

# Grundlegende Arbeitsmethoden in der Mikrobiologie



Biologie

Mikrobiologie &amp; Genetik

Grundlagen der Mikrobiologie

Applied Science

Medizin

Histologie &amp; medizinische Mikrobiologie



Schwierigkeitsgrad

schwer



Gruppengröße

2



Vorbereitungszeit

30 Minuten



Durchführungszeit

45+ Minuten

This content can also be found online at:

<http://localhost:1337/c/61dbfb97a2474d0003e08aaa>



## Informationen für Lehrkräfte

### Anwendung



Experimenteller Aufbau

Die Geschichte der Mikroorganismen beginnt mit der Erfindung des Mikroskops zu Beginn des 17. Jahrhunderts. Danach etablierte Louis Pasteur die ersten wichtigen Methoden für die Arbeit mit Bakterien. Robert Koch machte die Mikrobiologie für die Medizin nutzbar. Seine Methoden sind die Grundlage der heutigen mikrobiologischen Arbeit, zum Beispiel die Verwendung von Agar.

Dieses Experiment dient dem Erwerb von Grundkenntnissen im Umgang mit Mikroorganismen.

## Sonstige Informationen für Lehrkräfte (1/2)

PHYWE

### Vorwissen



Um zu verhindern, dass Nährböden und Kulturen von mit Mikroorganismen kontaminiert ist, die sich an die zur Arbeit Ausrüstung, die Ausrüstung, Nährmedien und Nährstoff-Lösungen müssen sterilisiert werden.

### Prinzip



Das Nährmedium wird entweder aus Reagenzgläsern in die Schalen gegossen, wobei ein Reagenzglas die erforderliche Menge an fertigem Medium für eine Petrischale enthält, oder aus Erlenmeyerkolben, wenn eine große Anzahl von Platten gleichzeitig vorbereitet werden muss.

## Sonstige Informationen für Lehrkräfte (2/2)

PHYWE

### Lernziel



Die Studierenden sollen die Kenntnisse grundlegender Arbeitstechniken speziell für mikrobiologisches Arbeiten erwerben.

### Aufgaben



- Die Schülerinnen und Schüler sollen die folgenden Arbeitstechniken einüben:
1. Sterilisation der Ausrüstung
  2. Herstellung von Standard-Nährstoffagar für Bakterien
  3. Herstellung von Standard-Nährstoffagar für Schimmelpilze und Hefen
  4. Herstellung einer Standard-Nährösung für Bakterien
  5. Vorbereitung von Schrägagarröhrchen
  6. Inokulation von Mikroorganismen

## Sicherheitshinweise

PHYWE



Für dieses Experiment gelten die allgemeinen Anweisungen für sicheres Experimentieren im naturwissenschaftlichen Unterricht.

PHYWE



## Informationen für Studenten

4/14

## Motivation

PHYWE



Die Geschichte der Mikroorganismen beginnt mit der Erfindung des Mikroskops zu Beginn des 17. Jahrhunderts. Danach etablierte Louis Pasteur die ersten wichtigen Methoden für die Arbeit mit Bakterien. Robert Koch machte die Mikrobiologie für die Medizin nutzbar. Seine Methoden sind die Grundlage der heutigen mikrobiologischen Arbeit, zum Beispiel die Verwendung von Agar.

Ziel dieses Experiments ist es, die Grundkenntnisse für die Arbeit mit Mikroorganismen zu erwerben.

## Aufgaben

PHYWE



Aufbau des Experiments

Üben Sie die folgenden Arbeitstechniken:

1. Sterilisation der Ausrüstung
2. Herstellung von Standard-Nährstoffagar für Bakterien
3. Herstellung von Standard-Nährstoffagar für Schimmelpilze und Hefen
4. Herstellung einer Standard-Nährösung für Bakterien
5. Vorbereitung von Schrägagarröhrchen
6. Inokulation von Mikroorganismen

