



Gerätekit Bakterienzucht Bakteriologisches Praktikum

Inhalt:

2 Impfösen	Antibiotika-Testblättchen, 2 x 6 Stück mit verschiedenen Substanzen
1 Drigalski-Spatel	2 x 125 ml Nähragar
4 Tropfpipetten	5 ml Methylenblau-Lösung
20 Einweg-Doppelpetrischalen	20 Stück Filterpapier
50 Objektträger	

Im modernen Biologieunterricht ist das Arbeiten mit Bakterien und deren Züchtung unverzichtbar. Schlüters „Bakteriologisches Praktikum“ soll Ihnen den Unterricht erleichtern helfen.

Bei Schülern und Erwachsenen ist oft eine gewisse „Bakterienangst“ anzutreffen, die dazu führt, dieser Organismengruppe „aus dem Weg zu gehen“. Abgesehen davon, dass dies im täglichen Leben weder möglich noch sinnvoll ist, sollte beachtet werden, dass nur relativ wenige Bakterienarten ausgesprochene Krankheitserreger sind, deren Zucht in der Schule ohnehin untersagt ist. Dennoch ist es angeraten, auch bei der Untersuchung und Zucht nichtpathogener Materialien Sicherheitsaspekte zu beachten. Der Umgang mit Bakterien sollte - das ist eine pädagogische Forderung - grundsätzlich unter diesen Gesichtspunkten vorstatten gehen. Alle Arbeitsmethoden der Bakteriologie sind nach Sicherheitsaspekten entwickelt worden.

Beachten Sie bitte folgende Hinweise: Bei bakteriologischen Arbeiten sollte weder gegessen, noch getrunken, noch geraucht werden.

Bakterienkulturen lässt man nicht offen stehen (z.B. Deckel von Petrischalen mit Klebeband am Boden befestigen) und man berührt sich auch nicht mit den Fingern. Laborgeräte, die mit Bakterien in Berührung gekommen sind, müssen sterilisiert werden. Häufig genügt einfaches Abflammen oder Ausglühen (z.B. Impföse vor und nach jedem Gebrauch). Bakterien, die vom Menschen stammen (z.B. Zahnbelag, Hautbakterien) eignen sich natürlich für die mikroskopische Untersuchung und geben interessante Aufschlüsse.

Eine Züchtung für Unterrichtszwecke sollte jedoch unterbleiben.

Bakteriell verunreinigte Arbeitsflächen sind mit Desinfektionsmitteln oder Spiritus abzuwischen. Ausgediente Bakterienkulturen werden sorgfältig beseitigt. Sehr günstig dafür sind Einweggeräte. Bevor Sie z.B. Petrischalenkulturen wegwerfen, versetzen Sie diese mit einigen ml eines Desinfektionsmittels (z.B. 5 - 10%ige Formalinlösung oder handelsübliche Desinfektionsmittel) und packen sie ein einen gut verschließbaren Plastikbeutel. Wurden Kulturen in Glasgeräten herangezogen (z.B. Reagenzgläser), die gespült werden sollen, dann ist auch hier ein Desinfektionszusatz notwendig, der einige Stunden lang einwirken sollte (am besten über Nacht).

Sofern ein Laborautoklav vorhanden ist, kann man natürlich auch damit Bakterienkulturen zuverlässig vernichten. Kulturen in Plastikpetrischalen können Sie auch verbrennen, falls dazu eine entsprechende Möglichkeit besteht.

Beschaffung von bakteriologischem Untersuchungsmaterial

Bakterienhaltiges Untersuchungsmaterial finden Sie leicht in der Natur oder Sie können es sich auf einfache Weise züchten. Dazu einige Beispiele:

Sauermilch entsteht ohne weiteres Zutun aus unpasteurisierter Milch durch einfaches Stehenlassen. Besonders in einem warmen Raum vermehren sich die in ihr enthaltenen Milchsäurebakterien sehr rasch. Sie verarbeiten Milchzucker zu Milchsäure die ihrerseits das Milcheiweiß zum Gerinnen bringt.

Sauermilch (Dickmilch) enthält *Streptococcus lactis*, ein Bakterium das einzeln, paarweise oder auch in kurzen Ketten von 3 bis 4 Zellen auftritt. Daneben findet man auch noch *Lactobacillus lactis*, ein relativ großes Stäbchen.

