



Brandenburgische
Technische Universität
Cottbus

Brandenburgische Technische Universität Cottbus
Fakultät 4
Lehrstuhl Altlasten
Prof. Dr.-Ing. Wolfgang Spyra

Modul: Allgemeine Mikrobiologie 42- 2- 13

Skript / Studierhilfe

Einführung

Mikrobiologisches Praktikum

Wintersemester 2011/ 2012

Unter Mitwirkung von:

Prof. Dr.-Ing. Wolfgang Spyra
CA Dr. Werner Bär
Dipl.-Ing. Heiko Pilz
Dipl.-Ing. (FH) Viola Baumgärtner
cand.-Ing. Mareen Pielock (stud. HK)

Inhalt

1	ORGANISATORISCHES UND TEILNAHMEVORAUSSETZUNGEN	3
2	TERMINÜBERSICHT	4
3	BEWERTUNG DES PRAKTIKUMS IM RAHMEN DES MODULS ALLGEMEINE MIKROBIOLOGIE.....	5
4	ARBEITSSCHUTZBELEHRUNG IM MIKROBIOLOGISCHEN LABOR	6
4.1	Allgemeine Laborordnung.....	7
4.2	Laborordnung für das Arbeiten in der Mikrobiologie	9
5	GRUNDLAGEN	13
5.1	Einführung	13
5.2	Morphologie von Mikroorganismen.....	16
5.3	Stoff- und Energiewechsel von Mikroorganismen	17
5.4	Mikroorganismen in der Umwelt	17
6	PRAKTIKUM	19
6.1	Ziel des Praktikums	19
6.2	Praktikumsvorbereitung	19
6.3	Erster Praktikumstag - Isolierung von Mikroorganismen.....	20
6.4	Zweiter Praktikumstag - Herstellung eines fraktionierten Ausstrichs	22
6.5	Dritter Praktikumstag - Erstellen eines Matrix-Testes	25
7	MUSTERPROTOKOLL- WISSENSCHAFTLICHES ARBEITEN	28
	QUELLENVERZEICHNIS.....	31

Die Verwendung des Skriptes dient zur Vorbereitung des mikrobiologischen Praktikums und stellt die Aufforderung an die Studentinnen und Studenten dar, sich vertiefend und kritisch mit dem angesprochenen Fachwissen auseinander zu setzen. Die Inhalte des Skriptes dürfen nicht zitiert, veröffentlicht oder an Dritte weitergereicht werden. Zum Ausarbeiten der Protokolle beziehen Sie sich entsprechend der guten Regeln für wissenschaftliches Arbeiten bitte auf einschlägige Literatur. Diese ist zu zitieren.

1 Organisatorisches und Teilnahmevoraussetzungen

Das Mikrobiologische Praktikum findet im Rahmen des Moduls Allgemeine Mikrobiologie (42-2-13) statt. Für das erfolgreich abgeschlossene Praktikum gibt es für das gesamte Modul Allgemeine Mikrobiologie 6 CP. Das Praktikum ist mit 1 SWS angesetzt. Die insgesamt 15 SWS setzen sich aus verschiedenen Veranstaltungen zusammen.

- Einführungsveranstaltung
- Führung durch die mikrobiologische Abteilung des CTK unter der Leitung von Chefarzt (CA) Dr. Bär
- Probenahme von Wasser- und Bodenproben im offenen Gelände
- 1. Praktikumstag
- 2. Praktikumstag
- 3. Praktikumstag
- Selbstständiges Erstellen eines Protokolls

Die Studenten sind verpflichtet an allen Veranstaltungen teilzunehmen. Zum Ende jeder Veranstaltung haben sich die Studenten in Anwesenheitslisten einzutragen. Ein Fehlen kann nur durch Krankheit entschuldigt werden bzw. es muss die Teilleistung an einem anderen Tag absolviert werden.

Um an dem Mikrobiologischen Praktikum teilnehmen zu können und somit das Modul erfolgreich abschließen zu können, ist das Bestehen der **Klausur zur Vorlesung Mikrobiologie** (VL 42-2-13) notwendig. Des Weiteren ist das Bestehen eines **Wissenstestes** als Teilnahmequalifikation erforderlich. Dadurch kann ein selbstständiges und sicheres Arbeiten der Studenten im Labor ermöglicht werden. Ein fließender und zügiger Arbeitsablauf im Labor soll so gesichert werden.

Die Anzahl der Praktikumsplätze ist auf 100 Studenten begrenzt. Gegebenenfalls entscheidet die erreichte Punktzahl des Wissenstests über die Teilnahme.

Ansprechpartner vor/während/nach dem Praktikum:

Prof. Dr.-Ing. Wolfgang Spyra

Dipl.-Ing. Heiko Pilz

2 Terminübersicht

Das Praktikum beinhaltet mehrere Teilleistungen. Die Termine sind wie in Folge gestaffelt:

Einführungsveranstaltung:	10.10.2011 – 15:30-17:00 Uhr, Audimax 2
Wissenstest:	14.10.2011 – 11:30-13:00 Uhr, HS 1
Bekanntgabe der Ergebnisse	24.10.2011
Eintragen in die Praktikumsgruppen:	24.10.2011 – 28.10.2011
Führung durch die Mikrobiologische Abteilung des CTK unter der Leitung von CA Dr. Bär (Probenahmen):	07.11.2011 bis 11.11.2011
1. Praktikumstag:	14.11.2011 bis 18.11.2011
2. Praktikumstag:	21.11.2011 bis 25.11.2011
3. Praktikumstag:	28.11.2011 bis 02.12.2011
Abgabe der Protokolle:	12.12.2011 bis 16.12.2011
Protokollrückgabe:	30.01.2012 – 15:30-17:00 Uhr, Audimax 2

Beim Eintragen in die Praktikumslisten bestimmt jeder Student aus den vom Lehrstuhl vorgeschlagenen Möglichkeiten seine Gruppe bzw. Block. Die drei Praktikumstage bestehen aus jeweils einem Unterrichtsblock. Jeder Student behält diesen Unterrichtsblock das gesamte Praktikum über bei. Ein Tauschen der Blöcke während des Praktikums ist nicht möglich.

Die genauen einzelnen Block-Termine werden mit dem aktuellen Vorlesungsverzeichnis für das Wintersemester 2011/2012 bekannt gegeben.

3 Bewertung des Praktikums im Rahmen des Moduls

Allgemeine Mikrobiologie

Das Mikrobiologische Praktikum stellt den praktischen Teil des Moduls Allgemeine Mikrobiologie dar. Für das erfolgreiche Abschließen des Praktikums und Abschließen des Moduls erhalten die Studenten gemäß der Studienordnung insgesamt 6 CP.

Die Klausurnote der Vorlesung stellt die Modulnote dar. Diese wird nach dem erfolgreichen Abschluss des Praktikums an das zuständige Studierendensekretariat übertragen.

Je Veranstaltungsblock des Praktikums werden insgesamt 12 Studenten betreut. Die Studenten werden während des Praktikums in zwei 6er Gruppen eingeteilt. Diese Gruppen bleiben das gesamte Praktikum über bestehen. Die Studenten sollen in der Gruppe (3 Personen) ein wissenschaftliches Praktikumsprotokoll anfertigen. Von der Praktikumsleitung werden die Protokoll-Gruppen am ersten Praktikumstag festgelegt. Das Protokoll soll im formellen und inhaltlichen Aufbau den wissenschaftlichen Standards entsprechen (siehe Anhang: Musterprotokoll). Den Studenten soll so die Möglichkeit gegeben werden, Übung im Verfassen solcher Protokolle zu erlangen.

Da das Praktikumsprotokoll nicht bewertet wird, sind die Kontrollstandards schärfer. Sie sollten daher das Protokoll ordentlich und gewissenhaft anfertigen. Wenn das Protokoll nicht den Standards entspricht oder inhaltlich Defizite aufweist, wird es an die Gruppe zurückgegeben. Die Gruppe hat dann die Möglichkeit gemäß den angegebenen Terminen das überarbeitete Protokoll erneut einzureichen. Bei nicht Erbringen der Leistung muss das Praktikum im kommenden Jahr wiederholt werden. Das gilt bei Gruppenprotokollen für alle Teilnehmer der Gruppe.

Bei Fragen bezüglich des Praktikums und des Protokolls sind Besprechungen mit den Verantwortlichen möglich.

4 Arbeitsschutzbelehrung im Mikrobiologischen Labor

Der Umgang mit Mikroorganismen erfolgt in Laboren, die dafür geeignet sind. Im Rahmen des Praktikums wird mit Mikroorganismen gearbeitet, die als harmlos bis verträglich gelten. In individuellen Fällen können selbst als verträglich geltende Mikroorganismen zu Körperreaktionen führen. Wer Bedenken oder Erkenntnisse über Unverträglichkeiten für spezielle Mikroorganismen erhält auf Anfrage eine Liste der im Praktikum verwendeten Organismen.

4.1 Allgemeine Laborordnung

Laborordnung im Lehrstuhl Altlasten / Fakultät Umweltwissenschaften und Verfahrenstechnik
(nach § 20 der Gefahrstoffverordnung)

Beim Umgang mit gasförmigen, flüssigen oder festen Gefahrstoffen sowie mit solchen, die als Stäube auftreten, sind besondere Verhaltensregeln und die Einhaltung von bestimmten Schutzvorrichtungen zu beachten.

Der Umgang mit Stoffen, deren Unbedenklichkeit nicht zweifelsfrei feststeht, hat so zu erfolgen wie der mit Gefahrstoffen.

