die Betreuer verständigen. Gefährliche Situationen lassen sich durch vorausschauendes Arbeiten vermeiden.

Es muss darauf hingewiesen werden, dass die Nichteinhaltung der in der Sicherheitsbelehrung genannten Verhaltenshinweisen oder sonstige sicherheitsrelevante Fehler oder Mißachtung von Anweisungen der Betreuer sanktioniert werden können und gegebenenfalls zum Ausschluss vom Praktikum führen kann.

Das Arbeiten mit Chemikalien erfordert besondere Sorgfalt, weil für einige Versuche gesundheitsschädliche und/oder umweltgefährdende Stoffe verwendet werden. Die Behälter solcher Chemikalien sind mit kodierten Warnhinweisen (Gefahrensymbolen) versehen, die durch die sogenannten **R**isiko- und **S**icherheits-Sätze näher beschrieben werden. Im Labor und als Aushang im Flur liegen Listen dieser Sätze aus, die Hinweise auf besondere Gefahren (R-Sätze) und Sicherheitsratschläge (S-Sätze) geben.

Die in den Kursexperimenten von uns verwendenden Bakterien gelten als nicht pathogen. Trotzdem ist Vorsicht angebracht, weil bei einer Infektion offener Wunden (auch kleiner, alltäglich auftretender unscheinbarer Hautverletzungen) allergische Reaktionen auftreten können. Aus diesem Grund ist ein direkter Hautkontakt mit den Bakterien zu vermeiden.

Wichtig: Das Skript liefert die Grundlage für das Verständnis und die sichere Durchführung der Versuche. Insofern muss die Anleitung für einen Versuch vor dem Versuchstag gelesen werden und auch in Form eines Vorprotokolls im Laborjournal eingetragen werden. Dieses Vorprotokoll muss beinhalten: Ziel des Versuches, Tabellenvorbereitung, wenn an diesem Tag Ergebnisse zu erwarten sind, und eventuelle Fragen zum Versuch sollten notiert sein. Vorprotokolle werden stichprobenartig von den Betreuern kontrolliert. An den Versuchstagen werden kurze Vorbesprechungen abgehalten werden, bei denen auftretende Fragen geklärt werden können. Ausgeloste Praktikumssteilnehmer werden zu Beginn der Vorbesprechung erläutern welche Versuche am Versuchstag behandelt werden und die geplanten Arbeitsabläufe benennen. Eine gute Vorbereitung ist daher empfehlenswert und hilfreich für eine erfolgreiche Praktikumsdurchführung.

3.2 Steriles Arbeiten in der Mikrobiologie

Da Mikroorganismen in der Umwelt überall vorhanden sind, ist steriles Arbeiten eine Grundvoraussetzung für mikrobiologische Arbeiten. Es dürfen weder unkontrolliert (möglicherweise pathogene) Organismen freigesetzt, noch in Kulturmedien eingebracht und mit kultiviert werden. Deshalb sind folgende Regeln zu beachten:

- Vor dem Arbeiten den Arbeitsplatz reinigen (dekontaminieren).
- Vermeiden von Luftturbulenzen (Türen und Fenster geschlossen halten, Husten und Niesen vermeiden).
- Ränder von Glasgeräten und Spatel in der Flamme abflämmen. Impfösen ausglühen (beides wird von den Betreuern demonstriert).
- Glaspipetten bei Entnahme aus den Köchern nur am oberen Ende anfassen. Darauf achten, dass das untere (sterile) Ende in der Nähe des Bunsenbrenners bleibt und nicht mit unsterilen Gegenständen oder den Händen in Kontakt kommt. Gefäße nicht von außen mit den Pipetten berühren.
- Beim Arbeiten mit Kolbenhubpipetten ist darauf zu achten, dass nur die sterile Pipettenspitze das Gefäß oder die Flüssigkeit berührt. Die korrekte Handhabung wird von den Betreuern demonstriert. Gruppenweise wird die korrekte Arbeitsweise mit den Kolbenhubpipetten geübt und kontrolliert. Jede Gruppe ist für die Funktionstüchtigkeit des Pipettensatzes verantwortlich.
- Sterile Flaschen oder Kulturgefäße nur kurz öffnen und dann an der Öffnung abflammen.
- Arbeiten mit Kulturen oder sterilisierten Materialien in unmittelbarer Nähe des Bunsenbrenners.

3.3 Zeitlicher Ablauf im WS 2014/15

Der erste Praktikumstag ist Freitag der **7.11.2014**. **Sie beginnen mit der Vorbereitung von Medien und Lösungen**, die für die Versuche benötigt werden. Daher ist es notwendig, dass die Laborausstattung an diesem Tag mitgebracht wird (Laborkittel, Schutzbrille, Laborjournal, Kugelschreiber, wasserfester Filzstift, Feuerzeug, Taschenrechner, Haushaltsrolle und lange Hose und feste Schuhe). Das Praktikum wird in Zweiergruppen durchgeführt. Für die Medienvorbereitung wird der Kurs geteilt, so dass am 7.11. und am 10.11.2014 jeweils nur ein Gruppenmitglied anwesend sein muss.

An jedem Versuchstag wird eine kurze Vorbesprechung abgehalten, in der auf Besonderheiten der einzelnen Versuche oder des Ablaufplans eingegangen wird. Hier zeigt sich dann auch, ob Sie ausreichend vorbereitet sind!

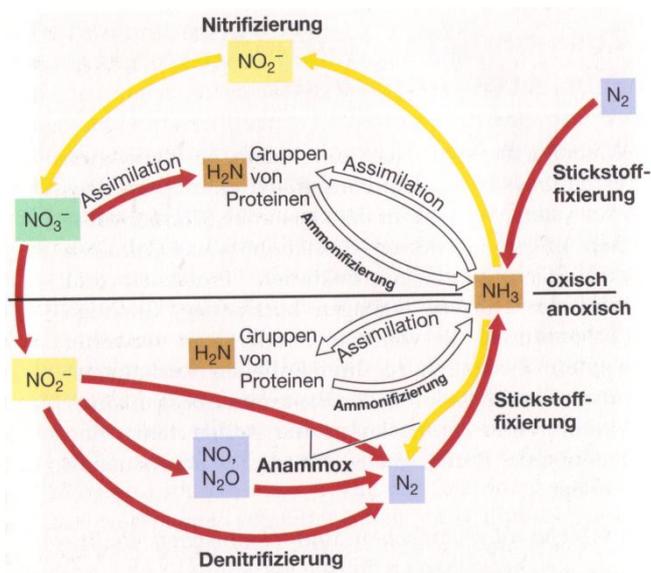
Das Versuchsprogramm in diesem Praktikum ist zeitlich sehr anspruchsvoll. **Daher ist es unbedingt nötig, dass sich die Gruppenpartner selbst organisieren.** Verschiedene Versuche beinhalten Zellanzuchten, die über 4 – 6 Stunden, mit Beprobung im Abstand von 30 Minuten, bis zum Erreichen einer ausreichenden Zelldichte verfolgt werden. Diese Versuche müssen an den jeweiligen Versuchstagen rechtzeitig begonnen werden; dies gilt auch für andere **zeitintensive Versuche**, bzw. Versuche die **am betreffenden Tag kursübergreifend abgeschlossen werden müssen**. Diese sind im Zeitplan **rot markiert**.

Zeitplan

Tag	Uhrzeit	Versuch	Aufgabe(n)	Raum
Fr, 7.11.	10:00 – 18:00		Block 1 Medienvorbereitung	S05 T02 A32
Mo, 10.11.	13:00 – 18:00		Block 2 Medienvorbereitung	S05 T02 A32
		5.2.1	Tag 1, Animpfen + Probenahme	
Di, 11.11.	10:00 – 18:00	4.1	Tag 1, Animpfen der Durham-Röhrchen	S05 T02 A32
		4.2	Tag 1, Animpfen Mannitagar	
		5.2.1	Tag 2, Probenahme	
		6.1	Tag 1, Animpfen der <i>B. subtilis</i> ÜN Kultur	
Mi, 12.11.	09:00 – 18:00	6.1	Tag 2, Anzucht / Wachstumskurve	S05 T02 A32
		4.1	Tag 2, Probenahme / Tüpfeltest	
		5.1	Tag 1, Jensenagarplatten beimpfen	
		5.2.1	Tag 3, Probenahme	
		7.1	Animpfen <i>E. coli</i> ÜN Kultur	
Do, 13.11.	08:00 – 10:00		Seminar 1	T03 R02 D39
	10:00 – 18:00	4.1	Tag 3, Probenahme / Tüpfeltest	S05 T02 A32
		5.2.1	Tag 4, Probenahme	
		6.2	Acetoinbestimmung	
		7.1	Tag 1, Phagentiterbestimmung	
Fr, 14.11.	08:00 – 10:00		Seminar 2	T03 R02 D39
	13:30 – 18:00	5.2.1	Tag 5, Probenahme, Zellernte (5.2.1)	S05 T02 A32
		5.2.2	Granaticinextraktion	
		4.1	Tag 4, Probenahme / Tüpfeltest	
		7.1	Tag 2, Auswertung Phagentiterbestimmung	
Mo, 17.11.	08:00 – 10:00		Seminar 3	T03 R02 D39
	10:00 – 13:00		Vorlesung	
	13:00 – 18:00	4.1	Tag 7, Probenahme / Tüpfeltest	S05 T02 A32
		5.1	Jensenagarplatten überschichten	
		5.2.4	Tag 1, Antagonistischer Effekt von Leucin auf die antibiotische Wirkung von Granaticin	
Di, 18.11.	10:00 – 18:00	4.1	Tag 8, Probenahme / Tüpfeltest	S05 T02 A32
		5.1	Jensenagarplatten auswerten	
		5.2.3	Tag 1, Wirksamkeit von Granaticin	
		5.2.4	Tag 2, Auswertung: Antagonistischer Effekt von Leucin auf die antibiotische Wirkung von Granaticin	
		7.2	Block 1 Vermehrungszyklus T4-Phage	
Mi, 19.11.	08:00 – 10:00		Seminar 4	T03 R02 D39
	10:00 – 18:00	4.1	Tag 9, Probenahme / Tüpfeltest	S05 T02 A32
		5.2.3	Tag 2, Auswertung: Wirksamkeit von Granaticin	
		7.2	Block 2 Vermehrungszyklus T4-Phage	
Do, 20.11.	08:00 – 10:00		Seminar 5	T03 R02 D39
	10:00 – 18:00	4.1	Tag 10, Probenahme / Tüpfeltest	S05 T02 A32
			Quantitative Nitritbestimmung	
		4.2	Mannitplatten auswerten / Mikroskopie	
Fr, 21.11.	08:00 – 10:00		Seminar 6	T03 R02 D39
	10:00 – 18:00		Reinigung der Laborausstattung- und räume Aufräumen / Inventur / Platzabgabe	S05 T02 A32

4 Versuche zum Stickstoffkreislauf

Das Leben auf der Erde ist eng mit dem Element Stickstoff verknüpft. Die unterschiedlichen Wertigkeitsstufen (Oxidationsstufen) des Stickstoffs reichen von -3 in organischen stickstoffhaltigen Verbindungen, wie z.B. Proteinen oder im Ammoniak/Ammonium ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$) über 0 in freiem, gasförmigen Stickstoff (N_2) bis +3 in Nitrit (NO_2^-) und +5 in Nitrat (NO_3^-). Durch biologische Aktivität unterliegt gebundener Stickstoff einem schnellen Um- und Abbau, so dass es zu keiner nennenswerten Anreicherung in der Natur kommt. Der Stickstoffkreislauf ist durch Mobilisierung und Immobilisierung unterschiedlicher Verbindungen charakterisiert. Immobilisierter Stickstoff liegt als organisch gebundener Stickstoff vor. Das bei der Zersetzung von Proteinen anfallende Ammoniak (Ammonifizierung oder Desaminierung) wird unter aeroben Bedingungen schnell über Nitrit zu Nitrat oxidiert (Abb. 1).



Prozess	Modellorganismen
Nitrifizierung <ul style="list-style-type: none"> $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$ $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ 	<i>Nitrosomonas</i> <i>Nitrobacter</i>
Denitrifizierung $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$ (via NO_2^- , NO , N_2O)	<i>Bacillus</i> , <i>Paracoccus</i> , <i>Pseudomonas</i>
N_2-Fixierung Aerob Anaerob Symbiotisch	<i>Azotobacter</i> , Cyanobacteria <i>Clostridium</i> , grüne und Purpurbakterien <i>Rhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Frankia</i>
Ammonifizierung $(\text{N}_{\text{org}} \rightarrow \text{NH}_4^+)$	kann von vielen Organismen ausgeführt werden
Anammox $(\text{NO}_2^- + \text{NH}_3 \rightarrow 2\text{N}_2)$	<i>Brocadia</i>

Abb. 1: Redoxzyklus des Stickstoffs. Oxidationen werden durch gelbe Pfeile, Reduktionen durch rote dargestellt. Reaktionen ohne Änderung der Oxidationszahl des Stickstoffs sind durch weiße Pfeile dargestellt. Die Tabelle zeigt eine Übersicht der Hauptprozesse und Prokaryoten im Stickstoffkreislauf (modifiziert nach Brock Mikrobiologie, 2006).

