



ÜBUNGEN

BIOLOGIE DER PROKARYOTEN

Universität Ulm

Redaktion: PD Dr. Christian Riedel
Auflage: 2017

Behandelte Themenbereiche

- (I) Mikrobiologische Techniken und Beschreibung ausgewählter Mikroorganismen
- (II) Isolierung und Charakterisierung von Bakterien aus Lebensmitteln
- (III) Bakteriellles Wachstum

Zu diesen Themenbereichen werden insgesamt zwei mehrtägige Versuche durchgeführt.

Generelle Informationen

In den Übungen im Modul ‚Biologie der Prokaryoten‘ sollen grundlegende mikrobiologische Arbeitsweisen erlernt werden, die es ermöglichen, Bakterien, Pilze oder Hefen in Reinkulturen zu isolieren und diese zu erhalten und zu kultivieren. Neu isolierte Bakterien werden dann charakterisiert, um sie zum einen in der Bakteriensystematik einordnen zu können und zum anderen ihre Wachstumsansprüche und Stoffwechselleistungen kennen zu lernen. Zur Untersuchung von Stoffwechselprozessen ist es wichtig das Wachstum der Bakterien quantitativ zu erfassen.

Steriles Arbeiten in mikrobiologischen Labors

Mikrobiologisches Arbeiten erfordert, dass alle Instrumente (Erlenmeyer, Reagenzgläser, Pipetten, Petrischalen, Platinnadeln) nicht nur makroskopisch sauber, sondern auch steril sind, d. h. sie dürfen keine lebensfähigen Organismen enthalten. Das gilt ebenso für alle flüssigen und festen Nährmedien, in denen ein bestimmter Organismus wachsen soll, als auch für Lösungen und Medien, die zum Verdünnen oder für andere Manipulationen benötigt werden.

Die Sterilisation von Medien erfolgt in Autoklaven bei einem gesättigten Wasserdampfdruck von ca. 2 bar (121 °C). Wässrige Lösungen, die 20 Minuten dieser Temperatur ausgesetzt werden, sind steril, und selbst hartnäckige Sporenbildner überleben diese Behandlung nicht. Oftmals muss man die einzelnen Komponenten eines Mediums getrennt sterilisieren und anschließend nach dem Abkühlen zusammengeben. Das ist vor allem für Kohlenhydrate (z.B. Glucose) wichtig, die als Kohlenstoffquelle benutzt werden (Gefahr des Karamellisierens).

Sterile Gefäße sind gewöhnlich mit einem Zellstoffstopfen verschlossen, der Luft, aber nicht Mikroorganismen, ungehindert Zutreten lässt. Zum Schutz vor Feuchtigkeit wird darüber in der Regel eine Metallkappe gestülpt. Wenn Sie sterile Gefäße öffnen, berühren Sie nicht die sterile Seite des Stopfens bzw. legen ihn nicht ab. Lassen Sie die Gefäße nur möglichst kurze Zeit offen und vor allem flammen Sie den Gefäßrand nach dem Öffnen und vor dem Verschließen ab. Das macht man durch

kurzes Durchziehen des Gefäßrandes durch die Flamme eines Bunsenbrenners. Halten Sie das Gefäß nicht in die Flamme, Sie brauchen das Glas nicht zu schmelzen.

Trockene Gefäße wie leere Reagenzgläser, Erlenmeyer, Glaspipetten usw. werden durch zweistündiges Erhitzen im Trockenschrank auf 160 °C sterilisiert. Glaspipetten werden in Metallbüchsen sterilisiert. Wenn eine Glaspipette nicht mehrmals kurz hintereinander für die gleiche Lösung oder Bakteriensuspension benutzt wird, entfernen Sie sie sofort in eine Desinfektionslösung. Legen Sie sie auf keinen Fall auf den Arbeitstisch. Pipetten für unsterile Arbeiten gehören auf die Pipettenablage.

Alle Glasgeräte, die mit Bakterien in Berührung gekommen sind, müssen nach Benutzung autoklaviert werden.

Platinösen werden vor und nach Benutzung in der Bunsenbrennerflamme sterilisiert und im geeigneten Ständer so aufgestellt, dass die Öse nach oben zeigt. Lassen Sie in keinem Fall benutzte Ösen unsterilisiert auf dem Tisch liegen.

Während Ihrer Arbeit im Labor tragen Sie bitte immer einen Arbeitskittel der außerhalb des Labors nicht getragen wird. Essen und Trinken oder Aufbewahren von Speisen im Labor ist strikt zu vermeiden. Wenn Sie das Labor verlassen, waschen Sie sich bitte die Hände mit dem bereitstehenden Desinfektionsmittel (Papierhandtücher zum Trocknen der Hände benutzen!). Gründliche Reinigung der Laborbänke am Ende jedes Versuchstages ist absolut erforderlich. Beachten Sie die ausgehängten Sicherheitsvorschriften und Hygienepläne und verhalten Sie sich entsprechend der Sicherheitsbelehrung, die Sie vor Beginn der Arbeiten im Labor erhalten.

Protokollführung

Jeder Teilnehmer muss spätestens eine Woche, also am Freitag nach Ende des Praktikums ein Ergebnisprotokoll vorlegen. Darin sollen die Resultate der beiden Versuche in geeigneter Form, also Tabellen und Abbildungen mit wenigen verbindenden und zusammenfassenden Worten (keine einfache Aneinanderreihung von Tabellen und Abbildungen!!!), dargestellt werden. Sollte das Protokoll aufgrund von Mängeln nicht testiert werden, so kann es einmal überarbeitet und erneut vorgelegt werden (wiederum innerhalb von 7 Tagen).

VERSUCH I: Isolation und Identifikation von Bakterien aus Lebensmitteln

1. Herstellen einer Reinkultur

Wie in anderen naturwissenschaftlichen Fächern ist es auch in der Mikrobiologie wichtig, mit einem definierten Ausgangsmaterial zu arbeiten; eine Reinkultur, hervorgegangen aus einer einzigen Bakterienzelle, stellt hier den Standard dar. Zur Isolierung von Bakterien - meist aus einer Anreicherungskultur - wird eine Bakteriensuspension auf einer Agarplatte ausgestrichen, um die Bakterien zu vereinzeln.

Mit den erlernten mikrobiologischen Techniken sollen Sie aus Lebensmitteln eine Bakterienart in Reinkultur isolieren. Der Stamm soll dann charakterisiert werden, um eine taxonomische Einordnung zu ermöglichen.

2. Charakterisierung der Bakterien

Wenn man über die mehr oder weniger aufwendige Prozedur der Isolierung zu einer Reinkultur von Bakterien gelangt ist, sollte man wissen, um welches Bakterium es sich handelt. Dies ist z.B. in der Medizin besonders wichtig, um spezifisch den Krankheitserreger zu bekämpfen und nicht pauschal den größten Teil der Bakterienpopulation des tierischen oder menschlichen Körpers zu vernichten, in der Hoffnung, dass es auch den Krankheitserreger träge. In der Biotechnologie kann nur durch die Arbeiten mit Reinkultur eine gleichbleibende Qualität und Ausbeute des Produktes sichergestellt werden.

Zur Charakterisierung von Bakterien - vergleichbar der Bestimmung von Pflanzen oder Tieren - werden verschiedene Parameter bestimmt um mit Hilfe eines Bestimmungsschlüssels (z.B. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) die entsprechende Art sicher zu bestimmen. Am Anfang steht die mikroskopische Betrachtung der Bakterien bei der die Zellform zu erkennen ist: entweder sind die Zellen kugelförmig (Coccus), oder die Form entspricht einem geraden oder gekrümmten Zylinder (Stäbchen, Vibrio, Spirillum). Außerdem lassen sich mittels des Mikroskops die Zellgröße bestimmen sowie gegebenenfalls Beweglichkeit der Bakterien feststellen.

Der zweite Punkt im Zuge der Bestimmung ist die Gram-Färbung (seit 1884). Diese wurde vom dänischen Bakteriologen Hans Christian Gram (1853–1938) rein zufällig entdeckt. Vor der Zeit der Phasenkontrasteinrichtungen gab es nur Mikroskope mit Hellfeldbeleuchtung, und man versuchte, mit vielen verschiedenen Farbstoffen die Bakterien anzufärben. Alle Farbstoffe konnten aus den gefärbten Bakterien wieder ausgewaschen werden; der Farblack, der sich in der Gram-Färbung bildet, konnte jedoch nur aus einigen Bakterien mit Alkohol wieder entfernt werden. Das führte im Bakterienreich zur Unterteilung von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien. Dieser empirische Befund wurde später durch elektronenmikroskopische Betrachtung von Ultradünnschnitten der Bakterienzellen sowie durch Analyse der Zellwandbausteine bestätigt und gilt inzwischen als gutes taxonomisches Merkmal.

