

Name:

Datum:

## Kleines Mikrobiologisches Praktikum

# Skriptum



GSF – Forschungszentrum  
für Umwelt und Gesundheit GmbH  
Helmholtzstr. 11, D-85075 Freising, Tel. 089 30920-0



Skriptversion: 28.06.2005

## Großes Mikrobiologisches Praktikum für Leistungskurse Biologie

---

Warum soll man Obst vor dem Essen waschen? Ist Zähneputzen wirklich nötig? Warum reicht Hände waschen allein nicht, sondern ist auch das Abtrocknen enorm wichtig? Überall in unserer Umwelt befinden sich Bakterien, die unser Leben ständig beeinflussen.

Ziel der Versuche in diesem großen, mikrobiologischen Praktikum ist es, den Schülerinnen und Schülern die Möglichkeit zu geben, den experimentellen Umgang mit Bakterien im Labor zu erproben. Zusätzlich lernen die Leistungskursler das Verfahren der Genübertragung durch Plasmide als modernes Instrument in der biochemischen Forschung kennen.

### Experimente

1. Prinzipien des sterilen Arbeitens / Herstellung von Agarplatten
2. Nachweis und Auswertung von Luftkeimen
3. Nachweis und Auswertung von Keimen in verschiedenen Wassersorten
4. Mikroskopieren von Bakterien
5. Färbung von Bakterien
6. Bakterien am Körper und Hygieneregeln
7. Wachstum von Bakterien

## **Grundsätze für mikrobiologisches (steriles) Arbeiten**

Mikroorganismen sind allgegenwärtig. Um Kulturen, sterile Lösungen und sterile Geräte vor Verunreinigungen (Kontaminationen) zu schützen, müssen einige Regeln beachtet werden. Nur so können **korrekte** mikrobiologische Ergebnisse gewährleistet werden.

Unter **Sterilität** (v. lat. *steril*: keimfrei, unfruchtbar) versteht man den Zustand absoluter Keimfreiheit (= Nichtvorhandensein vermehrungsfähiger Mikroorganismen). Dazu bedient man sich physikalischer und chemischer Verfahren. In den nachfolgenden Arbeitsschritten führst Du die verschiedenen Sterilisationsverfahren durch.

Als physikalisches Sterilisationsverfahren verwendet man das **Autoklavieren** (v. lat. *clavis* Schlüssel, Riegel). Diese Methode wird zur Sterilisation von hitzestabilen Kulturmedien, Lösungen und Gegenständen, die eine Temperatur über 130 °C nicht vertragen (z. B. Plastik), verwendet. Die zu sterilisierenden Gegenstände werden für mindestens 20 Minuten einer Wasserdampf-atmosphäre von 121 °C ausgesetzt; vergleichbar ist dies mit einem Dampfdrucktopf.

Bei der **Desinfektion** hingegen wird nicht immer ein vollständiges Abtöten pathogener (krankheitserregender) Keime erzielt, sondern erreicht oftmals nur eine Reduzierung (Verminderung) der Keimzahl.

<b>Material:</b>	Petrischalen, Impföse, Drygalskispatel, Reagenzglas mit Sterilisierkappen, Bunsenbrenner, Pasteurpipetten
<b>Chemikalien:</b>	Desinfektionsmittel, Seife

<b>Versuchsablauf</b>	<b>Bemerkungen</b>
<p>1. <b>chemisches Verfahren:</b>  <i>Händedesinfektion</i> (nur wenn ohne Handschuhe gearbeitet wird)                      Vor und nach jedem mikrobiologischen Arbeiten müssen die Hände mit speziell dafür vorgesehenem Desinfektionsmittel desinfiziert werden.</p> <p>2. <b>physikalisches Verfahren:</b>  <i>Arbeitsmaterialdesinfektion.</i>                      Beim mikrobiologischen Arbeiten müssen die verwendeten Arbeitsgeräte und -materialien jeweils vor und nach Gebrauch sterilisiert werden, so dass man keine Keime auf das zu untersuchende Objekt verschleppt.</p> <p>2 a) <b>AUSGLÜHEN</b>                      Sterilisation der <i>Impföse</i> durch Ausglühen in einer Flamme: Entzünde den Bunsenbrenner. Halte dann die Impföse schräg nach unten in den nicht leuchtenden Teil der Flamme bis sie glüht. Ziehe danach den Impfösenhals einige Male durch die Flamme. Anschließend lass die Impföse abkühlen, bevor du Material aufnimmst.</p>	<p><i>Hände erst mit Seife waschen, dann desinfizieren.</i>  <i>Beispiele für andere chemische Sterilisationsmittel sind: Antibiotika, Chemotherapeutika etc...</i></p> <p><u>Wege der physikalischen Sterilisation:</u>  <b>A. Temperatur: ausglühen, abflammen</b>                      B. mechanisch: filtrieren                      C. Strahlung: radioaktiv, UV</p> <p><u>Impföse:</u> <i>Werkzeug zur Entnahme von kleinen Mengen Kulturmaterial, sowie zum Beiimpfen von Kulturmedien.</i></p>

2 b) **ABFLAMMEN**

Tauche den *Drygalskispatel* kurz in das abgedeckte Becherglas mit Alkohol. Verschließe das Becherglas wieder mit der Petrischale.

Entzünde den *Drygalskispatel* **nur kurz** an der Bunsenbrennerflamme und halte dabei den brennenden *Drygalskispatel* neben dem Bunsenbrenner leicht schräg nach unten bis die Flamme erlischt.

Anschließend nimm die Schraubverschlussflasche mit dem sterilen Wasser. Öffne die Flasche neben der Bunsenbrennerflamme und zieh die Flaschenmündung **kurz** zweimal durch die Flamme. Gieß jetzt etwas Wasser aus, zieh die Flaschenmündung und die Innenseite des Verschlusses wieder kurz durch die Flamme und verschließe die Flasche.