Gefahrstoffe sind Stoffe oder Zubereitungen, die

sehr giftig (T+)	ätzend (C)	brandfördernd (O)
krebserzeugend	giftig (T)	reizend (Xi)
hochentzündlich (F+)	fruchtschädigend	mindergiftig (Xn)
explosionsgefährlich (E)	leichtentzündlich (F)	erbgutverändernd

sind oder aus denen bei der Verwendung entsprechende Stoffe entstehen oder freigesetzt werden können.

Bei allen Arbeiten haben Sie die hier aufgeführten Regelungen einzuhalten!

Bemerkung:

Am 20. Januar 2009 ist das GHS (Global Harmonisiertes System) in Kraft getreten. Das heißt, dass zurzeit eine Gegenüberstellung alte/neue Kennzeichnung möglich ist. Die R- Sätze werden sich in Gefahrenhinweise (H-Sätze) und die S-Sätze in Sicherheitshinweise (P-Sätze) umbenennen, wobei die Nummern nicht die gleichen Inhalte aufweisen werden. Des Weiteren werden sich die Piktogramme in Gesundheits-, Umweltgefahren sowie Physikalische Gefahren ändern. (www.gischem.de)

1. Grundregeln

- 1.1. Vor dem Umgang mit Gefahrstoffen ist durch den Benutzer anhand des Anhangs VI zur Gefahrstoffverordnung die Risikogruppe, zu der der Stoff gehört, zu ermitteln. Symbole auf der Verpackung der zu verwendeten Chemikalien beachten und zum besseren Verständnis der S- und R-Sätze den Aushang im Labor zu Rate ziehen.

Erläuterung: R-Sätze = Gefahrhinweise
S-Sätze = Sicherheitsratschläge
z.B. S 24 = Berührung mit der Haut vermeiden!
R 27 = Sehr giftig bei Berührung mit der Haut !

Die in den Sicherheitsratschlägen vorgesehenen Arbeitsschutzmittel (Schutzbrille, Gesichtsschutz und geeignete Handschuhe) sind zu benutzen.

Im Labor muss ständig eine Schutzbrille getragen werden; Brillenträger müssen eine optisch korrigierte Schutzbrille oder eine Überbrille nach W DIN 2 über der eigenen Brille tragen; besonders bei allen gefährlichen Arbeiten im Labor , z.B. beim Umgang mit Säuren und Laugen, Glasbearbeitung sowie Herstellen von Lösungen.

Es gilt: Erst das Wasser, dann die Säure!

Hinweis: Zur Einstufung wassergefährdende Stoffe in Klassen
WGK 0 = nicht wassergefährdender Stoff
WGK 1 = schwach wassergefährdender Stoff
WGK 2 = wassergefährdender Stoff
WGK 3 = stark wassergefährdender Stoff

Bitte vorher in der Chemikalienliste Informationen einholen! Liegt im Labor aus.

- 1.2. Gefahrstoffe dürfen nicht in Behältnisse aufbewahrt oder gelagert werden, die zu Verwechslungen mit Lebensmitteln führen können.
1.3. Sehr giftige und giftige Stoffe sind von Sachkundigen unter Verschluss aufzubewahren.

- 1.4. Das Essen, Trinken und Rauchen im Labor ist untersagt.
- 1.5. Im Labor ist Arbeitsschutzbekleidung (Baumwollkittel mit langen Ärmeln) sowie festes Schuhwerk zu tragen.
- 1.6. Sämtliche Gefäße sind mit Namen des Stoffes und den Gefahrstoffsymbolen zu kennzeichnen; sowie Datum der Herstellung.
- 1.7. Das Ansaugen gefährlicher Stoffe mit dem Mund ist verboten. Zum Ansaugen sind Sicherheitspipetten oder Saugpumpen zu verwenden.

2. Allgemeine Schutz- und Sicherheitseinrichtungen

- 2.1. Die Frontscheibe der Abzüge sind zu schließen; die Funktionsfähigkeit der Abzüge ist zu prüfen (z.B. durch einen Papierstreifen oder Wollfaden) Während der Abschaltzeiten dürfen Geräte, die einen Abzug benötigen nicht bedient werden.
- 2.2. Der Standort und die Funktionsweise der Hauptabsperroorgane sind in einer Unterweisung zu erläutern.
 Erdgas, Argon, Stickstoff, liegen außerhalb des Labors (auf dem Gang im Schaltschrank)
 Druckluft und Wasser liegen außerhalb des Labors (auf dem Gang im Schaltschrank)
 Elektrik roter Knopf im Labor
- 2.3. Feuerlöscher müssen nach jeder Benutzung zur Wiederbefüllung bei der entsprechenden Stelle abgegeben werden (Standort: auf dem Gang unter dem großen Erste-Hilfe-Kasten).
- 2.4. Körperduschen (über der Tür) und Augenduschen (am Waschbecken) sind durch das Laborpersonal monatlich auf ihre Funktionsfähigkeit zu prüfen.
- 2.5. Erste-Hilfe-Kästen (orangefarbig) befinden sich auf dem Gang vor dem Labor. Er ist ausgestattet mit Löschdecke, Verbandkasten sowie Verbandsbuch. Jede Entnahme ist einzutragen und dem Verantwortlichen zu melden.

3. Abfallentsorgung

- 3.1. Die experimentellen Arbeiten sind so durchzuführen, dass möglichst geringe Mengen gefährlicher Abfälle entstehen.
- 3.2. Anfallende Reststoffe/-boden müssen in den dafür vorgesehenen Behälter gesammelt und nach Beendigung der Arbeiten entsprechend entsorgt werden. Jeder ist für seine anfallende Reststoffe selbst verantwortlich!!!
- 3.3. Nicht weiterverwendbare Reststoffe, die aufgrund ihrer Eigenschaften als Sonderabfall einzustufen sind, müssen gemäß den Richtlinien entsorgt werden. Eventuelle Fragen beantwortet der Verantwortliche!
- 3.4. Kleine Mengen Säuren und Laugen können mit reichlich Wasser in den Waschbeckenabfluss im Labor entsorgt werden ansonsten Behälter „Organischer Abfall“ bzw. „Anorganischer Abfall“ verwenden.
- 3.5. Schwermetalle- und Lösungsmittelabfälle sind an separaten Orten (z.B. Abzug) in gekennzeichneten Flaschen zu sammeln.
- 3.6. Restmüll, Plaste und Glasabfälle sind getrennt in den dafür vorgesehenen Behälter zu entsorgen.

4. Verhalten in Gefahrensituationen

Bei allen gefährlichen Situationen, z.B. Feuer, Austreten brennbarer oder giftiger Gase, Auslaufen von gefährlichen Flüssigkeiten, sind folgende Anweisungen zu beachten:

- 4.1. Ruhe bewahren und überstürztes, unüberlegtes Handeln vermeiden!
- 4.2. Gefährdete Personen warnen, ggf. zum Verlassen der Räume auffordern.
- 4.3. Medienabspernung bedienen.
- 4.4. Laborleitung, Assistent und/oder Lehrstuhlinhaber benachrichtigen (Rufnummern neben dem Telefon).
- 4.5. Bei Unfällen mit Gefahrstoffen, die Langzeitschäden auslösen können oder die zu Unwohlsein oder zu Hautreaktionen geführt haben, ist ein Arzt aufzusuchen. Die Labor- und Praktikumsleitung ist zu informieren. Eine Unfallmeldung ist möglichst schnell an den Sicherheitsingenieur zu geben.

4.2 Laborordnung für das Arbeiten in der Mikrobiologie

Im Lehrstuhl Altlasten / Fakultät Umweltwissenschaften und Verfahrenstechnik

1. Einleitung

Der Umgang mit Mikroorganismen und anderen „biologischen Arbeitsstoffe“ wird seit dem 1. April 1999 durch die Biostoffverordnung geregelt.

Nach ihrer Gefährlichkeit für Mensch und Tier ordnet man die Mikroorganismen und Viren vier Risikogruppen zu. Je nach Gefährdungspotential der vier Risikogruppen entsprechen sie vier Sicherheits- und Schutzstufen S1 bis S4, wonach sich die Bauweise und die Ausstattung der Labore richten.

Die Risikogruppe 1 bedeutet kein oder nur sehr geringes Risiko für Mensch und Tier.

Für Arbeiten mit bestimmten hochpathogenen Agenzien, wie z.B. hoch menschenpathogenen, onkogenen oder in vitro neukombinierten Nucleinsäuren aus Säugetiertumoren, sind völlig geschlossene, gasdichte Sicherheitswerkbänke der Sicherheitsklasse 3 mit Handschuhöffnung („glove box“) vorgeschrieben.

Ziel einer sterilen und aseptischen (Asepsis = Gesamtheit aller Maßnahmen zur Verhütung einer mikrobiologischen Kontamination) Arbeitstechnik ist es,

- sterile Nährböden, Lösungen und Geräte sowie Reinkulturen von Mikroorganismen vor dem Eindringen unerwünschter Keime zu schützen,
- die Umwelt, d.h. in erster Linie das Labor und die in ihm tätigen Personen, vor einer Kontamination bzw. Infektion durch die Versuchskulturen zu schützen.

Vorsicht geboten ist bei chemoorganotrophen Mikroorganismen, die aus Abwässern oder anderen Abfall- und Ausscheidungsprodukten von Mensch und Tier sowie aus klinischem Material stammen.

Grundsätzlich gilt: Isolate, die weiterbearbeitet werden sollen, müssen so identifiziert werden, dass man ihr Gefährdungspotential abschätzen und sie der entsprechenden Risikogruppe zuordnen kann.

Eine zusätzliche Gefährdung besteht durch Verletzungen oder durch Auftreten von Aerosolen.

