

Bakteriologische und Mikrobiologische Experimente für die Hobby-Mikroskopie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
2. Hinweis	3
3. Praktische Methoden/Tipps.....	4
4. Untersuchungsmethoden	5
4.1. Methylenblau Färbung.....	5
4.2. Gram-Färbung.....	5
4.3. Endosporen Färbung.....	6
4.3.1. Endosporenfärbung nach Moeller.....	6
4.3.2. Endosporenfärbung mit Malachitgrün	7
4.4. Geißelfärbung.....	8
4.4.1. Klassische Färbung	8
4.4.2. Versilberung.....	11
V1 Bakterien aus Joghurt – Laktobazillen	12
V2 Anaerobier aus einer Kartoffel.....	13
V3 Zahnbelag und Mundhöhle.....	14
V4 Geißelfärbung an Bacillus sp.	14
V5 Bacillus Endosporen.....	16
V6 Fluoreszierende Bakterien – Pseudomonas fluorescens	18
Weiterführende Literatur:	22

1. Einleitung

Das Mikroskopieren von Bakterien ist unter Hobby-MikroskopikerInnen eher ein Nischenthema. Bakteriologische Untersuchungen bieten im Amateurbereich auch nicht so viel Abwechslung wie z.B. das Erstellen botanischer Präparate. In den gängigen Büchern zur Mikroskopie kommt das Bakteriologie Kapitel oft etwas kurz und die vorgestellten Methoden sind oft nicht so trivial anzuwenden, wie sie beschrieben werden. Nichtsdestotrotz gibt es ein paar schöne Experimente, die man zu Hause durchführen kann. Die hier vorgestellten Experimente sollen einen einfachen und gefahrlosen Einblick in mikrobiologische und bakteriologische Arbeitsweisen und Untersuchungen liefern.

Im ersten Teil werden die verwendeten Charakterisierungsverfahren und Färbungen beschrieben und im Anschluss ein paar relativ einfach durchzuführende Experimente.

Die Ideen entstammen von mir, oder den jeweils angegebenen Quellen und werden hier detailliert, mit persönlichen Anmerkungen wiedergegeben. Alle Bilder wurden von mir aufgenommen. Dieses Skript kann gerne weitergegeben werden und soll AnfängerInnen einen gelungenen Start in einfache mikrobiologische Experimente liefern.

2. Hinweis

Die in den Versuchen verwendeten Bakterien sind als harmlose, ubiquitär vorkommende Umweltbakterien anzusehen. Vor allem beim Kultivieren von Bakterien, auch aus dem Boden, sind einige Vorsichtsmaßnahmen zu beachten. Zum Sterilisieren von Nährmedien, Petrischalen und anderen verwendeten Geräten verwendet man einen Druckkochtopf und erhitzt bei 120°C für 40 Minuten. Vorsicht beim Umgang mit den verwendeten Chemikalien und Farbstoffen. Viele der verwendeten Anilinfarbstoffe (Fuchsin/Kristallviolett und Malachitgrün) gelten als krebserregend. Es empfiehlt sich Handschuhe zu tragen und gesammelte Farbstofflösungen sind der örtlichen Problemstoffsammlung beizugeben. Folgende allgemeine Hinweise sollten beachtet werden:

- Das Ableiten medizinischer Diagnosen ist nicht ohne weiteres möglich und ohne entsprechende Erfahrung absolut sinnlos.
- Bakterien können im Lichtmikroskop immer nur äußerlich beschrieben werden. Eine genaue Bestimmung im Mikroskop ist unmöglich.

- Keine Kulturen von menschlichen oder tierischen Körpern (Rachen, Haut, Stuhl, Urin,..) anfertigen, es könnten pathogene Keime anwachsen.
- Bodenproben für Kulturen nicht von Weideflächen, Überschwemmungsgebieten, gedüngten Feldern, oder mit Abwasser kontaminierten Umgebungen nehmen.
- Petrischalen nur soweit nötig seitlich öffnen.
- Arbeitsflächen, Hände gründlich desinfizieren, alle Geräte (Ösen, Pinzetten, Pipetten, mikroskopische Präparate/Objektträger..) und Kulturen sind nach Gebrauch vor der Entsorgung zu sterilisieren (Bunsenbrenner, Natriumhypochlorit, Wasserstoffperoxid 3% + 70% Isopropanol/Ethanol).
- Agar Platten vor der Entsorgung durch Übergießen mit 3% Natriumhypochlorit-Lösung (z.B. Danklorix), Autoklavieren, oder einem gleichwertigen Sterilisationsverfahren gründlich reinigen.
- Beim Arbeiten mit Agarplatten einen Bunsenbrenner (**Achtung: Brandgefahr durch alkoholische Desinfektionsmittel**) daneben entzünden; Luftzug und hektische Bewegungen vermeiden.