**MERKE DIR!!!**

**Je schneller du arbeitest, desto länger bleiben die verwendeten Materialien steril.**

**Drygalskispatel:** Werkzeug zum Ausstreichen von Kulturmaterial auf Nährböden in Petrischalen.

Glasgeräte können nicht ausglühen, sie können nur oberflächlich sterilisiert werden.

## Herstellung von Agarplatten

<b>Du brauchst:</b>	Kulturmedium (Nähragar), Bunsenbrenner, Petrischalen, Arbeitshandschuhe
---------------------	-------------------------------------------------------------------------

Versuchsablauf	Bemerkungen
<p>Das Kulturmedium (Nähragar) wurde von uns schon durch Autoklavieren sterilisiert und in Schraubverschlussflaschen vorbereitet. Besorge dir den frisch aufgekochten Nähragar aus der Mikrowelle.</p>	<p><i>Kulturmedium = ein Nährboden, der die für das Bakterienwachstum nötigen Stoffe beinhaltet.</i>  <i>Hier: Nähragar = enthält einen Fleischextrakt als Bakteriennahrung und Agar zum Festwerden des Nährbodens</i></p>
<p>1. Verschluss der Schraubverschlussflasche vorsichtig entfernen und Rand kurz abflammen.</p>	<p><i>Arbeitshandschuhe tragen!!!</i></p>
<p>2. Insgesamt acht Petrischalen (jede Gruppe) neben dem Bunsenbrenner bereitstellen.</p>	<p><i>Die Wärme der Flamme lässt Luft aufsteigen und bewirkt, dass beim Eingießen des Kulturmediums keine Keime aus der Luft hineinfallen können.</i></p>
<p>3. Deckel der Petrischalen anheben und soviel eingießen, dass der gesamte Boden vollständig bedeckt ist (ca. 30 ml). Während des Gießens den Deckel der Petrischale schräg über das Unterteil halten.</p>	<p><i>Das Halten des Deckels während des Gießens soll verhindern, dass sich Keime aus der Luft in den Nährboden mischen.</i></p>
<p>4. Eventuell entstandene Luftbläschen durch kurzes Befächeln (von oben) mit der entleuchteten Bunsenbrennerflamme entfernen.</p>	
<p>5. Deckel schräg auflegen und in waagrechter Position erstarren lassen. (ca. 5 min)</p>	<p><i>Dies soll verhindern, dass Kondenswasser vom Deckel in die Platten tropft und Bakterien wegschwemmt</i></p>
<p>6. Nach Erkalten und Erstarren des Nährmediums (erkennbar an einer leichten Trübung des Nähragars) werden die Petrischalen umgekehrt, mit Deckel <u>nach unten</u> und Boden nach oben, aufgestellt und für Versuch 2 verwendet.</p>	<p><i>Die Petrischalen nicht mehr bewegen, da sonst der Nähragar nicht erstarrt.</i></p>





## Nachweis von Keimen in der Luft

### B) Auswertung der inkubierten Platten

**Definition Kolonien-Morphologie:**

(Morphologie: Lehre von der Struktur und Form der Organismen; v. griech. "Lehre von der Gestalt")

Das Wachstum von Keimen auf Agarplatten resultiert in der Bildung von Kolonien, die ein ganz verschiedenartiges Aussehen haben können. Diese Kolonien-Morphologie ist oft sehr charakteristisch für entsprechende Bakterien und kann zur groben ersten Identifizierung einen ersten Anhaltspunkt bieten.

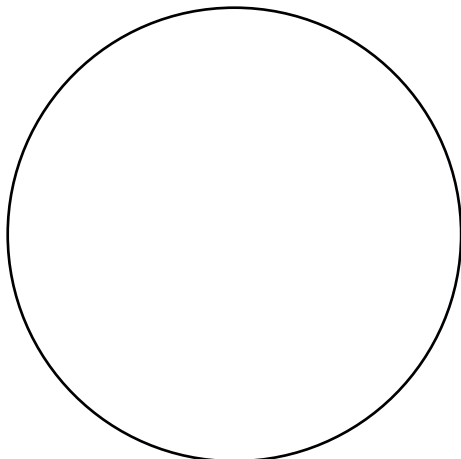


**ACHTUNG!!!** Bitte achte darauf, dass du die inkubierten Agarplatten **vor** der Auswertung sorgfältig am Rand mit Tesafilm zuklebst. Es könnten sich eventuell pathogene Keime in größerer Menge gebildet haben und dich infizieren!

**Materialien:** bewachsene Platten der Vorgruppen, Farbatlas der Mikrobiologie

Arbeitsgang	Bemerkungen
<p>1. Besorge dir drei bebrütete Ansätze (30, 60, 90 min) eines bestimmten Standortes und notiere Datum und Versuch. Verschließe die Platten <b>bevor</b> du sie auswertest, indem du den gesamten Rand mit Tesafilm umklebst.</p> <p>2. Beurteile und beschreibe anhand nebenstehender Tabelle die Morphologie der entstandenen Kolonien.</p> <p>3. Skizziere die verschiedenen Kolonien einer wenig bewachsenen Agarplatte und versuche mit Hilfe des Farbatlas die Bakterienkolonien zu benennen.</p>	<p><i>Lege dazu die bewachsenen Platten auf den Leuchttisch.</i></p>

**Skizze:**



Hilfestellung:

Luftkeime können sein:

Bakterien:

- Micrococcus luteus (goldgelb), M. ros eus (rot)
- Bacillus myocides, Bacillacea
- Corynebacterium
- Mycobacterium
- Streptomyces
- Nocardia, Rhodococcus (rot)

Pilze:

- Rhodotorula (roter Hefepilz)
- Aspergillus niger (Gießkanenschimmel)
- Mucor mucedo (Köpfchenschimmel)
- Alternaria
- Penicillium sp. (Pinselschimmel)
- Cladosporium



Beispiele für gebräuchliche Umschreibungen:

Größe: nadelkopfgroß, pfenniggroß, klein, ....