Das Einatmen von Aerosole ist die häufigste Ursache für Laborinfektionen, denn Aerosole können durch Spritzen oder Schäumen bei fast allen mikrobiologischen Tätigkeiten entstehen, z.B. Überimpfen, Ausglühen von Impfösen und -nadeln, Pipettieren, Umfüllen, Suspendieren, Rühren, Schütteln, Belüften, Öffnen von Kulturgefäßen, Zentrifugieren, Gefriertrocknen und Aufschließen von Zellen.

2. Grundregeln des sterilen Arbeitens

= Labor, Arbeitsplatz

- Fenster und Türen des Arbeitsraumes müssen während der Arbeiten geschlossen, Klima- oder Belüftungsanlagen und Ventilatoren abgeschaltet sein. Alle unnötigen Luftturbulenzen, z. B. durch hastige Bewegungen, sind zu vermeiden.
- Der Arbeitsraum muss absolut sauber sein. Seine Flächen (Fußboden, Ablage- und Arbeitsflächen) müssen regelmäßig, möglichst täglich, feucht gereinigt werden; die Arbeitsfläche ist außerdem vor und nach jedem Arbeiten zu desinfizieren.
Auch Brutschränke, Kühl- und Tiefkühlchränke müssen in regelmäßigen Abständen (z.B. monatlich) gereinigt und nach Kontamination desinfiziert werden.
- Labor und Arbeitsplatz müssen aufgeräumt sein. Am Arbeitsplatz muss genügend Bewegungsfreiheit gewährleistet sein.
- Am Sterilarbeitsplatz sollte weder mikroskopiert noch protokolliert werden.

= Person

- Bei allen Arbeiten ist ein Knie bedeckender Kittel mit langen Ärmeln zutragen. Er sollte häufig bei 95°C gewaschen werden; im Falle einer Kontamination mit Krankheitserregern ist er vorher zu Autoklavieren.
- Abgelegte Kleidungsstücke (z.B. Mäntel, Jacken, Schirme) dürfen nicht in den Arbeitsraum mitgenommen werden.
- Vor und nach jedem Arbeiten mit lebenden Materialien, nach einer Kontamination und vor dem Verlassen des Labors müssen die Hände gründlich gewaschen und möglichst auch desinfiziert werden. Während des Arbeitens vermeide man es, mit den Händen Gesicht und Haare zu berühren.

- Während des Arbeitens ist Sprechen, Husten oder Niesen zu vermeiden. Bei einer Erkältung sollte man eine Gesichtsmaske tragen.
- Im Arbeitsraum darf nicht gegessen, getrunken oder geraucht werden. Es dürfen keine Nahrungsmittel in ihm aufbewahrt werden.

= Umgang mit Geräten und Mikroorganismen

- Man sollte zügig, aber nicht hastig arbeiten und unnötige Pausen und Unterbrechungen vermeiden. Das Pipetieren mit dem Mund ist untersagt; es sind stets Pipetierhilfen zu verwenden. Diese gilt auch für wattegestopfte Pipetten, da auch sie keinen Schutz gegen eine Infektion bieten.
- Injektionsspritzen mit spitzen Kanülen sollte wegen der Verletzungsgefahr möglichst nicht benutzt werden.
- Die Bildung von Aerosolen ist möglichst zu vermeiden.
- Sterile Teile und Geräte (z.B. Stopfen, Pipetten, Impfgeräte) dürfen nur am äußersten Ende angefasst werden. Es ist darauf zu achten, dass sie nicht mit unsterilen Gegenständen (Kleidung, Arbeitsfläche) in Berührung kommen. Solange die Geräte weiterverwendet werden sollen, dürfen sie nicht abgelegt werden.
- Kulturgefäße fasst man beim Öffnen möglichst weit unten, den Verschluss möglichst weit oben, an. Die Gefäße dürfen nur so lange wie unbedingt nötig geöffnet werden; sie sind dabei schräg zu halten. Kulturgefäße darf man niemals offen lassen.
- Besondere Vorsicht ist bei versporteten Schimmelpilzkulturen erforderlich, um ein Einatmen der Sporen und eine Kontamination der Raumluft zu verhindern.
- Kulturen und kontaminiertes Material oder Geräte dürfen nicht mit bloßen Händen berührt werden.
- Nicht mehr benötigte Materialien müssen umgehend beseitigt werden.

Für den Umgang mit unbekanntem sowie Mikroorganismen der Risikogruppe 2 (z.B. Pseudomonas, Leptospira, Streptococcus) kommen folgende Schutzmaßnahmen der Sicherheitsstufe S2 hinzu:

- Der Arbeitsraum sowie die Sicherheitswerkbank, Kühlschränke, Behälter, Kulturen und Geräte, von denen eine Infektionsgefahr ausgeht, sind mit dem Warnzeichen „Biogefährdung“ auffällig zu kennzeichnen.
- Alle Flächen des Arbeitsraumes müssen täglich desinfiziert werden.
- Beim Arbeiten sind Schutzhandschuhe aus Latex zu tragen
- Die Schutzkleidung darf nicht außerhalb des Sterilbereichs getragen werden.
- Arbeiten müssen in einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 durchgeführt werden.
- Zum Ausglühen der Impföse oder -nadel verwende man einen Brenner, oder man arbeite mit vorsterilisierten Einmalimpfgeräten aus Kunststoff.
- Man verwende ganz allgemein vorzugsweise Einwegartikel.
- Kontaminierte Geräte und Gefäße sowie mikroskopische Präparate werden sofort nach Gebrauch in ein Desinfektionsbad eingelegt und anschließend - wenn es das Material zulässt- autoklaviert. Erst danach werden sie gereinigt oder entsorgt. Entsprechendes gilt für kontaminierte Kleidung.
- Bei einem Hautkontakt ist die betroffene Hautfläche sofort zu desinfizieren; dazu müssen an den Waschbecken Dosierspender mit einem Händedesinfektionsmittel zur Verfügung stehen.
- Wird Mikroorganismensuspension verschüttet oder durch Glasbruch freigesetzt, so muß der kontaminierte Bereich sofort gesperrt und desinfiziert werden.

- Abfälle, kontaminierte Einwegartikel und Kulturen in Einweggefäßen autoklaviert man in besonderen, nur locker zugeknöteten Vernichtungsbeuteln aus hochschmelzendem Kunststoff in einem Einsatz zum Schutz des Auslaufens. Anschließend kann man die Beutel samt Inhalt dem Müll zuführen.
- Die Schutz- und Sammelcontainer für Probengefäße sind mit dem Symbol für Biogefährdung gemäß Anhang 1 BioStoffV zu kennzeichnen. Sie müssen so beschaffen sein, dass sie unter normalen Transportbedingungen nicht zerstört werden können.



Abb. 1: Warnzeichen „Biogefährdung“ zur Warnung vor infektiösen Agenzien (schwarzes Symbol auf gelben Grund)

3. Erste Hilfe bei Laborinfektionen

Grundsätzlich gilt: Hilfe durch Laien, auch durch ausgebildete Ersthelfer, ist kein Ersatz für ärztliche Hilfe, sondern nur Notbehelf, bis der Arzt eingreift!

Folgende Erste-Hilfe-Maßnahmen sind zu ergreifen:

Mund

Infektiöses (oder möglicherweise infektiöses) Material ist in den Mund gelangt, aber noch nicht geschluckt worden:

- Nicht Schlucken! Sofort ausspucken!
- Anschließend den Mund wiederholt gründlich mit viel Wasser spülen, und mit Wasser gurgeln. Jedes Schlucken vermeiden; auch den Speichel ausspucken!
- Sofort den Arzt aufsuchen.

Infektiöses Material ist geschluckt worden:

- Kurz und kräftig den Mund spülen und gurgeln wie oben beschrieben.
- Sofort zum Arzt.

Nase

Infektiöses Material ist in die Nase gelangt:

- Sofort mehrmals kräftig in Zellstoff ausschnauben; dabei die Luft nur durch den Mund kräftig durch die Nase ausstoßen. Auch weiterhin durch den Mund einatmen, und durch Nase ausatmen!
- Da der Rachenraum ebenfalls gefährdet ist, anschließend die für den Mund (nicht geschlucktes Material) angegebenen Maßnahmen durchführen.
- Sofort Hals-Nasen-Ohrenarzt aufsuchen.

Auge

Infektiöses Material ist ins Auge gelangt:

- Nicht reiben!
- Mit einer am Wassernetz fest installierten Augendusche beide Augen spülen.
- Da das infektiöse Material durch den Tränenkanal in Nase und Mund gelangen kann, anschließend die für den Mund (nicht geschlucktes Material) angegebenen Maßnahmen durchführen.
- Sofort Augenarzt aufsuchen.

Haut

Infektiöses Material ist in eine Hautwunde gelangt, oder die Haut ist durch kontaminierte Instrumente oder Geräte verletzt worden:

- Wunde ausbluten lassen. Schlecht blutende Stichverletzungen mit einer Vakuumpumpe aussaugen.
- Wunde mit einem keimfreien Verband abdecken.
- Sofort den Arzt aufsuchen.

Erste-Hilfe-Kasten (orange) befindet sich auf dem Gang vor dem Labor. Er ist ausgestattet mit Löschdecken, Verbandkasten sowie Verbandsbuch. Darunter angebracht sind die Feuerlöscher.

