

Praktikum 4

Aerobe Sporenbildner und Differenzierung von Mikroorganismen

Aufgaben:

1. Mikroskopie von *Micrococcus luteus*
2. Kolonie und Zellmorphologie der aeroben Sporenbildner
3. Differenzierung von *Escherichia coli* und *Klebsiella terrigena*
4. GRAM-Färbung
5. GRAM-Schnelltest
6. Auswertung: Epidemiologische Verbreitung von Keimen

Durchführung:

1. Mikroskopie von *Micrococcus luteus*

Die aus dem Reinigungsausstrich der letzten Kurstage gewonnene Reinkultur von *Micrococcus luteus* wird unter dem Mikroskop auf Zellmorphologie und Kontaminationen untersucht. Letzteres ist im mikroskopischen Präparat nicht zu finden, dagegen sind aber die Zellpakete von *Micrococcus luteus* gut erkennbar. Es wurden wenige Einzelzellen beobachtet, in weitaus höherer Anzahl kam *Micrococcus luteus* paarweise oder in Tetraden (Vierer-Zellverbände) vor. Achter-Zellverbände waren aber schon wieder seltener.

2. Kolonie und Zellmorphologie der aeroben Sporenbildner

Hier sollen zunächst die am letzten Kurstag erstellten FP-Agarplatten mit den drei Erd-Suspensionen ausgewertet werden. Die Platte des autoklavierten Ansatzes zeigt keinerlei Koloniebildung, was darauf hindeutet, daß alle Bakterien inklusive deren thermoresistente Sporen abgetötet wurden. Im Fall des pasteurisierten Ansatzes ist Kolonie-Bildung zu beobachten, die auf thermoresistente Sporen schließen läßt, die bei der 80°C-Behandlung nicht abgetötet wurden. Die Platte des unbehandelten Ansatzes zeigt reiche Koloniebildung, die weit vielfältiger ist als bei dem pasteurisierten Ansatz. Hier wurden auch die vegetativen Zellen nicht abgetötet.

Von den Kolonien werden nun mikroskopische Präparate angelegt, die auf das Vorhandensein von Sporen untersucht werden.

Es wurde folgendes beobachtet:

- Spore oval, zentral liegend ohne Auftreibung der Mutterzelle, Mutterzelle relativ groß, wahrschl. *Bacillus megaterium*
- ovale Spore zentral liegend, Mutterzelle (kleiner als bei *B. megaterium*) spindelförmig aufgetrieben, evtl. *Bacillus polymyxa*
- lateral in der spindelförmig aufgetriebenen Mutterzelle liegende, ovale Spore, evtl. *Bacillus laterosporus*

3. Differenzierung von *Escherichia coli* und *Klebsiella terrigena*

Die oben genannten Stämme werden im Praktikum zunächst als „A“ und „B“ ausgegeben und sollen aufgrund der Ergebnisse folgender Tests differenziert werden:

- Indolbildung
- Methylrot
- Voges-Proskauer
- Citrat-Medium
- Gasbildung

Beobachtungen und Schlußfolgerung:

Test	Beobachtung Probe „A“	Beobachtung Probe „B“
Indolbildung	violette/rote Färbung	–
Methylrot	rote Färbung	Methylrot entfärbt
Voges-Proskauer	Färbung gelb/bräunlich	rote Färbung
Citrat-Medium	Auswertung nächstes Praktikum	Auswertung nächstes Praktikum
Gasbildung	Auswertung nächstes Praktikum	Auswertung nächstes Praktikum
	→ <i>Escherichia coli</i>	→ <i>Klebsiella terrigena</i>

4. GRAM-Färbung (*Micrococcus luteus*, *E. coli*, *Bacillus subtilis*)

Die Färbung wird wie auf Seite 22 des Scriptes durchgeführt, wobei jedoch die Zeitangaben einem der Versuchs-anordnung beiliegenden Zettel entnommen wurden. So wurde nicht 8 Minuten, sondern nur eine Minute mit Safranin gegengefärbt etc..

Beobachtung: Die GRAM-positiven *Bacillus subtilis* und *Micrococcus luteus* wurden violett angefärbt und sind mikro-skopisch gut sichtbar. Im Fall von *E. coli* wurde keine Färbung beobachtet.

5. GRAM-Schnelltest

Dieser Test wird zur Bestätigung der GRAM-Färbung durchgeführt. Dabei wird mit Hilfe von 3%iger KOH-Lösung die Zellwand der GRAM-negativen Bakterien zerstört und die DNA freigesetzt, die dann als viskoser Faden in Erscheinung tritt. GRAM-positive Bakterien lysieren dagegen nicht in 3%iger KOH.

Details zur Durchführung: siehe Script S. 23

Beobachtung: Der Test war in unserem Fall nicht sehr effektiv, da im Versuch Lösungen mit den Bakterien anstelle der wohl besser geeigneten Bakterienkulturen auf Agar-Platten als Ausgang verwendet wurden. Die Konzentration der Bakterien während des Versuchs ist deshalb viel geringer und es sind letztendlich zu wenig lysierte Zellen vorhanden, die sich per Fadenziehen am Zahnstocher bemerkbar machen könnten.

6. Auswertung: Epidemiologische Verbreitung von Keimen

Mit diesem Versuch soll gezeigt werden, wie schnell sich durch einfaches Berühren Epidemien ausbreiten können.

Jeder Student im Praktikum erhielt ein mit *E.coli* K12 kontaminiertes Stück Schokolade und zerrieb es im Handschuh. Ein Stück war jedoch mit *Micrococcus luteus* kontaminiert, der durch die Ausbildung gelber Kolonien auffällt. Der Reihe nach schüttelten sich die Studenten die Hand und strichen dann mit einem sterilen Zahnstocher etwas Material von ihrem Handschuh auf einer LB-Agarplatte aus.

Nun soll ausgewertet werden, bei welchem Student der *Micrococcus*-Befall zuerst auftrat und über wieviele Berührungen hinweg er weitergetragen wurde.

Berührungsabfolge: 1a1b1c1d1e2a2b...5e

Erstes Auftreten: Student 2b

Letztes Auftreten: Student 4d