Rand: glatt, zackig, samtig, ...

Farbe: elfenbeinfarben, weiß, durchsichtig, gelb, ...

Form: rund, unregelmäßig, kugelig, flach,...

Expositionszeit und Standort	Anzahl Kolonien	Größe	Farbe	Verlauf des Randes	Formen

**Aufgaben:**

1. **Vergleiche die Ergebnisse deiner Proben, indem du sie graphisch darstellst!**
2. **Versuche die zu erwartenden Ergebnissen, aber auch die eventuellen Abweichungen, allgemein zu interpretieren!**



### Nachweis von Keimen in Wasser

#### A) Erstellen einer Verdünnungsreihe

Um die unzähligen Keimanzahl in einer Probe bestimmen zu können, ist es oft erforderlich die Probe schrittweise zu verdünnen. Sind zum Beispiel zu viele Keime in einer Probe vorhanden, bewachsen sie die gesamte Oberfläche der Agarplatten und sind somit nicht mehr zählbar.

Mittels einer Verdünnungsreihe, dem schrittweisen Verdünnen einer Probe, ist es nun möglich die Keimanzahl der verschiedenen Verdünnungen zu zählen und letztendlich durch Umrechnen die Gesamtkeimzahl in einem Liter Wasser zu bestimmen.

<b>Material:</b>	4 Reagenzgläser mit Sterilisierkappen, 4 Nährböden in Petrischalen, verschiedene Wasserproben, Mikropipetten (200 µl und 1000 µl), sterilisierte Pasteurpipetten
<b>Chemikalien:</b>	steriles Wasser

#### Versuchsablauf

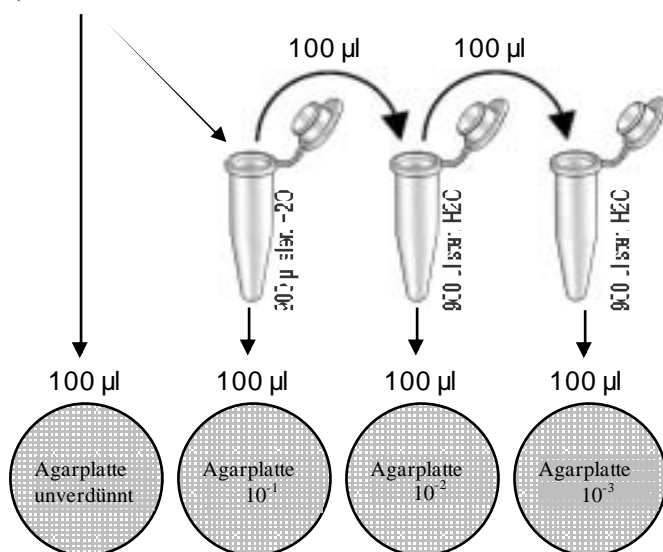
#### Bemerkungen

1. Im Folgenden soll die Keimzahl in verschiedenen Wassersorten untersucht werden. Dazu entscheide dich für eine der bereitgestellten Möglichkeiten an Wasserproben und beschrifte die Agarplatten auf der Unterseite mit Datum, Versuch (z.B. Nw v. Keimen in ...wasser) und der entsprechenden Verdünnung (z.B. 1:10, 1:100, 1:1000 oder  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ )
2. Lass dir vom Kurleiter den Gebrauch der Mikropipetten erklären!
3. Gib 100 µl der unverdünnten Wasserprobe auf eine Agarplatte.
4. Verdünne anschließend die Wasserproben mit sterilem Wasser getrennt nach folgendem Schema von  $10^{-1}$  bis  $10^{-3}$ . Dazu übertrage 100 µl der Probe in das erste Eppendorfgefäß und mische mit dem Vortexer.
5. Verdünne entsprechend des Schemas weiter. Nach jedem Schritt vortexen!
6. Entnimm 100 µl aus der jeder Verdünnungslösung und gib dies auf je eine Agarplatte.

*Wassersorten:  
Destilliertes Wasser, Leitungswasser, Teichwasser, Mineralwasser.  
Oder:  
Orangensaft, Apfelsaft, ...*

*Da die Wasserproben eine für die Auswertung zu hohe Anzahl an Keimen enthalten, muss vor dem Ausplattieren verdünnt werden.  
Mikropipette senkrecht halten, blasenfrei die Lösung aufnehmen und langsam tropfen.*

100 µl Probe



- 
7. Möglichst zügig den Drygalskispatel abflammen und auf dem Nährboden, neben dem aufgetragenen Wassertropfen abkühlen lassen.
  8. Drehe die Petrischale und verteile mit dem Drygalskispatel die Wasserprobe gleichmäßig auf der Agaroberfläche.
  9. Anschließend die Petrischale wieder verschließen und auf den Kopf drehen.
  10. Bringe die fertig beschrifteten Agarplatten zum Brutschrank. Die Agarplatten werden dann von uns 24 Stunden bei 37°C bebrütet.
- Den Drygalskispatel unbedingt abkühlen lassen, damit die Bakterien nicht abgetötet werden.*

**Nachweis von Keimen in Wasser**

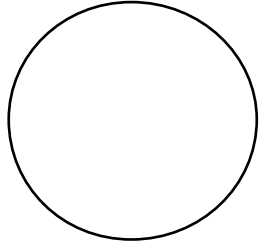
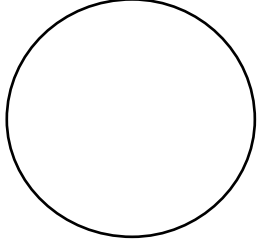
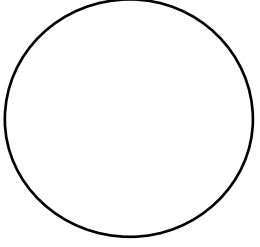
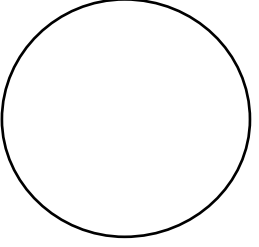
B) Bestimmung des Titers/ Kolonienmorphologie

Definition **Titer**: (frz. titre, eigtl. „Angabe eines (Mischungs)verhältnisse“) Gehalt einer verwendeten Lösung an einer Substanz oder an Zellen.