3. Praktische Methoden/Tipps

Zum Betrachten der an der Auflösungsgrenze der Lichtmikroskopie darstellbaren Bakterien benötigt man 1000-fache Vergrößerung, also ein 100x Objektiv unter Ölimmersion. Das Mikroskopieren unter Ölimmersion und Scharfstellen benötigt etwas Übung. Man kann bakterielle Ausstriche, nach gründlichem Trocknen, ohne Deckglas unter Ölimmersion mikroskopieren. Man kann sie aber auch wie gewöhnliche Präparate eindecken (Malinol, oder ein Tropfen Immersionsöl und mit Deckglaslack umranden). Euparal und andere Alkohollösliche Eindeckmittel würden die Farbstoffe schnell ausziehen.

Fast alle Präparate werden hitzefixiert (außer Präparate zur Geißelfärbung), wozu man den Objektträger mit dem Ausstrich nach oben, 3-mal zügig durch eine Bunsenbrenner Flamme zieht. Der Objektträger darf maximal so warm werden, dass man ihn auf dem Handrücken ablegen kann.

Um Farbstoff zu sparen ist es empfehlenswert den Bereich mit dem zu färbenden Ausstrich mit einem Paraffin/Wachsmalstift 2 Grenzen zu ziehen, damit die Färbelösungen in einem definierten Bereich bleiben. Überschüssiges Paraffin vom Anzeichnen kann mit Wundbenzin abgewaschen werden, ohne eine der Färbungen zu beeinträchtigen.

Zur groben Beurteilung der Motilität von Bakterien (z.B. Eignung für eine Geißelfärbung) wird ein Tropfen Wasser auf einem Deckglas aufgetropft und die zu untersuchende Probe darin suspendiert. Auf einem Objektträger, der links und rechts zwei mit Vaseline gebildete Höcker hat, wird das Deckglas verkehrt herum draufgelegt, sodass der Tropfen nicht den Objektträger berührt. Nun kann man das Deckglas mikroskopieren und untersuchen, ob zielgerichtete Bewegungen vorliegen. Hierbei darf eine zielgerichtete Bewegung nicht durch Strömungsbewegungen innerhalb des Tropfens verwechselt werden.

4. Untersuchungsmethoden

4.1. Methylenblau Färbung

Die Färbung mit Löfflers Methylenblau ist eine leicht durchzuführende Färbemethode. Die Farbstofflösung setzt sich folgendermaßen zusammen:

Methylenblau		0,5g in 30 ml 96% Ethanol lösen
Wässrige Kaliumhydroxid-Lösung 1%		1,0ml
destilliertes Wasser		99,0ml

Zur Durchführung der Färbung wird ein hitzefixierter Ausstrich für 10 Minuten mit Löfflers Methylenblau überdeckt. Im Anschluss wird die Farbstofflösung mit Wasser abgespült, getrocknet und eingedeckt.

4.2. Gram-Färbung

Die Gram-Färbung ist die wichtigste Färbemethode für Bakterien. Man teilt Bakterien nach ihrer Anfärbbarkeit ein, gram positiv = blau/violett und gram negativ = rot. Die Aufnahme der Farbstoffe, bzw. die „Entfärbbarkeit“ hängt mit dem Aufbau der Zellwand zusammen. Die Durchführung der Gram-Färbung ist relativ einfach, es bedarf aber etwas Übung, damit man reproduzierbare Ergebnisse erhält. Für die Färbung benötigt man Kristallviolett, Lugol'sche Lösung, Ethanol und Safranin. Statt Safranin kann auch Fuchsin verwendet werden. Fuchsin hat allerdings schon einen leicht violetten Farbton, weshalb man mit dem roten Safranin eine bessere Kontrastierung erreicht. Folgende Farbstofflösungen werden angesetzt:

- Kristallviolett-Lösung     : 2 g in 20 ml Ethanol 96 % lösen und mit 80 ml dest. Wasser, das 1 g Ammoniumoxalat enthält versetzen.

- Lugol'sche Lösung  : 1 g Kaliumiodid in 10 ml Wasser lösen, 0,5 g Iod hinzugeben und möglichst auflösen. Danach mit Wasser auf 150 ml auffüllen.
- Safranin-Lösung  : 1 g Safranin O in 100 ml dest. Wasser lösen.