4. Hinweise

- Händedesinfektion: Sterillium- Hände - Desinfektionsmittel 3 ml - 3 s
- Arbeitsplatzdesinfektion: Pursept - A / Sprühdesinfektion 60 s
- Gerätedesinfektion: Helipur H plus N 2,5 % 15 min
1,5 % 60 min

5. Grundsätze der Ersten – Hilfe – Leistung

- 5.1.** Bei allen Hilfeleistungen auf die eigene Sicherheit achten!
So schnell wie möglich Notruf tätigen.
- | | |
|------------------------|---|
| Wo geschah der Unfall: | Ortsangabe |
| Was geschah: | Feuer, Verätzung, Sturz, usw. |
| Welche Verletzungen: | Art und Ort am Körper |
| Wie viele Verletzte: | Anzahl |
| Warten: | niemals auflegen, bevor die Rettungsstelle das Gespräch beendet hat; es können wichtige Fragen zu beantworten sein. |
- 5.2.** Personen aus dem Gefahrenkreis bergen und an die frische Luft bringen.
5.3. Kleiderbrände löschen.
5.4. Notduschen (über der Labortür nutzen); vorher mit Chemikalien verschmutzte Kleidung entfernen.
5.5. Bei Augenverletzungen Augendusche (am Waschbecken) verwenden.
5.6. Blutungen stillen. Verbände anlegen, dabei Einmalhandschuhe benutzen.
Verletzte Personen nicht allein lassen.
5.7. Informationen für den Arzt sicherstellen.

6. Meldepflicht

Alle Unfälle sind unverzüglich dem Verantwortlichen zu melden. Besteht die Gefahr der Kontamination bei Verletzungen ist sofort der Arzt zu konsultieren.

IM NOTFALL

Feuerwehr	0-112
Notarzt	0-112

Notrufe der BTU

Sicherheitsingenieur	2153
Betriebsarzt Fr. Dipl.-Med. Schupp	0-78 09 614
Betriebsschutz (Hauptgebäude)	2330
Betriebsschutz (Lehrgebäude 2)	2152

Durchgangsarzte in Cottbus:

Dr. med. Thomas Herrmann Ärztehaus Cottbus Nord G.-Hauptmann-Str. 15/Süd 10	0355/35 55 39 15
---	------------------

MU Dr. Peter Noack (Ärztehaus am C.-Thiem-Klinikum) Thiemstr. 112	0355/42 58 58
---	---------------

Dr. Tobias Flöter Ärztehaus Franz - Mehring – Str. 12	0355/53 54 53
---	---------------

Dr. Jan Kowalewski G. – Hauptmann – Str. 15 / Süd 10	0355/ 35 55 39 15
---	-------------------

Ersthelfer:

Fritsche, Holm	3104
Baumgärtner, Viola	4536

5 Grundlagen

In den folgenden Abschnitten werden noch einmal die wichtigsten Grundlagen für das Praktikum aus der Vorlesung wiederholt.

5.1 Einführung

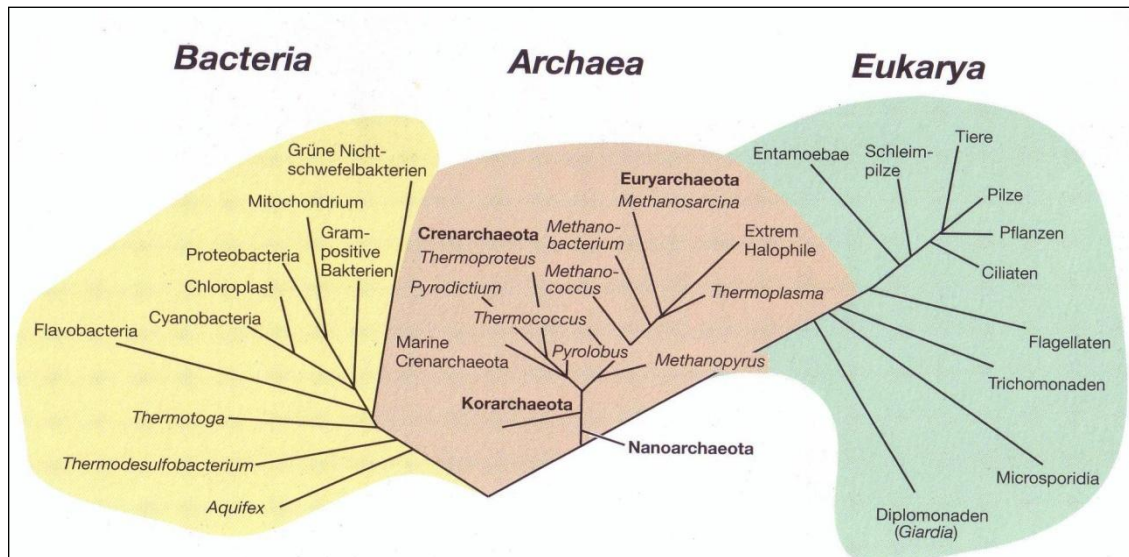


Abb. 2: Der Taxonomische Stammbaum der Organismenentwicklung schematisch dargestellt. Dabei wurden die wichtigsten Phyla (Einzahl: Phylum) dargestellt [1].

Organismen und ihre Eigenschaften sind leichter zu verstehen, wenn man die phylogenetische Abstammung der Organismen kennt. Deshalb soll hier ein kurzer Überblick gegeben werden.

Alle Organismen (Formen des Lebens) werden in drei Bereiche, auch Urreiche oder Domänen genannt, unterteilt. Diese drei Reiche stellen die Domäne der Bacteria, der Archaea und die Domäne der Eukarya dar. Diese können Sie in der Abbildung 2 in der grafischen Übersicht erkennen. Des Weiteren ist erkennbar, dass sich bei der Entwicklung der Organismen zuerst Bacteria und Archaea trennten. Später bildete sich aus der Domäne Archaea eine weitere Domäne der Eukarya. Eukarya und Archaea sind somit phylogenetisch näher miteinander verwandt als mit der Domäne Bacteria.

Organismen, die zur Domäne der Bacteria gehören sind zum Beispiel Boden-, Wasser- und Luftbakterien wie *Escherichia coli* oder *Nitrosomas oxidans*. Aber auch die Bakterien, die sich in unserem Darm oder auf unserer Haut befinden, gehören zu der gleichen Domäne. Das zweite Urreich bilden die Organismen der Archaea-Domäne. Im Allgemeinen gilt die Feststellung, dass Organismen, die zu dem Urreich der Archaea-Domäne zählen, in Habitaten mit extremen Verhältnissen leben. Es wird zwischen acidophilen und alkaliphilen Archaeen unterschieden je nachdem, ob sie an saure oder alkalische Milieus bevorzugen. Halophile Archaeen leben in einer Umgebung mit hoher Salzkonzentration (z.B. totes Meer), barophile bei hohen Drücken (z.B. extreme Tiefen). Leben diese Organismen in extrem kalten Gewässern bezeichnet man sie als kryophil, während thermophile Archaeen in einer heißen Umgebung wie Geysiren vorkommen.

Sie werden weiterhin an vielen anderen Extremstandorten vermutet. Die Erforschung dieser Domäne stellt sich als äußerst schwierig dar, da zum Beispiel Organismen, die im Überdruck existieren, im Labor mit atmosphärischem Druck nicht kultiviert und untersucht werden können. Die Organismen der Domänen Archaea und Bacteria werden auch als Prokaryonten bezeichnet, da die Organismen keinen Zellkern besitzen.

Das dritte Urreich bilden die Organismen der Eukarya-Domäne. Zu dieser Domäne zählen die Phyla der Tiere, Pilze, Pflanzen und Schleimpilze. Aber auch Einzeller wie Ciliaten und Flagellaten gehören zu der Domäne der Eukarya. Diese Organismen werden als Eukaryonten bezeichnet, da sie einen Zellkern besitzen, in dem sich die DNA befindet [2].

Zellaufbau

Den Unterschied zwischen Eukaryonten und Prokaryonten ist gut am Zellaufbau der einzelnen Formen zu erkennen.

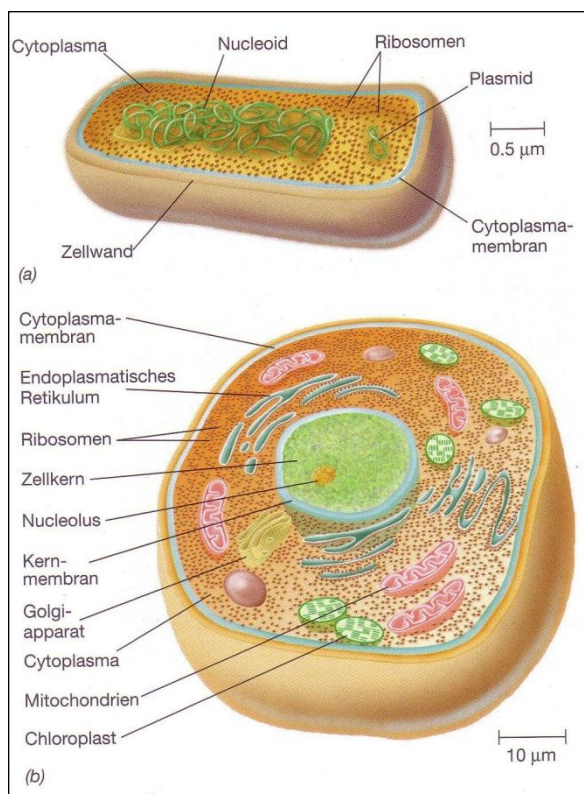


Abb. 3: Darstellung der prokaryontischen Zelle (a) und der eukaryontischen Zelle (b) [1]

Eine prokaryontische Zelle ist in Abb. 3a) dargestellt. Die prokaryontische Zelle weist keinen Zellkern auf. Die DNA liegt gewickelt umgeben von Cytoplasma in der Zelle. Zusätzlich weisen viele Prokaryonten sogenannte Plasmide auf. Das sind kurze DNA-Fäden, die bei Zellkontakt mit anderen Prokaryonten gleicher Art ausgetauscht werden. Somit kann das genetische Material erneuert werden.