## Ausrüstung

Position	Material	Item No.	Quantity
1	Autoclave with insert	04431-93	1
2	Compact Balance, OHAUS TA 302, 300 g / 0.01 g	49241-93	1
3	Test tube rack for 12 tubes, holes d= 22 mm, wood	37686-10	1
4	Test tube, 160 x 16 mm, 100 pcs	37656-10	1
5	Sterile stoppers f. id 15mm, 250	39266-00	1
6	Spoon, with spatula end, 180 mm, plastic	38833-00	1
7	Graduated cylinder, Borosilicate, 250 ml	36630-00	1
8	Glass rod,boro 3.3,l=300mm, d=7mm	40485-05	1
9	Beaker, Borosilicate, tall form, 600 ml	46029-00	1
10	Tripod,ring d=140 mm, h=240 mm	33302-00	1
11	Wire gauze with ceramic, 160 x 160 mm	33287-01	1
12	Bunsen burner /DIN/,nat.g.,w.cock	32168-05	1
13	Safety gas tubing, DVGW, sold by metre	39281-10	1
14	Petri dish, d 100 mm	64705-00	2
15	Watch glass, dia.60 mm	34570-00	2
16	Agar-agar, powdered 100 g	31083-10	1
17	Ammonium chloride 250 g	30024-25	1
18	Potas.dihydrogen phosphate,100 g	30261-10	1
19	Magnesium sulphate 500 g	30136-50	1
20	Water, distilled 5 l	31246-81	1

## Einrichtung (1/9) Sterilisation der Ausrüstung

PHYWE

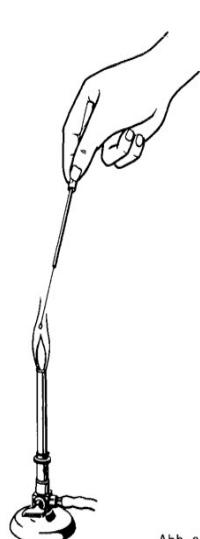


Abb. a

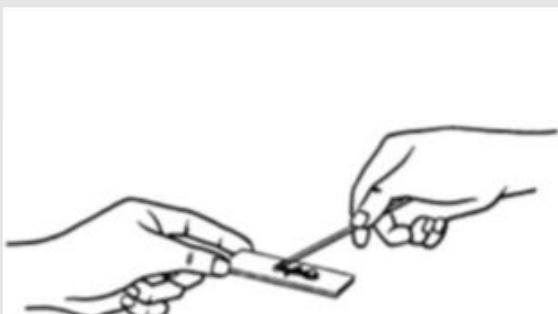
Die Geräte müssen steril sein, um eine Kontamination zu vermeiden. Metallgeräte werden mit der Flamme eines Gasbrenners sterilisiert. Impfösen und Nadeln werden vor und nach ihrer Verwendung in der Flamme eines Gasbrenners erhitzt, bis sie rotglühend sind, und dann abkühlen gelassen. Der Halter wird abgeflammt, wenn er mit den Kulturen oder sterilen Geräten in Berührung kommen kann. Kleine Glasobjekte, wie Objektträger und Deckgläser, werden ebenfalls durch Abflammen sterilisiert. Vor dem Abflammen können sie in 96%igen Ethylalkohol getaucht werden. Während dieses Vorgangs müssen die Objektträger und Deckgläser mit einer Pinzette festgehalten werden. Pipetten werden sterilisiert, indem man sie zwei- oder dreimal mit 96%igem Äthylalkohol füllt, den Alkohol auslaufen lässt, den restlichen Äthylalkohol in die Flamme eines Gasbrenners bläst und die Pipette anschließend wiederholt durch die Flamme führt. Alle anderen Geräteteile aus Glas werden in einem Heißluftsterilisator für 1 bis 1½ Stunden auf 160 °C erhitzt. Die Gefahr des Zerbrechens ist geringer, da sie langsamer abkühlen können. Deshalb werden Glasgeräte immer in einen Kaltsterilisator gestellt, wo sie nach der Sterilisation ebenfalls abkühlen.

