



Bakterienzucht - Schülerkit für Gruppenarbeit

Einleitung

Die Bakteriologie, die sich mit den Bakterien als Lebewesen beschäftigt, ist einerseits sehr alt und andererseits recht jung. Bakteriologische bzw. mikrobiologische Anwendungen wurden bereits vor Jahrtausenden entwickelt, beispielsweise für die Herstellung von Brot, Sauermilchprodukten, Wein und Bier. Obgleich man die Vorgänge nicht richtig verstand, funktionierte die Herstellung der genannten Lebensmittel recht verlässlich.

Wichtige Grundlagen der Bakteriologie, die einen Teilbereich der Mikrobiologie repräsentiert, lieferten besonders die Arbeiten um Louis Pasteur (1822-1895) und Robert Koch (1843–1910), die keine 200 Jahre zurück liegen. Pasteur, der sich neben medizinischen Fragestellungen auch an der Haltbarmachung von Nahrungsmitteln arbeitete (Pasteurisierung) widerlegte auch die bis dato gültige Theorie von der Urzeugung, die von einer spontanen Entstehung von Mikroorganismen ausging.

Neben wichtigen Erkenntnissen der medizinischen Mikrobiologie (Tuberkuloseerreger) durch den Berliner Bakteriologen Robert Koch verdankt ihm die Mikrobiologie auch die Einführung fester Nährmedien zur Kultivierung von Mikroorganismen. Zu Anfang nutzte er Kartoffelscheiben und Gelatine, um flüssige Nährmedien zu verfestigen, später führte er Agar als Verfestigungsmittel in die Mikrobiologie ein.

Das vorliegende Experimentierset beinhaltet grundlegende mikrobiologische Gerätschaften, erläutert grundlegende Kultivierungstechniken und beschreibt exemplarisch einfache Experimente mit harmlosen Bakterien für den Schulunterricht. Darüber hinaus werden generelle Sicherheitsaspekte zum Umgang mit Bakterien und Experimentierabfällen angesprochen.

Bestandteile des Kits

- Nähragar, 4 x 125 ml
- Reagenzgläser mit Schraubverschluss, 20 Stück
- Petrischalen, 20 Stück
- Impföse, 4 Stück
- Drigalskispatel, 4 Stück
- Objektträger, 50 Stück
- Tropfpipetten, 4 Stück
- Antibiotika-Testblättchen, 4 x 6 Stück mit verschiedenen Substanzen
- Filterpapier, 20 Stück
- Methylenblau-Lösung, 5ml

Erforderliche Ausstattung für alle Experimente

- Laborkittel
- Schutzbrille
- Handschuhe (Schutz vor Verbrühung)
- Sterile Glaspipetten, 1ml und 0,1ml oder
- Mikroliterpipetten mit denen man obige Volumen pipettieren kann (zzgl. passende sterile Pipettenspitzen)

- Mikroskop (Phasenkontrast)
- Bunsenbrenner
- Tischmixer (idealerweise)
- Schnellkochtopf (idealerweise Autoklav)
- Desinfektionsmittel

Hinweise zum Arbeiten mit Bakterien

Beim bakteriologischen Arbeiten sollte nicht gegessen, getrunken oder geraucht werden, auch Schminken ist am Arbeitsplatz zu unterlassen. Lange Haare sollten möglichst nicht offen getragen werden, ebenfalls kein „exzessiver“ Schmuck (lange oder grosse Ohrringe etc.). Laborkittel und Schutzbrillen, gegebenenfalls Handschuhe sind Standard bei Laborarbeiten. Bakterienkulturen sollten nicht offen stehen und nicht mit den Fingern berührt werden. Laborgeräte und Arbeitsflächen müssen sterilisiert werden. Impfösen werden entweder abgeflammt oder ausgeglüht.

Arbeitsflächen sind mit Desinfektionsmitteln oder Spiritus (70%ig) zu sterilisieren. Nicht mehr benötigte Bakterienkulturen in Reagenzgläsern oder in Petrischalen werden mit einem geeigneten Desinfektionsmittel abgetötet. Dazu werden diese mit einigen Millilitern eines Desinfektionsmittels versetzt und einige Zeit stehen gelassen (über Nacht), so dass das Desinfektionsmittel wirken kann.

Falls ein Autoklav zu Verfügung steht, kann man idealerweise damit Bakterienkulturen zuverlässig abtöten.