Joghurt enthält *Streptococcus thermophilus* (Kokken) und *Lactobacillus bulgaricus* (Stäbchen).

Kefir entsteht durch die Tätigkeit verschiedener Milchsäurebakterien wie *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* (bildet langen Ketten) und *Lactobacillus caucasicus* (Stäbchen). Ferner trifft man in Kefir *Bacillus caucasi* - ein gewundenes Langstäbchen - und außerdem verschiedene Milchzuckerhefen an.

All diese Milchprodukte eignen sich gut zur Herstellung von Ausstrichpräparaten für mikroskopische Untersuchungen. Die Ausstriche sollten möglichst dünn sein. Günstig ist es, wenn das Präparat nur wenig Milcheiweiß enthält. Dies erreichen Sie, indem Sie die molkeartige Flüssigkeit untersuchen, die sich in Vertiefungen ansammelt.

Wurzelknöllchen von Leguminosen (Schmetterlingsblütler) enthalten Knöllchenbakterien (*Rhizobium leguminosarum*), die als Stickstoffsammler von großer Bedeutung sind. Zur Untersuchung wird ein Wurzelknöllchen zerschnitten. Mit einem Messer schaben Sie dann an der Schnittfläche und fertigen von der abgeschabten Masse ein Ausstrichpräparat an.

Wenn Sie Heu mit Wasser übergießen und diesen Ansatz einige Tage ruhig stehen lassen, bildet sich an der Wasseroberfläche eine „Kahmhaut“ die zum größten Teil aus Heubazillen (*Bacillus subtilis*) besteht. *Bacillus subtilis* kann noch weiter angereichert werden, wenn Sie den Heuaufguß nach dem Ansetzen abkochen. So werden Fremdkeime weitgehend vernichtet, während die Sporen des Heubazillus das Erhitzen überstehen.

Stets verfügbar sind die Bakterien des Zahnbelags. Hier können Sie alle Bakterienformen antreffen, z.B. *Leptotrichum dentium*, ein Stäbchen, das bis zu 25 µm lang wird. Daneben finden Sie verschiedene Kokken, außerdem Spirochäten und Vibrionen. Abgesehen davon, dass die meisten Bakterien des Zahnbelags auf gewöhnlichem Nähragar nicht gedeihen, sollte auch aus Sicherheitsgründen darauf verzichtet werden, diese Bakterien zu züchten.

Herstellung von Nähragarplatten

Für die meisten bakteriologischen Experimente benötigt man sterilen Nähragar, der den Boden einer Petrischale bedeckt. Zu ihrer Herstellung enthält der Gerätekit sterile Einwegpetrischalen sowie sterilen Nähragar.

Zur Verflüssigung der Nährbodenmasse erwärmen Sie den Flascheninhalt im siedenden Wasserbad. Am einfachsten eignet sich dafür ein wassergefülltes Becherglas, in das die Nähragarflasche eingestellt wird. Dabei ist folgendes zu beachten: Der Durchmesser des Becherglases sollte nicht zu groß sein, damit die Flasche nicht umkippen kann. Ferner soll die Wasserfüllung höchstens 2/3 der Flaschenhöhe erreichen, damit kochendes Wasser nicht in die Flaschenöffnung gelangen kann. Vor dem Erhitzen lockern Sie den Schraubverschluß der Flasche um ca. ¼ Umdrehung (jedoch Verschluß nicht abnehmen!). Das dickwandige Flaschenglas könnte bei schroffem Temperaturwechsel springen. Es empfiehlt sich daher, die Nähragarflasche in kaltes Wasser zu stellen und dann erst aufzuheizen. Wenn der ganze Flascheninhalt flüssig ist, können Sie mit dem Plattengießen beginnen.

Inzwischen reihen Sie 8 bis 10 Petrischalen entlang einer Tischkante auf. Beachten Sie bitte, dass die Petrischalen steril und daher ohne weitere Maßnahmen sofort verwendungsfähig sind. Die Platten dürfen nicht unnötigerweise geöffnet oder gar mit den Fingern an den Innenseiten berührt werden.