Die Zelle der Abbildung 3b und der rechten unteren Abbildung stellt eine eukaryontische Zelle dar. Die Zelle ist deutlich strukturiert und weist mehr Zellkomponenten als die prokaryontische Zelle auf. Die Zellen haben Mitochondrien (oder in Pflanzenzellen Chloroplasten), ein Endoplasmatisches Retikulum und vor allem einen Zellkern. Da komplexe Prozesse in der Zelle sich in unterschiedlichen Zellkomponenten abspielen, wird

von einer Kompartimentierung gesprochen. Die Zellekomponenten sind somit räumlich durch eine Membran voneinander getrennt. Die wichtigsten Unterschiede zwischen Eukaryonten und Prokaryonten bzw. Acharea werden in der folgenden Tabelle gegenübergestellt.

Tab.1: Gegenüberstellung von Bacteria, Achaea und Eukarya unter Betrachtung der wichtigsten Zelleigenschaften [1]

	Bacteria	Archaea	Eukarya
Kompartimentierung durch Membran	Nein	Nein	Kernhülle, Mitochondrien, Chloroplasten, Endoplasmatisches Retikulum, Membranversikel
	z.T. Gasvakuolen aus Proteinen, z.T. Endosporen		Vakuolen
Größe	ca. 0,5 - 2 µm	ca. 1 µm	idR. 2 - 200 µm
Chromosomen	1 Eventuell Plasmide	1	Meist mehrere
Sexuelle Reproduktion	Nein Konjugation, partielle Übertragung von DNA möglich	Nein Konjugation, partielle Übertragung von DNA möglich	Meiose
Ribosomen	70S	70S	80S
Flagellen	Einfach	Einfach	Vielsträngig (9+2- Muster)
Zellwand	Sehr dünn, aus Murein (Peptidoglykan)	Proteine, Polysaccharide u.a. Pseudomurein	-Sehr dick bei Pflanzen, keine bei Tieren Chemische - aus Verbindungen wie Cellulose, Kalk, Silikate u.a.
Aufbau	Einfach	Einfach	komplex

Zellwand von Gram positiven und negativen Bakterien

Die Zellwände unterscheiden sich in ihrem Aufbau in der Struktur der Zellwand. Gram positive Bakterien bilden als Schutzschicht vor Radikalen und chemischen Stoffen eine dicke Mureinschicht aus. Diese kann bis zu 40 Schichten beinhalten. Gram negative Bakterien besitzen nur eine sehr dünne Mureinschicht, dazu aber eine zusätzliche äußere Zellwand. Dieser Unterschied im äußeren Zellabschluss ist wichtig für die Klassifikation der Bakterien sowie zum Verständnis gewisser Interaktionen zwischen den Bakterien in einem Milieu [2]. Die Gramfärbung unterscheidet den Aufbau der Zellwände mittels einer farblichen Analyseverfahren.

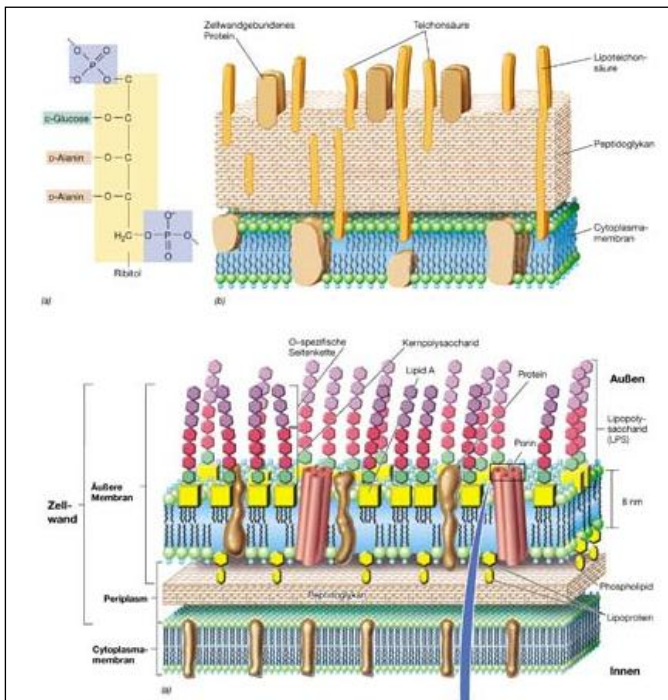


Abb. 4: Darstellung der Zellmembran und der Peptidoglykanschicht, welche auch Mureinschicht genannt wird, von Gram positiven (oben) und Gram negativen (unten) Bakterien [3].

Zur Gramfärbung:

Das zur Gramfärbung verwendete Kristallviolett bindet in der Mureinschicht. Überlegen Sie sich, warum bei der Tränkung mit Alkohol das Kristallviolett nur aus Gram negativen Organismen gewaschen werden kann?

5.2 Morphologie von Mikroorganismen

Die Morphologie von Mikroorganismen beschreibt die Form und Struktur der Mikroorganismen. Mit Hilfe der Morphologie lassen sich Mikroorganismen mikroskopisch grob kategorisieren und leichter phylogenetisch bestimmen. Die folgenden Grafiken sollen Ihnen bei der Bestimmung und Beschreibung von Mikroorganismen, in diesem Fall Bakterien und Pilzen, helfen. Die gängigsten Formen sollten Sie auch im Praktikum beim Mikroskopieren erkennen können.

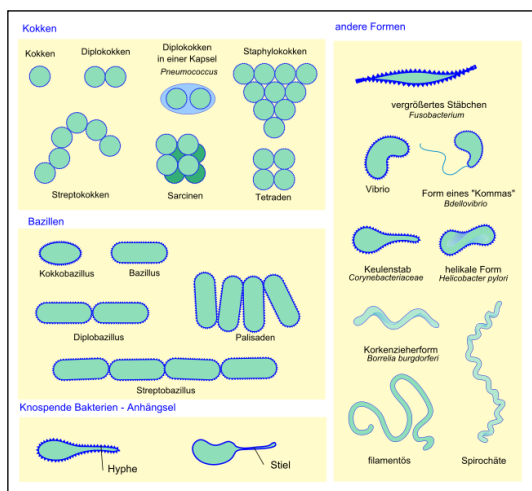


Abb. 5: Die wichtigsten Wuchsformen von Bakterien [4]

5.3 Stoff- und Energiewechsel von Mikroorganismen

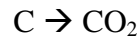
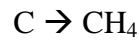
Mikroorganismen besiedeln fast alle Elemente auf der Erde. Während der Anpassung der Organismen entwickelten sich die unterschiedlichsten Stoffwechselwege. Es werden unterschiedliche Verbindungen als Energiequelle genutzt oder als Kohlenstoffquelle. Dabei verwenden alle Organismen die gleiche chemische Verbindung Adenosintriphosphat kurz ATP genannt. ATP kann als Energiewährung der Zelle angesehen werden, da der Verbrauch und die Regenerierung von ATP als zentrale Aufgabe des Stoffwechsels betrachtet werden kann. Die unterschiedlichen Stoff- und Energiewechsel von Mikroorganismen können nach mehreren Klassen unterschieden werden [1].

Zum einen betrachtet man die Art der Energiequelle. Es gibt Organismen die Licht als Energiequelle nutzen. Diese werden als **phototroph** bezeichnet. Pflanzen und einige Einzeller verwenden diese Art der Energiequelle und betreiben Photosynthese. Eine andere Art der Energiequelle sind chemische Verbindungen. Die Energie wird durch die Stoffumsetzung der chemischen Verbindungen generiert. Organismen die diese Energiequelle nutzen, werden als **chemotroph** bezeichnet. Eine weitere Klassifikation ist die Unterscheidung nach dem Elektronendonator. Elektronendonatoren sind nötig um Reduktionen durchführen zu können, da ein Donator in einer chemischen Reaktion Elektronen abgibt an den Elektronenakzeptor. Organismen, die organische Verbindungen verwenden, werden als **organotroph** bezeichnet. Eine andere Möglichkeit ist es, ausschließlich anorganische Stoffe als Elektronendonator zu verwenden. Diese werden dann als **lithotroph** bezeichnet. Eine dritte und letzte Klassifikation ist die Unterteilung in heterotroph und autotroph. Organismen die organische Verbindungen als Kohlenstoffquelle benutzen, werden als **heterotroph** bezeichnet. Wenn anorganische Verbindungen als Kohlenstoffquelle dienen, dann wird diese Form der Ernährung als **autotroph** bezeichnet. Aus den verschiedenen Klassifikationen und deren Formen lässt sich diverse Mischformen generieren, die Aussagen über die Ernährung von Organismen geben [1].