Mikrobiologische Methoden

Gießen von Nährböden in Petrischalen

Für viele bakteriologische Experimente werden sterile Nährböden in Petrischalen benötigt. Das vorliegende Experimentierset beinhaltet sowohl Nähragar als auch sterile Petrischalen.

Die Herstellung von sterilen Nährböden in Petrischalen erfolgt folgendermaßen:

- Schmelzen der Nährbodenmasse im Wasserbad. Vor dem Erhitzen den Schraubverschluss um ca. $\frac{1}{4}$ Umdrehung lösen und auf der Flasche belassen.
- Während des Aufkochens wird die leicht geöffnete Flasche vorsichtig entnommen (Handschuhe tragen, Verbrühungsgefahr) und der Inhalt durch Kreisen der Flasche gleichmäßig verteilt und die Flasche bei leicht geöffnetem Schraubverschluss wieder zurück ins Wasserbad gestellt. Falls ein Magnetrührer vorhanden ist, kann man auch bereits zu Anfang der Schmelzprozedur einen magnetischen „Rührfisch“ in die Nährbodenmasse geben und der Inhalt der Flasche kann damit auf einem Magnetrührer durch Rühren gleichmäßig verteilt werden. Wenn der gesamte Flascheninhalt flüssig ist, lässt man die flüssige Nährbodenmasse etwa auf 60 - 70°C abkühlen und gießt dann den Nähragar 2 bis 3mm dick in die Petrischalen.
- Es ist zweckmäßig direkt nach dem Gießen 5 bis 10 Petrischalen übereinander zu stapeln, so bildet sich nur an den 2 bis 3 oberen Petrischalen Kondenswasser beim Erstarren des Nährbodens. Nach dem Festwerden des Nährbodens das Kondenswasser „abschlagen“ und Deckel der Petrischalen wieder aufsetzen.
- Die Platten lässt man nun 2 bis 3 Tage stehen, damit sie etwas abtrocknen können und so die ausgespatelten Bakteriensuspensionen besser aufnehmen können.
- Beachten Sie, dass die Petrischalen steril sind und direkt zum Plattengießen eingesetzt werden können. Die Petrischalen nicht unnötigerweise öffnen oder innen mit den Fingern berühren.

Herstellen von Verdünnungsreihen

Häufig liegt die Konzentration der Bakterien in der Probe oder in der Probensuspension zu hoch als das man sie direkt auf dem Nährbodenagar bestimmen kann. Beim Auszählen der Kolonien sind Zahlen von 100 bis 200 Kolonien in der Regel die Obergrenze. Höhere Bakterienkonzentration bilden einen Bakterienrasen, den man quantitativ nicht mehr erfassen kann.

Am gebräuchlichsten ist das Verdünnen in Dezimalschritten, d.h. das Anlegen einer Verdünnungsreihe mit Verdünnungen im Verhältnis 1:10 (10^{-1}), 1:100 (10^{-2}) und so weiter bis die für Bestimmung geeignete Verdünnungsstufe erreicht wird.

Zum Verdünnen verwendet man häufig sterile 0,9%ige NaCl-Lösung, die man sich in Reagenzgläsern herstellt bzw. sterilisiert, jeweils 9ml pro Reagenzglas. Vor dem Versuch sind die Röhrcchen mit der Probenbezeichnung und der entsprechenden Verdünnungsstufe zu beschriften (wasserfester Filzstift).

Bei flüssigen Proben (Yoghurt, Wasser etc.) entnimmt man mit einer sterilen Pipette oder steriler Pipettenspitze 1ml Probe und gibt diese in das erste Reagenzglas, so hat man diese Flüssigprobe 1:10 verdünnt. Jetzt mischt man diese Verdünnung mit einem Tischmixer oder durch geeignetes Mixen mit der Hand.

Jede weitere Verdünnung auf ein folgendes Reagenzglas ist eine weitere 1:10 Verdünnung. Bei jeder Verdünnung ist entsprechend zu mixen, damit eine gleichmäßige Verteilung der Bakterien erfolgt.

Von den als geeignet eingestuften Verdünnungsstufen entnimmt man dann 0,1ml, gibt sie auf einen geeigneten Nährbodenagar und verteilt diese mit einem abgeflamten und damit sterilem Drigalskispatel.