<u>Material:</u>	Agarplatten der Vorgruppen, feiner Foliestift, Mac Conkey-Agarplatte
<u>Chemikalien:</u>	---

Versuchsablauf	Bemerkungen
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Besorge Dir jeweils drei bebrütete Ansätze einer Wasserprobe <u>und</u> drei bebrütete Ansätze einer anderen Wasserprobe (gleiche Wassersorten wie bei Versuchsteil A verwenden!). Notiere Datum, Versuch und Verdünnungsansatz.</li> <li>2. Verschließe jede Agarplatte, indem du den gesamten Rand mit Tesafilm umklebst.</li> <li>3. Zähle die Anzahl der Kolonien und notiere die Ergebnisse aller Versuchsansätze!</li> <li>4. Entnimm 100 µl von jener Verdünnung (s. Versuchsteil A), dessen bebrüteter Ansatz maximal 100 Kolonien enthält, und plattiere diese Verdünnung auf eine Mac Conkey-Agarplatte aus.</li> <li>5. Beschrifte und verschließe diesen Ansatz und lege ihn in den Brutschrank.</li> <li>6. Besorge dir gleich einen schon bebrüteten Ansatz dieser Agarplatte und zähle die Anzahl der Kolonien. Notiere das Ergebnis dieses Versuchsansatzes!</li> <li>7. Beurteile und beschreibe anhand der bei Versuch 2 angeführten Tabelle die Morphologie der entstandenen Kolonien dreier Versuchsansätze (Wasserprobe 1, Wasserprobe 2, Mac Conkey), die eine maximale Kolonienzahl von 100 Kolonien aufweisen.</li> <li>8. Skizziere die verschiedenen Kulturen der drei Agarplatten.</li> <li>9. Berechne den durchschnittlichen Titer an Keimen der verschiedenen Wasserproben. Dazu beachte die Verdünnung des entsprechenden Versuchsansatzes und das Volumen der pipettierten Probe!</li> <li>10. Berechne die durchschnittliche Keimzahl für einen Liter Wasser (<math>n_K = 1 / L</math>)!</li> </ol>	<p>Zum Abzählen lege die Agarplatte auf einen Leuchttisch und markiere mit einem Foliestift auf der Unterseite der Petrischale die abgezählten Kolonien.</p> <p>Mac Conkey-Agarplatten sind zum Nachweis von coliformen Keimen.</p> <p>Petrischalen immer verschlossen lassen! Infektionsgefahr!!!</p>

**Auswertung:**

Skizze:				
Datum, Verdünnung, Agarsorte				
Wassersorte:				
Anzahl an Kolonien:				
Morphologie der Kolonien:				
Titer:				

**Ergebnisse:**

**Fragen:**

Welche allgemeinen und auch ökologischen Aussagen lassen sich anhand deiner Ergebnisse treffen? Vergleiche dazu die Ergebnisse aller Wassersorten!

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### **Mikroskopie von Bakterien**

(Vergleichsmaterial wird von der Kursassistentin bereitgelegt, z.B. E. coli K12)

<u>Material:</u>	Mikroskop, Farbatlas der Mikrobiologie, Objektträger, Deckgläschen, Pinzette, Immersionsöl, Tropfpipette
------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------

<b>Versuchsablauf</b>	<b>Bemerkungen</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Lies genau die Mikroskopieranleitung durch.</li> <li>2. Impföse ausglühen und einen kleinen Tropfen Leitungswasser auf die Mitte des Objektträgers bringen.</li> <li>3. Impföse ausglühen und auf Agaroberfläche, nicht auf einer Bakterienkolonie, abkühlen lassen.</li> <li>4. Wenig Material einer Bakterienkolonie aus der Petrischale entnehmen und im Wassertropfen bis zur leichten Trübung verrühren.</li> <li>5. Deckglas mit einer Pinzette (nicht mit den Fingern!) auflegen und <u>vorsichtig</u> leicht andrücken, bis Luftbläschen verschwinden</li> <li>6.</li> <li>7. Immersionsöl (nur 1 kleiner Tropfen) auf die Mitte des Deckglases auftragen. Vorsichtig von der Seite beim Drehen des Grobtriebs beobachten, wie das 100-fache Objektiv langsam in den Öltropfen eintaucht. Darauf achten dass der Objektischabstand groß genug ist.</li> <li>8. Mit Feintrieb Schärfenebene suchen. Objekt auf x/y-Achse mit Objektisch-Einstellschrauben durchmustern und geeignete Stelle aufsuchen, an der die Bakteriensuspension nicht zu dicht ist.</li> </ol>	<p style="margin-top: 100px;"><i>ACHTUNG! Immersionsöl bitte nicht auf dem Tisch vertropfen. Im Falle von verschütten, bitte sofort wegwischen.</i></p> <p style="margin-top: 50px;"><i>Die Zellen müssen für eine gute Beurteilung frei schwimmen, ansonsten lässt sich die Beweglichkeit nicht beobachten.</i></p>

**Auswertung:**

Skizziere und beschreibe drei verschiedene Bakterienarten und beschrifte sie gegebenenfalls mit ihrem Namen (s. Farbatlas!).

### Unterscheidung von Bakterien durch Färbung

Neben vielen anderen Untersuchungsmethoden von Bakterien gibt es ein gängiges Färbeverfahren, mit dem es möglich ist, Bakterien unter dem Mikroskop zu unterscheiden.