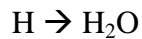
5.4 Mikroorganismen in der Umwelt

Die Umweltmikrobiologie beschäftigt sich u.a. damit, wie Schadstoffe aus der Umwelt mit Mikroorganismen beseitigt werden können. Dabei werden Mikroorganismen zur Bereinigung von Boden, Wasser und Luft verwendet. Diese Prozesse werden unter dem Selbstreinigungsvermögen der Natur subsummiert. Die Organismen werden an den jeweiligen Standorten angesiedelt und man versucht das nötige Milieu zu schaffen, sodass die Bakterien gewisse Schad- oder Fremdstoffe über die Stoffwechselwege metabolisieren und somit abbauen. Unter diesen Bedingungen können Bakterien oder Pilze sogar sogenannte Xenobiotika abbauen. Dies sind Stoffe, die in der Umwelt natürlich biologisch nicht vorkommen und chemisch künstlich hergestellt wurden. Die Behandlung des Bodens mit Mikroorganismen ist sehr vielseitig. Bakterien und Pilze werden zur Kompostierung,

Müllvergärung oder auch zur Altlastensanierung verwendet. Der Lehrstuhl Altlasten untersucht solche Vorgänge in unterschiedlichen Projekten. Unter Altlasten versteht man in diesem Zusammenhang Schadstoffe, die durch anthropogene Ursachen, wie industrielle Produktionsanlagen oder Deponien auf oder in den Boden eingetragen wurden. Die Schadstoffe werden von den Mikroorganismen als Kohlenstoff- oder Energiequelle benutzt und verstoffwechselt. Dabei entsteht aus Kohlenstoff Methan und Kohlenstoffdioxid,



Wasserstoff wird zu Wasser oxidiert.



In der Wasserwirtschaft werden Mikroorganismen zur Abwasserreinigung, Sickerwasserbehandlung oder auch zur Trinkwasseraufbereitung verwendet. Besonders bei der Abwasserbehandlung ist ein Verzicht auf Mikroorganismen undenkbar. Sie dezimieren Stickstoffverbindungen und Phosphatkomplexe. Somit wird die Eutrophierung von Gewässern durch die Einleitung des geklärten Abwassers vermieden.

6 Praktikum

6.1 Ziel des Praktikums

Ziel des Praktikums ist es einen Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten in der Mikrobiologie zu bekommen. Sie sollen die Mikrobiologie aus verschiedenen fachlichen Blickwinkeln betrachten können: zum einen aus der medizinisch-klinischen Sicht (Führung durch die Mikrobiologische Abteilung des CTK) und zum anderen unter umweltrelevanten Gesichtspunkten (selbstständiges Arbeiten im Labor). Dabei sollen im mikrobiologischen Labor bei authentischen Problemen die gängigsten Methoden an naturnahem Umweltbeispiel angewendet werden. Das wissenschaftliche Arbeiten, sowie die kritische Betrachtung von Ergebnissen auch in anderen Fachbereichen, soll gefördert werden.

6.2 Praktikumsvorbereitung

Die Einführungsveranstaltung führt in den Arbeitsschutz in einem mikrobiologischen Labor ein und klärt zusätzlich über die Organisation des Praktikums auf.

Nach der Veranstaltung tragen Sie sich in die Anwesenheitsliste ein. In Verbindung mit bestandener Klausur der Vorlesungsthemen, werden Sie automatisch beim Lehrstuhl für den Wissenstest registriert. Der Test beinhaltet theoretische und praktische Grundlagen für das wissenschaftliche Arbeiten in einem mikrobiologischen Labor (Arbeitsschutz, Geräte, Versuchsaufbau der einzelnen Praktikumstage). Sollten Sie nicht beim Test erscheinen oder diesen nicht bestehen können, dann ist für Sie eine Teilnahme am Praktikum erst wieder im nächsten Jahr möglich. Der Test gilt als bestanden, wenn mindestens 65% der möglichen Punkte erreicht worden sind.

Nach Bekanntgabe der Testergebnisse können Sie sich am Lehrstuhl Altlasten in die Praktikumslisten eintragen. Sie entscheiden sich für einen Block in der Woche, zu dem Sie zu den drei geplanten Praktikums- Veranstaltungen zu erscheinen haben. Das Praktikum findet dann zu den bekannt gegebenen Terminen regelmäßig statt.

Eine ausreichende Vorbereitung auf den jeweiligen Praktikumstag ist Voraussetzung für ein zügiges und gewissenhaftes Arbeiten. Bei unzureichender Vorbereitung ist ein Ausschluss aus dem Praktikum möglich, damit vorbereitete Studenten nicht gestört oder gefährdet werden!

6.3 Erster Praktikumstag – Isolierung und Kultivierung von Mikroorganismen

Am ersten Praktikumstag werden die Mikroorganismen der Boden- und Wasserproben des Probenahmetages auf Agar-Platten kultiviert. Bevor Sie mit der praktischen Arbeit beginnen erfolgt eine Einweisung, wie Sie sich im Labor zu verhalten haben. Generell gilt; es wird ständig unter der Sicherheitswerkbank gearbeitet.

Am ersten Praktikumstag sind folgende Arbeiten zu verrichten:

- Herstellung einer Bodensuspension
- Verdünnungsreihen von Boden- und Wasserprobe
- Ausplattieren der Boden- und Wasserproben
- Ausgießen von Nährmedium zur Vorbereitung des nächsten Praktikumstag

Ziel des Versuches ist es, die Anzahl der Bakterien in der aus dem Boden entnommenen Probe zu bestimmen. Dazu wird mit Hilfe der Bodenprobe eine Bodensuspension (Aufschluss) hergestellt. Die Suspension wird nach dem Absetzen über eine definierte Verdünnungsreihe verdünnt. Zwei Proben werden auf Nährmedium aufgetragen und im Inkubator (Brutschrank) eine Woche inkubiert.

Herstellung einer Bodensuspension

- 11,5 g Bodenprobe in einen 250 ml Erlenmeyerkolben geben
- mit 90 ml 0,2%iger tetra-Natriumpyrophosphat-Lösung mischen
- 30 min bei 150 U/min auf dem Rotationsschüttler dispergieren
- Probe 5 min. absetzen lassen

Herstellung einer Verdünnungsreihe

- 1. Verdünnungsstufe: 1 ml der abgesetzten Bodenprobe werden in ein steriles Reagenzglas mit 9 ml 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung gegeben und auf dem Schüttler vermischt (entspricht einer 10^{-1} - Verdünnung)
- 2. Verdünnungsstufe: 1ml der gerade hergestellten Verdünnung entnehmen und zu 9 ml 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung hinzufügen (entspricht einer 10^{-2} - Verdünnung)
- Wiederholen Sie diese Prozedur bis zu einer 10^{-3} - Verdünnung

- Verfahren Sie auf die gleiche Weise mit der Wasserprobe

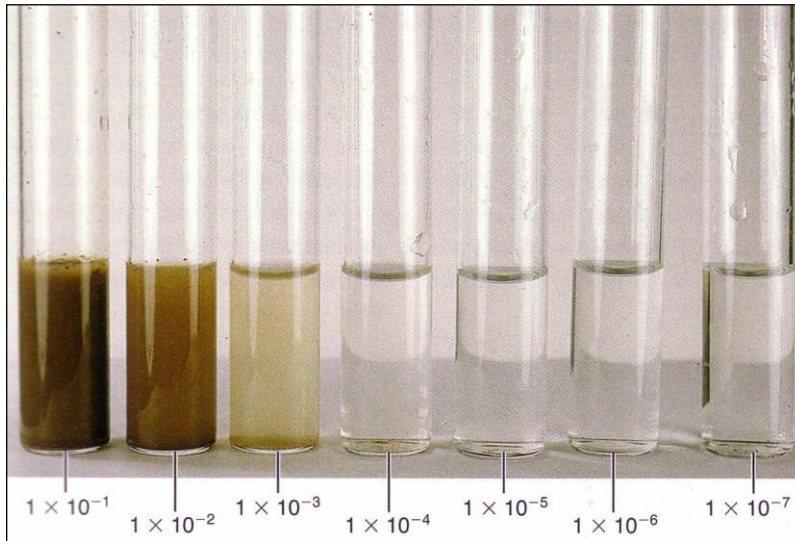


Abb. 6: Die Abbildung zeigt die verschiedenen Verdünnungsstufen der Bodensuspensionen in den Reagenzröhrchen. Die Verdünnungen reichen von 1:10 (1×10^{-1} ; links) bis 1: 10.000.000 (1×10^{-7} ; rechts) [1]

TIP: → Sorgen Sie für eine gute Durchmischung der Reagenzgläser, bevor Sie eine Probe weiter verdünnen.

Ausplattierung der Boden- und Wasserproben

- Entnehmen Sie mit einer sterilen Pipette 100 µl der entsprechende Probe und geben Sie diese auf eine sterile Agarplatte
- Streichen Sie die Verdünnung mit Hilfe eines Drigalskispatel aus

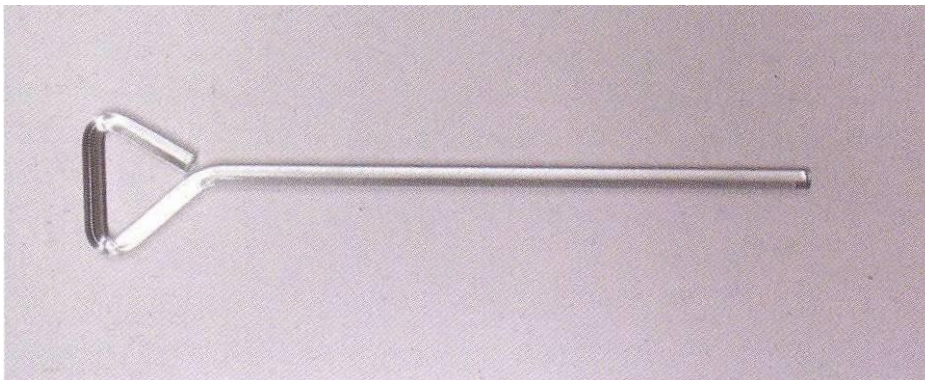


Abb. 7: Die Abbildung zeigt einen Drigalski-Spatel zum Ausstreichen von Proben auf Agarplatten (Platten die mit Nährmedium aus Agar Agar befüllt sind).