Bei festen Proben wie z.B. bei einer Bodenprobe wird 1g mit sterilen Hilfsmitteln abgewogen und entsprechend verdünnt bevor man die Suspension auf einem Nährboden ausgespatelt.

Ausspateln von Bakterien auf Nähragar

Bevor man beginnt, die Bakterien auf dem Nährbodenagar auszuspätern sollte man den Arbeitsplatz mit 70%igem Ethanol desinfizieren. Die Petrischalen werden auf der Unterseite beschriftet (Name, Probe, Verdünnungsstufe, Datum). Bevor man die Bakteriensuspension aus dem Reagenzglas entnimmt, wird sie kurz gemixt, damit die Bakterien im Nährmedium gleichmäßig verteilt sind. Nun entnimmt man 0,1ml der Suspension und pipettiert sie in die Mitte des Nährbodens. Mit einem sterilen Drigalskispatel verstreicht man die Bakteriensuspension unter ständigem Drehen der Platte auf der Oberfläche des Nährbodens bis ein kleiner Widerstand zu spüren ist. Dieser zeigt an, dass die Suspension in den Nährboden eingezogen ist. Die Platten werden dann für 1-2 Tage mit dem Deckel nach unten bebrütet. Die Bebrütungstemperatur ist vom Organismus abhängig.

Hinweis: Das Ausspateln von 0,1ml Bakteriensuspension bedeutet ebenfalls eine Verdünnungsstufe von 1:10 bei der Rückrechnung der Bakterienanzahl pro Milliliter bzw. Gramm.

Mikroskopische Betrachtung lebender Bakterien

Um lebende Bakterien zu betrachten, ist ein Phasenkontrastmikroskop am besten geeignet. Für das sogenannte Lebendpräparat wird eine Zellsuspension mit geringer Zelldichte auf einen Objektträger aufgebracht und luftblasenfrei ein Deckglas aufgelegt. Überschüssige Flüssigkeit wird mit einem Streifen Filterpapier abgesaugt. Um eine schnelle Austrocknung des Lebendpräparates zu verhindern, kann man die Ränder des Deckgläschens mit Nagellack oder Vaseline abdichten.

Herstellung von Ausstrichpräparaten und Färbung

Voraussetzung für die Herstellung einwandfreier Ausstrichpräparate ist die Benutzung fettfreier Objektträger. Dazu benutzt man etwas Spülmittel und handwarmes Leitungswasser. Anschließend die Objektträger senkrecht stellen, Wasser ablaufen lassen und an der Luft trocknen, nicht trocken wischen.

Auf die gereinigten Objektträger wird ein kleiner Tropfen Wasser gegeben. Mit der Impföse die Bakterien in den Wassertropfen bringen und sorgfältig vermischen bei waagerechter Haltung der Impföse und die Bakterienaufschwemmung auf dem Objektträger ausstreichen.

Die Objektträger mit den ausgestrichenen Bakterien waagrecht hinlegen und an der Luft trocknen lassen.

Die luftgetrockneten Präparate werden dreimal durch die Sparflamme eines Bunsenbrenners gezogen. Auf diese Weise werden die Bakterien abgetötet und auf dem Objektträger fixiert.

Zum Färben mit Methyleneblau-Lösung legt man die Präparate auf eine saugfähige Unterlage (Zeitungspapier, Filterpapier o.ä.), damit die Arbeitsflächen keine Farbflecken erhalten. Nun lässt man ein paar Tropfen Methyleneblaulösung 5 Minuten lang einwirken, anschließend mit Leitungswasser abspülen. Den gefärbten Ausstrich lässt man an der Luft abtrocknen. Alternativ kann man auch vorsichtig einen Streifen Filterpapier auflegen und Wasser absaugen. Keinesfalls abwischen, das würde das Ausstrichpräparat zerstören!

Die Präparate sind nun fertig für die mikroskopische Untersuchung, ein Auflegen eines Deckgläschens ist nicht notwendig. Die Präparate sind lichtgeschützt über Jahre haltbar.

Gram-Differenzierung mit KOH

Mit diesem einfachen Testverfahren kann man zwischen gram-negativen und gram-positiven Bakterien unterscheiden. Die eingesetzte 0,5molare Kalilauge lysiert gram-negative Zellen und mit einem Zahnstocher oder Impföse lassen sich DNA-Fäden ziehen. Bei gram-positiven Zellen erfolgt aufgrund der anderen Zellwandstruktur keine Freisetzung der bakteriellen DNA.