Form, Größe, Beweglichkeit der Bakterien sowie Gramreaktion und die Form und Farbe von Einzelkolonien auf Agarplatten stellen fast die gesamten "morphologischen" Merkmale von Bakterien dar; diese wenigen Charakteristika reichen noch nicht aus, um Bakterien einer Art zuzuordnen. Dazu ist auch noch die Charakterisierung stoffwechselphysiologischer Eigenschaften

notwendig. Hierfür wird die Verwertung verschiedener Energie- und Kohlenstoffquellen als Wachstumssubstrat durch die Bakterien bestimmt; weiterhin werden die Reduktion verschiedener Elektronenakzeptoren sowie das Vermögen der Bakterien, z.B. Kohlenhydrate zu vergären, getestet. Die Identifizierung der Gärprodukte erlaubt Rückschlüsse auf Stoffwechselwege. In den "api"-Tests zur schnellen Identifizierung von Bakterien sind dem Medium verschiedene typische Energie- und Kohlenstoffquellen sowie Farbindikatoren zugesetzt. Nach Abschluss des Bakterienwachstums gibt ein erfolgter oder nicht-erfolgter Farbumschlag im Test Auskunft über einige wichtige charakteristische Stoffwechseleigenschaften.

VERSUCH II: Wachstum von *E. coli*

Für Untersuchungen über den Stoffwechsel von Bakterien, z. B. Abbaurate von unliebsamen organischen Verbindungen, den Umsatz von bereitgestellten Substraten zu gewünschten Produkten oder für enzymatische Untersuchungen ist es wichtig, die Bakterienzahl oder Bakterienmasse zu erfassen. Hierzu gibt es verschiedene Methoden, von denen Sie einige im Praktikum kennen lernen und anwenden werden.

Tag 1 (13.03.2017)

<u>Versuch I</u> Isolation und Identifikation von Bakterien aus Lebensmitteln	<u>Versuch II</u> Wachstum von <i>E. coli</i>
Einführungsvorlesung, Sicherheitsbelehrung, Platzübergabe, Pipetten-Check	
Medienzubereitung, Autoklavieren	
Vorbesprechung	
<u>Grundtechniken:</u> Herstellen und Ausplattieren einer Verdünnungsreihe der Lebensmittel	

1. Allgemeine Vorbereitungen

Der erste Labortag soll Sie mit einigen Grundtechniken des aseptischen Arbeitens in der Mikrobiologie vertraut machen. Zu diesem Zweck isolieren Sie Bakterien aus Joghurt bzw. einer Babynahrung.

Für die gesamte Praktikumswoche sind folgende Medien und Materialien anzusetzen und zu autoklavieren:

750 ml MRS (de Man-Rogosa-Sharpe) Medium zur Isolierung von *Lactobacillus sp.* und *Bifidobacterium sp.*:

MRS-Pulver 55 g/l

L-Cystein 0.5 g/l (nur bei *Bifidobacterium sp.*)

in H₂O lösen (in einem 1000-ml-Becherglas), 11.25 g Agar (1.5 %) abwiegen und in eine 1 l Schottglas-Flasche überführen und gelöstes MRSC zugeben und autoklavieren (Rührfisch bei Agar immer in der Flasche lassen!). Nach dem Autoklavieren wird der Agar auf ca. 60 °C abgekühlt und anschließend in Petrischalen zu Agarplatten (etwa 25 ml/Petrischale) gegossen.

ODER (!!! für die Gruppen, die Streptokokken isolieren)

750 ml LM17 Medium zur Isolierung von *Streptococcus sp.*:

M17-Pulver 37.25 g/l

in H₂O lösen (in einem 1000-ml-Becherglas), 11.25 g Agar (1.5 %) abwiegen und in eine 1 l Schottglas-Flasche überführen und gelöstes M17 zugeben und autoklavieren (Rührfisch bei Agar immer in der Flasche lassen!).

Nach dem autoklavieren 5 g Lactose in 50 ml H₂O lösen und steril-filtrieren (ein steriles Falcon, wird gestellt) und davon 37.5 ml in den auf ca. 60 °C abgekühlten M17-Agar geben, kurz mischen und anschließend in Petrischalen zu Agarplatten gießen (etwa 25 ml/Petrischale).

ALLE GRUPPEN

500 ml LB (Luria-Bertani) für *Escherichia coli*:

Hefeextrakt 5 g/l
Trypton 10 g/l
NaCl 10 g/l

in H₂O lösen (in einem 1000-ml-Erlenmeyerkolben, wahlweise 1 l Schottglas-Flasche)

Den pH kontrollieren, er sollte bei 6.8 ± 0.2 liegen. Von diesem Medium je 5 ml in 2 große Reagenzgläser pipettieren. Mit Wattestopfen und Alukappen/-folie verschließen und autoklavieren. Den Rest des Mediums (490 ml) mit 7.35 g Agar (entspricht einer Endkonzentration von 1.5 % w/v) versetzen, autoklavieren und anschließend in Petrischalen zu Agarplatten gießen (etwa 25 ml/Petrischale).

200 ml Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS):

NaCl 8 g/l
KCl 0.2 g/l
KH₂PO₄ 0.24 g/l
Na₂HPO₄ 1.44 g/l

in 0.9 Vol. H₂O lösen und pH auf 7.4 ± 0.2 einstellen und anschließend auf das gewünschte Gesamtvolumen auffüllen. PBS wird in eine 500 ml Schottglas-Flasche umgefüllt und alles gemeinsam autoklaviert.

Zusätzlich müssen ca. 250 Eppendorfgefäße (offen) in einem Einweckglas mit Deckel sowie 5 Reagenzgläser mit Alukappen autoklaviert werden.

Da an den folgenden Tagen sterile Pipetten benötigt werden, sollen heute Pipetten in Alu-Büchsen zum Trockensterilisieren vorbereitet werden

ca. je 20-30 Pipetten 1 ml; 5 ml;
ca. je 10 Pipetten 10 ml.

MERKE:

- Vor sterilem Arbeiten Arbeitsplatz mit Desinfektionsmittel besprühen
- Agar nach Autoklavieren bei 60 °C im Wärmeschrank flüssig halten
- Petrischalen: Blasen im flüssigen Agar mit Bunsenbrennerflamme entfernen (Vorsicht: nicht das Plastikmaterial zum Schmelzen bringen!)
- Agarplatten nach Erstarren umdrehen und über Nacht bei Raumtemperatur trocknen lassen. Anschließend in der Originalverpackung (Plastiktüte) bei 4 °C aufbewahren.

AUFGABE: Überlegen Sie sich die Zahl der Agarplatten die Sie zur Durchführung des gesamten Praktikums von jedem Medium benötigen. Welche Menge PBS und wie viel Eppendorfgefäße benötigen sie im Verlauf des Praktikums für die Durchführung aller Versuche? Besprechen Sie die Ergebnisse Ihrer Überlegungen mit Ihrem/r Betreuer/in.

Versuch 1: Isolation einer Reinkultur von Lebensmittelbakterien

Um Bakterien aus z.B. einer Bodenprobe, einer Wasserprobe oder, wie hier im Praktikum, aus Lebensmitteln zu isolieren, müssen die Proben zunächst so aufgearbeitet, verdünnt und auf (Selektiv-)Agar ausplattiert werden, dass Einzelkolonien entstehen. Das Ausplattieren auf Agar, ggf. in Verdünnungsreihen, eignet sich ebenfalls um die Anzahl aller lebensfähigen Bakterien in einer Kultur (Lebendzellzahl), oder wie hier, in einem Lebensmittel zu bestimmen. Dies wird u.A. im Wachstumsversuch eingesetzt um die Lebendzellzahl zu bestimmen. Bei der Isolation von Bakterien aus einer Probe mit komplexer Mikroflora wird unter Umständen dem Wachstum auf Selektivmedium noch eine Anreicherungskultur in einem Medium vorgeschaltet, dass das Wachstum der gewünschten Bakterien begünstigt.

AUGFABE: Im Praktikum sollen aus Joghurt bzw. einer Babynahrung die folgenden Bakterien isoliert werden: *Lactobacillus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Bifidobacterium sp.*. Dabei konzentriert sich jede Praktikumsgruppe auf eine der Bakterien-Arten. Zur Isolation der Bakterien wird zunächst eine Verdünnungsreihe des Lebensmittels in PBS angelegt.