TIP: → Nutzen Sie die gesamte Fläche der Agarplatte, das Ausstreichen sollte zügig erfolgen, damit keine Kontamination aus der Luft erfolgt.

- Die Platten werden unmittelbar im Inkubator bei 28°C für 7 Tage inkubiert (Idealtemperatur für Bodenbakterien)
- Die Auswertung erfolgt in der nächsten Woche, am Praktikumstag 2

6.4 Zweiter Praktikumstag - Herstellung eines fraktionierten Ausstrichs

Vor der Herstellung des fraktionierten Ausstriches erfolgt eine Auswertung der Platten aus Praktikumstag 1:

Bestimmung der Koloniebildenden Einheiten - KBE/ml (colony forming units - cfu/ml)

- entnehmen Sie Ihre Kulturplatten dem Inkubator
- Begutachten Sie die Kolonien auf Ihrer Nährplatte
- Notieren Sie den Zustand der Platte (Pilzbewuchs, Koloniengröße, Aussehen der Kolonien, Farbe der Platte, Hoch- und Breitwachstum der Mikroorganismen, etc.)



Abb. 8: Pilzkulturen bei unterschiedlichen Verdünnungsstufen → je höher die Verdünnung, desto weniger Pilzkolonien wachsen auf der Platte. Die Verdünnungsstufen mit denen die Platten beimpft wurden (von links nach rechts): 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5} [1].



Abb. 9: Bakterienkulturen bei unterschiedlichen Verdünnungsstufen → je höher die Verdünnung, desto weniger Bakterienkolonien wachsen auf der Platte. Die Verdünnungsstufen mit denen die Platten beimpft wurden (von links nach rechts): 10^{-4} ; 10^{-5} ; 10^{-6} ; 10^{-7} [1].

- markieren Sie auf dem Boden der Platte alle Koloniepunkte der Bakterienkulturen mit einem wasserfesten Stift
- zählen Sie beim Markieren die Punkte als KBE
- halten Sie die gesamte Zeit die Platte geschlossen

- notieren Sie die ermittelte Zahl und zählen Sie erneut mit einer anderen Farbe
- tragen Sie den Durchschnitt in Ihr Protokoll und in die ausliegenden Listen

Tab. 3: Beispieltabelle zur Erfassung der ausgezählten Kolonien.

	Platte 1 / Boden Verdünnung:	Platte 2 / Wasser Verdünnung:
Ergebnis 1		
Ergebnis 2		

- Bestimmen Sie die Keimzahl der Verdünnung mit folgender Gleichung:

$$KBE = \left[\frac{\text{Anzahl Mikroorganismen}}{100\mu\text{l}} \right] \cdot 10 \cdot 10^{\text{Verdünnungsfaktor}} \quad (1)$$

- (Die Ergebnisse aller Studenten werden für Sie für die Auswertung bzw. den Vergleich in der Diskussion ins Internet gestellt.)

TIP: BEISPIELRECHNUNG

Der Student zählt 67 Kolonien auf seiner Platte (100 µl) mit der Verdünnungsreihe 10⁻².

Sein Ergebnis lautet unter Nutzung von Gleichung (1): 67000 KBE/ml

Er gibt sein Ergebnis korrekterweise in Zehnerpotenzen an: **6,7* 10⁴ KBE/ml**

Herstellen eines Fraktionierten Ausstrichs

- wählen Sie aus dem Kolonierasen Ihrer Platte eine Kolonie aus
- beschriften Sie die neue Nährplatte mit Name, Gruppe und Datum
- Arbeiten Sie unter der Sicherheitswerkbank an der Flamme
- Glühen Sie die Impföse über der Flamme vollständig



Abb. 10: verschiedene Impfwerkzeuge
(links: Impföse) [1]

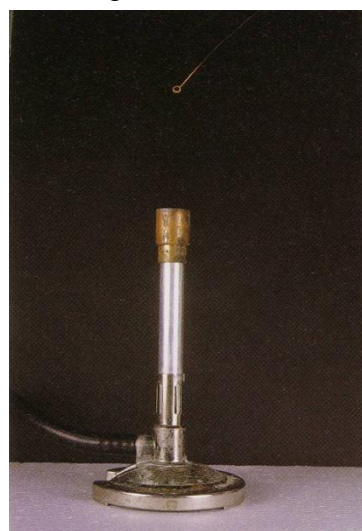


Abb. 11: Ausglühen der Impföse über dem
Bunsenbrenner [1]

- Entnehmen Sie die Bakterienkolonie vollständig und zügig aus der Platte mit der ausgeglühten und abgekühlten Impföse

- Schließen Sie die Platte sofort
- Übertragen Sie die Bakterienkultur nach folgendem Muster:

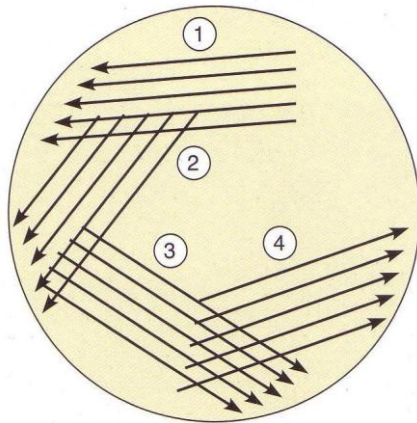


Abb. 12:

- 1: Verteilen Sie die entnommene Kolonie im oberen Teil der Platte
 - 2: Anschließend sterilisieren Sie die Impföse wieder und streichen vom Randbereich des gerade durchgeführten Ausstrichs erneut aus.
- 3 und 4: Diesen Vorgang sollten Sie noch zweimal wiederholen

- Die Platte mit dem fraktionierten Ausstrich wird im Inkubator bei 28°C bis zum nächsten Praktikumstag 7 Tage bebrütet

Zu erwartendes Ergebnis- Mögliches Kolonienwachstum

Die dargestellten Bakterienkulturen stellen nur Beispiele dar und sind nicht notwendig Bakterien aus dem Boden!

Es soll das Bakterienwachstum bzw. die Koloniebildung der Bakterien optisch dargestellt werden. Als gelungene Vereinzelnung ist ein fraktionierter Ausstrich anzusehen, wenn einzelne Kolonien (einzelne farbige Punkte) auf der Kultur vorhanden sind.



Abb. 13: *Enterobacter aerogenes* auf Blutagar [1]

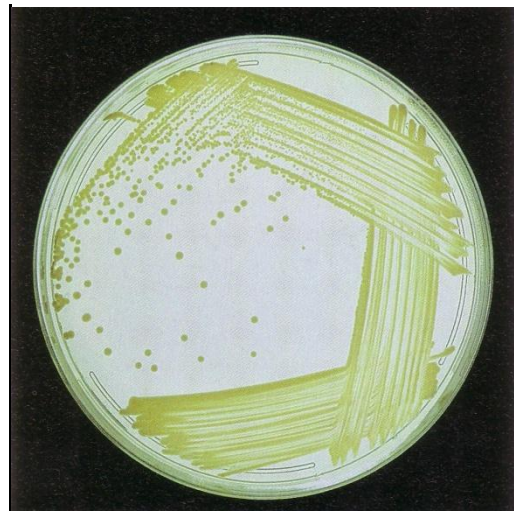


Abb. 14: *Micrococcus luteus* auf Nähragar [1]

Aufgaben/ Fragen zur Praktikumsvorbereitung:

- Was bewirkt das mehrmalige Ausglühen der Impföse beim fraktionierten Ausstrich?

6.5 Dritter Praktikumstag - Erstellen eines Matrix-Testes

Sie erhalten eine Ihnen unbekannt Kultur von fünf definierten Kulturen. Fertigen sie aus der Reinkultur ein Präparat an, mit dem Sie dann folgende Tests durchführen, um Ihre Kultur zu definieren:

1. Gramfärbung,
2. KOH-Test,
3. Katalase-Test,
4. Indol-Test und
5. Oxidase-Test.

Anhand der vorgegebenen Tests sind Sie in der Lage die Kultur zu bestimmen.

Tab. 4: Beispielmatrix zur Kulturbestimmung.

Kulturen/Test	Gramfärbung	KOH	Katalase	Oxidase	Indol
Kultur Nr. 1	+	-	+	-	-
Kultur Nr. 2	+	-	-	-	-
Kultur Nr. 3	-	+	-	-	+
Kultur Nr. 4	-	+	+	-	-
Kultur Nr. 5	-	+	+	+	-

1. Gramfärbung

Anfertigung des Präparates

- **Die Arbeiten sind unter der Sicherheitswerkbank an der Flamme durchzuführen!**
- Beschriften Sie die Objektträger mit den Nummern der Kulturen.
- Nutzen Sie pro Probe einen Objektträger.
- **Arbeiten Sie zügig mit den Kulturplatten, um Kontaminationen zu vermeiden!**
- Geben Sie auf den Objektträger einen Tropfen Wasser (*Aqua dest.*).
- Glühen Sie die Impföse vollständig über der Flamme aus.
- Entnehmen Sie zügig aus der Platte einen kleinen Teil der Bakterienkultur und schließen Sie sofort wieder die Platte.
- Verreiben Sie die Bakterien mit dem Wasser auf dem Objektträger.
- Glühen Sie die Impföse erneut aus, um alle daran haftende Bakterienreste auszubrennen.
- Trocknen Sie die Suspension vorsichtig über der Bunsenbrennerflamme.
- Schwenken Sie den Objektträger kurz über der Flamme.
- **Achtung: nicht zu lange über der Flamme halten, da sonst die Bakterien verbrennen und die Zellen lysieren!**
- Die vollständig getrockneten Proben nochmals kurz über die Flamme ziehen, um die Bakterien zu fixieren.
-