## Set-up (2/9) Standard-Nährstoffagar für Bakterien

Das Nährmedium ist so beschaffen, dass es den Anforderungen der Zielorganismen, in diesem Fall Bakterien, entspricht. Das verwendete Geliermittel ist Agar-Agar oder Kurzagär. Im Gegensatz zu Gelatine kann Agar von wenigen Bakterienarten zersetzt werden. Wiegen Sie die benötigten Mengen aller Zutaten ab, füllen Sie sie in ein Becherglas und kochen Sie sie auf, bis sich das Agar vollständig aufgelöst hat. Das Becherglas muss groß genug sein, um die vierfache Menge des vorbereiteten Nährbodens aufzunehmen, da Agar leicht überkocht. Sobald die Lösung kocht, die Flamme reduzieren und die Lösung mehrmals umrühren. Wiegen Sie den Fleischextrakt ab. Dazu rollt man den Glasstab auf dem Objektträger aus (Bild auf der nächsten Folie) und spült den Fleischextrakt in das Becherglas. Der Objektträger kann auch zusammen mit der Lösung gekocht und anschließend entfernt werden.



## Setup (3/9) Standard nutrient agar for bacteria



Abwiegen des Fleischextrakts

Das Nährmedium sollte Folgendes enthalten: Liebigscher Fleischextrakt 0,3%; Pepton 0,5%; Agar 2,0%; als Lösungsmittel wird destilliertes Wasser verwendet.

Wenn sich alle Bestandteile vollständig aufgelöst haben, wird das Nährmedium durch Zugabe von Tropfen einer 1%igen Natriumhydroxidlösung auf einen pH-Wert von 7,4 bis 7,6 gebracht. Überprüfen Sie dabei den pH-Wert mit pH-Teststäbchen (pH 6,5 bis 10,0). Bakterien wachsen am besten in einem neutralen bis schwach alkalischen Milieu, d.h. bei einem pH-Wert von etwa 7,0 bis 7,2. Da die Wasserstoffionenkonzentration während der Sterilisation des Nährmediums leicht abnimmt, wird sie von vornherein auf einen höheren Wert als den eigentlich gewünschten Wert eingestellt. Das vorbereitete Nährmedium wird dann in Reagenzgläser abgefüllt; etwa 12 bis 15 ml (etwa halb voll) für das Ausgießen der Platten.

## Setup (4/9) Standard nutrient agar for bacteria



Schleimpilz

Schimmelpilze und Hefen wachsen hauptsächlich auf leicht sauren Substraten, was bei der Herstellung der Nährböden zu berücksichtigen ist. Der Nährboden sollte enthalten: Sirup (Rübensaft) 5,0%; Agar 2,0%; als Lösungsmittel wird destilliertes Wasser verwendet. Füllen Sie die erforderlichen Mengen aller Zutaten in ein Becherglas und verfahren Sie analog zum Bakterienmedium. Wenn sich alle Zutaten aufgelöst haben, prüfen Sie den pH-Wert des Nährmediums mit einem Teststäbchen. Er sollte etwa 5,0-6,0 betragen. Weicht der pH-Wert von diesem Referenzwert ab, fügen Sie Tropfen einer 1%igen Natriumhydroxidlösung oder 1%iger Salzsäure hinzu. Das vorbereitete Nährmedium wird dann in Reagenzgläser gefüllt; etwa 12 bis 15 ml (etwa halb voll) für das Ausgießen von Platten und 5 bis 6 ml (etwa ein Viertel voll) für die Herstellung von Schrägagargläsern. Größere Mengen, die in einem Zug für das Ausgießen von Platten verwendet werden können, werden in Erlenmeyerkolben abgefüllt. Verschließen Sie die Reagenzgläser und Erlenmeyerkolben mit sterilen Stopfen und sterilisieren Sie sie im Autoklaven. Die meisten Hefen und Schimmelpilze gedeihen gut auf dieser Art von Nährmedium. Verfahren Sie auf die gleiche Weise, um Nährböden mit einer anderen Zusammensetzung für Hefen und Schimmelpilze herzustellen.

## Einrichtung (5/9) Sterilisation von Nährmedien und Lösungen



Benchtop-Autoklav

Die Bestandteile der Nährmedien und -lösungen sowie die Werkzeuge und Geräte, die für ihre Zubereitung verwendet werden, sind mit einer Vielzahl von Mikroorganismen kontaminiert, die schnell wachsen und die zubereiteten Nährmedien verunreinigen würden. Um die Kontamination zu beseitigen, werden sie in einen Autoklaven gelegt und mit strömendem Dampf sterilisiert. Heißluftsterilisatoren sind für Nährmedien und -lösungen nicht geeignet, da ihr Wassergehalt reduziert würde, wodurch sich die Nährstoffkonzentration erhöhen würde.