Für die Isolation von *Bifidobacterium sp.* wird die Babynahrung wie auf der Packung beschrieben aus dem Milchpulver hergestellt und anschließend 0.5 ml in 4.5 ml PBS (steril im Falcon) verdünnt (1. Verdünnungsstufe 1:10).

Für die Isolation von *Streptococcus sp.* und *Lactobacillus sp.* werden 0.5 g Joghurt in einem sterilen Falcon abgewogen und anschließend mit 4.5 ml PBS versetzt (1. Verdünnungsstufe 1:10). Die weiteren Verdünnungen erfolgen jeweils durch steriles Überführen von 100 µl der Suspension in 900 µl PBS (siehe Abb. 2). Dabei ist wichtig, dass die einzelnen Suspensionen immer gut homogenisiert werden (starkes Vortexen) bevor die nächste Verdünnung angelegt wird. Alle Lebensmittel werden bis zur Verdünnungsstufe 10^{-9} verdünnt.

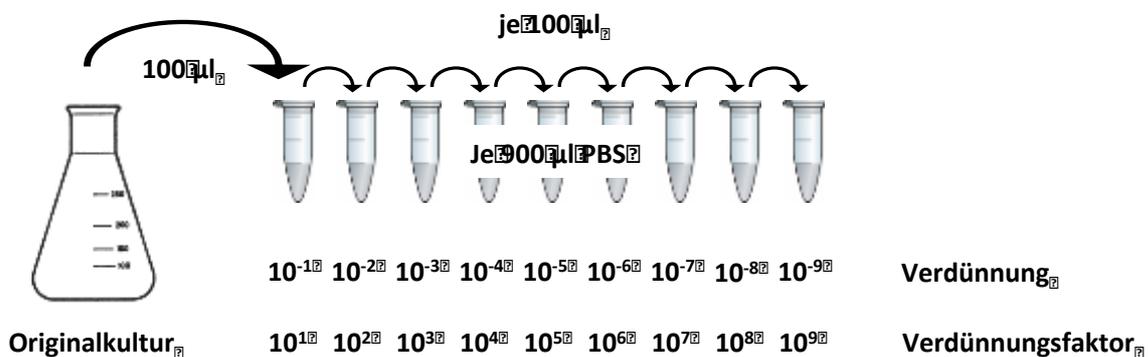


Abbildung 2: Schema nach dem eine bakterielle Kultur in mehreren aufeinanderfolgenden Stufen (jeweils 1:10) verdünnt wird.

Nach Anlegen der Verdünnungsreihe werden von jeder Verdünnungsstufe 100 µl auf Agarplatten ausplattiert (Doppelbestimmung!!! D.h. je Verdünnungsstufe 2 Agarplatten). Die Isolation von *Bifidobacterium sp.* erfolgt auf MRSC-Agar und Inkubation bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen. Diese werden hergestellt indem die Platten in einem Anaerobentopf gestellt, ein Anaerogen-Beutel dazugegeben und der Anaerobentopf luftdicht verschlossen wird. Zur Isolation von *Lactobacillus sp.* wird auf MRS-Agar ausplattiert aber bei 37 °C aerob inkubiert. *Streptococcus sp.* wird isoliert indem auf LM17-Agar ausplattiert und ebenfalls bei 37 °C aerob inkubiert wird.

Notizen:

Tag 2 (14.03.2017)

<u>Versuch I</u> Isolation und Identifikation von Bakterien aus Lebensmitteln	<u>Versuch II</u> Wachstum von <i>E. coli</i>
Vorbesprechung	
	Herstellung von Minimalmedium
<u>Grundtechniken:</u> Dreistrichmethode, Messung der optischen Dichte (Biomasse), Mikroskopieren und Auszählen einer <i>E. coli</i> -Kultur (Gesamtkeimzahl)	
<u>Isolation:</u> Auszählen der Verdünnungsreihe (Lebendkeimzahl)	
<u>Isolation:</u> Mikroskopieren und Überimpfen einer Einzelkolonie der Lebensmittelbakterien	
	Animpfen einer <i>E. coli</i> Kultur

150 ml Minimalmedium zur Kultivierung von *E. coli*:

Für das Minimalmedium werden zunächst sterile Einzellösungen hergestellt, um ein Ausfallen unlöslicher Salze während des Autoklavierens zu verhindern.

Lösung A:

1.5 g KH_2PO_4 in 45 ml dH_2O lösen, mit KOH auf pH 7.0 einstellen und auf 60 ml mit dH_2O auffüllen, in einem 500 ml Erlenmeyer-Kolben mit Schikanen überführen.

Lösung B:

230 mg Glucose (Monohydrat) in 60 ml dH_2O lösen und in einen 100 ml Becherglas füllen

Lösung C:

225 mg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 45 ml dH_2O lösen und in einen 100 ml Erlenmeyer-Kolben füllen

Lösung D (nur von einer Gruppe anzusetzen)

225 mg $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ und 75 mg $\text{FeCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ zusammen in 15 ml 30 mM H_2SO_4 lösen und in einen 100 ml Erlenmeyer-Kolben füllen

Lösung E:

Spurenelemente-Lösung SL 10 (wird gestellt)

H ₂ O	900 ml
25% HCl	10 ml
FeCl ₂ x 4 H ₂ O	1.5 g (0.97g FeCl ₂)
ZnCl ₂	70 mg
Mn Cl ₂ x 4 H ₂ O	100 mg (75 mg Mn Cl ₂)
H ₃ BO ₃	6 mg
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	190 mg
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	2 mg
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	24 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	36 mg
H ₂ O	ad 1000 ml, pH = 6.5

Lösungen A, C und D werden getrennt autoklaviert und Lösung B in ein Falcon steril-filtriert. Nach Sterilisation und Abkühlen wird das Medium durch sterile Zugabe der anderen Komponenten zum Phosphatpuffer (Lösung A) wie folgt hergestellt:

(Lösung A:	60	ml)
Lösung B:	45	ml
Lösung C:	45	ml
Lösung D:	0.12	ml
Lösung E:	0.225	ml

Vom fertigen Medium werden ca. 1-2 ml steril entnommen und der pH-Wert mit dem Indikatorpapier überprüft. Der pH sollte 7.0 ± 0.2 betragen. Bei deutlichen Abweichungen halten Sie bitte Rücksprache mit Ihren Betreuern.

Weitere 50 mL werden für die OD₆₀₀-Messungen während des Wachstumsversuches steril in ein Falcon überführt. Den Kolben mit Minimalmedium über Nacht im Kühlraum (4 °C) aufbewahren.

Grundtechniken

Dreistrichmethode

Mit dieser Methode vereinzeln Sie die Zellen, so dass Sie auf den Agarplatten nach Inkubation über Nacht im Brutraum Einzelkolonien erhalten werden. Diese Technik spielt eine wichtige Rolle um eine Reinkultur von Bakterien zu erhalten, im Falle des Praktikums nach Isolation aus Lebensmitteln.

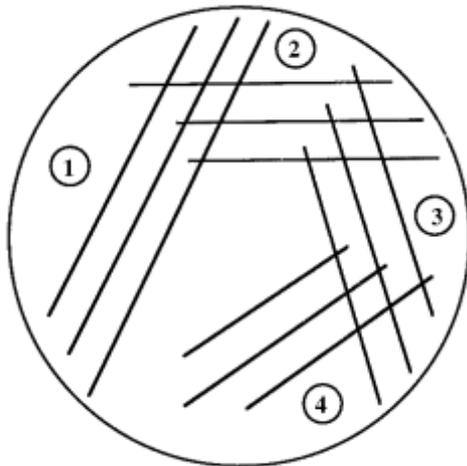


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Dreistrich-Methode für den Vereinzelausstrich von Bakterienkulturen oder -kolonien. Dabei werden die ersten 3 Striche nacheinander gezogen. Vor jedem weiteren Strichsatz (jeweils mit Zahlen markiert) wird die Impföse - nur diese - kurz ausgeglüht und nach dem Erkalten der nächste Strichsatz gezogen.

AUFGABE: Da sie diese Methode für die Isolation von Bakterien aus Lebensmitteln anwenden müssen, soll sie zunächst an einer zur Verfügung gestellten Platte mit *E. coli* ausprobiert werden. Von der bereitgestellten Platte mit dem *E. coli*-Stamm wird eine Einzelkolonie auf LB-Agar in einem Tropfen (50 µl) PBS (steril) suspendiert und die Suspension nach der Dreistrichmethode (Abb. 1) ausgestrichen und ebenfalls über Nacht bei 37 °C im Brutraum/Brutschrank bebrütet.