Abhängig von den Umweltbedingungen kann die Nitrifizierung vor Stickstoffverlust schützen oder zu Verlusten führen. Die Nitrifikation wirkt der Verflüchtigung des Ammoniaks in die Atmosphäre durch Umwandlung von Ammoniak in Nitrat entgegen, andererseits ermöglicht sie aber auch vom Nitrit oder Nitrat ausgehende Stickstoffverluste durch folgende Prozesse:

- (1) **Denitrifizierung**, die mikrobielle Reduktion von NO_3^- , NO_2^- (oder N_2O) zu (NO), N_2O oder N_2 .
- (2) **Chemodenitrifizierung** von NO_2^- bei pH-Werten kleiner 7,0. Dabei wird NO entsprechend der Gleichung $2 \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} + \text{NO}_3^-$ an die Atmosphäre abgegeben. Da in den meisten Böden die Nitritoxidationsaktivität nitrifizierender Bakterien größer als die

Ammoniakoxidationsaktivität ist, werden Nitritkonzentrationen über 1 ppm selten angetroffen. Vom stofflichen Umsatz her ist dieser Prozess von geringer Bedeutung.

- (3) **Laugung.** Anders als Ammonium (NH_4^+), das z.B. an Tonminerale fest gebunden wird, ist NO_3^- sehr mobil. Der Eintrag von NO_3^- in Bäche, Flüsse, Seen, Meer- und Grundwasser erfolgt durch Auswaschen (Laugen) von NO_3^- , z.B. aus überdüngten Böden.

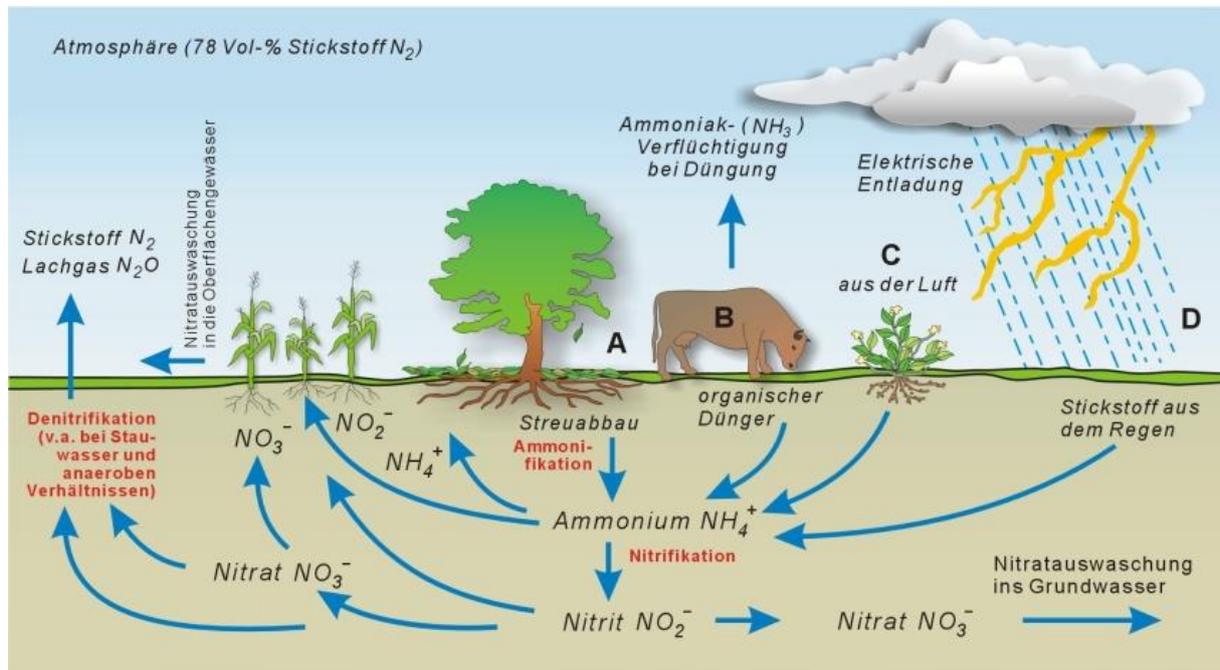
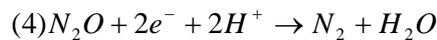


Abb. 2: Schematische Darstellung des Stickstoffkreislaufes im Boden (Quelle: Bayerisches Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz).

Der in Abb. 2 schematisch dargestellte Stickstoffkreislauf des Bodens gilt als sehr gut untersucht. Die gemessenen Stickstoff-Flüsse ändern sich mit dem Typ des Ökosystems. Am genauesten wurde der Eintrag des Stickstoffs über biologische N_2 -Fixierung bestimmt, die Verluste über Denitrifikation und Ammoniakverflüchtigung waren bisher weniger genau messbar.

4.1 Denitrifikation (dissimilatorische Nitratreduktion)

Viele aerobe Bakterien können NO_3^- anstelle von Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor verwenden (Nitratatmung, Denitrifizierung). Die dabei auftretenden gasförmigen Zwischenprodukte sind NO und N_2O , Endprodukt ist meist N_2 . Alle zur Denitrifikation gehörenden Enzyme wie Nitrat- (1), Nitrit- (2), NO - (3) und N_2O -Reduktasen (4) sind Metallproteine, die eines oder mehrere der Übergangsmetalle Mo, Fe und Cu in unterschiedlichen Kofaktoren enthalten. Die folgenden Reaktionen werden von den genannten Enzymen katalysiert:



Die Enzyme sind membranassoziiert. Die Nitratreduktase ist ein Molybdo-Eisen-Schwefelprotein, das der Sulfitoxidase und der Xanthinoxidoreduktase ähnelt. Sie ist an der cytoplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran gebunden.

Der Energiegewinn aus der Veratmung von organischen (z.B. Glucose) und anorganischen Substraten (z.B. $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) mit NO_3^- (1) ist nur wenig geringer als der mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor (2).



Sauerstofflimitierung ist ein wichtiger Faktor für die Induktion der Enzyme, die die einzelnen Teilreaktionen der Denitrifikation katalysieren. Die Denitrifikation ist somit ein spezieller Atmungstyp der für die schrittweise Kopplung der Elektronentransportphosphorylierung an die sequenzielle Reduktion der oxidierten Stickstoffverbindungen sorgt.

Heute sind etwa 130 Arten aus 50 Gattungen bekannt, die denitrifizieren können. Dazu gehören auch Archaeobakterien wie *Halobacterium denitrificans*. Bei den Pseudomonaden sind 28 Arten, bei *Neisseria* 13 und bei *Bacillus* 12 Arten bekannt. Innerhalb der Proteobakterien findet man Denitrifikanten in allen Subdivisionen.

Im Rahmen dieser Versuchsreihe soll die Verstoffwechslung von NO_3^- und Zitronensäure und der dadurch bedingte Alkalitätsanstieg gemessen werden.

Ziele des Versuchs:

Aus einer selbst mitgebrachten Bodenprobe sollen denitrifizierende Mikroorganismen angereichert werden. Der Verlauf der Denitrifikation soll anhand der Konzentration von Nitrat und Nitrit sowie des pH-Wertes beobachtet werden.

Material

- Gartenerde
- Mikroliterpipetten
- Sterile Spitzen
- Unsterile Reagier-Gefäße 1,5 mL
- Filterpapier
- Impföse
- pH-Indikatorpapier
- Voll-Küvetten
- Nitrat-Teststäbchen, halbiert oder gedrittelt
- Amidoschwefelsäure
- 2 Lange Reagenzgläser mit Durham-Röhrchen
- Vortexer
- 20 mL 1,25 M HCl
- 20 mL 12,5 %ige Ammoniak-Lösung
- Photometer

Zur Beachtung: Alle Teststäbchen sollen der Länge nach mit einer Schere geteilt werden!

- 2 lange Reagenzgläser mit Durham-Röhrchen und jeweils 12 mL Nährlösung (Denitrifikanten-Medium)

Substanz	Menge
Zitronensäure	5,00 g
NaNO ₃	2,00 g
KH ₂ PO ₄	0,50 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,20 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,05 g
NaOH	2,00 g
Leitungswasser (!)	ad 1000 mL

pH mit 2 M NaOH auf 6,8 - 7,0 einstellen und 30' bei 121°C autoklavieren

- 5 mL Tüpfel-Reagenz

Lösung 1:

Substanz	Menge
Sulfanilamid	4,00 g
Ortho-Phosphorsäure	10,0 mL
Aqua dest.	ad 50 mL

Lösung 2:

Substanz	Menge
N-(1-naphtyl)-ethylendiamin-dihydroxychlorid	0,20 g
Aqua dest.	ad 50 mL

Lösungen vereinigen und in brauner Flasche dunkel und kühl aufbewahren. Alternativ Aufbewahrungsgefäß mit Alufolie umwickeln.

- 10 mM Nitrit-Stammlösung (690 mg NaNO₂ ad 1 L Aqua dest.)
- 20 mL Rieglers Reagenz

Substanz	Menge
4-Aminonaphthalin-1-sulfonsäure Na-Salz	2,00 g
1-Naphtol	1,00 g
Aqua dest.	ad 200 mL

15 min rühren, dann durch Faltenfilter filtrieren und in brauner Flasche dunkel aufbewahren

Arbeitsgang

Tag 1:

1. Ein langes Reagenzglas mit Durham-Röhrchen und 5 ml Denitrifikanten-Nährlösung (Abb. 3) wird mit einer Spatelspitze (sehr wenige Erdpartikel!!!) Gartenerde beimpft und zusammen mit einer unbeimpften Kontrolle (nur Denitrifikanten-Nährlösung) bei 30°C stehend inkubiert bis kein Nitrat mehr nachweisbar ist (siehe Abb. 3).

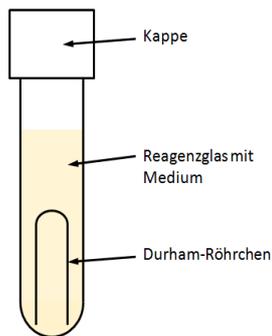


Abb.3: Reagenzglas mit Medium und Durham-Röhrchen

2. Direkt nach Inokulation wird die erste 300µL Probe für die pH-Wert-Bestimmung, den Tüpfeltest auf Nitrit und den Nitrattest genommen.

Tag 2 - Ende:

3. Die Anreicherung von Denitrifikanten wird durch Nachweis der NO_2^- - und NO_3^- -Bildung in der Kultur regelmäßig überprüft. Der Verlauf der nach wenigen Tagen auftretenden Gasentwicklung durch N_2O - und N_2 -Bildung ist zu protokollieren.
4. Hierfür werden **täglich 300 µL Probe** für die pH-Wert-Bestimmung, den Tüpfeltest auf Nitrit und den Nitrattest entnommen.
5. Wenn in einer der Proben Nitrit nachweisbar ist, sind jeweils mindestens 200 µL der Probe einzufrieren.
6. Die von den verschiedenen Tagen gesammelten, eingefrorenen Proben werden am Ende des Versuches quantitativ auf Nitrit untersucht.

4.1.1 Bestimmungsmethoden

Semiquantitativer Nachweis von Nitrat

Für den Nachweis von Nitrat werden Teststäbchen von Merck (Merckoquant 1.10020.001) verwendet. Eventuell in der Probe vorhandenes Nitrit (erst den Tüpfeltest - s. nächste Seite – durchführen) stört die Messung und muss mit Amidoschwefelsäure ausgetrieben werden. Hierfür wird eine Spatelspitze Amidoschwefelsäure (Feststoff) in eine Petrischale oder auf Parafilm gegeben und 50 µL Probe werden hinzu gegeben und vermischt. Nach 10 Sekunden kann das Nitrat-Teststäbchen durch den Tropfen gezogen werden. Das obere Testfeld (Nitrit) sollte sich nun nicht verfärben.

Qualitativer Nachweis von Nitrit (Tüpfeltest)

Nitrit wird mit Tüpfel-Reagenz nachgewiesen. Nitriten bilden in saurer Lösung (pH 1,9) mit Sulfanilamid und N-(1-naphtyl)-ethylendiamin-dihydroxychlorid einen intensiv rosa gefärbten Azofarbstoff.

In Vorbereitung auf die durchzuführende Tüpfelreaktion wird zunächst Filterpapier tröpfchenweise mit Tüpfelreagenz getränkt (kann sich leicht rosa verfärben). Auf das derart vorbehandelte Filterpapier wird mit einer sterilen Impföse Kulturlösung aufgetragen.

Kräftige Pinkfärbung zeigt das Vorhandensein von Nitrit an. Als Kontrollen werden eine Nitritlösung und Aqua dest. getestet.

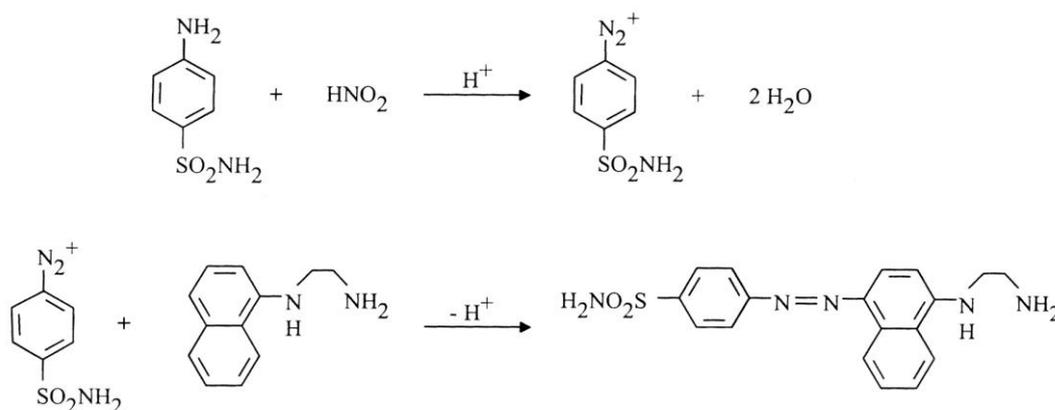


Abb. 4: Kolorimetrischer Nachweis von Nitrit durch Diazotierung und anschließende Azokupplung

Quantitativer Nachweis von Nitrit

Die Farbreaktion wird in langen Reagenzgläsern in 2 Parallelen durchgeführt. Plastikkappen verwenden, da die Aluminiumkappen von den Ammoniak-Dämpfen angegriffen werden. Als Eichlösung dient 2, 4, 6, 8 und 10 mM NaNO₂-Lösung (in Eppis). Eine 10 mM NaNO₂-Stammlösung ist vorhanden.