Für die Herstellung von 100ml 0,5molarer Kalilauge werden 2,8g KOH eingewogen und in 100ml Wasser gelöst.

Den Versuch führt man am besten auf einem Objektträger durch. In einen kleinen Tropfen Kalilauge rührt man mit der Impföse Bakterien ein und beobachtet, ob sich beim Rühren Fäden zeigen.

Katalasetest

Der Katalasetest ist ein einfaches Verfahren zum Nachweis des Enzyms Katalase, welches vom Wasserstoffperoxid (H_2O_2) Sauerstoff abspaltet.

Man benötigt dazu eine 3%ige Wasserstoffperoxidlösung. Entweder macht man den Test mit einer Kolonie auf der Nährbodenplatte oder auf einem Objektträger. Dazu werden 10 μ l der Peroxidlösung entweder direkt auf die Kolonie gegeben oder man reibt Bakterien mit einer Impföse in den 10 μ l grossen Tropfen auf einem Objektträger.

Katalase positive Bakterien verursachen eine Gasentwicklung (Bläschenbildung), bei Katalase negativen Bakterien bleibt die Gasentwicklung aus.

Beschaffung von Bakterien

lebende Bakterienstämme auf Schrägnähragar (Reagenzglaskulturen)

Bakterien aus dem Supermarkt

Sie lesen richtig, Bakterien können Sie in jedem Supermarkt kaufen. Sie brauchen lediglich in Richtung Kühlregal gehen und die Sauermilcherzeugnisse ansteuern. Traditionelle

Sauermilchprodukte wie Joghurt, Dickmilch, Buttermilch und dergleichen enthalten Streptokokken und Laktobazillen in hoher Zelldichte. Aber auch fermentierte Rohwürste wie beispielsweise Salami, Mettwürste etc. oder Sauerkraut in Konserven enthalten herstellungsbedingt große Mengen bewusst zugesetzter Milchsäurebakterien.

Traditionelle Sauermilchprodukte wie Joghurt, Dickmilch, Buttermilch und dergleichen enthalten Streptokokken und Laktobazillen. Dazu im Einzelnen:

Joghurt

Joghurt enthält typischerweise *Streptococcus thermophilus* und *Lactobacillus bulgaricus*.

Dickmilch

Dickmilch (Sauermilch) enthält *Streptococcus lactis* und *Lactobacillus lactis*. *S. lactis* kommt einzeln, paarweise und in kurzen Zellketten vor, *L. lactis* ist ein relativ großes Stäbchenbakterium.

Buttermilch

Buttermilch enthält häufig *Lactococcus lactis*, *L. cremoris*, *L. diacytylactis*, *Leuconostoc citrovorum*.

Kefir

Enthält typischerweise *Streptococcus lactis*, *S. cremoris* und *Lactobacillus caucasicus*.

Milchsäurebakterien in Rohwürsten und im Sauerkrautkonserven

In Rohwürsten findet man häufig *Lactobacillus*- und *Leuconostoc*-Arten, im Sauerkraut in der Regel Arten der Gattung *Leuconostoc*, häufig *L. mesenteroides*.

Einfache mikrobiologische Experimente

Aus den oben genannten Milchprodukten kann man gut Ausstrichpräparate für mikrobiologische Untersuchungen herstellen. Am besten nehmen Sie molkeartige Flüssigkeit, die sich in den Vertiefungen von Dickmilch oder Joghurt ansammelt und relativ eiweißarm ist. Bei Buttermilch und Kefir vorher verdünnen, um nicht so viel Eiweiß mit auszustreichen. Eine zu starke Verdünnung der Keimzahlen wird kaum auftreten, da diese in Sauermilchprodukten recht hoch liegt (zwischen 10^6 und $> 10^8$ / ml).

Isolation von Milchsäurebakterien aus dem Joghurt

Da die Keimzahlen in Sauermilchprodukten in der Regel zwischen 10^6 und $>10^8$ / ml liegen, ist zu Anfang vom Joghurt eine Verdünnungsreihe anzulegen, bevor die Ausplattierung auf den Nährböden erfolgt. Anschließend erfolgt die Bebrütung bei 37°C für 1-2 Tage. Zur Vermeidung von Kondenswasser am Petrischalendeckel sind die Platten mit dem Deckel nach unten zu bebrüten.