Autoklaven sind Dampfgefäß, die luftdicht verschlossen werden können. Sie ermöglichen die Sterilisation unter Überdruck und bei Temperaturen über 100 °C, wodurch auch Bakteriensporen abgetötet werden. Die Abtötungszeit hängt jedoch stark von der Dampfsättigung im Autoklaven ab.

## Einrichtung (6/9) Sterilisation von Nährmedien und Lösungen



Deshalb ist darauf zu achten, dass nach dem Siedebeginn des Wassers im Autoklaven möglichst viel Luft entweichen kann, um eine hohe Dampfsättigung zu erreichen. Der Autoklav muss mit der erforderlichen Wassermenge gefüllt werden - in der Regel bis knapp unter den Einsatz - und dann werden die zu sterilisierenden Gegenstände hinzugefügt. Mehrere Reagenzgläser werden als Gruppe in einen Behälter gestellt. Stellen Sie die Sterilisationsbedingungen auf 1,4 - 2,7 bar, ca. 125 - 140 °C ein; nachdem das Wasser im Autoklaven zu sieden begonnen hat, was durch Dampfaustritt aus dem Dampfablassventil angezeigt wird, halten Sie das Dampfablassventil noch 3 Minuten lang geöffnet, bis der Autoklav entlüftet ist, und schließen Sie es dann. Durch den Druckanstieg wird nun der Betriebsdruck erreicht, und es entweicht Dampf aus dem Sterilisationsventil. Das bedeutet, dass während der gesamten Zeit der Sterilisation ein wenig Dampf entweichen sollte. Nachdem ein Hochdruck von 1,4 bar erreicht wurde, beträgt die Sterilisationsdauer 20 Minuten bzw. 15 Minuten bei 2,7 bar. Lassen Sie das Sterilisiergut nach der Sterilisation im Autoklaven abkühlen. Warten Sie mit dem Öffnen des Autoklaven, bis der hohe Druck abgeklungen ist, um sicherzustellen, dass kein Sterilisiergut aus dem Gefäß herauskocht. Nehmen Sie dann den Deckel ab.

## Einrichtung (7/9) Gießen von Platten

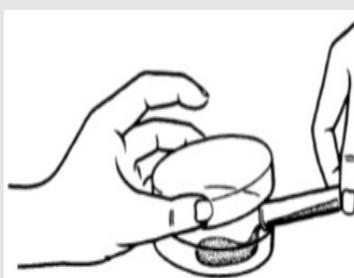
Petrischalen, die mit einem verfestigten Nährmedium gefüllt sind, werden als Platten bezeichnet. Das Nährmedium wird entweder aus Reagenzgläsern in die Schalen gegossen, wobei ein Reagenzglas die erforderliche Menge an fertigem Medium für eine Petrischale enthält. Reagenzgläser mit Nährmedium werden von Mikrobiologen einfach als Röhrchen bezeichnet. Um jederzeit Platten ausgießen zu können, ist es sinnvoll, Röhrchen mit fertigem Nährmedium vorrätig zu haben. Röhrchen mit Nährstoffagar werden im Wasserbad gekocht, bis sich ihr Inhalt verflüssigt. Röhrchen mit Nährstoffgelatine werden im Wasserbad erhitzt, bis die Gelatine flüssig geworden ist. Nachdem sich das Nährmedium verflüssigt hat, nimmt man ein Röhrchen aus dem Wasserbad und entfernt den Wattestopfen. Dann flammt man die Röhrchenmündung kurz in der Flamme eines Gasbrenners ab, um eventuelle Verunreinigungen zu entfernen (oberes Bild auf der nächsten Folie)