Tab. 1: Pipettierschema für die Herstellung der Eichlösungen

Konzentration [mM]	0	2	4	6	8	10
Stammlösung [mL]	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Aqua dest. [mL]	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0

1. 5 mL Aqua dest. in Reagenzröhrchen geben und 25 µL Probe/Eichlösung hinzufügen.
2. 100 µL Rieglers Reagenz zugeben und vortexen
3. Mit 100 µL 1,25 M HCl ansäuern und vortexen
4. Genau 90 sec nach Zugabe der Salzsäure mit 100 µL 12,5 %iger Ammoniak-Lösung alkalisieren und vortexen
5. Reagenzgläser im Dunkeln aufbewahren, nach ca. 10 min Extinktion gegen den Blindwert messen (546 nm)

4.1.2 Auswertung

Stellen Sie den Verlauf von pH-Wert sowie Nitrit- und Nitratkonzentration gegen die Zeit tabellarisch und graphisch dar. Nitrit- und Nitratkonzentration sollten dabei sinnvollerweise in einem gemeinsamen Diagramm dargestellt werden, um den Verlauf der Denitrifikation beurteilen zu können. Interpretieren und erläutern sie anschließend den Kurvenverlauf.

4.2 Fixierung von molekularem Stickstoff

Nur Prokaryoten, die den Nitrogenase Enzymkomplex besitzen, sind in der Lage molekularen Stickstoff (N_2) zu Ammoniak (NH_3) zu reduzieren. Dazu gehören u.a. Vertreter der Gattungen *Azotobacter* (aerob, frei lebend), *Rhizobium* (aerob, symbiotisch), *Nostoc* (aerob, phototroph), *Rhodospseudomonas* (anaerob, phototroph) und *Clostridium* (anaerob, chemotroph). Die Nitrogenase besteht aus zwei Komponenten, der Nitrogenase und der Nitrogenase-Reduktase. Beide Einheiten sind Eisen-Schwefel-Proteine welche im Cytoplasma lokalisiert und außerordentlich sauerstoffempfindlich sind. Die Nitrogenase besteht aus vier Untereinheiten die je ein Atom Molybdän enthalten. Mit Hilfe von Ferredoxin und Flavodoxin werden Elektronen zunächst auf die Nitrogenase-Reduktase übertragen und dann unter ATP-Verbrauch auf die Nitrogenase weitergeleitet. Dieses Enzym katalysiert die Reduktion von N_2 . Gleichzeitig werden zwei Protonen zu H_2 reduziert. Die Nitrogenaseaktivität wird durch Ammonium-Ionen reprimiert.

Ziele des Versuchs

Azotobacter spp. soll aus selbstmitgebrachter Gartenerde angereichert und mikroskopisch charakterisiert werden.

Material

- Trockene Gartenerde
- Impföse
- Leitungswasser (!)
- Hohlschliffobjektträger
- Vaseline
- Mikroskop, Tusche, Deckgläser
- Sieb
- 5 Mannit-Agarplatten

Substanz	Menge
Mannit	20,0 g
KH_2PO_4	1,00 g
Spurenelementlösung n. Drews	5,00 mL
Agar (Kobe 1)	12,0 g
Leitungswasser (!)	ad 1000 mL

pH **VOR** Zugabe des Agars auf 7.5 einstellen. Fertigen Agar 30 min bei 121 °C autoklavieren und danach bei 60 °C bis zum Gießen der Platten lagern.

Arbeitsgang

Tag 1:

1. Es werden 5 Mannit-Agarplatten mit unterschiedlichen Mengen fein gesiebter Gartenerde bestreut und 9 Tage bei 28°C bebrütet. Platten in Tüten packen, um Verdunstung zu vermeiden.

Tag 8:

2. Danach werden große, schleimige, anfangs weißliche, später bräunliche Kolonien mikroskopisch im Tuschepräparat auf *Azotobacter* untersucht

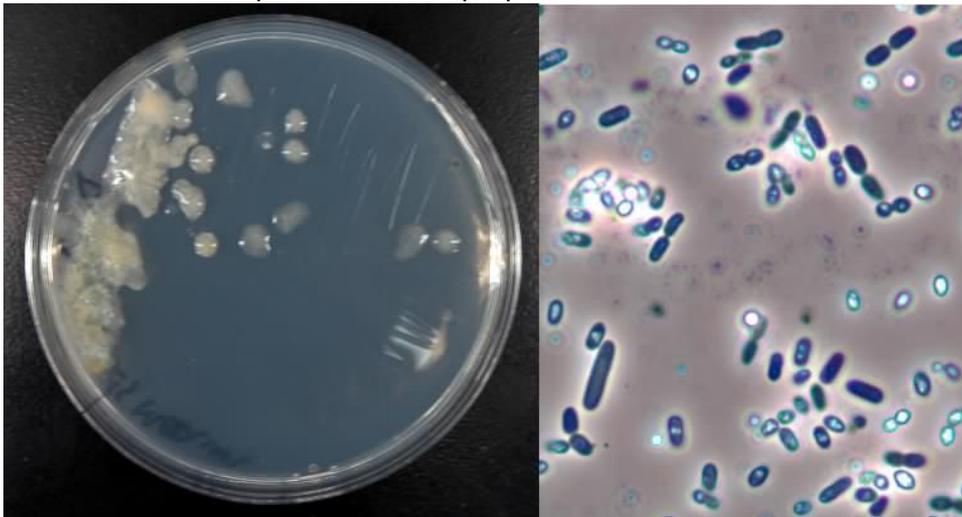


Abb. 5: *Azotobacter* Kolonien (links) sind oft schleimig – aufgrund der Synthese von Exopolysacchariden - und pigmentiert. Rechts eine Einzelkolonie in flüssiger Aufschwemmung in 1000X Vergrößerung. Sowohl Cysten (im Phasenkontrast leuchtenden Ovale) als auch die vegetativen Zellen (im Phasenkontrast dunkel) sind sichtbar.

4.2.1 Tuschepräparat

Mit einer Impföse wird eine Probe entnommen und eine in einem Tropfen Leitungswasser (50 µL) suspendiert. Anschließend wird die Suspension mit Tusche im Verhältnis 3:2 (30 µL Suspension : 20 µL Tusche) gemischt. Ein Tröpfchen (25 µL) von diesem Gemisch gibt man auf die Mitte eines Deckglases. Mit einem Bruchstück eines zweiten Deckglases wird das Tröpfchen bedeckt, das sich kapillar zwischen den Glasoberflächen ausbreitet. Falls erforderlich muss mit Filterpapier noch etwas Flüssigkeit vom Präparat abgesaugt werden. Dann wird das Deckgläschen mit Vaseline auf einem Hohlschliffobjektträger fixiert, um die Verdunstung zu minimieren. Unter dem Mikroskop erscheinen die Schleimhüllen im Tuschepräparat als helle Höfe. Im Zentrum der Schleimhöfe befinden sich große, pleomorphe Zellen. In Präparaten von Anreicherungskulturen befinden sich häufig Zellen von *Azotobacter chroococcum*. Die Zellen sind kugel- bis stäbchenförmig und relativ groß (ca. 2 x 3 µm).

Dies ist ein abgewandelte Version des „hängenden Tropfens“- siehe Anhang S. 49. Hier wird jedoch kein hängender Tropfen verwendet.

4.2.2 Auswertung

Beurteilen sie die Anreicherungskulturen und skizzieren sie die mikroskopischen Präparate. Welche morphologischen Besonderheiten weist *Azotobacter* auf und warum?

5 Versuche zur Biotechnologie

Biotechnologie ist die Lehre von der Anwendung biologischer Prozesse im Rahmen technischer Verfahren und industrieller Produktionen. Speziell für die Lebensmittelherstellung haben biologische Prozesse seit mehr als 2000 Jahren eine zentrale Bedeutung. 1983 fand in London die erste weltweite Konferenz über den kommerziellen Einsatz biologischer Verfahren statt. Seit dieser Zeit hat eine weitgefächerte Entwicklung eingesetzt, die in der Praxis mittlerweile fest verankert ist und u. a. zu folgenden Anwendungen führte: Fermentation einschließlich Biomassegewinnung, Ölgewinnung, Laugung von Armerzen, Biotransformation/Biokatalysatoren, Arzneimittelherstellung, Umweltschutz mit entsprechenden Patenten und Lizenzen. Als interdisziplinäres Fach umfasst die Biotechnologie 3 Teilgebiete:

1. Mikrobiologie einschließlich molekulare Genetik
2. Biochemie, physikalische und technische Chemie
3. Verfahrenstechnik und Apparatebau

Die Biotechnologie als eine anwendungsorientierte naturwissenschaftliche Disziplin ist eng mit wirtschaftlichen Aspekten verknüpft. Ziel ist immer die Herstellung und der Verkauf eines Produktes. Die dafür notwendigen Verfahren verlaufen gemäß der Gleichung:



Die Verfahrenstechnik beinhaltet die Umsetzung eines Substrates (biologische und nicht biologische Materialien) mit Hilfe von Bakterien-, Pilz- oder tierischen Zellkulturen (Fermentation), die anschließenden Aufarbeitung (Gewinnung der Produkte oder biologischer Zellen) und die Konfektionierung (Abfüllen der Produkte).

Produktion von Antibiotika

Zahlreiche Mikroorganismen produzieren während des Wachstums sekundäre Metabolite. Hierzu gehören u.a. die Antibiotika, Mycotoxine, Vitamine und Alkaloide. Durch die Fähigkeit zur Produktion solcher Metabolite haben viele dieser Organismen eine große wirtschaftliche Bedeutung erlangt.

Tab. 1: Herkunft, Stoffklasse und Wirkungsort ausgewählter, von Streptomyceten produzierter Antibiotika.

Antibiotikum	Produzent	Stoffklasse	Wirkort
Novobiocin	<i>Streptomyces niveus</i>	Substituiertes Coumarin	DNA-Gyrase
Streptomycin	<i>Streptomyces griseus</i>	Aminoglycosid	Proteinsynthese
Chloramphenicol	<i>Streptomyces venezuelae</i>	halogenierter subst. Aromat	Proteinsynthese
Decoyinin	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Adenosinderivat	GMP-Synthese
Cycloserin	<i>Streptomyces orchidecus</i>	Aminosäureanalogon	Alaninracemase
Phosphonomycin	<i>Streptomyces fradiae</i>	Epoxid	Muraminsynthetase

Unter den Sekundärmetaboliten sind die Antibiotika für den Menschen von besonderer Bedeutung. Die Antibiotika sind definiert als Substanzen biologischer Herkunft, die schon in geringsten Konzentrationen das Wachstum von Mikroorganismen hemmen. Viele Antibiotika haben dadurch erhebliche therapeutische Bedeutung erlangt.

Die meisten Antibiotikaproduzenten gehören zu den Bakterien (insbesondere Streptomyceten) und zu den Pilzen. Die stoffliche Vielfalt und Wirkungsmechanismen der Antibiotika sind weit gefächert. Tab. 2 zeigt eine Auswahl von Streptomyceten produzierter Antibiotika.

Ziele des Versuchs

Antibiotika-produzierende Streptomyceten sollen aus einer Bodenprobe isoliert werden.

Granaticin, gebildet durch *Streptomyces violaceoruber* Tü22, soll isoliert und seine antibiotische Wirkung charakterisiert werden. Der antagonistische Effekt von Leucin auf die Antibiose durch Granaticin bei *Bacillus subtilis* soll demonstriert werden.

5.1 Isolierung Antibiotika-produzierender Streptomyceten

Streptomyceten gehören zu den Actinomyceten. Als Substrate verwerten sie z. T. schwer abbaubare Naturstoffe wie Zellulose, Chitin und Pektine. Beim Wachstum auf festen Nährböden bilden sie ein weit verzweigtes Mycel aus Substrathyphen und Lufthyphen (Sporophoren) mit Konidiosporen. Dadurch ergibt sich das Bild kleiner, wattiger Kolonien. Aus einer Erdprobe sollen Streptomyceten selektiv angereichert und isoliert werden.

Material

Tag 1:

- **Selbst mitzubringen:** Erdprobe (stark erdiger Geruch deutet bereits auf Streptomyceten hin → Geosmin)
- 1 langes Röhrchen 5 mL 1%ige Phenol-Lösung
- Drigalskispatel
- 5 Platten Jensen-Agar

Substanz	Menge
Glucose	2,0 g
Caseinpepton	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 g
Agar (Kobe 1)	15,0 g
Spurenelementelösung n. Drews	5,0 mL
Aqua dest.	ad 1000 mL

pH **VOR** Zugabe des Agars auf 6,5 - 6,8 einstellen und 30 min bei 121 °C autoklavieren. Nach dem Autoklavieren auf 60 °C abkühlen lassen und 300 E/mL steril abgewogenes Nystatin (=0,1g/l) als Fungistatikum zugeben.

Tag 7:

- Pro Laborbank eine frische Übernachtkulturplatte *Micrococcus luteus* (MICO 004)
- Standard 1-Medium zum Abschwemmen (alternativ 0,9% NaCl)
- 5 lange Röhrchen à 7 mL Std.1-Weichagar
- Pro Bank 1 steriler 100 ml Erlenmeyerkolben

Substanz	Menge
Pepton	15,0 g
Hefeextrakt	3,0 g
NaCl	6,0 g
Glucose	1,0 g
Agar (Bacto TM)	7,0 g
Aqua dest.	ad 1000 mL

pH **VOR** Zugabe des Agars auf 7,0 einstellen und 30 min bei 121 °C autoklavieren. Anschließend bei 60 °C bis zur Abfüllung in Reagenzröhrchen lagern.