Anhand der Anzahl der Kolonien, die auf den jeweiligen Platten zu finden sind, kann mit der entsprechenden Verdünnungsstufe auf die Anzahl der Bakterien pro Milliliter Joghurt hochgerechnet werden.

Ob es sich bei den Milchsäurebakterien im Joghurt um Streptokokken oder Laktobazillen handelt, lässt sich mikroskopisch klären. Streptokokken sind kugelig und liegen paarweise oder in verschiedenen langen Ketten vor, während Laktobazillen stäbchenförmig sind.

Sowohl Streptokokken als auch Laktobazillen sind gram-positiv und Katalase negativ. Die Testverfahren sind unter 5.6 und 5.7 beschrieben.

Bakterien aus dem Heuaufguss

Der „Heuaufguss“ ist eine Methode, um darin befindliche Mikroorganismen zu aktivieren. Geben Sie eine Handvoll Heu in ein 1000 ml Becherglas und übergießen Sie dies mit Leitungswasser. Diesen Ansatz lassen Sie bei Raumtemperatur ein paar Tage stehen und beobachten die Ausbildung einer Kahlhaut. Das heißt, es bildet sich ein Biofilm auf der Wasseroberfläche, der aus verschiedenen Organismen besteht. Hauptvertreter in diesem Biofilm sind Heubazillen mit der Bezeichnung *Bacillus subtilis*.

Bacillus subtilis kann noch weiter angereichert werden, in dem Sie den Heuaufguss kochen. Dabei überstehen die Sporen von *B. subtilis* diese Prozedur, während die meisten Fremdkeime abgetötet werden.

Hinweis: Der Heuaufguss sollte nach spätestens 4 Wochen entsorgt werden.

Bakterien in Bodenproben

Von Bodenproben werden jeweils 1g unter Benutzung steriler Hilfsmittel (Becher, Löffel etc.) abgewogen und zu 9ml sterile 0,9%ige NaCl-Lösung gegeben und in einer Verdünnungsreihe weiter verdünnt. Von verschiedenen Verdünnungsstufen werden dann jeweils 0,1ml auf Nährbodenplatten mit einem sterilen Drigalskispatel ausgespatelt.

Die Petrischalen am besten mit etwas Parafilm oder Tesafilm verschließen, damit gegebenenfalls auftretende Pilzsporen nicht entweichen können. Stark verpilzte Platten sollten nicht von Schülern bearbeitet werden und direkt entsorgt werden.

Bakterien in Wasserproben

Von Wasserproben (See, Fluß, Leitungswasser, Mineralwasser, destilliertes Wasser) werden jeweils 0,1ml auf Nährböden mit dem Drigalskispatel ausgespatelt. Damit dabei keine Fremdkeime eingebracht werden, ist der Spatel vor Gebrauch abzuflammen.

Die Petrischalen 2 bis 3 Tage bei Raumtemperatur stehen lassen und auswerten. Eine dunkle Unterlage ist hilfreich beim Erkennen der Kolonien auf der Agaroberfläche. Die Anzahl der Kolonien lässt Rückschlüsse auf die Wasserqualität zu.

Bakterien in der Luft

Um einen Eindruck zu bekommen, wie stark die mikrobiologische Luftbelastung an verschiedenen Standorten ist, kann man folgende Versuche durchführen. Petrischalen mit Nährböden an verschiedenen Standorten unterschiedlich lang öffnen (5 – 30 Minuten), dann den Deckel wieder schließen. Anschließend die „eingefangenen“ Mikroorganismen lichtgeschützt bei Raumtemperatur einige Tage wachsen lassen.

Sie werden bei der Auswertung eine mehr oder weniger große Anzahl an Bakterienkolonien erkennen, die sich deutlich von eventuell auch vorhandenen Pilzen unterscheiden. Eine Bakterienkolonie geht in der Regel auf ein Bakterium (oder Bakterienspore) zurück.

Stark verpilzte Nährböden sollten nicht von Schülern bearbeitet werden, sondern direkt entsorgt werden.

Bakterien auf der Hand

Ungewaschene Hände weisen bis zu mehrere tausend Keime/cm² auf. Durch intensives Waschen mit einfacher Seife werden bereits 60-80%, bei Verwendung antimikrobieller Seifen 80-90% der Hautkeime reduziert.