Bestimmung der Menge an Bakterien in einer Kultur

Zur mengenmäßigen Erfassung von Bakterienzahl und -masse gibt es verschiedene Methoden:

- Trübungsmessung (optische Dichte)
- Zellzählung: Gesamtzellzahl oder Lebendzellzahl
- Trockengewichtsbestimmung
- Proteinbestimmung

Verschieden Methoden der Trübungsmessung und Zellzählung werden Sie im Praktikum kennen lernen und anwenden.

Ein Verfahren zur schnellen Bestimmung der Biomasse in einer homogenen Kultur von Mikroorganismen ist die Messung der optischen Dichte. Bakterienzellen unterscheiden sich deutlich in ihrem Brechungsindex von dem des sie umgebenden wässrigen Mediums; aufgrund der dadurch hervorgerufenen Lichtstreuung sieht eine Bakterienkultur trüb aus. Die Trübung oder Lichtstreuung

kann im Photometer wie eine Absorption gemessen werden und wird dann als optische Dichte (OD) bezeichnet. Die OD kann bei verschiedenen Wellenlängen gemessen werden, im Praktikum erfolgt die Messung bei 600 nm (OD_{600}), da bei dieser Wellenlänge die meisten Bakterien keine Lichtabsorption besitzen. Bis zu einer bestimmten Zelldichte, bei der sich die Bakterienzellen gegenseitig zu beschatten beginnen, ist die Trübung proportional zur Zellzahl. Dies gilt bis zu einem Wert von maximal $OD_{600} = 0.3$. Dichtere Suspensionen müssen entsprechend mit Wasser oder Medium verdünnt werden, um exakte Messungen zu ermöglichen. Der Nullabgleich des Photometers erfolgt gegen frisches, unbeimpftes Medium; der Nullabgleich für verdünnten Proben erfolgt mit entsprechend verdünntem Medium, falls mit Wasser verdünnt wurde. Achten Sie darauf, dass Ihre Probe etwa Raumtemperatur hat: Kondenswasser auf der Küvette verfälscht Ihre Messung.

Eine Methode zur Quantifizierung aller Bakterienzellen in einer Kultur (Gesamtzellzahl) ist die Auszählung mit Hilfe einer Zählkammer. Hierbei werden die Zellen in einem definierten Volumen gezählt. Meist ist es nötig, die Ausgangskultur in mehreren Stufen zu verdünnen (siehe Abb. 2), damit die einzelnen Zellen überhaupt gezählt werden können.

Für die Verdünnung muss die Kultur zunächst aufgeschüttelt werden, damit die Zellen homogen verteilt sind. Das gleiche gilt für die Verdünnungsschritte: es ist immer auf homogene Suspension zu achten da Bakterien mit der Zeit sedimentieren. Eine geeignete Verdünnung wird dann in der Zählkammer (Abb. 3) unter dem Mikroskop ausgezählt. Von der Zählkammer sind sowohl die auszählende Fläche als auch die Tiefe (Distanz zwischen Boden der Kammer und Deckelglas) bekannt. Damit kann das Volumen berechnet werden, letztlich ergibt sich daraus dann unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Anzahl an Bakterienzellen pro ml Kultur.

A?

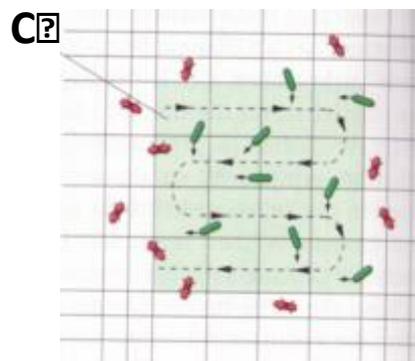
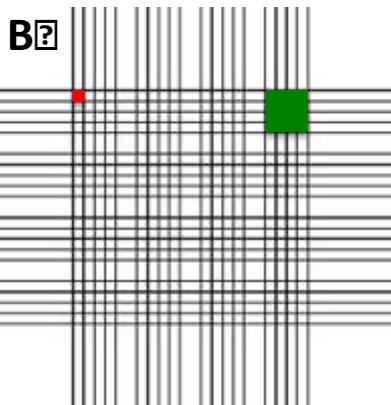
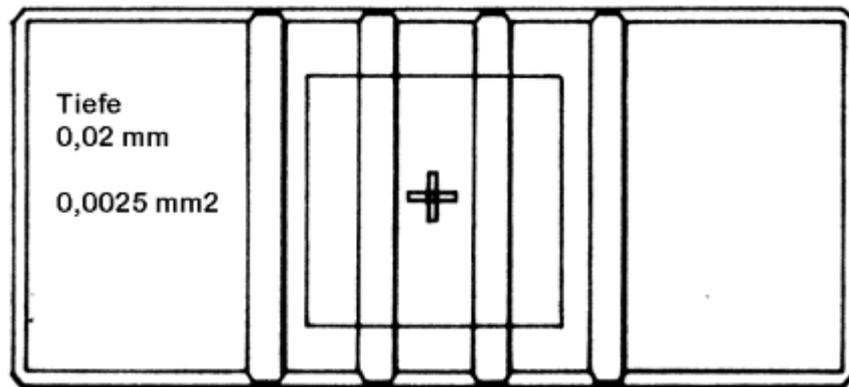


Abbildung 3: Gesamtansicht (A) und Detailansicht des Gitternetzes (B) einer typischen Zählkammer mit Kleinquadraten (rot) und Großquadraten (grün). Auf der Zählkammer sind die Tiefe sowie die Fläche eines Großquadrates im Gitternetz angegeben. Die Auszählung der Bakterien in einem Großquadrat erfolgt wie in (C) dargestellt.

AUFGABE: Erstellen sie eine Verdünnungsreihe der bereitgestellten *E. coli*-Kultur und bestimmen Sie die Gesamtzellzahl in der unverdünnten Kultur. Die Verdünnungen können unsteril durchgeführt werden. Für die Zählung müssen die Bakterien unbeweglich sein und daher notfalls mit 1/3 Volumen Formaldehydlösung (2 % v/v) abgetötet werden (Vorsicht: dann in den Verdünnungsfaktor einrechnen).

BITTE BEACHTEN:

- Zählkammer nicht auf die nackte Laborbank legen, sondern auf eine Papierunterlage
- das beiliegende Deckglas benutzen (es ist plan geschliffen und sorgt daher für die exakte Tiefe des Zählvolumens)
- das Deckglas an den Stegen fest auf die Zählkammer drücken, damit der definierte Abstand zwischen Deckglas und Zählkammer erreicht wird (Vorsicht: geschliffene Deckgläser sind teuer!)

- wenn keine Strömungen mehr in der Zellsuspension unter dem Deckglas erfolgen, werden die Bakterien gezählt; von den 4 Quadratseiten werden nur die Bakterien, die auf zwei der Seitenlinien liegen, mitgezählt; vorher definieren, auf welchen beiden Seitenlinien die Zellen gezählt oder nicht gezählt werden sollen
- insgesamt 16 Großquadrate zählen, damit statistische Verteilungsschwankungen ausgeglichen werden; dabei immer nur die 4 Großquadrate in den Ecken und in der Mitte zählen, dann die Kammer reinigen und einen zweiten Tropfen der Kultur aufbringen und auszählen.

Versuch 1: Isolation einer Reinkultur von Lebensmittelbakterien

AUFGABE: Berechnen Sie mit den anhand der Koloniezahlen, der Verdünnungsstufe sowie der eingesetzten Menge an Joghurt bzw. Babynahrung die Lebendkeimzahl in koloniebildenden Einheiten pro g (KBE/g). Legen sie hierfür eine Tabelle an (siehe unten).

Besprechen Sie mit Ihrem mit Ihrem/r Betreuer/in welche Verdünnungsstufen für diese Auswertung sinnvollerweise herangezogen werden können?

Mustertabelle 1: Lebendkeimzahl

Verdünnung	Koloniezahl			Lebendkeimzahl pro ml
	Platte 1	Platte 2	Mittelwert	
10^0				
10^{-1}				
10^{-2}				
10^{-3}				
10^{-4}				
10^{-5}				
10^{-6}				
10^{-7}				
10^{-8}				
10^{-9}				

AUFGABE: Um eine Reinkultur der aus den Lebensmitteln isolierten Bakterien zu erhalten müssen Sie eine gut sichtbare Einzelkolonie von einer der Platten der Verdünnungsreihe weiter bearbeiten. Dabei soll zunächst ein Teil der Kolonie steril abgenommen, auf einem Objektträger übertragen und die Morphologie der Bakterienzellen im Mikroskop untersucht werden.

Besprechen Sie mit Ihrem/r Betreuer/in welche Morphologie für die von Ihnen zu isolierenden Bakterien zu erwarten ist.