Die Gram-Färbung ist nach dem dänischen Arzt und Bakteriologen HANS CHRISTIAN GRAM benannt, der sie ca. Ende des 19. Jahrhunderts entwickelte. Verschiedene Bakterien reagieren auf diese Färbung unterschiedlich. So kann man eine Einteilung in sogenannte *Gram-positive* Bakterien, die violett/blau erscheinen, und *Gram-negative* Bakterien, die rot gefärbt werden, ableiten.

„Dies ist ein wichtiges Kriterium für die Unterscheidung verschiedener Bakterien z.B. bei der Diagnostik von Infektionskrankheiten. "Gram-positive" und "Gram-negative" Bakterien reagieren unterschiedlich auf Antibiotika. Mit dieser schnellen diagnostischen Methode kann man in kurzer Zeit (ca. 5 Minuten) anhand eines Abstriches das "Gramverhalten" der Bakterien bestimmen. Damit hat man die Möglichkeit, sofort mit einer antibiotischen Therapie zu beginnen bevor das Ergebnis der oft mehrere Tage dauernden definitiven Keimbestimmung vorliegt.“ (s. www.lexikon-definition.de)

#### A) Vorbereitung des Präparats – Hitzefixierung

<u>Material:</u>	Objektträger, Deckgläser, Pinzette, Tropfpipette, Impföse, Bunsenbrenner, bewachsene Agarplatte mit apathogenen Bakterienstämmen (z.B. E. coli K12, B-Staphylokokken, etc.)
<u>Chemikalien:</u>	dest. Wasser

Versuchsablauf	Bemerkungen
1. Reinige die Objektträger mit Alkohol (Entfetten).	
2. Ziehe den entfetteten Objektträger 2-3-mal kurz durch die Flamme des Bunsenbrenners.	<i>Achtung! Entfettete Schichtseite beachten</i>
3. Lege den Objektträger über die Färbeschale und gib einen Tropfen Wasser darauf.	
4. Entnimm mit der ausgeglühten Impföse etwas Material einer Bakterienkultur und vermische das Material mit dem Wassertropfen auf dem Objektträger.	
5. Verteile den Wassertropfen auf eine größere Fläche (ca. 10 x 20 mm) und erwärme den Objektträger <b>vorsichtig</b> an der Rückseite, damit das Wasser schneller verdampft.	<i>Nicht zu stark erhitzen!! Wedeln beschleunigt das Eintrocknen!</i>
6. Ziehe den Objektträger mit der Schichtseite nach oben einige Male <b>SCHNELL</b> durch die Bunsenbrennerflamme.	<i>Das Glas darf nur <b>handwarm</b> werden, ansonsten ist das Präparat beschädigt und nicht mehr brauchbar!</i>
7. Wiederhole den Arbeitsgang 1-5 mit einer anderen Bakterienkultur!	



### Unterscheidung von Bakterien durch Färbung

#### B) Färbung nach GRAM

<u>Material:</u>	Objektträger, Petrischale
<u>Chemikalien:</u>	Kristallviolett-Lösung, Lugolsche Lösung, Alkohol, Safranin-Lösung, dest. Wasser

**ACHTUNG!!!!**

Beim Färben Handschuhe tragen, um Kontakt mit den Farbstoffen zu vermeiden. Farbspritzer auf den Tischen bitte sofort mit einem feuchten Papiertuch abwischen!!!

Versuchsablauf	Bemerkungen
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Lege die hitzefixierten Präparate über eine Färbeschale / Petrischale.</li> <li>2. Gib nur einen Tropfen Kristallviolett-Lösung auf die Oberfläche und betätige die Stoppuhr.</li> <li>3. Spüle die Kristallviolett-Lösung nach einer Minute mit Lugolscher-Lösung ab und warte zwei Minuten.</li> <li>4. Tropfe anschließend Alkohol langsam auf den gefärbten Ausstrich, lass den Alkohol einwirken und kipp den Alkohol ab. Dies wird solange wiederholt, bis keine Farbwolken mehr vom Präparat abgehen.</li> <li>5. Gib jetzt 3-4 Tropfen Safranin-Lösung hinzu und spüle nach einer Minute mit dest. Wasser.</li> <li>6. Trockne die Rückseite des Objektträgers und lege ein Deckglas auf die Schichtseite.</li> <li>7. Untersuche die gefärbten Bakterien unter dem Mikroskop auf ihr Farbverhalten und vergleiche den Abbildungen von Bakterien im Farbatlas der Mikrobiologie (s. Seite 78!).</li> </ol>	<p><i>Behandelte Seite nach oben!</i></p> <p><i>Bereite die Stoppuhr vor!</i></p> <p><i>Überschüssiges Wasser auf der Schichtseite wird vorher durch <b>Absaugen</b> mit Papier entfernt!</i></p>

**Auswertung:**

**Beschreibe die Form und die Gram-Färbung deiner Präparate!**



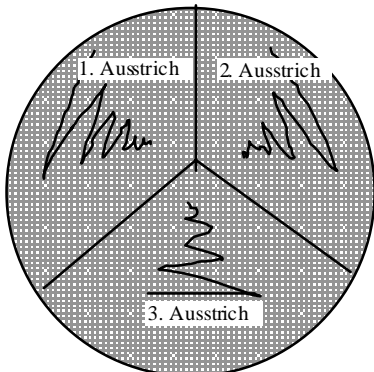
## Nachweis von Keimen am Körper

### A) Verschiedene Körperregionen

<b>Material:</b>	sterile Wattestäbchen, drei Agarplatten
<b>Chemikalien:</b>	steriles Wasser

Im folgenden Versuch geht es darum zu untersuchen, an welchen Körperstellen sich verschiedene Keime befinden.

Zum Beispiel befinden sich auf der Haut je nach Region unterschiedlich viele Keime: So wachsen am Rücken etwa 1.000 Keime pro Quadratmeter, unter den Achseln dagegen, wo es viel feuchter ist, etwa 100.000. Auf jeden Fall wachsen die Keime unserer Hautflora so dicht, dass sie uns vor schädlichen Keimen wie zum Beispiel dem Eitererreger *Streptococcus aureus* schützen. Diese Keime sind zwar in geringer Anzahl auf der Haut vorhanden, haben aber keine Chance, sich zu vermehren.