Arbeitsgang

Tag 1:

1. 0,5 g trockene Gartenerde wird in 5 mL Leitungswasser suspendiert und einige Minuten durch Vortexen homogenisiert.
2. 50 µL der homogenen Suspension werden in ein langes Reagenzglas mit 5 mL 1%iger Phenollösung gegeben und wieder gründlich vermischt.
3. Nach 15 min Einwirkung des Phenols werden 5 Jensen-Agarplatten mit je 100 µL beimpft. Das Material wird sorgfältig mit einem Drigalskispatel auf dem Nährmedium verteilt. Die Platten werden anschließend in Tüten verpackt und bei 28 °C, 7 Tage inkubiert.

Tag 7:

4. Die nach einwöchiger Inkubation auf den Agar-Platten makroskopisch zu identifizierenden Streptomycceten-Kolonien (kleine, wattige Kolonien) werden markiert und gezählt. Zusätzlich wird die Gesamtzahl der Kolonien ermittelt.
5. Dann werden diese Platten mit *Micrococcus luteus* überschichtet.
6. Dazu wird die Übernachtkultur (eine Platte pro Laborbank) mit 20 mL steriler Standard-I-Lösung und Einsatz eines sterilen Drigalskispatels von der Platte abgeschwemmt. Alternativ kann eine bewachsene Kultur (Flüssigmedium) pro Bank von den Betreuern ausgegeben werden. Je 0,5 mL dieser Suspension/Kultur wird durch Rollen in 7 mL Weichagar (50°C) eingemischt. Der Weichagar wird zügig auf den Platten verteilt.
7. Die Platten werden ca. 24 h bei 28°C inkubiert.
8. In dieser Zeit bilden die *Micrococcus*-Zellen in der Weichagar-Schicht einen dichten Rasen. Nur über Antibiotika produzierenden Kolonien bilden sich bakterienfreie, klare Hemmhöfe im Weichagar aus.

Tag 8:

9. Die Antibiotika produzierenden Streptomycceten- und alle sonstigen Kolonien werden gezählt.

Auswertung

Zählen sie die Streptomyceten-Kolonien auf den Platten aus und ermitteln sie den Anteil der Antibiotikaproduzenten an der Gesamtpopulation anhand von sichtbaren Hemmhöfen.

5.2 Isolierung und Charakterisierung von Granaticin

Bei den zu den Actinomyceten gehörenden Streptomyceten handelt es sich um mycelartig wachsende, typische Bodenbakterien. Sie sind Gram-positiv und bilden ein stark verzweigtes Substrat- und zusätzlich ein ausgeprägtes Luft-Mycel. Die Sporophoren genannten Lufthyphen sind im vegetativen Stadium mehrkernig und differenzieren sich während der Sporulation durch Wandbildung zu Konidienketten um.

Industrielle Bedeutung haben Streptomyceten aufgrund ihrer weit verbreiteten Sekundärmetabolite gewonnen, die oft antibiotisch wirken. Häufig werden von einer Art mehrere Antibiotika mit manchmal ganz unterschiedlichen Strukturen gebildet. Insgesamt sind über 500 verschiedene Antibiotika bekannt. Etliche davon finden Anwendung im medizinischen Bereich, wie das Streptomycin und verschiedene Tetracycline. Andere, wie das hier bearbeitete Granaticin, sind in der Herstellung zu aufwendig, verursachen zu viele Nebenwirkungen oder sie sind sogar toxisch.

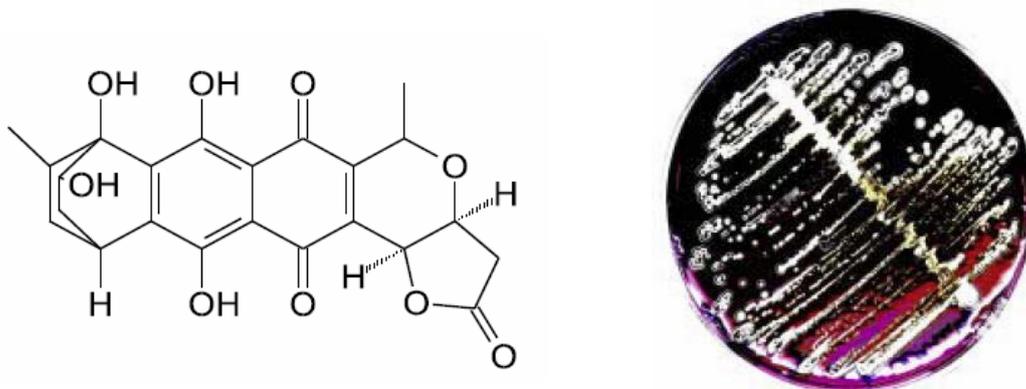


Abb. 6: Links; Strukturformel von Granaticin A (nach Keller-Schierli, 1968; Helv. Chim. Acta 51, 1257-1268). Rechts; Kolonien von *Streptomyces violaceoruber* Tü 22 nach 4 Tagen Inkubation auf Komplett-Nähragar. Die dunkelblau-violette Färbung wird durch das ausgeschiedene Granaticin verursacht.

Granaticin wird von verschiedenen Streptomyceten wie z.B. *Streptomyces violaceoruber* Tü22 gebildet. Die Anreicherung des intensiv gefärbten Antibiotikums (rot im sauren, blau im alkalischen pH-Bereich) ist auf festen Nährböden und auch in aeroben Flüssigkulturen gut zu beobachten (Abb. 5). Die reine Substanz bildet tiefrote kubische Kristalle (Rhombendodekaeder). Da die Form und die Farbe der Kristalle an den Schmuckstein Granat erinnert, erhielt die Substanz ihren Namen.

In *Bacillus subtilis* hemmt Granaticin spezifisch, aber reversibel die Aminoacylierung von tRNA^{leu}. Dies hat zur Folge, dass wegen des Mangels an dieser aminoacylierten tRNA die Translation stoppt und durch die ausgelöste Stringent-Reaktion zusätzlich die Synthese stabiler RNA eingestellt wird. Die Zellen hören auf zu wachsen. Die Empfindlichkeit des Organismus gegen das Antibiotikum nimmt deutlich ab, wenn Leucin dem Medium zugegeben wird.

5.2.1 Anzucht von *Streptomyces violaceoruber* Tü 22

Material

Nur Tag 1

- pro Bank eine gut bewachsene Platte *Streptomyces violaceoruber* Tü 22 (3 Tage bei 30°C bebrütet)
- sterile 5 mL Glaspipetten
- steriler 100 mL Erlenmeyerkolben

Zentrifuge

- Granaticin-Medium: Pro Laborbank 1 x 100 mL (100 mL Schottflasche) und pro Gruppe 1 x 200 mL (1L-Erlenmeyer-Kolben)

Substanz	Menge
Hefeextrakt	0,50 g
Pepton aus Casein	0,25 g
Glucose	5,00 g
Leitungswasser (!)	ad 500 mL

pH auf 7,2 einstellen und 30 min bei 121 °C autoklavieren.

Tag 1-5

- Eisessig
- 1 + 2 ml Reagiergefäß
- Granaticin-Medium (Blindwert)
- Photometer
- HalbmikroküvettenZentrifuge

Arbeitsgang

Tag 1:

1. Die gut bewachsenen Vorkulturplatten werden mit je 10 mL Granaticin-Medium (aus Schottflasche) abgeschwemmt. Da sich die Zellen nur schwer aus dem Mycelverband lösen, müssen die Zellen mit der Impföse abgekratzt werden. Es ist Geduld erforderlich.
2. 1 L-Erlenmeyerkolben mit 1 - 2 mL der Zellsuspension beimpfen und 5 Tage bei 30°C im Schüttler inkubieren.
3. Direkt nach dem Beimpfen 3 mL Probe entnehmen, Davon 1 ml direkt in eine Halbmikroküvette geben und die OD bei 600 nm im Zelldichtemeßgerät messen.
4. Die anderen 2 ml in ein 2ml Reagiergefäß geben und mit 1 Tropfen Eisessig ansäuern. Anschließend die Zellen abzentrifugieren (12.000 UPM, 5 min) und die relative Zunahme der Antibiotikakonzentration im Überstand bei 532 nm bestimmen. *Hierbei handelt es sich um eine indirekte „Bestimmung“, denn die Antibiotikakonzentration wird nur anhand der Zunahme der Absorption bei 532 nm bestimmt.*
5. 1 ml des zellfreien Überstandes für die Bestimmung der antibiotischen Wirksamkeit einfrieren.

Tag 2 - 5: Wiederhole Punkt 3 bis 5

5.2.2 Extraktion des Antibiotikums aus dem Kulturmedium

Material

- Kulturansatz aus 5.2.1
- 500 mL-Zentrifugenbecher
- Zentrifuge
- Messzylinder
- Eisessig
- 1 L-Scheidetrichter
- Ethylacetat
- Natriumsulfat (geschätzt: Menge entsprechend ca. 2 Esslöffel)
- Faltenfilter
- Rundkolben
- Rotationsverdampfer
- 10 mL Messpipetten

Arbeitsgang:

1. Der Kulturansatz (5.2.1) wird für 10 min bei 7500 UPM zentrifugiert.
2. Der Überstand wird sofort nach dem Zentrifugieren vorsichtig in einen Messzylinder abgegossen. Er wird mit einigen Tropfen Eisessig bis zur Rotfärbung angesäuert. Das Volumen wird bestimmt.
3. Nach Überführung in den Scheidetrichter wird $\frac{1}{4}$ Volumen Ethylacetat zugegeben und das Granaticin ausgeschüttelt. Nach Phasentrennung hat sich das Granaticin fast komplett in der organischen Phase gesammelt (obere Phase). Erhöhung der Ausbeute wäre durch erneutes Ausschütteln möglich, darauf wird verzichtet.
4. Wässrige und organische Phasen trennen.
5. **Die organische Phase** wird durch Zugabe von Natriumsulfat getrocknet und anschließend durch einen Faltenfilter filtriert. Eintrag von Wasser/Salz in die Probe würde zu einer falschen Bestimmung der Ausbeute an Granaticin führen und muss daher verhindert werden. Daher darauf achten das nur die organische Phase (Ethylacetat) entnommen wird. Jeweils 5 Gruppen vereinigen Ihren Extrakt in einem Rundkolben, **der zuvor gewogen wurde**.
6. Das Ethylacetat wird im Rotationsverdampfer abgezogen (40°C, 240 mbar).
7. Granaticin wiegen (mit Rundkolben und dann den Wert des Gewichtes des leeren Rundkolbens abziehen). Die jeweilige Ausbeute pro Gruppe kann über die OD 532-Werte jeder Gruppe aus der gemeinsamen Ausbeute berechnet werden.
8. Rundkolben mit 10 mL Ethylacetat (Messpipette) befüllen um das Granaticin zu lösen, danach in 50 mL Zentrifugengefäße (Falcon-Röhrchen) überführen.
9. Erneut 10 mL Ethylacetat in den Rundkolben geben um evtl. Reste des Granaticins aufzufangen und mit dem Vorangegangenen vereinigen.
10. Den Granaticin-Extrakt bei -20 °C für die Bestimmung der antibiotischen Wirksamkeit aufbewahren. (V 5.2.4)

5.2.3 Bestimmung der antibiotischen Wirksamkeit von Granaticin

Die Wirkung von verschiedenen Volumina des in Ethylacetat gelösten Granaticins und der Kulturüberstände nach unterschiedlich langer Kultivierung wird an zwei Bakterienstämmen mittels Hemmhoftest ermittelt.

Material

- Je Bank eine Flüssig - Übernachtskultur eines Gram-positiven Bakteriums (*Bacillus subtilis* (BC 011) oder *Micrococcus luteus*), und eines Gram-negativen Bakteriums (*Escherichia coli* K12 oder *Pseudomonas fluorescens*), 50 mL in 100 mL Erlenmeyerkolben.
- Extrahiertes Granaticin in Ethylacetat aus V5.2.2
- Proben vom Kulturüberstand (s. 5.2.1)
- Pinzette
- Mikroliterpipetten
- Sterile Spitzen
- 50 mL sterile 0,9 % NaCl-Lösung
- 4 sterile 100 mL-Erlenmeyerkolben
- 32 sterile Testplättchen (9 mm)
- 1 sterile Glaspetrischale

- 4 Standard-I-Agarplatten

Substanz	Menge
Pepton	15,0 g
Hefeextrakt	3,0 g
NaCl	6,0 g
Glucose	1,0 g
Agar (Kobe 1)	15,0 g
Aqua dest.	ad 1000 mL

pH VOR Zugabe des Agars auf 7,0 einstellen (entfällt bei Fertigmedium) und 30 min bei 121 °C autoklavieren. Nach dem Autoklavieren bis zum Plattenguß bei 60 °C lagern.

- 4 Minimal-Glucose-Agarplatten

Lösung 1:

Substanz	Menge
Glucose	5,0 g
Na-Citrat x 3 H ₂ O	1,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	6,0 g
MgSO ₄	6,0 g
Agar (Kobe 1)	16,0 g
Aqua dest.	ad 895 mL

pH VOR Zugabe des Agars auf 7 einstellen und 30 min bei 121 °C autoklavieren.

Lösung 2:

Substanz	Menge
K ₂ HPO ₄	1,4 g
KH ₂ PO ₄	0,6 g
Aqua dest.	ad 100 mL

pH-Wert auf 7,0 einstellen und 30 min bei 121 °C autoklavieren.