Weisen die Bakterienzellen der Kolonie die richtige Morphologie auf, so wird ein weiterer Teil der selben Kolonie mit der sterilen, abgekühlten Impföse abgenommen und in einem Tropfen PBS (steril!!!!) in einem Eppendorfgefäß (steril!!!!) suspendiert. Streichen Sie diese Bakteriensuspension nach oben beschriebener Dreistrichmethode aus und bebrüten die Agarplatten bei 37 °C je nach Bakterien-Art aerob oder anaerob (siehe oben).

Versuch 2: Wachstum von *E. coli*

Für den Wachstumsversuch am folgenden Tag müssen Sie heute die Vorkulturen animpfen. Hierfür impfen sie 5 ml Minimal-Medium und 5 ml LB-Medium (als Sicherheit) in separaten Reagenzgläsern mit je einer Einzelkolonie des *E. coli*-Stammes von der zur Verfügung gestellten Agarplatte an. Diese Kulturen werden bei 37 °C auf dem Schüttler über Nacht inkubiert.

Desweiteren wird der Kolben mit Minimalmedium für den Wachstumsversuch am folgenden Tag über Nacht bei 37 °C im Inkubator temperiert.

Tag 3 (15.03.2017)

<u>Versuch I</u> Isolation und Identifikation von Bakterien aus Lebensmitteln	<u>Versuch II</u> Wachstum von <i>E. coli</i>
Vorbesprechung	
<u>Isolation</u> : Mikroskopieren und Überimpfen einer Einzelkolonie der Lebensmittelbakterien	
	Animpfen der <i>E. coli</i> -Hauptkultur für den Wachstumsversuch
	<u>Wachstum</u> : Messung der optischen Dichte während des Wachstums (Zeitpunkte t = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 h)
	<u>Wachstum</u> : Bestimmung der Gesamt- und Lebendkeimzahl (Zeitpunkte t = 0, 2, 4, 6 h)
	<u>Substratverbrauch</u> : Probennahme für die Glucose-Bestimmung (Zeitpunkte t = 0, 4, 8 h)

Versuch 1: Isolation einer Reinkultur von Lebensmittelbakterien

AUFGABE: Wiederholen Sie die Prozedur zur Isolation einer Reinkultur Lebensmittelbakterien indem Sie eine sichtbare Einzelkolonie von einer der Platten vom Vortag steril abnehmen, im Mikroskop auf die Morphologie untersuchen und plattieren sie nach der selben Prozedur wie oben beschrieben (siehe Tag 2).

Versuch 2: Wachstum von *E. coli*

Im Hauptteil des 2. Versuchs soll das aerobe Wachstum von *E. coli* in statischer Kultur mit einer wachstumsbegrenzenden Menge Glucose als Substrat quantitativ erfasst werden; bis auf die Glucose als Kohlenstoff- und Energiequelle sind alle Nährsalze im Überschuss vorhanden; für eine ausreichende Sauerstoffversorgung müssen die Kulturen intensiv geschüttelt werden.

AUFGABE: Für den Wachstumsversuch wird der Kolben mit 3 ml der Übernachtskultur in Minimalmedium angeimpft.

Es werden folgende Parameter bestimmt:

- Biomasse über die Trübung (OD_{600}), über den gesamten Verlauf des Versuches in stündlichen Abständen (Zeitpunkte $t = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8$ und 24 h)
- Gesamt- und Lebendzellzahl (Zeitpunkte $t = 0, 2, 4, 6$ und 24 h)
- Konzentration des Substrates (Glucose; Zeitpunkte $t = 0, 4, 8$ und 24 h)

Dazu entnehmen Sie zum jeweiligen Zeitpunkt je 2 ml Probe zur Bestimmung der OD_{600} und je nach Zeitpunkt 1 ml für die Glucose-Messung oder zur Bestimmung von Gesamt- und Lebendzellzahl. Die Kultur muss nach der Probennahme unverzüglich wieder auf den Schüttler zurückgestellt werden.

Die Proben zur Gesamt- und Lebendzellzahl werden sofort und bis zur weiteren Verarbeitung ins Eisbad gestellt um den Stoffwechsel und damit weitere Teilungen zu stoppen.

Die Messung der OD_{600} erfolgt direkt nach Probennahme in der unverdünnten Kultur (frühe Zeitpunkte) oder in geeigneten Verdünnungen (spätere Zeitpunkte). Achtung: Nullabgleich mit Medium oder entsprechender Verdünnung.

Für die Glucose-Messung werden die Proben in einem Eppendorfgefäß zentrifugiert (Tischzentrifuge, 5 min, volle Geschwindigkeit) um die Bakterien zu sedimentieren und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und eingefroren.

Um die Gesamt- und Lebendkeimzahl zu den angegebenen Zeitpunkten zu bestimmen wird zunächst eine Verdünnungsreihe in (sterilem) PBS wie in Abb. 2 beschrieben erstellt. Von jeder Verdünnung werden dann je 3 Spots à $10 \mu\text{l}$ nach dem in Abb. 4 gezeigten Schema ausplattiert. Wichtig ist dabei, dass die Oberfläche des Agars ausreichend abgetrocknet ist um ein möglichst schnelles Abtrocknen der Spots zu gewährleisten und damit ein Verlaufen zu verhindern.

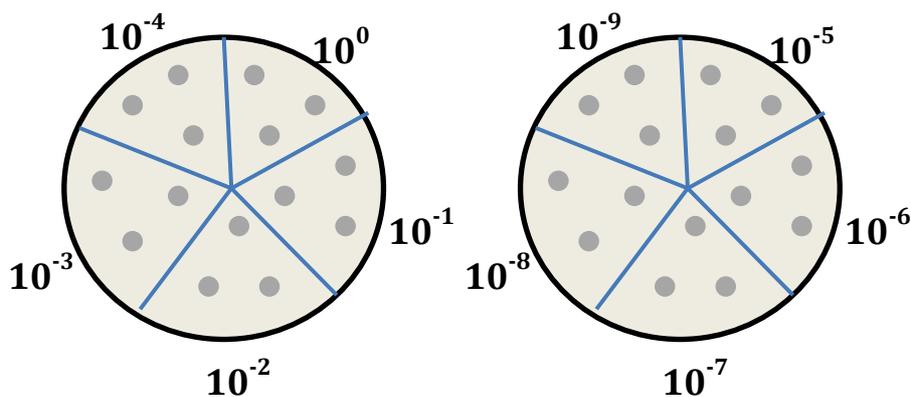


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Spotplating-Methode zur Bestimmung von Lebendzellzahlen in Bakterienkulturen. Jede Platte wird in 5 Sektoren eingeteilt. In jedem Sektor werden 3 Spots à $10 \mu\text{l}$ einer Verdünnungsstufe aufgetragen. Nach Abtrocknen der Spots können die Platten unter den entsprechenden Bedingungen inkubiert werden (Vorsicht: auf den Kopf drehen)

Bereits während des Wachstumsversuchs werden die gemessenen Werte in Tabellen eingetragen; Anhand der OD₆₀₀-Werte wird die Wachstumskurve auf halblogarithmischem Papier (3 Dekaden) gezeichnet. Bitte tragen Sie sowohl Zellzahl pro ml als auch OD₆₀₀ ein.

Mustertabelle 2: OD₆₀₀-Messung

Uhrzeit	Zeit (h)	OD ₆₀₀ (verdünnt)			Verdünnung	OD ₆₀₀ (unverdünnt)
		Messung 1	Messung 2	Mittelwert		

Mustertabelle 3: Gesamtkeimzahl

Uhrzeit	Zeit (h)	Zellzahl pro Großquadrat (Mittelwert aus 16 GQ)	Verdünnung	Gesamtkeimzahl [ml ⁻¹]

Notizen:

Tag 4 (16.03.2017)

<u>Versuch I</u> Isolation und Identifikation von Bakterien aus Lebensmitteln	<u>Versuch II</u> Wachstum von <i>E. coli</i>
Vorbesprechung	
	<u>Wachstum:</u> Messung der optischen Dichte (Zeitpunkt t = 24 h)
	<u>Substratverbrauch:</u> Probennahme zur Glucose- Bestimmung (Zeitpunkt t = 24 h)
<u>Identifikation:</u> Mikroskopieren (Vergl. mit <i>E. coli</i> und <i>P. fluorescens</i> und <i>B. subtilis</i>)	
<u>Identifikation:</u> Gram-Färbung (Identifikation; Vergl. mit <i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i>)	
<u>Identifikation:</u> Katalase-Test (Vergl. mit <i>E. coli</i> und <i>P. fluorescens</i> und <i>B. subtilis</i>)	
<u>Identifikation:</u> Oxidase-Test (Vergl. mit <i>E. coli</i> und <i>P. fluorescens</i>)	
<u>Identifikation:</u> Animpfen der api-Teststreifen	
	<u>Sterilisationsverfahren:</u> Gesamt- und Lebendkeimzahl vor und nach Ethanolbehandlung, Autoklavieren, Filtersterilisieren, Hitze (Zeitpunkt t = 24 h)
	<u>Substratverbrauch:</u> Auswertung der Proben zur Glucose-Bestimmung: Erstellen einer geeigneten Verdünnung der Proben, Kalibriergerade, Messung

Versuch 1: Isolation einer Reinkultur von Lebensmittelbakterien

Heute sollen Sie die morphologischen Merkmale der drei Mikroorganismen *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* sowie des von Ihnen aus einem Lebensmittel isolierten Bakteriums bestimmen, soweit sie im mikroskopischen Bild zu erkennen sind. Zusätzlich wird der aus dem Lebensmittel isolierte Organismus mittels Gram-Färbung, Katalase- und Oxidase-Test untersucht und mit Referenzstämmen verglichen.