## Einrichtung (8/9) Sterilisation von Nährmedien und Lösungen



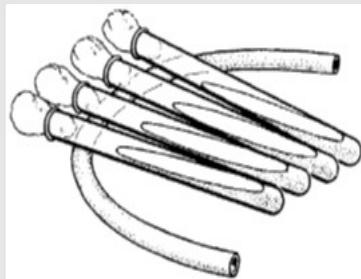
Abb. a



Öffnen Sie den Deckel einer sterilen Petrischale mit einem Durchmesser von 100 mm so weit, dass die Öffnung des Röhrchens zwischen Ober- und Unterteil passt, ohne diese zu berühren. Gießen Sie dann das Nährmedium aus dem Röhrchen in die Petrischale (unteres Bild) und bringen Sie den Deckel sofort wieder an. Während des Ausgießens sollte der obere Teil der Petrischale den unteren Teil möglichst vollständig bedecken, damit keine Mikroorganismen aus der Luft in die Schale fallen. Führen Sie eine kreisende Bewegung mit der geschlossenen Petrischale auf der Tischplatte aus, um das Nährmedium gleichmäßig über die gesamte Oberfläche der Schale zu verteilen. Lassen Sie die Platte anschließend ruhen, bis das Nährmedium fest geworden ist.

Beim Ausgießen von Platten aus Erlenmeyerkolben wird in gleicher Weise verfahren. Platten, die nicht sofort verwendet werden, können einige Zeit mit dem Deckel nach unten, d. h. auf dem Kopf stehend, im Kühlschrank gelagert werden.

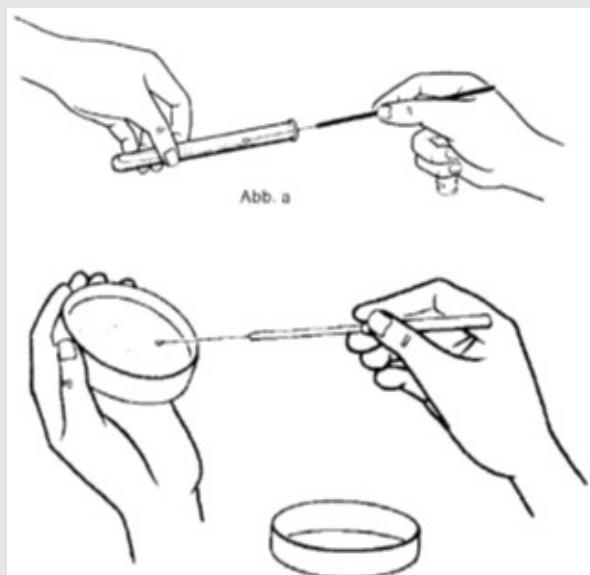
## Vorbereitung (9/9) von Schrägagarröhrchen



Schrägagarröhrchen sind Reagenzgläser, in denen das Nährmedium mit einer schrägen Oberfläche verfestigt ist. Dadurch steht ein größerer Teil der Nährstoffoberfläche für die Inokulation zur Verfügung. Da sie recht platzsparend sind, werden sie häufig anstelle von Platten in Versuchsreihen verwendet. Darüber hinaus werden Reinkulturen von Mikroorganismen zu Sammelzwecken auf Schrägagarröhrchen aufbewahrt, sofern die Kulturbedingungen dies zulassen. Bereiten Sie das gewünschte Nährmedium vor, füllen Sie 5-6 ml davon in einige Reagenzgläser (etwa ein Viertel voll), verschließen Sie sie mit sterilen Stopfen und sterilisieren Sie sie. Unmittelbar danach, solange das Nährmedium noch flüssig ist, stellen Sie das obere Ende der Reagenzgläser auf einen etwa 12-15 mm hohen Holzstreifen. Auch das Rohr eines Gasbrenners ist für diesen Zweck bestens geeignet, da es den perfekten Durchmesser hat (Bild oben links). Dadurch verfestigt sich das Nährmedium in den Reagenzgläsern und bildet eine lange, schräge Fläche. Das Nährmedium sollte etwa den Anfang des oberen Drittels des Röhrchens erreichen.

## Verfahren (1/2)

Beim Animpfen der Mikroorganismen ist es wichtig, dass die Nährmedien oder Kulturen nicht mit fremden Mikroorganismen kontaminiert werden. Gehen Sie während der Beimpfung nicht im Raum umher, um unnötige Luftbewegungen zu vermeiden. Zum Reinigen und Sterilisieren die Impföse in der Flamme eines Gasbrenners abflammen, bis sie rotglühend ist. Lassen Sie sie dann abkühlen. Bei der Entnahme von Mikroorganismen aus einem Röhrchen ziehen Sie den Wattestopfen vorsichtig mit der Hand, die die Impföse hält, aus dem Röhrchen. Halten Sie den Stopfen in dieser Position (oberes Bild auf der nächsten Folie), bis er wieder in das Röhrchen eingesetzt wird. Flammen Sie die offene Röhrenmündung kurz mit der Flamme eines Gasbrenners ab. Führen Sie die Impföse vorsichtig in das Röhrchen ein, ziehen Sie etwas von der Kultur heraus, flammen Sie die Röhrenmündung noch einmal ab und setzen Sie den Wattestopfen wieder ein. Anschließend das Beimpfungsmaterial auf oder in das neue Nährmedium überführen.