Lösung 3:

Substanz	Menge
Methionin	20 mg
Tryptophan	50 mg
Aqua dest.	ad 50 mL

Lösung 4:

Substanz	Menge
FeCl ₃	162 mg
Aqua dest.	100 mL
HCl 0,1M	0,1 mL

Lösung 1 und 2 nach dem Autoklavieren steril vereinigen und 5 mL Lösung 3 sowie 1 mL Lösung 4 steril dazufiltrieren.

- 4 Standard-I-Weichagar-Röhrchen à 7 mL (kein Fertigprodukt, alles einzeln abwiegen.)
 s. Standard I- Agar, Agarkonzentration auf 7 g /L reduzieren, Bacto TM Agar nehmen
- 4 Minimal-Glucose-Weichagar-Röhrchen à 7 mL
 s. Minimal-Glucose- Agar, Agarkonzentration auf 7 g /L reduzieren, Bacto TM Agar nehmen

Arbeitsgang

Tag 1:

1. Die Agarplatten mit Versuchsnummer, Agarsorte, Testorganismus, Datum und Gruppennummer. beschriften.
2. Pro Testorganismus je 2 Standard-I- und 2 Minimal-Glucose-Weichagarröhrchen mit je 0,5 mL der Flüssigkultur beimpfen, zügig durch Rollen mischen und sofort gleichmäßig auf die entsprechenden Nähragarplatten ausgießen (Weichagar-Technik). Den Weichagar fest werden lassen.
3. Parallel je 8 Testblättchen (pro Organismus und Medium) in eine sterile leere Glas-Petrischale (wichtig, Ethylacetat löst Kunststoff auf) legen und 5, 10 oder 20 µL Granaticin-Testlösungen, 20 µL Ethylacetat oder 20 µL Kulturüberstand der Tage 1 bis 4 aufpipettieren.
4. Mit Granaticin-Testlösung versehene Filter an der Luft trocknen lassen und dann entsprechend (Abb. 7) auf die Agarplatten auflegen. Filter mit Kulturüberstand können direkt auf die Platten gelegt werden (nur vorsichtig andrücken).



Abb. 7: Schema zur Auflage der Filter mit Granaticin aus Extraktion bzw. Kulturüberständen

5. Platten bei 28°C für 18 Stunden mit Deckel nach oben bebrüten.

Tag 2:

6. Auswertung der Hemmhofbildung auf den Platten

5.2.4 Antagonistischer Effekt von Leucin auf die antibiotische Wirkung von Granaticin gegen *Bacillus subtilis*

Der Vergleich der Minimalen-Hemmkonzentrationen (siehe oben) auf einem Komplex- und Minimal-Medium gibt einen ersten Hinweis auf den antagonistischen Effekt durch Aminosäuren. Dass dieser Effekt durch Leucin verursacht wird, soll durch einen Streifentest und auf Gradientenplatten gezeigt werden.

Material

- Granaticin aus Extraktion in Ethylacetat
- 3 mL 100 mM Leucinlösung (sterilfiltrieren)
- 2 sterile Glaspetrischale
- 1 Minimal-Glucose-Agarplatte (s.5.2.3)
- 2 Gradientenplatten aus:
 - 2 x 12 mL Minimal-Glucose-Agar (s. 5.2.3)
 - 2 x 12 mL Leucin-Agar
 - 10 mL Minimal-Glucose-Agar (s.5.2.3)
 - 2 mL Leucinlösung (s.o.)
 Gradient beim Gießen markieren!!! (Die Platten dürfen erst kurz vor Benutzung gegossen werden, da sonst durch Diffusion der Gradient "verläuft".)
- 3 Minimal-Glucose-Weichagar-Röhrchen (s.5.2.3)
- 10 mL sterile 0,9 % NaCl-Lösung
- 1 steriles langes Reagenzglas
- Pro Bank eine Flüssig - Übernachtskultur *Bacillus subtilis* (BC 011), 25 mL in 100 mL Erlenmeyerkolben
- 3 sterile Filterstreifen (7 x 0,5 cm)
- 2 sterile Filterstreifen (3,5 x 0,5 cm)
- Pinzette
- Mikroliterpipetten
- Sterile Spitzen

Arbeitsgang

Tag 1:

1. Streifentest
2. Gradientenplatten

Streifentest

1. Granaticin-Lösung 1:10 mit Ethylacetat verdünnen.
2. Einen langen Filterpapierstreifen gleichmäßig mit der Granaticin-Lösung tränken und trocknen lassen. Sterile Glaspetrischale benutzen.
3. Zwei kurze Filterpapierstreifen gleichmäßig mit der Leucin-Lösung tränken und trocknen lassen.
4. Minimal-Glucose-Platte mit *B. subtilis* beimpfen (Weichagar-Technik, s.o.). Den Weichagar fest werden lassen.
5. Erst den Granaticin-Teststreifen, dann im 90°-Winkel dazu die beiden Leucin-Streifen auflegen (Abb.8)
6. Platte 18 h bei 28°C mit dem Deckel nach oben bebrüten.

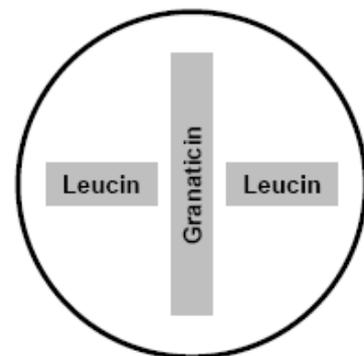


Abb. 8: Schema zur Auflage der Leucin-/Granaticin-Filterstreifen

Gradienten-Platten

Zum Herstellen der Gradientenplatte Petrischale z. B. mit Hilfe einer Pipettenspitze schräg stellen und ca. 15 mL Leucin-Agar einfüllen (s. nachfolgendes Schema). Nach dem Erkalten die Platte gerade stellen und ca. 10 mL Minimal-Glucose-Agar zugeben (Abb. 9). Es werden pro Gruppe 2 Platten benötigt.

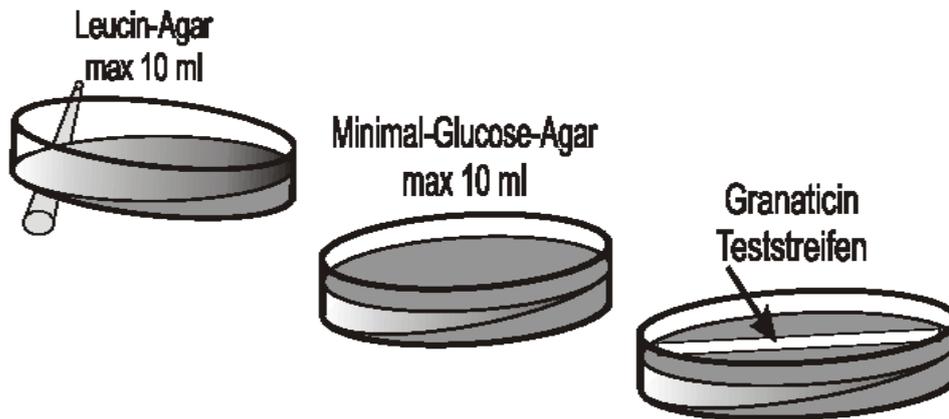


Abb. 9: Verfahren zur Herstellung von Gradientenplatten mit Leucin-/Minimal-Glucose-Agar

1. Einen Filterstreifen mit 1:10 verdünnter und einen Filter in konzentrierter Granaticinlösung tränken und trocknen lassen.
2. Die Gradientenplatte mit *B. subtilis* (Weichagar-Technik) beimpfen.
3. Nach Festwerden des Weichagars den Hemmstreifen in Gradientenrichtung auflegen (s. Abb.9).
4. Die Platte mit dem Deckel oben 18 h bei 28°C inkubieren.

Tag 2:

1. Auswertung des Wachstums / der Hemmhofbildung.

5.3 Gesamtauswertung

Stellen Sie Zelldichte und Antibiotikakonzentration gegen die Zeit graphisch dar (aus 5.2.1).

Geben Sie die Granaticin-Ausbeute an (5.2.2).

Tragen Sie den Hemmhofdurchmesser der Granaticinplättchen gegen den Logarithmus der Granaticinkonzentration auf um die minimale Hemmkonzentration (Menge pro Plättchen) zu errechnen. Berücksichtigen Sie dabei den Plättchendurchmesser. Stellen Sie Hemmhofdurchmesser der Kulturüberstände und die Kultivierungsdauer gegenüber. Stellen sie schließlich die Hemmung der verschiedenen Testorganismen durch *Streptomyces violaceoruber* in einem Schema dar und erklären Sie die Ergebnisse umfassend (5.2.3).

Erstellen Sie eine Skizze der Hemmhöfe des Streifen-tests und der Gradientenplatte und erläutern Sie diese (5.2.4).

6 Versuche zur unvollständigen Oxidation

Bei vielen Mikroorganismen werden in Abhängigkeit von den Milieubedingungen die Abbauege reguliert. So wird beispielsweise Acetoin als ein Stoffwechselprodukt von *Bacillus subtilis* immer dann von den Zellen hergestellt und in das Medium ausgeschieden, wenn energiereiche Substrate wie Glucose im Überschuss vorhanden sind. Unter solchen Bedingungen erfolgt der Substratabbau über die Glykolyse wesentlich schneller, als das daraus entstehende Pyruvat in den TCA-Zyklus einfließen kann. Um einer Überkonzentration von Pyruvat im Medium, d.h. einer Übersäuerung der Kultur entgegenzuwirken, verstoffwechseln die Bakterien das saure Pyruvat über zwei Decarboxylierungsreaktionen zu neutralem Acetoin und schleusen es aus. Sobald die energiereichen Substrate verbraucht sind, kann das Acetoin wieder aufgenommen und über Acetat-Acetaldehyd metabolisiert werden.

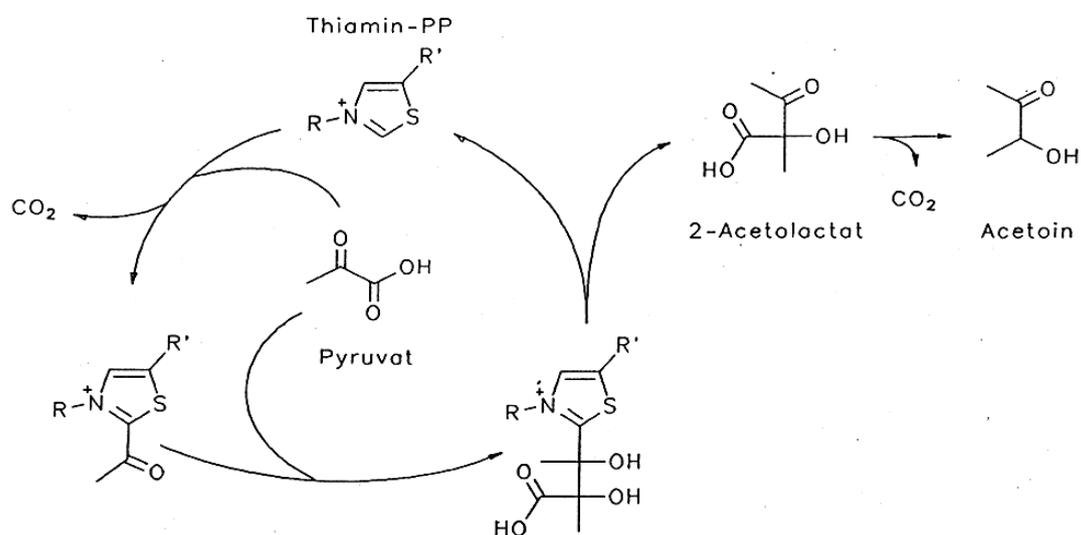


Abb. 10: Synthese von Acetoin in Zellen von *Bacillus subtilis*

Ziel des Versuchs

Produktion und Abbau von Acetoin durch *Bacillus subtilis* in glucosehaltigem Medium soll quantitativ erfasst und dargestellt werden.

6.1 Zellanzucht

Material

Tag 1:

- 1 Platte Übernachtskultur *Bacillus subtilis* (BC019) pro Kurs
- Pro 5 Gruppen im Kurs je 1x 300 mL Erlenmeyerkolben mit je 100 mL TYP-Medium ohne Glucose
- Impföse

Tag 2:

- Mikroliterpipetten
- sterile Spitzen
- 2 mL Eppis
- Eisbad
- Zelldichte-Meßgerät (oder Photometer)
- Halbmikroküvetten
- Tischzentrifuge
- 10 mL Acetoin-Eichstammlösung (8,8 mg/L)
- 40 mL 0,5 % Creatinlösung in aqua dest.
- 40 mL 5% α -Naphthollösung in 2,5 N KOH (Aufbewahrungsgefäße lichtundurchlässig umwickeln - Alufolie)
- kurze Reagenzgläser
- Pro Kurs 1 Platte Übernachtskultur *Bacillus subtilis* (BC 019)
- Pro 5 Gruppen im Kurs je 1x 300 mL Erlenmeyerkolben mit je 100 mL TYP-Medium ohne Glucose

Substanz	Menge
Pepton	15,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	5,0 g
Aqua dest.	ad 1000 mL

pH auf 7,5 einstellen und 30 min bei 121 °C autoklavieren.

- TYP-Medium mit Glucose: Pro Gruppe 1 x 300 mL-Erlenmeyerkolben mit 100 mL Medium und
- pro Kurs 1 x 50 mL extra in einer kleinen Schottflasche (Blindwert)

Substanz	Menge
Pepton	15,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	5,0 g
Glucose	0,5 g
Aqua dest.	ad 1000 mL

pH auf 7,5 einstellen und 30 min bei 121 °C autoklavieren.