AUFGABEN:

1. Mikroskopieren

Eigenbeweglichkeit der Bakterien lässt sich von Brown'scher Molekularbewegung unterscheiden, indem die Bakterien durch Zusatz von Formaldehyd (2 %) abgetötet werden. Die Größe der Bakterienzellen wird mittels eines Okularmikrometers bestimmt (bei zeitlichen Engpässen auch am folgenden Tagen).

2. Gram-Färbung

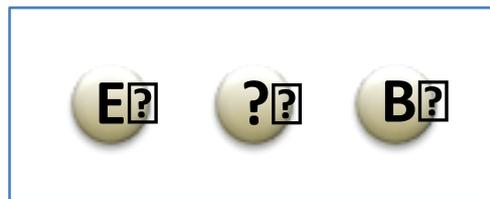
Die Gram-Färbung dient zur Unterscheidung von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien, die sich durch verschieden dicke Zellwände und eine äußere Membran unterscheiden. Hierauf beruht das unterschiedlich starke Zurückhalten des bei der Gram-Färbung ausgebildeten Farblackes im Zellsacculus, der sich bei Gram-negativen Bakterien mit Alkohol wieder heraus waschen lässt, nicht jedoch bei Gram-positiven Bakterien.

Als Referenzen für die Gram-Färbung dienen

Escherichia coli Gram-negativ

Bacillus subtilis Gram-positiv

1. Auf einem Objektträger je eine Kolonie der beiden Referenzstämme und des Eigenisolates in einem Eppendorfgefäß in 100 µl PBS suspendieren und einen Tropfen auftragen. Position markieren oder merken (Filzstiftbeschriftung löst sich in Ethanol!)



2. Kulturtropfen lufttrocknen und anschließend hitzefixieren. Dabei Objektträger mit Pinzette/Holzzange halten und mehrfach durch die Flamme des Bunsenbrenners ziehen
3. mit Kristallviolettlösung überschichten und 3 min färben
4. mit Lugol'scher Lösung ($KJ \times J_2$) die Kristallviolettlösung abwaschen und zur Ausbildung des Farblackes 1 min einwirken lassen
5. anschließend Flüssigkeit abkippen und mit Ethanol (96 %) entfärben, bis keine blaue Farbe mehr abgeht
6. mit A. dest. abspülen und mit Safraninlösung (0,5 %) überschichten und 1 min gegenfärben
7. anschließend vorsichtig mit Wasser abspülen.

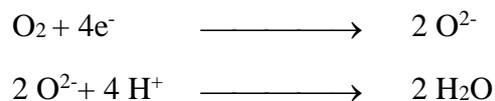
Zum Mikroskopieren ohne Deckglas die Objektive 40× oder 100× einsetzen (letzteres nur mit Immersionsöl).

3. Katalase-Test

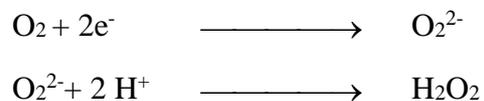
Sauerstoff ist der terminale Elektronen-Akzeptor der aeroben Atmung und somit für alle aeroben Organismen lebensnotwendig. Gleichzeitig haben aber einige reduzierte Produkte des Sauerstoffs eine giftige Wirkung für die Zelle. Alle aeroben und fakultativ anaeroben Organismen verfügen deshalb über Enzyme, die eine Schutzwirkung gegenüber diesen Zellgiften haben.

In der Zelle kann molekularer Sauerstoff auf drei Arten aktiviert werden:

1. Gleichzeitige Übertragung von vier Elektronen durch Cytochromoxidase; bei dieser Reaktion entstehen keine toxischen Verbindungen:



2. Gleichzeitige Übertragung von zwei Elektronen durch einige flavinhaltige Enzyme; dabei entsteht Wasserstoffperoxid, ein starkes Zellgift:



Wasserstoffperoxid wird dann von Katalasen in Wasser und molekularen Sauerstoff gespalten:



3. Übertragung eines einzelnen Elektrons durch viele Oxidasen; es wird das sehr reaktionsfähige Superoxidradikal gebildet, das mit anderen Verbindungen in der Zelle reagiert:



Eine Schutzwirkung gegenüber den Superoxidradikalen übt die Superoxid-Dismutase aus, die O_2^- in Wasserstoffperoxid und molekularen Sauerstoff überführt.

Alle aeroben und fakultativ anaeroben Organismen verfügen über Katalase. Katalase-Aktivität lässt sich einfach nachweisen: Kommt es in einer mit einem Tropfen 3 % H_2O_2 behandelten Bakterienkolonie zu einer heftigen Gasbildung, ist Katalase vorhanden.

Der Katalase-Test wird mit dem Isolat sowie als Referenzen *E. coli*, *P. fluorescens* und *B. subtilis* durchgeführt. Für den Katalase-Test werden je eine Einzelkolonie quantitativ auf einen Objektträger aufgebracht (analog des Schemas für die Gram-Färbung), mit 1 Tropfen 3 % H_2O_2 -Lösung überschichtet und die Gasbildung beobachtet.

4. Oxidase-Test

Beim oxidativen Stoffwechsel erfolgt der Elektronentransport über eine membrangebundene Elektronentransportkette. Verschiedene obligat oder fakultativ aerobe Bakterien unterscheiden sich im Aufbau dieser Transportkette durch das Fehlen oder Vorhandensein von Cytochrom c, was ein weiteres taxonomisches Merkmal darstellt. Das Vorhandensein von Cytochrom c wird im Oxidase-Test geprüft; der Farbstoff TMPD (1 % Tetramethylparaphenylendiamin in H₂O) kann von Cytochrom c oxidiert und somit in seine farbige Form überführt werden.

Für den Oxidase-Test wird eine Einzelkolonie der zu untersuchenden Bakterienstämme mit der Platinöse von der Agarplatte abgenommen, 10 s an der Luft getrocknet und mehrfach (10 ×) auf einen mit Farbstoff getränkten Filterpapierstreifen (in leerer Petrischale) getupft. Eine Verfärbung nach Blau-Purpur zeigt eine positive Reaktion an. Der Oxidase-Test wird mit dem Isolat sowie als Referenzen *E. coli* und *P. fluorescens* durchgeführt.

Zur Auswertung werden alle Beobachtungen in eine Tabelle eingetragen.

Mustertabelle

Organismus	Form	Größe	Beweglichkeit	Gram-Färbung	Katalase-Test	Oxidase-Test

5. Identifizierung des Isolates mit api-Teststreifen

Zur abschließenden Identifikation wird mit jedem isolierten Bakterien-Stamm ein api-Test durchgeführt. Je nach vermuteter Bakterienart kommt dabei entweder der Rapid ID32 A (*Bifidobacterium sp.*), Rapid ID32 STREP (*Streptococcus sp.*) oder der Api 50 CHL (*Lactobacillus sp.*) zum Einsatz.

Das Prinzip der api Test-Streifen ist die Analyse, ob der untersuchte Keim in der Lage ist eine Reihe von biochemischen Reaktionen zu katalysieren. Die api Streifen besteht aus mehreren Mikroröhrchen, in denen sich verschiedene Substrate in dehydratisierter Form befinden. Die

Röhrchen werden mit der Bakteriensuspension beimpft, welche die Substrate löst. Die biochemischen Reaktionen können anhand von Farbumschlägen abgelesen werden, die entweder während der Inkubation oder nach Zugabe der Reagenzien entstehen.