Gramfärbung

- Den Objektträger 1 min Färben mit Kristall-Violett
- ca. 10 s mit Aqua dest.spülen
- 1 min mit Lugol'scher Lösung stabilisieren, dazu 1 - 2 Tropfen der Lösung direkt auf die gefärbte Kultur auf den Objektträger geben
- mit Aqua dest. kurz spülen
- mit Ethanol 5 - 10 s entfärben
- **SOFORT** mit Aqua dest. 5 - 10 s spülen
- 1 min mit Safranin-Lösung gegenfärben
- mit Aqua dest. spülen
- das Präparat an der Luft trocknen lassen

Untersuchung des Präparates

- das getrocknete Präparat mit dem Mikroskop unter 100facher Vergrößerung untersuchen
- dazu benötigen Sie eine Ölimmersion
- verwenden Sie einen Tropfen Öl auf der Stelle der Färbung und drehen Sie am Mikroskop so lange an der Feinjustierung bis keine Luft mehr zwischen dem Objektiv und dem Objektträger ist
- nutzen Sie die Feinjustierung, um das Bild scharf zu stellen, beachten Sie dabei die mehrschichtigen Dimensionen auf dem Objektträger
- bestimmen Sie die Form und die Farbe der gefärbten Kultur

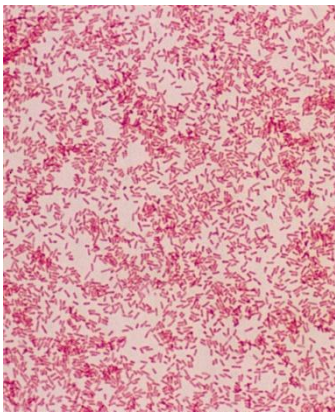


Abb. 16: Gram negative Bakterien werden rötlich eingefärbt [1]

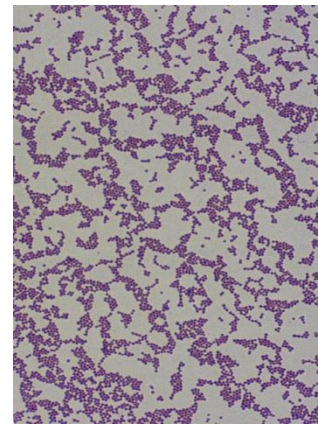


Abb.17: Grampositive Bakterien werden blau/violett eingefärbt [1]

2. KOH-Test: Test auf Gram pos./neg. mittels Kaliumhydroxid- Lösung

- gilt als Schnelltest auf Gram positiv oder negativ
- von der Kultur mit der sterilen Impföse einen kleinen Teil entnehmen
- auf dem Objektträger ausstreichen
- auf die Zellkultur 1 Tropfen 3%ige KOH-Lösung geben
- mit einem Zahnstocher die Lösung mit der Bakterienkultur verreiben
- das Ergebnis ist sofort sichtbar

- **negativ:** **kein sichtbares Ergebnis (gram⁺)**
- **positiv:** **mit dem Zahnstocher kann man langsam hauchdünne, feine Fäden (DNA) aus der Lösung hochziehen (gram⁻)**

3. Katalase-Test mit H₂O₂

- zur Bestimmung der Kulturen führen Sie einen Test auf Katalase durch
 - beschriften Sie einen Objektträger mit der Probennummer
 - entnehmen Sie unter dem Abzug an der Flamme aus der Reinkultur einen Teil mit einer ausgeglühten Impföse
 - verreiben Sie die Bakterienkultur auf dem Objektträger (ca. 15 - 30 s)
 - Geben Sie auf den Objektträger 1 Tropfen 3%ige Wasserstoffperoxid (H₂O₂)-Lösung
 - Das Ergebnis ist sofort sichtbar
- **Katalaseproduktion:** **Blasenproduktion, Zischen**
 - **Keine Enzymproduktion:** **der Ausstrich bleibt klar**

4. Indol-Test

- Geben Sie auf das Filterpapier ein Tropfen Substrat geben
 - übernehmen Sie aus der Reinkultur mit der Impföse einen Teil der Kultur
 - geben Sie die Kultur auf das Filterpapier (nur fest drücken, nicht verreiben!)
 - lassen Sie das Substrat mit der Kultur ca. 20 - 30 s inkubieren
- **Indolpositiv:** **Rosafärbung des Substrates**
 - **Indolnegativ:** **keine Farbreaktion**

5. Oxidase-Test

- Test funktioniert mit Hilfe von Teststreifen
 - Streifen mit Hilfe einer Pinzette kurz auf die Kolonie legen (Stempelmethode)
 - Streifen auf einen Objektträger legen
 - Ca. 10 - 20 s Warten
- **Positiv:** **Blaufärbung des Streifens**
 - **Negativ:** **Keine Farbveränderung des Streifens**

Aufgaben/ Fragen zur Praktikumsvorbereitung:

- Warum müssen die Bakterienkulturen hitzefixiert werden?
- Was bewirkt das Enzym Katalase? Was bewirkt das Enzym Oxidase?
- Informieren Sie sich über die Farbreaktionen der verschiedenen Tests!
- Auf welcher Grundlage funktioniert die Gramfärbung?
- Welche Rolle spielt bei dem Test die Lugol'sche Lösung?
- Wie wirkt die KOH-Lösung auf die untersuchte Zelle?

7 Musterprotokoll - wissenschaftliches Arbeiten



Brandenburgische
Technische Universität
Cottbus

Brandenburgische Technische Universität Cottbus
Fakultät 4
Lehrstuhl Altlasten
Prof. Dr.-Ing. Wolfgang Spyra

Modul: Allgemeine Mikrobiologie 42- 2- 13

Mikrobiologisches Praktikum

-Praktikumsprotokoll-

Gruppe:

Name:

Matrikelnummer:

Praktikumsgruppe:

Gliederung

Hier soll aufgelistet werden, was Sie verfasst haben. Geben Sie die Seitenzahlen an und erstellen Sie ein in Unterpunkten gegliedertes Inhaltsverzeichnis. Achten Sie auf eine inhaltliche Gliederung und vermeiden Sie eine Gliederung nach zeitlichen Aspekten. Gestalten Sie Ihr Inhaltsverzeichnis so, dass ein roter Faden durch Ihre Arbeit erkennbar ist.

Einführung

Geben Sie kurz Ihren Wissenstand in Form einer kurzen mikrobiologischen Einleitung wieder. Beziehen Sie sich dabei auf den Kontext des Praktikums.

Beschreiben Sie, wie Sie die einzelnen Praktikumsschritte in den Kontext einordnen und stellen Sie ihre Vorgehensweise während des Praktikums dar!

Bleiben Sie bei Ihren Ausführungen bei der Thematik und vermeiden Sie Ausschweifungen und zu allgemeine Aussagen! Die Einführung soll lediglich Ihre Arbeit einleiten, nicht das gesamte Fachgebiet Mikrobiologie.

Material und Methoden

Was haben Sie Wozu gebraucht und Wie benutzt?

Warum haben Sie den entsprechenden Test durchgeführt?

Erläutern Sie in kurzen Sätzen, welche Reaktionsmechanismen untersucht werden, um zu zeigen, dass Sie das Prinzip der Tests verstanden haben. Vermeiden Sie das bloße Zitieren des Praktikumsskriptes!

Ergebnisse

Was haben sie innerhalb der Praktikumstage dokumentiert und herausgefunden?

Die Auflistung der Ergebnisse ist oft in Tabellen übersichtlicher. Es eignet sich auch die Anfertigung von Diagrammen. Diese sollen die Ergebnisse besser beschreiben und nicht bunt und unübersichtlich aufgebauscht werden. Zu den Ergebnissen sollten Sie eine kurze Beschreibung geben.

Diskussion

Sie sollen Ihre Ergebnisse diskutieren und kritisch hinterfragen. Warum ist es gerade zu diesen Ergebnissen gekommen. Es eignet sich auch ein Vergleich mit Ergebnissen anderer Gruppen. Hinterfragen Sie auch Ihre eigene Arbeitsweise. Haben Sie ordentlich und steril gearbeitet? Wo liegen in den einzelnen Arbeitsschritten wohlmöglich Fehlerquellen?

Zeigen Sie in diesem Teil Ihrer Arbeit, dass Sie sich mit der Thematik und ihren eigenen Ausführungen der mikrobiologischen Arbeiten beschäftigt haben.

Quellen- / Literaturverzeichnis

Alle Informationen, die Sie aus Primär- oder Sekundärliteratur erhalten haben, müssen gekennzeichnet werden und in einem Literaturverzeichnis aufgelistet werden.

Vorlesungsmaterial und Skripte sowie Lexika zählen nicht zu Primär- bzw. Sekundärliteratur und sollten hier nicht erwähnt werden. Stützen Sie Ihre Aussagen auf Fachliteratur.

Listen Sie nur Literatur auf, die Sie auch tatsächlich im Text verwendet haben. Kennzeichnen Sie die jeweiligen Stellen im Text, da sonst von Plagiat ausgegangen wird.

Quellenverzeichnis

- [1] Alexander, Steve K.; Strete, Dennis: Mikrobiologisches Grundpraktikum. München [u.a.], Pearson-Studium, 2006.
- [2] Cypionka, Heribert: Grundlagen der Mikrobiologie. Berlin [u.a.], Springer, 2006.
- [3] www.biokurs.de/skripten/bilder/!cellwall.jpg; abgerufen am 04.07.2011, 16:45 Uhr
- [4] http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Morphologie_bei_Bakterien.svg; abgerufen am 04.07.2011, 17:48 Uhr