Arbeitsgang

Tag 1:

1. Pro 5 Gruppen im Kurs wird jeweils ein 300 mL Erlenmeyerkolben mit TYP-Medium mit einer Impföse Material von der Platte Übernachtskultur *B. subtilis* beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt.

Tag 2:

2. Einen Erlenmeyerkolben mit TYP-Medium mit Glucose bei 37 °C 20 min vorwärmen
3. Dieser vorgewärmte Erlenmeyerkolben wird mit 5 mL der Zellsuspension beimpft und bei 37°C geschüttelt.

4. Nach 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 und 360 min werden je 3 mL Probe entnommen. (1x 1mL für die Bestimmung der optischen Dichte direkt in einer Halbmikroküvette und 1x 2mL in einem 2mL Eppi, welches auf Eis gestellt wird.
5. Die Kulturtrübung (1 mL) der Probe wird bei 600 nm im Zelldichtemessgerät gegen TYP-Medium mit Glucose gemessen. Ab einer OD von 0,8 muss mit sterilem Medium verdünnt werden.
6. Anschließend werden 2 mL unverdünnter Probe für 5 min bei 12.000 UPM zentrifugiert, der Kulturüberstand in ein neues 2 mL Eppi überführt und bis zur Acetoinbestimmung bei - 20°C aufbewahrt. Die Kühlung ist hier zur Stabilisierung des intermediären Metaboliten wichtig (Zwischenlagerung im Eisbad, Zentrifugieren in der Kühlzentrifuge).

6.2 Acetoinbestimmung

Acetoin wird kolorimetrisch nach einer Methode von Westerfeld (1945) im Photometer nachgewiesen. Die Farbreaktion beruht darauf, dass funktionelle Guanidinogruppen (z.B. an Creatin, Abb. 9) mit Acetoin einen roten Farbstoff bilden.

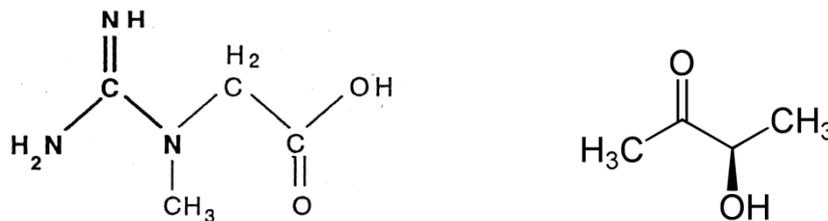


Abb. 11: Links, Guanidino-Gruppe in Creatin. Rechts, Acetoin (R)-3-Hydroxybutan-2-on)

Die Bestimmung erfolgt in 2 Parallelen.

1. In kurze Reagenzgläser werden folgende Lösungen pipettiert und anschließend gründlich vermischt:
 - x mL Acetoin-Eichstammlösung oder Kulturüberstand von den Kulturproben (bei den Kulturproben von t=0 bis einschliesslich t=150 min je 500 µL und ab t=180 min je 100 µL)
 - y mL aqua dest (siehe Pipettierschema auf der nächsten Seite)
 - 0,5 mL Creatinlösung 0,5%
 - 0,5 mL α-Naphthollösung 5%
2. 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
3. Extinktion bei 546 nm messen.

Tab.2: Pipettierschema zur Acetoinbestimmung

[Acetoin]	x (Acetoin-Eichlsg.)	y (A. dest.)	Creatinlsg	α -Naphthollösung	Gesamt
[μ mol]	[mL]	[mL]	[mL]	[mL]	[mL]
0,200	2,00	0,50	0,50	0,50	3,50
0,100	1,00	1,50	0,50	0,50	3,50
0,080	0,80	1,70	0,50	0,50	3,50
0,060	0,60	1,90	0,50	0,50	3,50
0,050	0,50	2,00	0,50	0,50	3,50
0,040	0,40	2,10	0,50	0,50	3,50
0,030	0,30	2,20	0,50	0,50	3,50
0,020	0,20	2,30	0,50	0,50	3,50
0,010	0,10	2,40	0,50	0,50	3,50
0,005	0,05	2,45	0,50	0,50	3,50
0,000	0,00	2,50	0,50	0,50	3,50
Probe	x (Kulturüberstand)	y (A.dest)			
Zeitpunkt der Probenahme	[mL]	[mL]	[mL]	[mL]	[mL]
0 bis 150 min	0,5	2,0	0,50	0,50	3,50
180 bis 360 min	0,1	2,4	0,50	0,50	3,50

6.3 Gesamtauswertung

Stellen Sie das Wachstum anhand der Trübung des Kulturmediums (log OD) und die Konzentration von Acetoin im Kulturüberstand in Abhängigkeit von der Zeit graphisch dar.

7 Vermehrung des Bakteriophagen T₄

Bakteriophagen sind Viren, die ausschließlich Bakterien infizieren. Strukturell bestehen die Bakteriophagen aus einer Proteinhülle (Capsid), die Nukleinsäure beinhaltet (**Abb. 16 A**).

Diese kann als Doppel- oder Einzelstrang, linear oder ringförmig vorliegen. Meist handelt es sich um doppelsträngige, lineare DNA. Viele Bakteriophagen sind aus einem Kopf- und einem Schwanzteil aufgebaut. Letzterer dient zur Anheftung der Bakteriophagen an die Bakterienzellwand.

Der lytische Vermehrungszyklus am Beispiel des T₄-Phagen beginnt mit der Adsorption. Mit seinen Tentakeln und der Basisplatte bindet der Phage an spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche (**Abb. B**). Die Schwanscheide kontrahiert sich, der hohle Schwanzstift durchdringt die Zellwand und die DNA wird injiziert. Diesen Vorgang nennt man Penetration. Danach wird die Synthese von Bakterien-DNA sofort eingestellt. Bakterien-RNA- und Proteinsynthese kommen wenig später zum Stillstand. Stattdessen wird der Synthesepapparat der Zelle nun in den Dienst der Bakteriophagen-Vermehrung gestellt. Phagencodierte Enzyme bauen die Wirts-DNA ab.

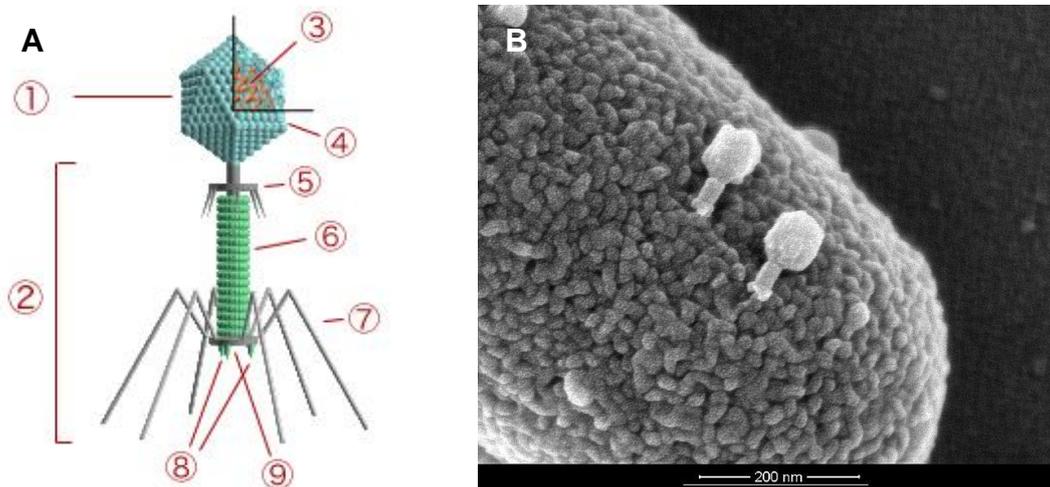


Abb. 16 A, Struktur eines T₄-Phagen, bestehend aus Kopf (1), Schwanz (2), Nukleinsäure (3), Capsid (4), Kragen (5), Schwanzstück (6), Schwanzfaser (7), Spikes (8) und Basisplatte (9). **B**, T₄-Phagen infizieren eine lebende *E. coli*-Zelle (Quelle: hyglos.de)

Die Phagen-DNA ist vor diesen DNasen geschützt, denn sie enthält anstatt Cytosin Hydroxymethylcytosin. Außerdem ist sie an dieser Base noch teilweise glucosyliert. Frühe phagencodierte Enzyme sorgen für die Synthese von Desoxyhydroxymethylcytosintriphosphat. Später beginnt dann die Synthese von Phagen-DNA und Proteinen, sowohl für den Aufbau des Kopfes, als auch für den Schwanz. 15-20 Minuten nach der Infektion beginnt der Zusammenbau von kompletten, infektiösen Phagen aus den inzwischen gebildeten und angereicherten Einzelbestandteilen. Dabei werden zunächst nur die Phagenköpfe zusammengesetzt, wobei jeweils ein komplettes Phagengenom in die Proteinhülle eingepackt wird. Die komplett zusammengesetzten Schwänze werden anschließend angehängt. Als letzte Funktion wird die Wirtszelle von innen lysiert. Sie platzt und entlässt eine Nachkommenschaft von 80-120 Phagen ins Medium. Bakteriophagen, die zur Lyse der Bakterien führen, werden virulent oder lytischen genannt. Bei manchen Bakteriophagen erfolgt die Freisetzung ohne Lyse der Wirtszelle durch Penetration durch die Zellwand.

Ziele des Versuchs

Der Phagentiter einer T4-Phagensuspension soll ermittelt und die Dauer des Vermehrungszyklus des Phagen bestimmt werden.

7.1 Titerbestimmung eines T4-Phagenlysates

Material

- Pro Bank 1 Erlenmeyerkolben mit 50 mL
Übernachtskultur *Escherichia coli* K12
- Phagensuspension
- 10 sterile Eppendorfgläser
- Wasserbad
- 10 mL 0,9 %ige NaCl, steril
- 12 Standard-I-Weichagar-Röhrchen á 7 mL

Substanz	Menge
Pepton	15,0 g
Hefeextrakt	3,0 g
NaCl	6,0 g
Glucose	1,0 g
Agar (Bacto TM)	7,0 g
Aqua dest.	ad 1000 mL

pH VOR Zugabe des Agars auf 7,0 einstellen (entfällt bei Fertigmedium) und 30 min bei 121 °C autoklavieren. Nach dem Autoklavieren bis zum Gießen der Weichagar-Röhrchen bei 60 °C lagern.

- 12 Platten mit Standard-I-Agar (Fertigmedium)

Substanz	Menge
Pepton	15,0 g
Hefeextrakt	3,0 g
NaCl	6,0 g
Glucose	1,0 g
Agar (Kobe 1)	12,0 g
Aqua dest.	ad 1000 mL

Fertigmischung in aqua dest. lösen und 30 min bei 121 °C autoklavieren und bis zum Plattenguß bei 60 °C lagern.

Arbeitsgang

Tag 1:

1. Herstellung einer Verdünnungsreihe in 10er-Schritten bis 10^{-10} in Eppendorfgläsern. Dazu werden jeweils 900 µL einer 0,9 %igen sterilen NaCl-Lösung vorgelegt und 100 µL Suspension der vorhergehenden Verdünnungsstufe zugegeben (Abb.).

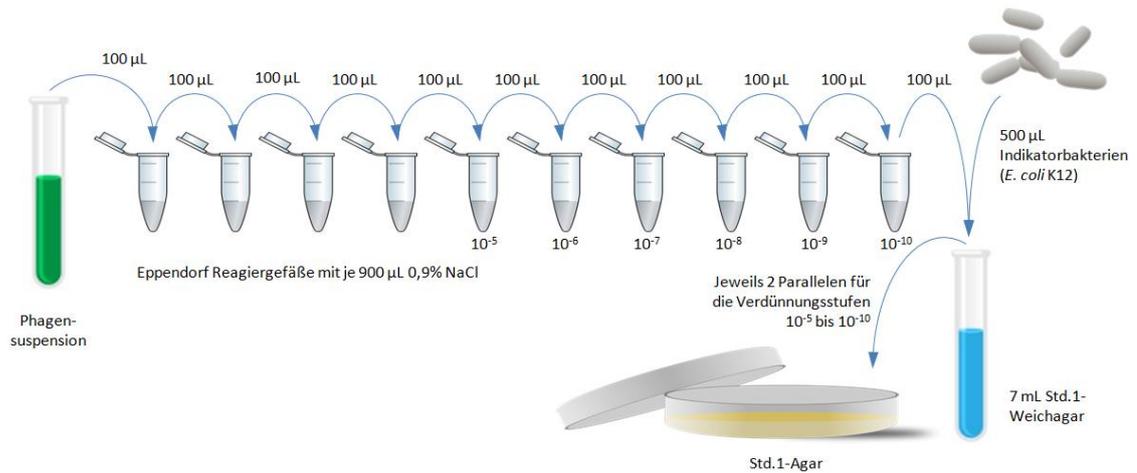


Abb. 17: Herstellung einer Verdünnungsreihe zur Phagentiter-Bestimmung

2. Je 100 µL der Verdünnungsstufen 10^{-5} bis 10^{-10} werden in zwei Parallelen mit 0,5 mL Bakteriensuspension in 7 mL Weichagar eingemischt (rollen nicht whirlen) und auf Standard-I-Agarplatten ausgegossen. Hierbei ist es wichtig den Agar nicht komplett abkühlen zu lassen, deswegen kommen die Weichagarröhrchen in ein temperiertes Wasserbad (50°C). Da das Erhärten des Agar recht schnell geht (und zu vermeiden ist), bitte nicht mehr als zwei Röhrchen gleichzeitig beimpfen.
3. Die Platten werden 18 h bei 37°C inkubiert.

Tag 2:

4. Die Phagenplaques (durch Bakterienlyse verursachte Löcher im Bakterienrasen) werden ausgezählt.

Auswertung

Errechnen Sie aus der Zahl der Phagenplaques den Phagentiter (Phagen/mL).