Nun wird die Nähragarflasche mit einem dicken Tuch angefaßt, der Verschluß ganz abgeschraubt und die Flaschenöffnung sicherheitshalber kurz mit der Gas- oder Spiritusflamme abgeflammt. Dann heben Sie den Deckel einer Petrischale einseitig leicht an und gießen aus dem Vorratsgefäß so viel Nähragar ein, dass der Schalenboden damit ca. 3 mm hoch bedeckt ist. Nach dem Erstarren des Agars drehen Sie die Platten um und bewahren sie auf dem Deckel liegend auf.

In der Regel beschlägt sich der Schalendeckel mit Kondenswasser. Dieses kann sich bei Experimenten störend auswirken, wenn es auf den Nährboden tropft. Daher sollten Sie die Platte erst verwenden, wenn das Wasser verdunstet ist (z.B. über Nacht liegen lassen). Sie können aber das Kondenswasser kurz vor dem Gebrauch von dem Plattendeckel wegschütteln. Andererseits läßt sich Kondenswasserbildung weitgehend vermeiden, wenn der verflüssigte Nährboden vor dem Gießen auf etwa 60° C („gut handwarm“) abgekühlt wurde.

Nunmehr besitzen wir sterile Nährböden, die sich für zahlreiche Untersuchungen eignen.

Nun einige Beispiele:

Nachweis von Luftkeimen

Um Luftkeime „einzufangen“ werden einfach die Petrischalen geöffnet und der Nähragar ca. 10 bis 20 Minuten exponiert. Dann legen Sie den Deckel wieder auf und lassen die Platte lichtgeschützt einige Tage bei Zimmertemperatur stehen. Sie werden auf der Nährboden-Oberfläche eine mehr oder weniger große Anzahl von z.T. recht auffällig gefärbten Bakterienkolonien erkennen, die sich deutlich von evtl. vorhandenen Pilzen unterscheiden. Eine Kolonie geht in der Regel aus einem einzigen Bakterium (bzw. Spore) hervor. Dieser Versuch läßt sich leicht in verschiedener Weise modifizieren: Platten an verschiedenen Orten exponieren (z.B. Zimmer, Schulhof, belebte Straße, Wald usw.). Die Zahl der Kolonien gibt einen Hinweis auf die Bakterienbelastung der Luft.

Sie können auch mehrere Platten in gleicher Weise exponieren, jedoch bei verschiedenen Temperaturen bebrüten. Abgesehen von unterschiedlichen Vermehrungsschwierigkeiten ergeben sich auch Unterschiede, die auf verschiedene Temperaturansprüche der Bakterien zurückzuführen sind.

Mit der Impföse ist es leicht möglich, Bakterienproben zu entnehmen und Ausstrichpräparate anzufertigen. Auch Reinkulturen können Sie herstellen.

Untersuchung von Wasserproben

Dafür gibt es zwei Möglichkeiten:

1. Ein Tropfen der Wasserprobe wird auf die Agaroberfläche gebracht und mit Hilfe eines Drigalksi-Spatels gleichmäßig verteilt. Um mit dem Spatel keine zusätzlichen Bakterien einzuschleppen, muß dieser vor Gebrauch abgeflammt werden.
2. In eine leere Petrischale pipettieren Sie 1 ml des zu untersuchenden Wassers und gießen flüssigen handwarmen Nähragar hinzu. Durch vorsichtige, kreisende Bewegungen verteilen Sie den Schaleninhalt gleichmäßig.

In beiden Fällen wird bei Zimmertemperatur „bebrütet“ und nach 24 oder 48 Stunden kontrolliert. Besonders deutlich heben sich die teilweise recht kleinen Kolonien auf einer dunklen Unterlage ab. Die „Kolonienzahl“ läßt Rückschlüsse auf die Wassergüte zu.

Herstellung von Reinkulturen

Eine Reinkultur enthält Bakterien derselben Art.

Meist wird eine einheitlich aussehende Bakterienkolonie, wie sie z.B. auf einer „Luftplatte“ zu finden ist, aus einem Keim hervorgegangen sind und demzufolge nach dem Abimpfen auf frischen Nähragar zu einer Reinkultur führen.