Versuchsablauf	Bemerkungen
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Besorge dir eine Agarplatte und teile sie auf der Unterseite in drei gleich große Felder ein. Beschrifte sie mit Datum und Versuch.</li> <li>2. Entscheide dich für drei Körperregionen deren Keimzahl du untersuchen willst.</li> <li>3. Feuchte ein steriles Wattestäbchen mit sterilem Wasser an (nicht tiefend nass machen!) und streiche über die entsprechenden Körperregionen.</li> <li>4. Berühre das entsprechende Drittel der Agarplatte mit dem beimpften Wattestäbchen und streiche in Zick-Zick-Linien über die Agaroberfläche ohne den Agar zu beschädigen (s. Skizze)</li> <li>5. Wiederhole die Prozedur (3 und 4) für die beiden anderen Proben.</li> <li>6. Anschließend verschließe die Petrischale und drehe sie auf den Kopf.</li> <li>7. Falls noch Zeit bleibt, dann berühre eine weitere Agarplatte mit drei verschiedenen Alltagsgegenständen, z.B. Geldschein, -stück, Stift, Handtuch, .... Verschließe und beschrifte diese Agarplatte.</li> <li>8. Bringe die fertig beschrifteten Agarplatten zum Brutschrank. Die Agarplatten werden dann von uns 24 Stunden bei 37°C bebrütet.</li> </ol>	



B) Hygieneregeln

<u>Material:</u>	sterile Wattestäbchen, Agarplatte
<u>Chemikalien:</u>	steriles Wasser

**Versuchsablauf**

1. Besorge dir eine Agarplatte und beschrifte sie am Rand mit Datum und Versuch. Zeichne auf der Rückseite mit dem Foliestift ein Kreuz, um die Platte in vier Bereiche einzuteilen.
2. Beschrifte die vier Bereiche mit den Versuchsteilen, die durchgeführt werden.
3. Führe vier Fingerabdrücke (vorsichtiges Berühren) in folgenden Zuständen durch:
  - ungewaschen
  - gewaschen, nicht getrocknet
  - abgetrocknet
  - anschließend desinfiziert
4. Bringe die fertig beschrifteten Agarplatten zum Brutschrank. Die Agarplatten werden dann von uns 24 Stunden bei 37 °C bebrütet.
5. Wasche dir nach dem Versuch die Hände!

**Auswertung:**

Besorge dir die schon bereitgestellten, bebrüteten Agarplatten der Vorgruppen dieses Versuches und verschließe sie, indem du den gesamten Rand mit Tesafilm umklebst.

**Leite aus deinen Ergebnissen für den Alltag nützliche und sinnvolle Hygieneregeln ab!**

---



---



---



---


**Fragen:**

Äußere dich kritisch zu folgendem Presseartikel, indem du deine Versuchsergebnisse mit einbeziehst!

## Presseinformation **GBF**



### Wenn Karies-Erreger tödlich werden

#### Forschungsprojekt soll Mundhöhlen-Streptokokken genau untersuchen

Bakterien vom Typ der so genannten Oralstreptokokken, die in der menschlichen Mundhöhle leben, lösen nicht nur Karies aus, sondern manchmal auch weitaus schlimmere Erkrankungen bis hin zur Herzklappenentzündung. Ein neues Forschungsprojekt, gefördert durch die Helmholtz-Gemeinschaft Deutscher Forschungszentren, wird diese Erreger jetzt genau unter die Lupe nehmen – und Ansätze für mögliche Gegenmaßnahmen entwickeln. An dem Vorhaben beteiligen sich drei wissenschaftliche Einrichtungen, koordiniert wird es von der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig.

Im Mund des Menschen leben mehrere hundert Arten von Bakterien. Gut zwei Dutzend von ihnen gehören zur Gattung Streptococcus, beispielsweise die Arten Streptococcus mutans und Streptococcus salivarius. Manche dieser Oralstreptokokken sind an der Bildung von Plaque und Karies an den Zähnen beteiligt – unangenehm, aber nicht wirklich gefährlich. Wenn sie jedoch in den Kreislauf eindringen, etwa durch Verletzungen, können diese Mikroorganismen zu einer Blutvergiftung (Sepsis) führen. Gelangen sie über die Blutbahn an andere Stellen des Körpers, verursachen die Keime manchmal Abszesse in Hals, Lunge und Leber, sogar lebensbedrohliche Herzklappenentzündungen.

#### Zähneputzen schützt die Herzklappe

Anlass zur Panik besteht dennoch nicht: Keineswegs jede Bakterien-Verunreinigung im Blut muss dramatische Folgen haben – nur in großer Anzahl und bei geschwächtem Immunsystem können sich Oralstreptokokken zur Bedrohung entwickeln. Doch Fachleute befürchten, dass ihre klinische Bedeutung in naher Zukunft zunehmen wird. Professor Singh Chhatwal, Streptokokken-Experte und Abteilungsleiter an der GBF, nennt dafür mehrere Ursachen: „Das liegt zum einen an unserer Lebensweise – zuckerreiche Ernährung begünstigt das Wachstum von Karies-Bakterien“, erklärt Chhatwal. Zum anderen ist es paradoxerweise gerade die gute zahnmedizinische Versorgung, die neue Risiken hervorbringt: „Eine große Zahl von zahnmedizinischen Eingriffen erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass kleine Wunden in der Mundhöhle entstehen, durch die Oralstreptokokken ins Blut gelangen können.“ Die gestiegene Lebenserwartung und damit verbundene Immunschwäche bei älteren Leuten erleichtert zudem die Umwandlung von harmlosen Kariesbakterien in gefährliche Krankheitserreger. Bei Kindern mit Leukämie werden Blutvergiftungen durch Kariesbakterien zunehmend häufiger beobachtet.