Achtung: Bei einem flüchtigen und einmaligen Waschen mit Seife und ohne Abtrocknen mit sterilem oder keimarmem Trockenpapier (frischem Handtuch) beobachtet man häufig sogar eine Zunahme auf der Hautoberfläche. Dies liegt daran, dass beim einmaligen Waschen

Bakterien aus der Poren und Hautleisten freigesetzt werden und an die Oberfläche gespült werden. Abtrocknen der Haut mit einem sterilem oder keimarmen Handtuch oder Hygienepapier reduziert die Keimzahl ganz erheblich.

Versuchsvorschlag

Teilen Sie eine Nährbodenplatte in zwei Hälften und bezeichnen Sie diese mit „vor Desinfektion“ und „nach Desinfektion“. Drücken Sie die Fingerkuppen der linken Hand vorsichtig auf die obere Hälfte einer Nährbodenplatte.

Nehmen Sie z. B. 70%igen Ethanol (p.A. Qualität, kein Brennspritus) und reiben dieselben Fingerkuppen damit ein. Zwei Minuten einwirken lassen und an der Luft trocknen lassen. Anschließend die Fingerkuppen vorsichtig auf die untere Hälfte der Nährbodenplatte drücken. Die Nährbodenplatte wird bei 36°C für 2-3 Tage bebrütet und die Kolonien ausgezählt.

Achtung: Ethanol unverdünnt hat eine schlechtere Desinfektionswirkung als Ethanol 70%ig!

Prüfung auf antibakterielle Stoffe im Hemmhof-Test

Für diesen Test eignet sich beispielsweise das Heubakterium *Bacillus subtilis*. Mit einer kleinen Pipette übertragen Sie etwa 0,1ml Bakteriensuspension (1 großer Tropfen) auf den Nährboden und verteilen diese mit einem Drigalskispatel. Legen Sie nun ein oder mehrere verschiedene Testblättchen mit unterschiedlichen Substanzen in der Mitte des Nährbodens auf und bebrüten Sie die Platten 1 Tag bei 36°C. Um die antibiotikahaltigen Testblättchen können Sie bakterienfreie Zonen erkennen, wobei die Größe des Hemmhofes auf die Wirksamkeit des jeweiligen Antibiotikums beziehungsweise auf die Empfindlichkeit des Testkeims Aufschluss gibt.

Wirkung von UV-Strahlung auf Bakterien

UV-Strahlen im Wellenbereich von 200-280nm (UV-C) können keimtötend wirken, wobei das Wirkungsoptimum bei einer Wellenlänge von 254nm liegt. Diese Wellenlänge wird vorzugsweise von den Nukleinsäuren absorbiert und hat deshalb die größte keimtötende Wirkung.

Darüber hinaus können UV-Strahlen mit den o.g. Wellenlängen Mutationen hervorrufen. UV-Bestrahlung wird beispielsweise zur Erzeugung von Auxotrophie-Mutanten eingesetzt. Darunter versteht man Mutanten, die bestimmte Wachstumsfaktoren wie Vitamine, Aminosäuren oder Purine und Pyrimidine zugesetzt werden müssen, da durch Mutation ein Defekt in der Eigensynthese der o.g. Wachstumsfaktoren aufgetreten ist.

Weiter unten wird ein Experiment zur Isolierung von Auxotrophie-Mutanten beschrieben, die einen Defekt in der Synthese von Aminosäuren, Vitaminbiosynthese und (oder) in der Synthese der Nukleinsäurebausteine aufweisen.

Hinweis: UV-C-Strahlung schädigt auch die Haut und Augen von Menschen. Daher beim Experimentieren Laborkittel, Schutzbrille und Handschuhe tragen.

Keimtötende Wirkung von UV-Strahlen

Für diess Experiment kann beispielsweise auch das sporenbildende Bakterium *Bacillus subtilis* eingesetzt werden. Die Bakterienkultur sollte frisch sein bzw. maximal 1 Tag alt, da sich in frischen Kulturen von Sporenbildnern die Sporen noch in der UV-empfindlichen vegetativen Phase befinden.