Es kann sich jedoch herausstellen, dass selbst eine makroskopisch einheitlich aussehende Kolonie manchmal aus zwei Bakterienarten besteht. Zur Sicherheit wird man daher eine Vereinzelnung der Bakterienzellen auch bei einheitlich aussehenden Kolonien vornehmen. Erst recht muß eine Auftrennung erfolgen, wenn aus heterogenem Material (wie z.B. aus einem Heuaufguß) einzelne Bakterienstämme herausgezüchtet werden sollen.

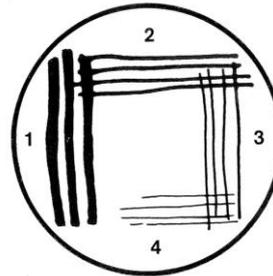
Eine einfache Methode, um Bakteriengemische aufzutrennen, stellt der Verdünnungsausstrich dar:

Mit der Impföse nehmen Sie eine kleine Menge des Bakterienmaterials auf und streichen es in engen Schlangenlinien auf einer Nähragarplatte aus. Je länger die Schlangenlinie, um so mehr werden dem Ende zu die Bakterien einzeln zu liegen kommen. Die sich daraus entwickelnden Kolonien werden als Reinkultur separat weitergezüchtet.



Impföse

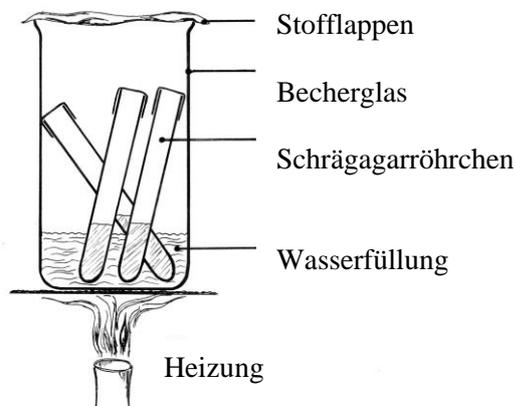
Gute Resultate können Sie auch bei einem Ausstrich nach folgendem Muster erzielen:



1-4: Reihenfolge der Strichführung

Zur längeren Aufbewahrung und für platzsparende Kulturen eignen sich in besonderer Weise Schrägagar-Röhrchen. Dies sind Reagenzgläser mit Kappen- oder Watteverschluß, die etwa zu einem Viertel mit Nähragar gefüllt werden. Allerdings bedarf der Nährboden jetzt wieder einer erneuten Sterilisation - entweder im Dampftopf oder Drucktopf (Autoklav).

Dampftopf: Großes Becherglas (1 Liter, hohe Form) etwa 3 - 5 cm hoch mit Wasser füllen, Agarröhrchen einstellen, Wasserfüllung zum Kochen erhitzen. Um eine hohe Dampfsättigung zu erzielen, decken Sie das Becherglas mit einem Lappen ab. Wasserbad ca. 20 Minuten kochen lassen. Diesen Vorgang an den folgenden Tagen noch zweimal wiederholen. Zum Schluß lassen sie den Agar in Schräglage erstarren und impfen dann die Bakterien in Schlangenlinien ab.



Bei der Auswertung der Versuche sollte bedacht werden, dass selbst reines Quellwasser - im Gegensatz zu entkeimtem Wasser - stets eine Anzahl sogenannter „Wasserkeime“ enthält. Eine geringe Bakterienzahl könnte also unter Umständen sogar eine Art Qualitätsbeweis darstellen.

Antibiotikatest

Mit der Impföse übertragen Sie auf die Nährbodenoberfläche eine Bakterienprobe. Als Testbakterium ist z.B. der Heubazillus (*Bacillus subtilis*) geeignet. Streichen Sie dann mit dem Drigalski-Spatel die Bakterien gleichmäßig über den gesamten Nährboden aus („plattieren“). Legen Sie nun ein oder mehrere verschiedene Testblättchen mit unterschiedlichen Substanzen in der Mitte des Nährbodens auf. Schon am nächsten Tag erkennen Sie rings um diese Anhänge eine bakterienfreie Zone. Die Größe des Hemmhofes gibt Aufschluß über die Wirksamkeit eines Antibiotikums bzw. über die Empfindlichkeit des Testkeims. Je nach Art des verwendeten Testbakteriums fallen demnach die Ergebnisse unterschiedlich aus.