Die Durchführung der Färbung erfolgt folgendermaßen:

Hitzefixierte Ausstriche für 3 Minuten mit Kristallviolett-Lösung überdecken. Danach mit Lugol'scher-Lösung abspülen und Lugol'sche-Lösung 1 Minute lang einwirken lassen. Danach wird für maximal 30 Sekunden mit Ethanol 96% abgespült, sodass keine violetten Farbwolken mehr abgehen. Danach wird kurz mit dest. Wasser abgespült und für 30-60 Sekunden mit Safranin gegengefärbt. Im Anschluss wird mit dest. Wasser abgespült und getrocknet.

4.3. Endosporen Färbung

4.3.1. Endosporenfärbung nach Moeller

Chemikalien:

Chromsäure 5%					
Schwefelsäure 2 %					
Fuchsin					
Ethanol 96 %					
Methylenblau					
Kalilauge 1 %					

Durchführung:

Man überschichtet den Ausstrich für 5 Minuten mit einigen Tropfen 5 % Chromsäure Lösung. Danach wäscht man die Chromsäure gut ab, ungefähr eine Minute, und lässt den Ausstrich trocknen. Im Anschluss überschichtet man den Ausstrich mit einigen Tropfen Fuchsin Lösung und zieht den Objektträger immer wieder durch die Bunsenbrennerflamme und erhitzt ihn so. Die Lösung sollte nicht kochen (aber dampfen) und darf nicht eindampfen. Bevor die Lösung eindampft, tropft man neue nach. Man erhitzt den Ausstrich für 2 Minuten, indem man abwechselnd kurz erhitzt und dann wieder abkühlen lässt. Danach wäscht man mit Wasser ab und überführt den Objektträger für wenige (!) Sekunden in eine 2%ige Schwefelsäure. Dabei löst sich überschüssiges Fuchsin ab. Sofort danach wird der Objektträger mit Wasser gespült

und für 2 Minuten in Wasser eingestellt, um überschüssige Schwefelsäure sicher zu entfernen. Jetzt sollten die Endosporen gefärbt sein und die restlichen Bakterien entfärbt. Nun muss man gegenfärben. Dafür verwendet man Löfflers Methylenblaulösung. Die Gegenfärbung sollte sehr zart ausfallen, da man sonst die dunkelroten Endosporen schwerer erkennt. Zu diesem Zweck wird die Methylenblau Lösung 1:1 verdünnt, indem man einen Tropfen Wasser auf den Ausstrich aufbringt und dann einen Tropfen Methylenblau. Dann schwenkt man den Objektträger vorsichtig, damit sich die Methylenblau Lösung gut vermischt. Die Einwirkzeit sollte 15 Sekunden nicht überschreiten. Man bricht die Färbung ab, indem man mit Wasser abwäscht. Dann lässt man den Objektträger trocknen und mikroskopiert unter Ölimmersion. Die Bakterien sollten zartblau gefärbt sein und die Endosporen kräftig dunkelrot. Sollte die Methylenblau-Färbung zu schwach ausgefallen sein, kann man das Immersionsöl entfernen, indem man den Objektträger mit Diethylether oder Petrolether spült, und wie oben beschrieben nachfärben.

Entsorgung:

Chromsäure als krebserregende Chrom(VI)-Verbindung muss vor der Entsorgung im Schwermetallabfall mit Natriumdisulfit, Ascorbinsäure, oder Ethanol zu ungefährlichen Chrom(III)-Verbindungen reduziert werden.

Erklärung:

Endosporen sind sehr widerstandsfähig. Durch Behandlung mit aggressiver Chromsäure, welche ein starkes Oxidationsmittel ist, wird die Endospore anfärbbar.

4.3.2. Endosporenfärbung mit Malachitgrün

Diese Art der Endosporenfärbung ist wesentlich einfacher und schneller durchzuführen als die Methode nach Moeller. Man kann bakterielle Endosporen auch als ungefärbte Areale in der Gram-/Methylenblau-Färbung erkennen. Die originale Färbung wird mit Malachitgrün(oxalat/chlorid) durchgeführt. Die Methode funktioniert aber auch mit Malachitgrün G = Brilliantgrün. Zur Gegenfärbung können Safranin, oder Eosin verwendet werden. Die Endosporen färben sich grün and, das Bakterium rot. Folgende Lösungen werden benötigt:

- Malachitgrün-Lösung     , oder Malachitgrün G (=Brilliantgrün)  : 1 g in 20 ml Wasser lösen.
- Safranin-Lösung  : 0,1 g Safranin in 20 ml dest. Wasser lösen.

- Eosin-Lösung  : 0,5 g Eosin in 20 ml dest. Wasser lösen.