Für den Test wird jeweils eine mittelgroße Kolonie von einer frischen Agarplatte (24-48 h bebrütet) in NaCl-Lösung (im Test mitgeliefert) bzw. dem mitgelieferten Suspensionsmedium suspendiert (für die ungefähre OD₆₀₀ bitte Packungsbeilage beachten). Mit dieser Bakteriensuspension werden die Test-Streifen beimpft, ggf. mit Mineralöl überschichtet und unter den geeigneten Bedingungen (siehe Packungsbeilage) inkubiert.

Versuch 2: Wachstum von *E. coli*

AUFGABEN:

Messung der OD₆₀₀ zum Zeitpunkt t = 24 h.

Probennahme für die Glucose-Bestimmung zum Zeitpunkt t = 24 h.

Bestimmung der Gesamt- und Lebendkeimzahl zum Zeitpunkt t = 24 h.

Auswertung der Platten zur Lebendkeimzahl vom Vortag.

Mit dem Rest der Kultur aus dem Wachstumsversuch werden verschieden Sterilisationsverfahren getestet (Ethanol-Behandlung, Autoklavieren, Sterilfiltration, Pasteurisierung).

Sterilisationsmethoden

Die häufigsten Sterilisationsverfahren haben Sie bereits kennen gelernt: Autoklavieren bei 120 °C im Wasserdampf und Trockensterilisation. Lösungen, die thermolabile Substanzen enthalten, werden durch Filtration sterilisiert. Für kleinere Mengen werden Oberflächenfilter benutzt, die Partikel auf der Oberfläche zurückhalten. Filter, die Bakterien zurückhalten sollen, haben eine Porengröße von 0,2 µm. Da Oberflächenfilter relativ schnell verstopfen, werden für großtechnische Zwecke Tiefenfilter benutzt. Einen einfachen Tiefenfilter kennen Sie bereits, nämlich die Watte, mit der Ihre Kulturgefäße verschlossen werden. Weitere Materialien für Tiefenfilter sind: Keramik, Teflon oder gesintertes Glas. Die zu sterilisierenden Flüssigkeiten oder Gase strömen über eine längere Strecke durch das Filtermaterial, dessen feine Poren Bakterienzellen zurückhalten.

Autoklavieren ist eine Sterilisationsmethode, d.h. in der Regel werden alle lebensfähigen Keime abgetötet. Methoden der Teilentkeimung sind: Sterilfiltration, das Pasteurisieren (Erhitzen einer Lösung auf 75 °C für 15 Minuten) und die Teilentkeimung durch Alkohol. Bei teilentkeimenden Methoden werden lediglich die vegetativen Zellen der Bakterien abgetötet, Dauerformen werden nicht inaktiviert.

AUFGABEN:

1. Teilentkeimung mit Alkohol:

Nehmen sie 0,5 ml der *E. coli*-Kultur ab, versetzen diese in einem sterilen Eppendorf-Gefäß mit 1 ml 98 % Ethanol (Ethanolkonzentration nach Mischen ca. 65 % (v/v)) und inkubieren für 15 min bei Raumtemperatur; dabei wird alle 5 min geschüttelt. Nach dieser Inkubation wird eine Verdünnungsreihe in PBS angelegt und nach dem Spotplating-Verfahren (Abb. 4) auf LB-Agar ausplattiert.

2. Sterilfiltration

1,5 ml der *E. coli*-Kultur werden durch einen Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm) in ein steriles Eppendorfgefäß filtrieren. Anschließend wird eine Verdünnungsreihe erstellt und mittels Spotplating ausplattiert.

3. Pasteurisieren

Von der *E. coli*-Kultur werden 0.5 ml Kultur in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und 15 min bei 75 °C im Heizblock inkubiert. Zur Kontrolle der Temperatursgleichzeit wird ein Röhrchen mit 0,5 ml Wasser (unsteril) und Thermometer mitgeführt. Von der pasteurisierten Bakteriensuspension wird wiederum eine Verdünnungsreihe hergestellt und mittels Spotplating ausplattiert.

4. Autoklavieren

Der Rest der *E. coli*-Kultur wird im Kolben autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wird wiederum eine Verdünnungsreihe hergestellt und der Spotplating-Methode ausplattiert.

Glucose-Bestimmung

Die Bestimmung der Glucose erfolgt durch einen gekoppelten enzymatischen Test mit Hexokinase und Glucose-6-Phosphat 1-Oxidoreduktase (Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase). Die Reaktionen verlaufen nach folgenden Gleichungen:

1. D-Glucose + ATP → D-Glucose-6-Phosphat + ADP
2. D-Glucose-6-Phosphat + NADP⁺ → D-Glucono-1,5-Lacton-6-Phosphat + NADPH/H⁺
3. D-Glucono-1,5-Lacton-6-Phosphat → 6-Phosphogluconat (spontan)

Die erste Reaktion wird durch die Hexokinase (EC 2.7.1.1) katalysiert und ist unspezifisch. Das Enzym Hexokinase setzt neben Glucose auch andere Hexosen um. Die zweite Reaktion wird durch die Glucose-6-Phosphat-1-Oxidoreduktase (EC 1.1.1.49) katalysiert und ist spezifisch, so dass Glucose auch in Zuckermischungen spezifisch quantifiziert werden kann. Die Bildung des reduzierten Nukleotids (NADPH + H⁺) ist die Messgröße, die bei 365 nm im Photometer bestimmt

wird. Das Produkt der Reaktion der Glucose-6-Phosphat-1-Oxidoreduktase (D-Glucono-1,5-Lacton-6-Phosphat) wird anschließend spontan zu 6-Phosphogluconat umgesetzt. Die Reaktionsgleichgewichte aller Reaktionen liegen auf der rechten Seite; die Reaktionen verlaufen also vollständig.

AUFGABE:

Die folgenden Lösungen werden für die Glucose-Bestimmung benötigt:

- (1) Hexokinase/Glucose-6-Phosphat 1-Oxidoreduktase (340 U HK/ml und 170 U G6P-OR/ml; Roche Kat#127825), Lagerung auf Eis
- (2) 100 mM ATP-Stammlösung: 60 mg Adenosin-5'-Triphosphat Dinatriumsalz (ATP-Na₂; Roche Kat#127523) in 1 ml demineralisiertem Wasser, Lagerung auf Eis, M_r=605,2; Haltbarkeit bei -20 °C ca. vier Wochen
- (3) 40 mM Magnesiumsulfat Heptahydrat (MgSO₄ x 7H₂O; Fluka Kat#00627; M_r=246,48 g/mol) in 50 ml demineralisiertem Wasser
- (4) 12,7 mM NADP⁺-Stammlösung (Nikotinamidadenin-Dinukleotid Dinatriumsalz; Roche Kat#128031; M_r=787,4 g/mol): 10 mg NADP⁺ in 1 ml demineralisiertem Wasser; Haltbarkeit bei 4 °C ca. 4 Wochen), Lagerung auf Eis
- (5) 2 mM Glucose-Stammlösung (Glucose-Monohydrat; Fluka Kat#49160; M_r=198 g/mol); Lagerung bei Raumtemperatur; bei -20 °C über Monate haltbar, 100 ml
- (6) 100 mM Tris-HCl-Puffer (M_r= 157,60 g/mol), pH 7.8 mit KOH einstellen, 100 ml

Lösungen (1), (2) und (4) werden bereitgestellt

Für die Lösungen (3), (5) und (6) müssen mit Hilfe der molaren Massen (M_r), die Mengen zur Einwaage berechnet werden.

Die Glucose-Konzentration in den Proben wird im Praktikum anhand einer Kalibriergeraden, die mit von Glucose-Standards bekannter Konzentration erstellt wird

Achtung: Von den Proben werden nach Rücksprache mit dem Betreuer 2-3 Verdünnungen hergestellt, um im Test mindestens mit einer Verdünnung im linearen Bereich der Kalibriergeraden zu liegen. Alle Proben und Standards werden in Doppelbestimmung gemessen!

AUFGABE: Schätzen sie die Verdünnungsstufen ab, die eine gute Messbarkeit der Proben zu Beginn und am Ende des Wachstums erlauben. Besprechen Sie die Ergebnisse Ihrer Überlegungen mit Ihrem/r Betreuer/in.