7.2 Bestimmung der Dauer eines Vermehrungszyklus

Material

- Pro 10 Gruppen im Kurs jeweils ein 300 mL Erlenmeyerkolben mit 100 mL Übernachtskultur *Escherichia coli* K12
- Phagensuspension
- 1x 300 mL-Erlenmeyer-Kolben mit 50 mL und pro Kurs eine kleine Schottflasche mit 10 mL (als Blindwert und zur Verdünnung) Standard-I-Bouillon
- 5 mL-Glaspipetten
- ZelldichtemessgerätKüvetten

Substanz	Menge
Pepton	15,0 g
Hefeextrakt	3,0 g
NaCl	6,0 g
Glucose	1,0 g
Aqua dest.	ad 1000 mL

pH-Wert auf 7,0 einstellen und 30 min bei 121 °C autoklavieren.

Arbeitsgang

1. Der Erlenmeyer-Kolben mit 50 mL Standard-I-Bouillon wird bei 37°C vorgewärmt.
2. Der Kolben wird mit 4 mL der Suspension von *E. coli* angeimpft und die Kultur bei 37°C geschüttelt.
3. Die Vermehrung der Bakterien wird alle 30 min durch Trübungsmessung bei 600 nm verfolgt. Der Schüttler darf zum Entnehmen der Proben immer nur kurz angehalten werden, damit eine gute Belüftung der Kultur gewährleistet ist.
4. Bei einer Extinktion von 0,6 bis 0,8, was in etwa einer Zellkonzentration von 2×10^8 Zellen/mL entspricht, wird zu der Kultur 10mal so viele T₄-Phagen wie Bakterien zugesetzt (2×10^9 Phagen).
5. In 5-Minuten-Intervallen wird nun die Kulturtrübung gemessen bis die Zelldichte sich nicht mehr verändert.

Auswertung

Werten Sie das Ergebnis graphisch aus. Stellen sie dazu den Logarithmus der Extinktion der Zeit gegenüber und errechnen sie mit Hilfe der aufgetragenen Kurve die Dauer eines Vermehrungszyklus. Geben Sie alle Formeln, die sie zur Berechnung der Vermehrungsdauer aus der Kurve verwendet haben, klar und nachvollziehbar an.

8 Anhang

8.1 Benutzung der Laborgeräte

Die Verwendung von Laborgeräten erfolgt ausschließlich nach Anleitung durch die Kursleiter/-betreuer.

Mikroliter-Pipette: Da während des Kurses sehr kleine Flüssigkeitsmengen pipettiert werden müssen, werden Mikroliterpipetten verwendet. Diese bestehen aus einem Grundgerät und einer Wechsellspitze. Die Pipetten unterscheiden sich durch ihr maximales Aufnahmevolumen. Das über ein Stellrädchen einzustellende Volumen (nicht überdrehen!) wird in einem Sichtfenster direkt angezeigt. Die Wechsellspitzen unterscheiden sich in ihrer Farbkennung. Eine typische Mikroliter-Pipette besitzt neben dem Einstellrad zwei auf der Oberseite angebrachte Knöpfe bzw. Hebel. Der erste, apikal angeordnete Knopf hat zwei Druckpunkte.

Zum Aufnehmen der Probe wird er zunächst bis zum ersten Widerstand gedrückt und nach dem Eintauchen der Spitze in die Flüssigkeit wird der Knopf langsam nach oben gelassen. Keine Flüssigkeit in den Saugmechanismus der Pipette ziehen!! Keine Luftblasen aufziehen, fehlerhaft aufgenommene Volumina werden die Versuchsergebnisse zwangsläufig verfälschen!!

Zur Abgabe des gesamten aufgenommenen Flüssigkeitsvolumens wird der Knopf bis zum zweiten Druckpunkt gedrückt. So verbleibt kein Rest in der Wechsellspitze. Der zweite Knopf wirft über ein Metallgestell die gebrauchte Spitze ab. Neuere Pipetten vereinigen die beschriebenen Funktionen in einem Knopf.

Das Zurückschnellen des Knopfes ist zu vermeiden, da sonst Flüssigkeit in die Pipette aufgenommen werden kann. Des Weiteren soll die Pipette nicht eingestellt werden, wenn sich noch eine benutzte Spitze an der Pipette befindet. Reststoffe können in die Pipette gelangen.

Zentrifuge: In der Zentrifuge müssen sich immer zwei gleichschwere Gefäße gegenüber stehen. Andernfalls entsteht beim Zentrifugieren eine Unwucht, die insbesondere bei hohen Umdrehungszahlen großen Schaden an dem Gerät und dessen Umgebung verursachen kann. Bei Zentrifugation mit Eppendorf-Gefäßen können die Flüssigkeitsstände nach Sicht eingestellt werden. Bei größeren Zentrifugengefäßen reicht die Inaugenscheinnahme der Füllhöhen nicht aus, diese Gefäße müssen durch Wägung austariert werden.

(Fein)waage: Waagen müssen unbedingt sauber gehalten werden und dürfen mit dem Wägegut nicht in Berührung kommen. Benutzen Sie daher immer Wägepapier oder ein Becherglas für das zu wiegende Material. Überführen Sie das Wägegut auf die Unterlage in der Waage vorsichtig mit Hilfe eines Spatels, niemals durch Schütten aus dem Behälter! Sollten dennoch Verunreinigungen auftreten, sind diese mit einem Pinsel oder durch Abwischen mit einem feuchten Tuch sofort zu entfernen.

Photometer: Das Photometer dient in der analytischen Chemie zur Bestimmung von Konzentrationen in Lösungen. Das Funktionsprinzip basiert auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz, wonach ein Zusammenhang zwischen der Absorption von Licht in Flüssigkeiten und der Konzentration der gelösten (absorbierenden) Inhaltstoffe besteht. Die Messung der Testlösung erfolgt in einer Kunststoff- oder Glasküvette, auf die monochromatisches Licht definierter Wellenlänge fällt. Das Photometer erfasst die Abnahme der Lichtintensität beim Durchqueren der Testlösung (Extinktion). Das Befüllen der Küvette sollte mit Hilfe einer Mikroliter-Pipette oder einer anderen geeigneten Pipettierhilfe vorgenommen werden. Dabei ist unbe-

dingt zu beachten, dass keine Luftblasen eingebracht werden, die das Meßergebnis prinzipbedingt verfälschen würden. Die Küvette wird in den dafür vorgesehen Adapter platziert. Beim Einstellen der Küvette in den Strahlengang des Photometers darf die Meßlösung nicht verschüttet werden. Der Nullabgleich des photometrischen Systems erfolgt gegen Wasser (Aqua dest.) oder einen Blindwert und ist vor jeder Meßreihe einmal vorzunehmen und sollte während einer Meßreihe wenigstens einmal kontrolliert werden.

8.2 Lichtmikroskopische Techniken

Die Beobachtung von Bakterien wird durch ihre geringe Größe (0,5-5 μm) erschwert. Mit dem bloßen" Auge können einzelne Bakterienzellen nicht gesehen werden. Erst größere Ansammlungen sind als Kolonien auf der Anzuchtplatte sichtbar. Die Unterscheidung von Einzelzellen erfordert eine mindestens 250fache Vergrößerung, die durch ein Lichtmikroskop eingestellt werden kann. Mit den Mitteln der optischen Mikroskopie können auch höhere Vergrößerungen realisiert werden. Ab der 1000er Vergrößerung spricht man von "leeren" Vergrößerungen, weil keine weiteren Details erkennbar werden. Das Auflösungsvermögen ist aufgrund des Phänomens der Lichtbeugung an sehr kleinen Objekten auf Dimensionen im μm -Bereich begrenzt.

***Tip!** Das Auflösungsvermögen eines Lichtmikroskops wird durch die Wellenlänge λ des Lichts begrenzt. Die maximale Auflösung beträgt in etwa $\lambda/2$. Durch Verwendung von Blaufilter, die die langwelligen Strahlen des Lichts absorbieren, wird die Auflösung etwas verbessert. Ein detailliertes Abbild zellulärer Strukturen kann mit Hilfe der Lichtmikroskopie aber nicht erzeugt werden. Für Detailuntersuchungen an Bakterien werden daher die Elektronen- oder andere nicht optische Verfahren wie die Rasterkraftmikroskopie eingesetzt.*

Durch ein einfaches **Durchlichtmikroskop** lassen sich ausschließlich Amplitudenobjekte beobachten. Das Objekt absorbiert dabei einen Teil des Lichts und verringert dadurch die Amplituden der Lichtwellen. Unsere Augen können die resultierenden Helligkeitsunterschiede gut wahrnehmen. Leider sind Bakterien schlechte Amplitudenobjekte. Die mikroskopisch erzeugten Bilder sind daher wenig kontrastreich. Abhilfe kann eine Anfärbung der Bakterien schaffen. Durch die Anfärbung lassen sich Amplitudenunterschiede vergrößern, und der Kontrastbereich wird erweitert.

Mikroorganismen sind allerdings gute Phasenobjekte und können auch ohne Anfärbung in einem **Phasenkontrastmikroskop** beobachtet werden. Dabei wird die Phasenverschiebung der Lichtwellen nach Durchlaufen eines Objekts als Helligkeitsunterschied sichtbar gemacht.

Eine weitere Technik der Beobachtung von Mikroobjekten stellt die **Polarisationsmikroskopie** dar. Von Bakterien abgeschiedene Schleime, Kapseln oder auch eingelagerte Substanzen sind in vielen Fällen optisch aktiv und drehen die Polarisationssebene des durchlaufenden Lichts, was durch Verwendung geeigneter Filter sichtbar gemacht werden kann.

8.2.1 Bedienung des Lichtmikroskops

Das Lichtmikroskop liefert nur dann ein gutes Bild, wenn die optischen Funktionselemente sauber und optimal ausgeleuchtet sind. Die Reinigung verschmutzter Linsen erfolgt ausschließlich mit speziellem Optikpapier, sonst besteht die Gefahr des Verkratzens.

Die korrekte Ausleuchtung des Mikroskopes wird nach dem sogenannten **Köhler'schen Verfahren** (Köhler, 1893) vorgenommen, das eine Abbildung der Lichtquelle in der Aperturebene sowie eine homogene Leuchtdichteverteilung in der Leuchtfeldebene und damit in allen Bild- und Objektebenen vorsieht. Hierfür wird eine Mikroskopierlampe mit

Kollektor und Irisblende (Leuchtfeldblende) benötigt, die idealerweise fest im Stativfuß des Mikroskops eingebaut ist. Weiterhin ist ein Kondensator mit Irisblende (Kondensator- oder Aperturblende) erforderlich, der mit einem Feintrieb in der Höhe verstellbar ist (Abb. 18). Bei der Köhler'schen Beleuchtung ist nicht die eigentliche Lichtquelle (die Lampenleuchtquelle) sondern die hell und diffus strahlende Austrittspupille des Kollektors für die Ausleuchtung des Präparates zuständig. Durch die Kondensatorlinse wird das aus dem Kollektor austretende Licht auf das Objekt fokussiert. Dieses Verfahren hat sich in der Praxis bestens bewährt und wird nachstehend Schritt für Schritt beschrieben:

1. Einschalten der Lichtquelle und Regulierung auf mittlere Lichtintensität.
2. Objekt (Präparat) auf Objektträger unter Deckglas bei schwächster Vergrößerung fokussieren.
3. Kondensatorblende (= Aperturblende) vollständig öffnen.
4. Beleuchtungsstärke auf subjektiv angenehmes Maß regulieren.
5. Leuchtfeldblende so weit wie möglich schließen. Das polygonförmige Leuchtfeld im Sichtfeld zentrieren.
6. Kondensator heben bzw. senken, bis Rand der Leuchtfeldblende scharf gestellt ist.
7. Auf nächste Vergrößerungsstufe durch Einschwenken des entsprechenden Objektivs umschalten und erneut fokussieren.
8. Leuchtfeldblende erneut randscharf einstellen (durch Heben oder Senken des Kondensators).
9. Leuchtfeldblende öffnen, bis gesamtes Sehfeld ausgeleuchtet ist.
10. Kondensatorblende so weit schließen, dass ein subjektiv angenehmer Kontrast entsteht.

Beide Irisblenden des Köhler'schen Beleuchtungsapparates, Kondensator – und Leuchtfeldblende, sowie die Kondensatorhöhe müssen nach jedem Objektivwechsel stets neu eingestellt werden.

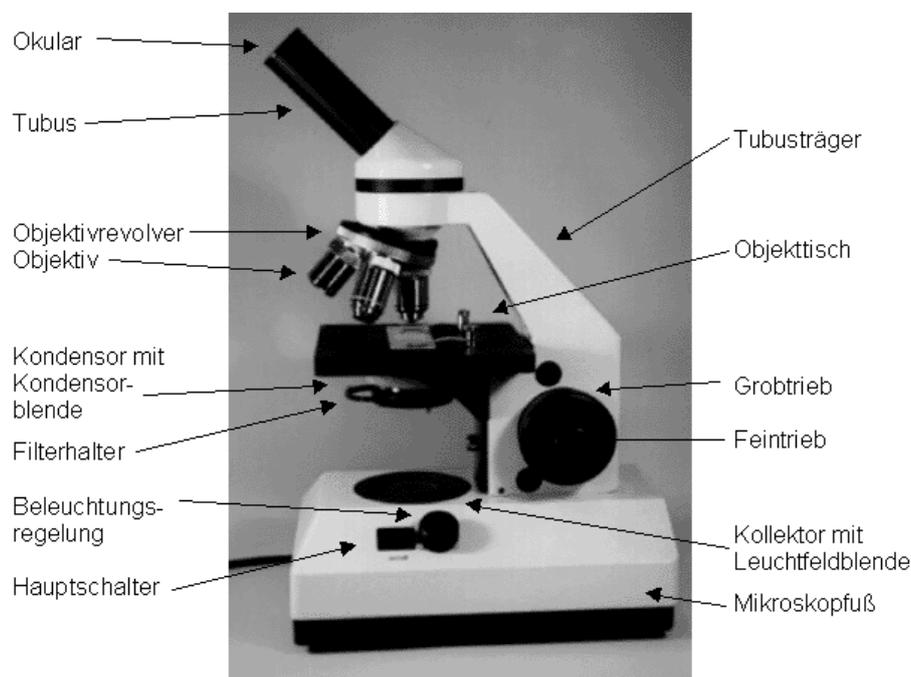


Abb. 18: Aufbau eines Lichtmikroskops mit Köhler'scher Beleuchtung

Bei Benutzung eines Phasenkontrastmikroskopes ist zusätzlich darauf zu achten, dass in den Kondensoren die zu dem verwendeten Objektiv passende Ringblende eingeschoben wird (siehe hierzu die Gravur auf dem Objektiv; ph1, ph2 oder ph3).