Die bedenklichste Entwicklung jedoch: „Streptokokken haben eine ausgeprägte Fähigkeit, Resistenzen zu entwickeln. Das heißt, sie werden unempfindlich gegen Antibiotika, unsere besten Waffen im Kampf gegen Bakterien“, warnt Chhatwal. „Und wir beobachten, dass Streptokokken ihre Gene für solche Resistenzen an andere Bakterien weitergeben – auch an noch gefährlichere Krankheitserreger.“ Deshalb halten Chhatwal und seine Forscherkollegen es für unverzichtbar, mehr über Oralstreptokokken zu erfahren. Bis man die Mechanismen besser versteht, die aus harmlosen Mundhöhlen-Bewohnern manchmal gefährliche Erreger machen, bleiben im Alltag nur bewährte Hausmittel für die Prophylaxe: „Zähne putzen und gesund leben“, empfiehlt Chhatwal, „denn gefährdet sind vor allem Personen mit schlechter Mundhygiene und schwachem Immunsystem.“

#### Fakten zum Forschungsprojekt

Das Projekt Oral streptococci: An emerging threat for human health hat zum Ziel, die Mechanismen der Pathogenität oraler Streptokokken zu untersuchen. Projektpartner sind die GBF, die Universität Kaiserslautern und das Klinikum der Universität Leipzig. Bildmaterial unter [www.gbf.de/presseinformationen](http://www.gbf.de/presseinformationen).



**Wachstum von Bakterien**

Die Vermehrung von Bakterien erfolgt über Zellteilung und damit grundlegend anders als bei mehrzelligen Organismen. Da eine einzelne Zellteilung vergleichsweise schnell abläuft, resultieren enorme Vermehrungsraten.

In diesem Versuch wird über eine Zeitdauer von mindestens vier Stunden das Bakterienwachstum verfolgt, indem man einerseits die gewachsenen Kolonien aus einer Verdünnungsreihe auszählt, andererseits die Trübung der Nährlösung mittels eines Photometers misst. Zum Schluss lässt sich eine verlässliche Aussage über die Vermehrungsrate von Bakterien treffen.

**Material:** Übernachtskultur von E. coli, Schikane Kolben, Schüttler, Flüssigmedium, Mikroliterpipetten, Eppendorfgefäße, Kulturmedium in Petrischalen, Folienstifte, Drygasliski-Spatel

Versuchsdauer: mindest. 4 Stunden!

**Versuchsablauf**

**Bemerkungen**

Ein Schikane Kolben mit 50ml Flüssigmedium wird mit 1,0ml einer Übernachtskultur von E. coli beimpft und bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

Alle 60 Minuten vorzubereiten:

4 Eppendorfgefäße mit: Beschriftung Probe  $10^{-2}$   $10^{-4}$   $10^{-5}$   $10^{-6}$   
Flüssigmedium (LB) s.u.

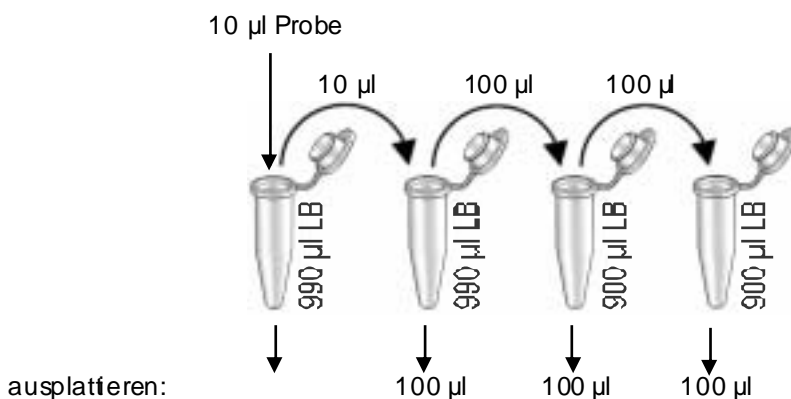
4 Agarplatten mit Beschriftung auf Unterseite:  
Versuch, Gruppe, Zeit (Minuten), Verdünnung, Datum

Zu Beginn des Versuches (0 Minuten) und dann alle 60 Minuten wird eine Probe der Flüssigkultur genommen.

*Die Probe muss sofort weiter verarbeitet werden!*

1. Übertragen Sie 10 µl der Probe in das erste Eppendorfgefäß und mischen Sie gründlich mit dem Vortexer oder per Hand.
2. Verdünnen Sie entsprechend des Schemas weiter. Nach jedem Schritt vermischen!
3. Von jedem Eppendorfgefäß 100 µl auf die entsprechende Petrischale ausplattieren und die Agarplatten zum Brutschrank bringen.
4. Parallel die Absorption der unverdünnten Probe messen. Dazu den nicht benötigten Rest der Probe in eine neue Küvette geben und in die Probenposition 3 des Photometers geben.
5. Die Platten werden bei 37 °C für 2-3 Tage inkubiert.

*Die Absorption ist direkt proportional zur Bakterienzahl. Bitte Betreuer zu Hilfe hden!*