Pipettierschema für die Kalibriergerade:

Probennummer	1	2	3	4	5
Tris-HCl-Puffer (μl)	690	690	690	690	690
MgSO ₄ -Lösung (μl)	50	50	50	50	50
A. dest. (μl)	150	130	110	70	30
2 mM Glucose (μl)	0	20	40	80	120
ATP-Lösung (μl)	50	50	50	50	50
NADP ⁺ -Lösung (μl)	50	50	50	50	50
HK/G6P-OR (μl)	10	10	10	10	10

Pro Testansatz wird von den Lösungen die folgende Menge jeweils in Küvetten pipettiert

- | | | | | |
|----|-----|---------------------------|-----|---------------|
| 1. | (6) | Tris/HCl-Puffer (pH 7,8) | 690 | μl |
| 2. | | Probe | 150 | μl |
| 3. | (3) | MgSO ₄ -Lösung | 50 | μl |
| 4. | (2) | ATP-Lösung | 50 | μl |
| 5. | (4) | NADP ⁺ -Lösung | 50 | μl |

Anschließend werden nach folgendem Protokoll alle Proben nacheinander durchgemessen:

1. Start der Reaktion durch Zugabe von 10 μl des Enzym-Gemisches (1) und gutes Mischen
2. Nach Zugabe von Enzymen Inkubation der Ansätze für 20 min bei 37 °C
3. Messung der Absorption bei 365 nm (nacheinander!)
4. Merke: Bei Mehrfachverwendung muss vor dem Neubefüllen alle Flüssigkeit aus der Küvette entfernt sein, ggf. durch Ausschlagen), Proben in aufsteigender Glucosekonzentration messen

AUFGABE: Berechnen sie die Konzentrationen im Test der folgenden Komponenten:

Tris/HCl-Puffer:

Hexokinase:

Glucose-6-Phosphat-1-Oxidoreduktase:

ATP:

Mg²⁺:

NADP⁺:

AUFGABE: Berechnen sie mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes den molaren Extinktionskoeffizient von Glucose bei 365 nm.

Lambert-Beer'sches Gesetz: $\Delta E = \varepsilon \times d \times c_{\text{Glc}}$

mit ΔE = Absorption (Blindwert abgezogen), ε = molarer Extinktionskoeffizient, $d = 1$ cm (Schichtdicke) und c_{Glc} = Glucose-Konzentration

Zur Berechnung der Glucose-Konzentration wird der Mittelwert der Absorptionen des Nullwertes (Probennummer 1 der Kalibriergeraden: 0 mM Glucose) von der Absorption der Proben/Standards abgezogen.

Für die Berechnung der Glucose-Konzentration (in mM) im Testansatz wird das Lambert-Beer'sche Gesetz nach der Konzentration c_{Glc} aufgelöst.

Berechnen sie die Glucose-Konzentration in Ihren Proben einmal mit dem berechneten molaren Extinktionskoeffizienten und einmal mit dem Literaturwert ($\varepsilon_{\text{Glc}} = 3,35 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

Wichtig:

- Probe und Enzyme im Eis aufbewahren
- Graphische Auftragung der Kalibriergeraden (Millimeterpapier und/oder in MS Excel) , um den linearen Bereich der Messung festzustellen
- Eintragung der Werte in eine Tabelle und in die Wachstumskurve
- Gruppenweise Messung, zeitversetzt
- Für die Berechnung der Glucose-Konzentration (in mM) in den Proben müssen Sie noch die Verdünnung berücksichtigen!
- Abgleich der quantitativen Messung mit der Menge der eingewogenen Glucose

Notizen:

Tag 5 (17.03.2017)

<u>Versuch I</u> Isolation und Identifikation von Bakterien aus Lebensmitteln	<u>Versuch II</u> Wachstum von <i>E. coli</i>
Vorbereitung	
<u>Identifikation:</u> Auswertung der api-Teststreifen	
	<u>Sterilisationsverfahren:</u> Auswertung Lebendkeimzahl vor und nach Ethanolbehandlung, Autoklavieren, Filtersterilisieren, Hitze
Aufräumen, Putzen, Nachbesprechung	

Versuch 1: Isolation einer Reinkultur von Lebensmittelbakterien

Werten Sie die api Test-Streifen mit Hilfe der Software am Computer aus.

Versuch 2: Wachstum von *E. coli*

Auswertung der Platten zur Bestimmung der Lebendzellzahl zum Zeitpunkt $t = 24$ h vor und nach verschiedenen Sterilisationsverfahren

Notizen:

Auswertung der Versuche für das Protokoll

Versuch 1: Isolation einer Reinkultur von Lebensmittelbakterien

Geben sie die Lebendkeimzahl der von Ihnen aus dem jeweiligen Lebensmittel isolierten Bakterien an. Entspricht diese Lebendkeimzahl der Gesamtzahl aller lebensfähigen Bakterien im jeweiligen Lebensmittel?

Beschreiben Sie Ihren Organismus anhand der von Ihnen bestimmten mikroskopischen und physiologischen Merkmale (Morphologie, Größe, Gram-Färbung, Oxidase- und Katalase-Test). Welches Ergebnis lieferte die Auswertung der api-Teststreifen? Geben die Ergebnisse aller Analysen eindeutig oder lassen sie Interpretationsspielraum? Ergeben sie ein schlüssiges Bild? Kommt der isolierte Organismus im jeweiligen Lebensmittel vor? Gab es Probleme bei der Isolation?

Versuch 2: Wachstum von *E. coli*

Mit den Messwerten zu den einzelnen Wachstumsparametern werden für das Protokoll die folgenden Parameter bestimmt:

1. Wachstumskurve anhand der Trübungsmessungen (ist bereits während des Praktikums erfolgt soll jedoch exakter mit Hilfe einer geeigneten Software (z.B. Excel, Numbers etc) ausgewertet werden
2. Vergleichen sie die Gesamt- und Lebendkeimzahl zu den unterschiedlichen Zeitpunkten
3. Berechnen Sie aus Ihren Zellzahlbestimmungen (exponentieller Bereich der Kurve) die Teilungsrate v . Dazu sollten Sie eine Ausgleichsgerade in diesem Bereich legen und 2 Wertepaare benutzen, die auf dieser liegen.

$$v = \frac{\log N_2 - \log N_1}{\log 2 \cdot (t_2 - t_1)}$$

N_2 = Zellzahl zum Zeitpunkt t_2

N_1 = Zellzahl zum Zeitpunkt t_1

4. Berechnen Sie aus der ermittelten Teilungsrate v die Generationszeit g .

$$g = \frac{1}{v}$$

5. Berechnen Sie aus den Werten der OD₆₀₀-Bestimmung im exponentiellen Bereich der Kurve die Wachstumsrate μ . Dazu sollten Sie eine Ausgleichsgerade in diesem Bereich legen und 2 Wertepaare benutzen, die auf dieser liegen.

$$\mu = \frac{\ln OD(t_2) - \ln OD(t_1)}{t_2 - t_1}$$

OD(t₂) = OD₆₀₀ zum Zeitpunkt t₂

OD(t₁) = OD₆₀₀ zum Zeitpunkt t₁

6. Berechnen Sie aus der ermittelten Wachstumsrate μ die Verdopplungszeit t_d.

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

7. Berechnen Sie die Glucose-Konzentrationen zu den einzelnen Zeitpunkten. Korreliert der Substratverbrauch mit dem Wachstum?
8. Lebendkeimzahl zum Zeitpunkt t = 24 h vor und nach Behandlung durch verschieden Sterilisationsverfahren. Diskutieren Sie die Effizienz der unterschiedlichen Verfahren.
9. Bitte diskutieren anhand der Ergebnisse der Keimzahlbestimmungen und dem Wissen aus der VL bei welcher der Methoden es sich um Sterilisations- bzw. Teilentkeimungsverfahren handelt.

Literatur:

1. Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (2006). The Prokaryotes, 3. Auflage, Springer, Berlin
2. Holt JG (1984) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 9. Auflage, Williams & Wilkins, Baltimore
3. Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR (1994). Methods for General and Molecular Bacteriology, American Society for Microbiology, Washington
4. Gerlach D (1985). Das Lichtmikroskop, Thieme, Stuttgart
5. Bergmeyer HU (1974). Methoden der enzymatischen Analyse, 3. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim
6. Firma E. Merck (1989). Nährböden Handbuch, E. Merck Darmstadt
7. Fuchs G (2006). Allgemeine Mikrobiologie, begründet von Schlegel HG, 8. Auflage, Thieme, Stuttgart
8. Madigan MT, Martinko JM (2009). Brock Mikrobiologie, 11., aktualisierte Auflage Pearson Studium, München
9. Cypionka H (2003). Grundlagen der Mikrobiologie, 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin
10. Munk K (2001). Grundstudium Biologie: Mikrobiologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
11. Steinbüchel A, Oppermann-Sanio FB (2003). Mikrobiologisches Praktikum. Springer-Verlag Berlin
12. Alexander SK, Strete D (2006). Mikrobiologisches Grundpraktikum. Ein Farbatlas. Pearson Studium, München