Antibiotika-Testblättchen: Diese finden in der Human- und Tiermedizin Verwendung, um die Wirksamkeit der Antibiotika auf bestimmte Krankheitserreger beurteilen zu können. Auf den einzelnen Blättchen sind verschiedene Antibiotika aufgetragen. Allerdings sind die verwendeten Antibiotikamengen unterschiedlich. Sie entsprechen den bei üblicher Therapie in vivo erzielbaren Blut- und Gewebespiegeln.

Haltbarkeit: Bei trockener und kühler Aufbewahrung (Kühlschrank) bleibt die volle Wirksamkeit 4 Wochen erhalten. Zwar lässt dann die Wirkung allmählich nach, **wobei jedoch eine Verwendung für den Schulgebrauch noch monatelang möglich ist.**

Hinweis: da bei diesem Versuch Resistenzkeime angereichert werden können, muß bei der Beseitigung der Platte mit Sorgfalt vorgegangen werden (Formalinlösung zur Desinfektion zugeben!).

Es ist während des Kurses von außerordentlichem Interesse, auch andere Stoffe auf ihre bakterizide Wirksamkeit zu testen. Tränken Sie zu diesem Zweck kleine Filtrierpapierstücke (markiert) mit verschiedenen Desinfektionsmitteln oder mit Schwermetallsalzen (z.B. Kupfer- oder Quecksilbersalze). Legen Sie diese Papierschnitzel feucht oder getrocknet auf die Kultur und protokollieren Sie die Ergebnisse.

Bakterien auf der Haut. Wascheffekt.

Unterteilen Sie eine Nährbodenplatte in zwei Hälften durch einen Markierungsstrich am Schalenboden. Auf die eine Hälfte drücken Sie den ungewaschenen Daumen ab. Dann waschen Sie die Hand gründlich mit Seife, spülen unter fließendem Wasser ab und drücken denselben Daumen noch feucht (nicht abgetrocknet!) auf die andere Nährbodenhälfte. Die Bakterien entwickeln sich bereits bei Zimmertemperatur, rascher geht es bei 30° C.

Nach wenigen Tagen erhalten Sie ein verblüffendes Resultat: Eigentlich könnte man annehmen, dass sich vom Abdruck des ungewaschenen Daumens mehr Bakterien entwickeln, als vom gewaschenen. Das Umgekehrte ist aber der Fall.

Erklärung: Die Seife reinigt „porentief“ und spült die Bakterien aus den Hautleisten. Trocknet man jetzt die gewaschene Haut ab, so bleibt die Masse der Bakterien am Handtuch hängen (Problematik des Gemeinschaftshandtuchs!)

Die Abdruckmethode eignet sich auch, um orientierende Hinweise auf den Bakterienbesatz der Oberfläche verschiedener Gegenstände zu erhalten. Interessant sind z.B. entsprechende Untersuchungen an Handtüchern, Geldscheinen, Münzen, Türklinken usw.

Hinweis: Aus Sicherheitsgründen sollten menschliche Hautbakterien nicht weitergezüchtet werden. **Kulturen nach Gebrauch zuverlässig vernichten.**

Wirkung ultravioletter Strahlung. UV-Strahlung kann Bakterien abtöten. Sie wird deshalb auch zur Sterilisation verwendet. Als Strahlenquelle für einfache Experimente dient eine UV-Laborlampe, ersatzweise ein UV-Bestrahlungsgerät.

Durchführung: Man plattiert auf der Nährbodenoberfläche eine Bakterienprobe aus. (Drigalski-Spatel verwenden). Die Bakterien sollten einer Kultur entstammen, die erst ca. 1 - 2 Tage alt ist. Selbst Kulturen von Sporenbildnern, wie beispielsweise *Bacillus subtilis*, befinden sich zu dieser Zeit noch in der UV-empfindlichen vegetativen Phase.

Die offene Petrischale wird mit einer Pappscheibe abgedeckt, in die ein Fenster (z.B. Kreuzform) eingeschnitten worden ist. Die so abgedeckte Kultur wird etwa 20 Minuten der Strahlung ausgesetzt, anschließend mit dem Deckel verschlossen und 1 bis 2 Tage bebrütet (Zimmertemperatur).

Zur Prüfung der UV-Durchlässigkeit von Glas decken Sie das Schablonenfenster mit einer Glasplatte (Objektträger) ab.