Man plattiert 0,1ml der Bakteriensuspension auf der Nährbodenoberfläche mit einem Drigalskispatel aus. Anschließend deckt man die offene Petrischale mit einem Pappkarton ab, in den man zuvor ein Muster (Dreieck, Kreuzform etc.) eingeschnitten hat. Die Bestrahlung mit der UV-Lampe erfolgt aus geringem Abstand über einen Zeitraum von 5, 10, 15 ... 30 Minuten. Nach der Bestrahlung werden die Petrischalen mit dem Deckel verschlossen und 2 Tage bei Zimmertemperatur bebrütet.

Isolierung von Auxotrophie-Mutanten

Viele Bakterien sind prototroph, d.h. sie benötigen zum Wachstum neben anorganischen Salzen lediglich eine Kohlenstoff- und Energiequelle, beispielsweise Glucose. Sogenannte Defektmutanten (Auxotrophie-Mutanten) brauchen dagegen zusätzlich einen oder mehrere Wachstumsfaktoren (Ergänzungstoffe), das heißt bestimmte organische Verbindungen, die als lebensnotwendige Zellbestandteile oder deren Vorläufer dienen, von der Zelle aber nicht selbst synthetisiert werden können und deshalb dem Nährmedium zugesetzt werden müssen. Solche Organismen oder Defektmutanten bezeichnet man als auxotroph.

Im Wesentlichen unterscheidet man drei Gruppen von Wachstumsfaktoren:

1. Vitamine (Bestandteile von Coenzymen und prosthetischen Gruppen von Enzymen)
2. Aminosäuren (Synthese von Proteinen)
3. Purine und Pyrimidine (Synthese von Nukleinsäuren)

Aus dem Experiment „Keimtötende Wirkung von UV-Strahlen“ ist bekannt, bei welcher Bestrahlungsdauer ca. 95-99% der Bakterien abgetötet werden. Genau diese Dosis ist geeignet für die Isolierung von Auxotrophie-Mutanten.

Jeweils 0,1ml einer frischen *B. subtilis*-Suspension auf 2-3 Petrischalen mit Nähragar ausplattieren. Anschließend mit der Dosis an UV-Licht bestrahlen, die 95-99% der Bakterien abtötet. Nehmen Sie nun einen Replikator mit einem sterilen Transfertuch (Schlüter Biologie Jörk Klawun Art. 355.400) und stempeln Sie das Koloniemuster auf ein Voll- und ein Minimalmedium und bebrüten Sie die Petrischalen für 1 bis 2 Tage.

Die Kolonien, die auf dem Vollmedium wachsen und auf dem Minimalmedium nicht, haben offensichtlich einen Defekt in der Biosynthese von Wachstumsfaktoren.

Durch Kultivierung auf Medien, die keine Vitamine, Aminosäuren oder Purine und Pyrimidine enthalten, kann der genetische Defekt näher charakterisiert werden.

Bestimmung der Wachstumsrate von Bakterien

Wenn man eine frische Nährlösung mit einer Bakteriensuspension animpft, beobachtet man folgendes. Die Bakterien beginnen zu wachsen, zunächst allerdings noch nicht mit maximaler Geschwindigkeit, da die katabolischen und anabolischen Prozesse mit unterschiedlicher Geschwindigkeit ablaufen. Diese Phase bezeichnet man als Anlaufphase oder lag-Phase (vgl. Abb. 1).