**Auswertung:**

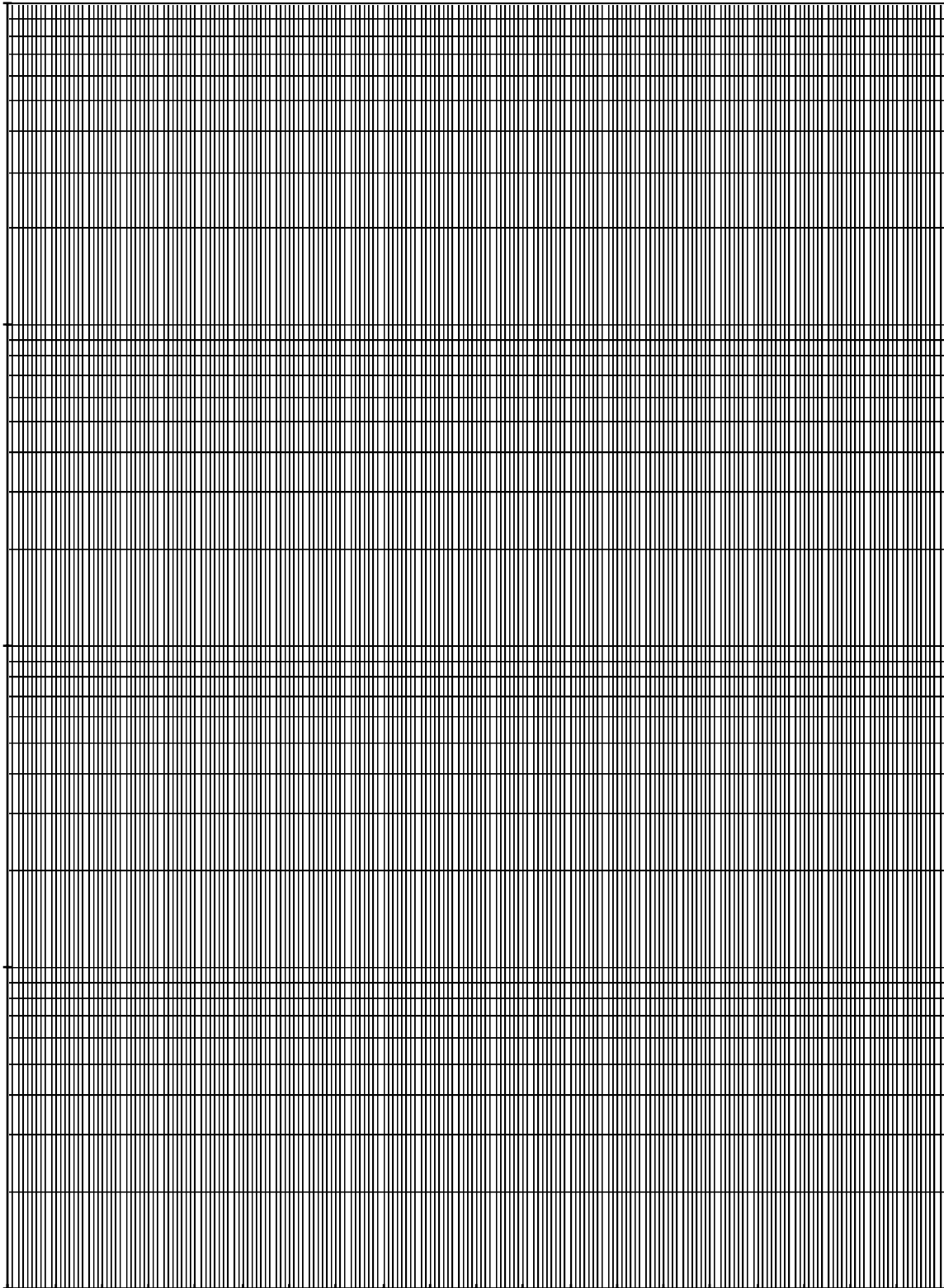
Holen Sie sich vom Materialtisch einen Stapel mit allen Agarplatten dieses Versuches einer Gruppe. Wählen Sie für jeden Zeitpunkt eine Petrischale mit einer sinnvollen Koloniedichte und zählen Sie sie aus.

1. Berechnen Sie die Bakteriendichten in der Flüssigkultur und stellen Sie die Ergebnisse in einem halblogarithmischen t/N-Diagramm dar. Benennen Sie einzelne Abschnitte!
  2. Tragen Sie im selben Diagramm mit einer zweiten y-Achse die Absorption ein!
  3. Bestimmen Sie die Generationszeit!
- 
- 

**Fragen:**

1. Wieso werden die Werte in einem halblogarithmischen Diagramm dargestellt?
2. Bakterien vermehren sich stets schrittweise durch Zweiteilung. Warum sind – selbst bei genauester Messung – nie Sprünge in der Koloniezahl zu beobachten?







## > Über das Gläserne Labor

Das Gläserne Labor wurde speziell für Schülerinnen und Schüler eingerichtet. Hier sollen sie zu bestimmten naturwissenschaftlichen Themen möglichst eigenständig, aber natürlich nach Anleitung, experimentieren und dabei entdecken, wie faszinierend naturwissenschaftliche Phänomene sind und Spaß haben an der Experimentier- und Forschertätigkeit.

Zusätzlich sollen die Schülerinnen und Schüler die GSF als Forschungseinrichtung kennen lernen und verstehen, wie Grundlagenforschung funktioniert und warum sie wichtig bzw. nötig ist. Je nach Thema werden aktuelle Forschungsprojekte der GSF vorgestellt.

Das GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit übernimmt als Mitglied der Helmholtz-Gemeinschaft Verantwortung für die Qualität der naturwissenschaftlich-technischen Bildung unserer Kinder.

Das Gläserne Labor dient als Institution, um dieser Anforderung durch unterrichtsergänzende Angebote gerecht zu werden.

Es wurde am GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit mit großzügiger finanzieller Unterstützung der Helmholtz-Gemeinschaft eingerichtet.

## > Weitere Informationen

Besuchen Sie uns im Internet. Dort finden sie aktuelle Informationen und das Anmeldeformular:

[www.gsf.de/gsf-lab](http://www.gsf.de/gsf-lab)

Bei Fragen stehen wir telefonisch unter 089. 3178 – 2725 zur Verfügung.

Auf ein baldiges Wiedersehen freut sich ihr Team vom Gläsernen Labor!

**Gläsernes Labor**  
**Abteilung Öffentlichkeitsarbeit**  
**GSF – Forschungszentrum**  
**für Umwelt und Gesundheit**  
**Ingolstädter Landstrasse 1**  
**85764 Neuherberg**