Ergebnis: Nicht sporenbildende Bakterien sowie Sporenbildner im vegetativen Zustand werden relativ rasch abgetötet („Fenster“ in der Pappabdeckung). Da sich unter der Glasabdeckung ein ungestörter Bakterienrasen entwickelt, kann gefolgert werden, dass Glas das UV-Licht absorbiert.

Vervielfältigung von Kolonie-Verteilungsmustern auf andere Nährböden

Beachten Sie bitte dabei, dass die verwendeten Petrischalen einen \varnothing von mindestens 80 mm haben.

Mit dem Replika-Stempel (Art. 355.400) werden Bakterienkulturen in ihren Verteilungsmustern auf andere Nährböden übertragen (dupliziert).

Auf diese Weise können Sie vielfältige Tests mit den gleichen, aber duplizierten Bakterienstämmen durchführen. Zum Beispiel, in dem Sie unterschiedliche Wirkstoffe auf die Stämme einwirken lassen oder durch Änderung des pH-Wertes der Nährböden. Bei der Verwendung eines Agar-Nährbodens, dem einzelne Aminosäuren fehlen, wird eine veränderte Wachstumsrate feststellbar sein, Mangelmutanten könnten gefunden werden u.a.

Gebrauch: Um eine Kolonieplatte zu duplizieren, fixiert man ein steriles Tuch mit dem Haltering auf dem Stempel. Stempel und Haltering vorher mit Ethanol sterilisieren, ebenso die Pinzette, mit der die Tücher vorsichtig aus der Alufolie entnommen und mit der weichen Seite nach oben auf den Replikatorblock gelegt werden. Mit dem Haltering wird das Tuch auf dem Block fixiert. Anschließend wird die Kolonieplatte mit der Oberseite leicht auf das gespannte Transfertuch gedrückt. Mit einer weiteren Petrischale, in der sich ein geeigneter Nährboden befindet, wird dieser Vorgang wiederholt. So erzeugt man einen Abdruck (Replikat) der ursprünglichen Kolonieranordnung auf der neuen Platte.

Herstellung von Ausstrichpräparaten

Voraussetzung für ein einwandfreies Gelingen ist die Benutzung fettfreier Objektträger. Das Einfetten geschieht z.B. durch Abwischen mit Benzin oder Alkohol. Als recht geeignet erweist sich auch einfaches Spülen mit Wasser, dem etwas Spülmittel zugesetzt wurde. Die Objektträger stellt man senkrecht und läßt sie abtropfen und an der Luft trocknen - nicht trocken wischen! Es bildet sich ein Spülmittelfilm, der das Ausstreichen erleichtert.

Nun verfahren Sie in folgender Weise:

Einen kleinen Wassertropfen auf den Objektträger aufbringen.

Bakterien mit der Impföse im Wassertropfen aufschwemmen.

Bakterienaufschwemmung mit der waagrecht gehaltenen Impföse ausstreichen.

Ausstriche waagrecht flach legen und an der Luft trocken lassen.

Fixieren:

Dazu ziehen Sie den Objektträger, mit dem Ausstrich nach unten, 3 x - jeweils etwa eine Sekunde lang - durch eine nichtrußende Flamme (z.B. Sparflamme des Bunsenbrenners, Spiritusflamme usw.). Die Bakterien werden auf diese Weise abgetötet und außerdem am Objektträger befestigt.

Färben:

Ausstrich waagrecht auf saugfähige Unterlage (Filterpapier, Zeitungspapier usw.) legen und Farbstofflösung auftropfen.

Bei Verwendung von **Methylenblaulösung** läßt man die Farbe ca. 5 Minuten lang einwirken. Dann wird mit Leitungswasser abgespült. Den gefärbten Ausstrich läßt man anschließend an der Luft trocknen. Man kann Spülmittelreste auch durch vorsichtiges (!) Auflegen eines Filterpapiers absaugen. Nicht abwischen! Jetzt ist das Präparat fertig zur mikroskopischen Untersuchung. Das Auflegen eines Deckgläschens erübrigt sich. Lichtgeschützt aufbewahrt sind solche Präparate jahrelang haltbar.

Dauerpräparat:

Auf den gut getrockneten Ausstrich gibt man einen Tropfen Einschlußmittel und legt ein Deckglas auf - fertig.