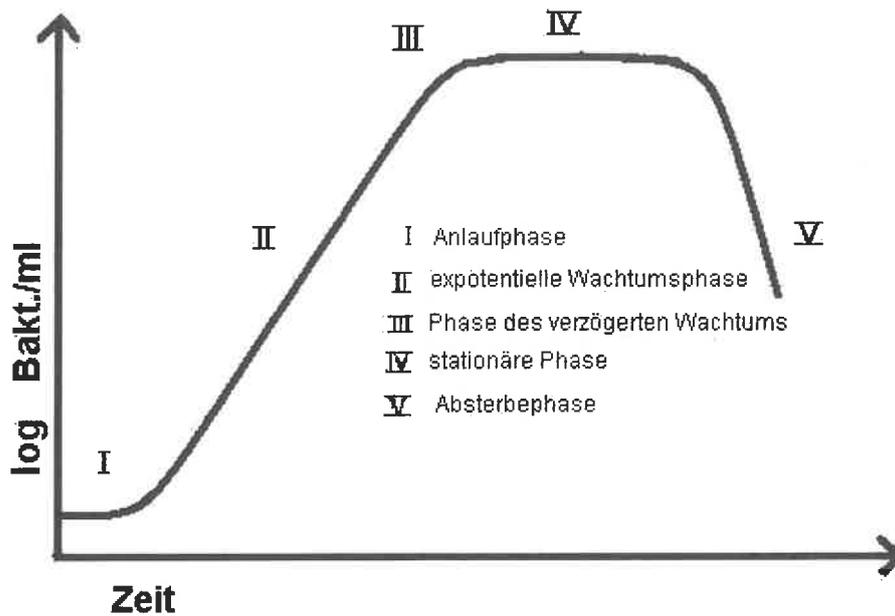


Abb.1 Typischer Verlauf einer Wachstumskurve

Im weiteren Verlauf beobachtet man, dass die Zellmasse pro Zeiteinheit um einen konstanten Faktor zunimmt. Das ist die Phase des logarithmischen oder exponentiellen Wachstums und als exponentielle Wachstumsphase oder log-Phase bezeichnet.

In dieser Phase nimmt nicht nur die Zellzahl bzw. Zellmasse konstant zu, sondern auch Protein, DNA und RNA. Obgleich sich verschiedene Prozesse, wie z.B. Enzymaktivitäten rhythmisch ändern können, bleibt der Gleichgewichtszustand zwischen den Stoffwechselprozessen erhalten.

Da durch das Wachstum der Kultur die Substratkonzentration abnimmt, der pH-Wert sich ändert, eventuell hemmende Stoffe sich anreichern usw. kommt es irgendwann zu einem verzögerten Wachstum. Diese Phase des verzögerten Wachstums wird auch Retardations-Phase genannt. Diese Phase geht letztendlich in die stationäre Phase über, die durch eine konstante Zellzahl gekennzeichnet ist. Entweder finden keine Zellteilungen mehr statt oder es werden nur so viel neue Zellen produziert wie alte Zellen absterben. Mit zunehmender Zeit kommt die Kultur in die sogenannte Absterbe-Phase.

Wenn man in einem Koordinatensystem auf der Abszisse die Kultivierungszeit linear und auf der Ordinate die Anzahl der Organismen pro Milliliter im logarithmischen Maßstab aufträgt, so zeigt die logarithmische Wachstumsphase einen linearen Verlauf (vgl. Abb.1).

Der Steigungsgrad der Kurve ist ein Maß für die Wachstumsrate. Aus den Bestimmungen zur Anzahl der Bakterien zu verschiedenen Zeiten in der exponentiellen Phase kann man die durchschnittliche Generationszeit (Verdopplungszeit) berechnen.

Tab. 1: Vermehrung von Bakterien in einer exponentiell wachsenden Kultur (Beispiel)

Kultivierungszeit In Minuten	Anzahl der Bakterien arithmetisch	log ₂	log ₁₀
0	1	0	0,000
30	2	1	0,301
60	4	2	0,602
90	8	3	0,903
120	16	4	1,204
150	32	5	1,505
180	64	6	1,806

$$\text{Generationszeit } g = \frac{t}{n} = \frac{t \times \log_2}{\log_{10} N_1 - \log_{10} N_0} = \frac{t \times 0,30103}{\log_{10} N_1 - \log_{10} N_0}$$

t = Kultivierungszeit

N₀ = Anzahl der Bakterien zu einem bestimmten Zeitpunkt in der logarithmischen Wachstumsphase

N₁ = Anzahl der Bakterien nach t (Minuten) Kultivierungszeit

n = Anzahl der Generationen in der Kultivierungszeit t

$$n = \frac{\log_{10} N_1 - \log_{10} N_0}{\log_2}$$

Für diesen Versuch sollten möglichst harmlose Bakterienstämme verwendet werden. Alternativ dazu könnte man auch ein Milchsäurebakterium nehmen, welches man in den oben beschriebenen Versuchen isoliert hat.

Eine über Nacht im Schüttelwasserbad angezogene Bakterienkultur im Reagenzglas wird genommen, um eine Nährlösung (50 ml) im Erlenmeyerkolben zu beimpfen. Die Extinktion der angeimpften Nährlösung sollte ca. 0,05 bis 0,1 betragen bei 580 nm im Photometer gemessen. Nun wird die Kultur im Erlenmeyerkolben bei konstanter Temperatur und konstanter Schüttelbewegung kultiviert. Nach bestimmten Kultivierungszeiten werden jeweils 0,1ml Bakteriensuspension entnommen und ausplattiert.