## Verfahren (2/2)



Soll ein Schrägagarröhrchen beimpft werden, so ist beim Öffnen des Röhrchens genauso zu verfahren wie bei der Entnahme des Beimpfmaterials. Beim Umfüllen in Nährösungen wird die Masse der Mikroorganismen vorsichtig an der Glaswand knapp unter der Flüssigkeitsoberfläche ausgebreitet, damit sie sich möglichst gleichmäßig in der Nährösung verteilt. Sollen die Platten beimpft werden, so müssen sie mit dem Deckel nach unten, d. h. auf den Kopf gestellt werden. Heben Sie dann den unteren Teil an, drehen Sie ihn um, verteilen Sie das Beimpfungsmaterial und legen Sie den unteren Teil wieder auf den Deckel. Verfahren Sie auf die gleiche Weise, wenn Sie Material von einer Platte entnehmen, auf der Mikroorganismen gewachsen sind.



Auf allen Arten von Nährböden wird das Anzuchtssubstrat in der Regel zickzackförmig ausgebreitet (oberes Bild), um die verfügbare Nährbodenfläche optimal auszunutzen. Nach dem Animpfen flammt man die Impföse sofort in der Flamme eines Gasbrenners ab, bis sie rotglühend ist, um sie zu reinigen und zu sterilisieren. Flammen Sie den Griff soweit ab, wie er mit dem Beimpfungsmaterial in Berührung gekommen ist.

**PHYWE**



## Protokoll

## Aufgabe 1

PHYWE

Welche Art von Lebewesen sind Schimmelpilze und Hefen?

Pflanzen (Plantae)

Pilze

Archaea

Bakterien



## Aufgabe 2

PHYWE

Welcher Teil der normalen Eukaryotenzellen fehlt den Bakterien?

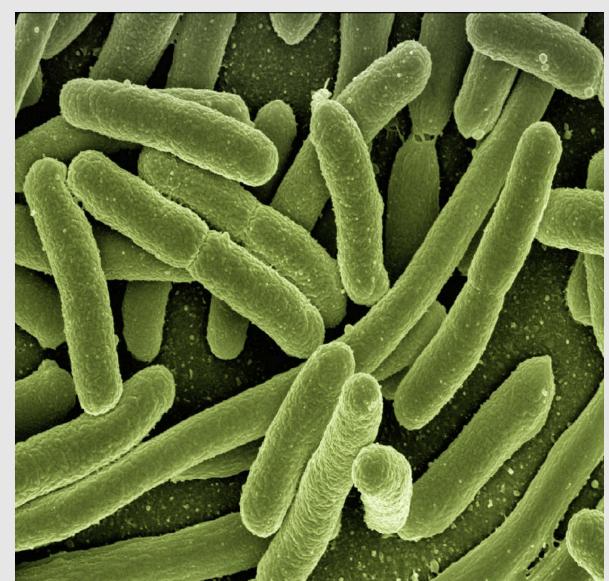
Nukleus

Mitochondrien

Zellmembran

Zytoplasma

Siehe



## Aufgabe 3

PHYWE

Warum wird Agar anstelle von Gelatine verwendet?

Agar ist porös und kann daher von Mikroorganismen durchwandert werden.

Gelatine zersetzt sich beim Erhitzen und verfestigt sich danach nicht.

Im Gegensatz zu Agar kann Gelatine von vielen Mikroorganismen verarbeitet werden.

Agar wird aus Algen gewonnen und ist somit vegan.



Dia

Ergebnis/Insgesamt

Dia 22: Schimmelpilze und Hefen

0/1

Dia 23: Bakterien

0/2

Dia 24: Agar-Agar

0/1

Gesamtpunktzahl

0/4



Lösungen anzeigen



Wiederholung

14/14