8.2.2 Verwendung von Ölimmersionsobjektiven

Zur Verbesserung der optischen Auflösung wird insbesondere bei starken Vergrößerungen (1000x) das Ölimmersionsverfahren empfohlen. Ein prinzipielles Problem der Lichtmikroskopie ist, dass die Lichtstrahlen mehrere Grenzflächen (Glas/Luft) durchlaufen müssen. Dabei wird das Licht jedesmal gebrochen, wodurch das Auflösungsvermögen abnimmt. Eine besonders kritische Stelle im Strahlengang des Mikroskops ist der normalerweise mit Luft gefüllte Raum zwischen dem auf einem gläsernen Objektträger liegenden Präparat und der Frontlinse des Objektivs. Die Lichtbrechung an dieser Stelle kann bei der Konstruktion des Mikroskopes nicht berücksichtigt werden, weil der Abstand zwischen Objekt und Linse den unterschiedlichen Bedürfnissen des Anwenders entsprechend variabel bleiben soll. Abhilfe schafft die Einführung von Immersionsöl, das idealerweise den gleichen Brechungsindex aufweist wie das Glas (was z.B. bei Zedernöl in etwa der Fall ist). Das Ölimmersionsobjektiv ist exakt für diesen Anwendungsfall konzipiert und eignet sich daher nicht für die Benutzung ohne Öl (umgekehrt eignen sich Normalobjektive nicht für Öl!).

In der Praxis wird ein Tropfen Öl direkt auf das auf einem Objektträger liegende Präparat gegeben. Anschließend fährt man das Objektiv so weit herunter, dass die Frontlinse in den Öltropfen eintaucht, um dann vorsichtig zu fokussieren. Das Deckglas darf dabei nicht berührt werden. Das Öl zwischen Deckglas und Frontlinse sorgt dafür, dass die auf das Präparat fallenden Lichtstrahlen nicht vom Mittelstrahl weg brechen, sondern ebenfalls ins Objektiv gelenkt und am Bildaufbau beteiligt werden. Auf diese Weise werden die numerische Apertur und das Auflösungsvermögen des Ölimmersionsobjektivs gesteigert.

***Tip!** Eine Immersion kann mit Öl, Wasser oder Glycerin ausgeführt werden. Auf der Fassung des Objektivs ist in einer Gravur vermerkt, für welche Art von Immersion die Linsen berechnet sind. Als Immersionsmedium nehme man stets das vom Objektivhersteller empfohlene oder gelieferte! Ein durch angetrocknetes Öl verklebtes Objektiv lässt sich mit Hilfe eines Optiktuches und (wenig) Ethanol oder Isopropanol reinigen.*

8.2.3 Mikroskopische Beobachtungen am "hängenden Tropfen"

Für die lichtmikroskopische Untersuchung eines Objektes im "hängenden Tropfen" wird gemäß Abb. 19 auf einem Hohlschliffobjektträger eine geschlossene "feuchte Kammer" eingerichtet. Der Objektträger besitzt eine Vertiefung (Hohlschliff), über die ein Deckglas gelegt werden kann. Dieser Versuchsaufbau hat insbesondere bei Verwendung wässriger Proben den Vorteil, dass durch Verdunstung hervorgerufene Flüssigkeitsströmungen vermieden werden können. Durch die Beruhigung des Wasserkörpers lassen sich Bakterien, Wachstums- und Teilungsvorgänge genauer beobachten. Ein Nachteil dieser Technik ist allerdings die durch den Hohlschliff bedingte große Dicke des Präparates, in dem die Lichtstrahlen stärker gebrochen werden als in einem normalen Objektträger.

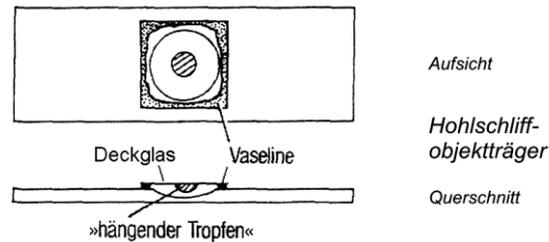


Abb. 19: Objektträger für die Mikroskopie des "hängenden Tropfens"

In der Praxis wird auf einen Hohlschliffobjektträger um die kreisförmige Vertiefung herum ein Vaselinering aufgebracht. Weiterhin wird ein kleiner Tropfen der zu untersuchenden wässrigen Probe auf ein Deckglas überführt (z.B. mit Hilfe einer sterilen Impföse). Sodann wird der Objektträger über Kopf so auf das Deckglas gelegt, dass sich der Tropfen im Hohlschliff befindet. Anschließend wird das Präparat umgedreht und auf den Objektstisch des Mikroskops gelegt. Zunächst wird bei schwacher Vergrößerung und starker Abblendung auf den Rand des Tropfens fokussiert. Dann erfolgt die mikroskopische Untersuchung mit dem Ölimmersionsobjektiv.

8.3 Techniken zur Anreicherung und Isolierung von Bakterien

Mikrobiologische Untersuchungen an Bakterien erfordern ein Testsystem mit einer ausreichenden Anzahl dieser Organismen, die unter Anwendung nachstehend beschriebener Kultivierungstechniken zunächst angereichert (vermehrt) und ggfs. isoliert werden müssen. Die Anreicherung von Bakterien erfolgt i.d.R. aus natürlichen Ressourcen wie Luft-, Boden- und Wasserproben, die normalerweise Mischpopulationen aus verschiedenartigen Mikroorganismen beherbergen. Über selektive Kultivierungsbedingungen (Nährstoffzusammensetzung des Mediums, pH, Temperatur, Sauerstoffgehalt) kann ein Selektionsdruck auf die Mikroflora einer Probe ausgeübt werden. Nach Maßgabe dieser Einflußnahme werden nur die Mikroorganismen stoffwechselaktiv und teilungsfähig bleiben, die an die gewählten Kulturbedingungen am besten angepasst sind. Alle anderen Begleitorganismen stellen den Stoffwechsel ein und werden überwachsen, sterben aber nicht zwangsläufig ab. So bedeutet die Anreicherungskultur lediglich den ersten Schritt zur Herstellung einer Reinkultur, wenn die Isolierung eines Organismus' (ohne Begleitflora) gewünscht wird.

Per Definition besteht eine **Reinkultur** ausschließlich aus Klonen eines Bakteriums. Die Isolierung ist üblicherweise so vorzunehmen, dass bereits angereichertes Probematerial auf feste Kulturmedien (Agar-haltige Nährböden in verschließbaren Platten) ausplattiert und im Idealfall Zellen vereinzelt verteilt werden und dann bebrütet wird, bis vereinzelt (inselartige) Kolonien auftreten. Im Prinzip genügen diese Kolonien bereits den Anforderungen an eine Reinkultur und können mit Hilfe einer Impföse abgegriffen werden. Grundsätzlich sollten aber dennoch weitere Ausstriche über mehrere Platten angefertigt werden, um sicher zu gehen, dass sich die (idealerweise einheitlichen) Kolonien hinsichtlich makroskopischer Kriterien wie Form, Größe und Farbe auch über Generationen hinweg nicht verändern (andernfalls wäre die Kultur nicht rein, sondern immer noch durch Fremdorganismen kontaminiert!). Die abschließende Kontrolle der Kultur erfolgt am Lichtmikroskop, mit Hilfe dessen die morphologische Einheitlichkeit der Bakterienzellen im Sichtfeld bei 1000-facher Vergrößerung und Ölimmersion geprüft wird.

8.3.1 Kulturmedien

Kulturmedien enthalten die für das Wachstum der Mikroorganismen notwendigen Nährstoffe und ggfs. sogenannte Suppline (Zusätze, z.B. essentielle Aminosäuren). **Flüssige Nährmedien** werden i.d.R. für die Massenanzucht von Bakterien verwendet, in denen Konzentrationen von bis zu 10^{10} Zellen pro mL auftreten können. Das Wachstum der Bakterien wird ab einer bestimmten Zelldichte durch Trübung des Mediums angezeigt. Alternativ können Kulturmedien mit Agar (ein Galactosepolymer aus Rotalgen) als Geliermittel versetzt werden, das von den meisten Bakterien nicht abgebaut werden kann. Dabei entstehen weiche **Nährböden**. Auf diesen wachsen Bakterien in Form von Kolonien, die vereinzelt auftreten und gezielt abgegriffen werden können. Weiterhin werden folgende Medientypen unterschieden:

- Standardmedien sind hinsichtlich der chemischen Zusammensetzung (qualitativ und quantitativ) exakt definiert. Hiervon unterscheiden sich die sogenannten Komplexmedien. Diese enthalten Komplexnährstoffe (wie Hefeextrakt, Fleischextrakt, Pepton, Säfte und Blut), die hinsichtlich der chemischen Zusammensetzung nicht exakt definiert sind.
- Ein Vollmedium enthält neben essentiellen Nährstoffen auch solche, die der Organismus selbst herstellen kann (also nicht essentiell sind). Dagegen besteht ein Minimalmedium ausschließlich aus essentiellen Nährstoffen.
- Selektive Medien enthalten gezielt ausgewählte Nährstoffe, die auf die Nährstoffansprüche eines bestimmten Organismus' zugeschnitten sind und idealerweise nur diesem das Wachstum ermöglichen.
- Differentielle Medien enthalten einen Indikator, der z.B. über eine Farbreaktion eine bestimmte Stoffwechselleistung anzeigen kann.

Rezepte für Nährmedien werden meist für einen Liter angegeben. Dabei werden die eingewogenen Bestandteile und weiter flüssige Komponenten mit destilliertem Wasser oder einem anderen Lösungsmittel auf einen Liter aufgefüllt. Dies wird im Rezept mit der Abkürzung "ad 1 L" angezeigt.

Als Kulturgefäße werden im Falle von Flüssigmedien Reagenzgläser, Erlenmeyerkolben, oder (Schott-)Flaschen und im Falle von Nährböden Petrischalen verwendet. Grundsätzlich ist jedes Kulturgefäß mit Rücksicht auf die Gefahr der Kontamination durch Fremdorganismen durch geeignete Deckel zu verschließen. Im Falle der Kultivierung von Organismen, die mit Luftsauerstoff leben (Aerobier), müssen gasdurchlässige (Kork- oder Wattestopfen) oder Überwurfdeckel (die mit der Gefäßwandung nicht bündig abschließen) verwendet werden.

8.3.2 Herstellung von Nähragarplatten

Das in der Hitze (nach dem Autoklavieren) verflüssigte Agarmedium wird im Wasserbad auf ca. 55°C abgekühlt und dort bis zur weiteren Verwendung gelagert, um den Prozeß der Verfestigung hinauszuzögern. Das Gießen des Mediums in die (sterilen!) Petrischalen soll aus dem vorgenannten Grund möglichst zügig erfolgen. Dabei hat es sich bewährt, in einer Hand gleich mehrere Petrischalen zu halten und diese von unten im Stapel beginnend zu befüllen. Die bereits befüllten Schalen verbleiben auf dem Arbeitstisch, die noch folgenden werden darüber gestapelt. Die Füllmenge soll (meist nach Augenmaß) etwa 20 mL betragen. Wird eine Schale zu sparsam befüllt, kann das Medium während der Bebrütung austrocknen. Ein

idealer Agarboden weist eine glatte Oberfläche ohne Luftblaseneinschlüsse auf, was die spätere Auszählung der Kolonien erheblich erleichtert.

Beim Abkühlen der Petrischalen kann es zur Bildung von Kondenswasser auf den Nährböden kommen. Dieser Effekt führt nach der Beimpfung des Mediums dazu, dass insbesondere bewegliche Bakterienzellen über die feuchte Oberfläche ausschwärmen und der Nährboden rasenförmig zuwächst. Das Auszählen oder die Isolierung einzelner Kolonien ist dann nicht mehr möglich. Die Bildung von Kondenswasser auf den Nährböden kann verhindert werden, wenn die noch warmen Petrischalen stapelweise aufgetürmt und nach dem Erstarren sofort umgedreht werden (Schale oben, Deckel unten). Restfeuchte oder an den Deckeln verbliebenes Kondenswasser können durch 2-stündige Einlagerung der abgekühlten und vollständig erstarrten Nährböden im Trockenschrank bei 37 °C entfernt werden. Die Plattenstapel werden dazu weiterhin mit den Deckeln nach unten im Schrank aufgestellt.

Die Beschriftung der Agarplatten erfolgt grundsätzlich am Rand der Unterschalen (nicht auf den Deckeln!) und informiert mindestens über das Medium, den Namen des Experimentators, das Datum der Beimpfung und das ausgestrichene Probematerial.