Die Durchführung erfolgt folgendermaßen:

In einem 100 ml Becherglas werden 30 ml Wasser zum Kochen gebracht, sodass heißer Dampf entweicht. Das Becherglas wird mit einem Drahtnetz bedeckt. Der zu untersuchende, hitzefixierte Ausstrich wird mit einigen Tropfen Malachitgrün-Lösung bedeckt und für 5 Minuten auf das Drahtnetz gelegt, sodass der heiße Dampf den Objektträger erhitzt. Nach 5 Minuten wird das Malachitgrün (oft eingetrocknet) abgewaschen und für 30 Sekunden mit Safranin-Lösung, oder 1 Minute mit der Eosin-Lösung gegengefärbt.

4.4. Geißelfärbung

4.4.1. Klassische Färbung

Viele Bakterien besitzen Geißeln (lat. Flagellum). Die Geißeln dienen der aktiven Fortbewegung der Bakterien und sind eigentlich nur wenige Nanometer dünn und können nicht ohne weiteres im Lichtmikroskop beobachtet werden. Die Anzahl und Anordnung der Geißeln war ein wichtiger Anhaltspunkt für die Bestimmung. In Zeiten von PCR und Massenspektrometrie zur genauen Zuordnung ist dieses speziellere Verfahren im wissenschaftlichen Alltag in den Hintergrund gerückt.

Die Literatur zur Durchführung ist rar und meistens schon einige Jahrzehnte alt. Am häufigsten begegnet man der Leifson-Methode. Die in diesem Versuch durchgeführte Variante entspricht einer etwas abgewandelten Rezeptur. Die Grundzusammensetzung der Färbelösung entstammt aus einem Paper von L. Forbes „Rapid flagella stain“ aus dem Jahr 1981¹. Man findet zahlreiche Variationen der angegebenen Methode, im Prinzip haben aber alle dieselbe Funktionsweise. Die hier

Chemikalien:

Fuchsin (C.I.42510)  
 Kristallviolett (C.I.42555)    
 Malachitgrün/Brilliantgrün (C.I.42040) 
 Säurefuchsin (C.I.42685) 

¹ Forbes L. Rapid flagella stain. J Clin Microbiol. 1981 Apr;13(4):807-9. doi: 10.1128/jcm.13.4.807-809.1981. PMID: 6164691; PMCID: PMC273886.

Ethanol 96%, unvergällt 

Tannin 

Kaliumaluminiumsulfat

Glycerin

Natriumchlorid

Farbstoff:

In einem 50 ml-Becherglas werden 0,5 Kaliumaluminiumalaun und 0,4 g Tannin in 7,5 ml dest. Wasser gelöst. Die Lösung wird auf einer Heizplatte zum vorsichtigen Sieden erwärmt. In einem 15 ml fassenden Zentrifugenröhrchen werden 0,4 g Fuchsin und 0,2 g Säurefuchsin vorgelegt und in 2,5 ml Ethanol 96% und 0,5 ml Glycerin aufgenommen und geschüttelt. Im Anschluss wird die Alaun-Tannin Lösung noch warm in das Zentrifugenröhrchen gegossen und sofort für mindestens 1 Minute stark geschüttelt. Danach lässt man das Zentrifugenröhrchen auf Zimmertemperatur abkühlen und für 1 Stunde ruhen, wobei immer wieder geschüttelt wird. Im Anschluss wird die Lösung zentrifugiert (5 Minuten bei ca. 5000 u/min) und der klare Überstand wird vorsichtig abgegossen. Die Farbstoff-Lösung ist bei Zimmertemperatur einige Tage haltbar.

Färbung:

Es werden mehrere Objektträger vorbereitet. Dazu gibt man auf den ersten Objektträger einen großen Tropfen dest. Wasser, auf die anderen einen kleineren Tropfen in der Mitte am Rand einer Längskante. Die Öse wird mit einem Tropfen Wasser befeuchtet und damit eine Kolonie auf dem Nährboden berührt. Dabei sollte man nicht hineinstechen, ein bloßes Berühren der Kolonie mit dem Wassertropfen auf der Öse genügt. Danach wird die Öse in den großen Tropfen des ersten Objektträgers eingetaucht und vorsichtig gedreht, sodass eine leichte Trübung wahrnehmbar ist. Danach wird die Öse ausgeglüht und abgekühlt. Im Anschluss wird die Öse vorsichtig in den großen Tropfen des 1. Objektträgers getaucht und im Anschluss in den kleineren Tropfen des zweiten Objektträgers getaucht. Daraufhin wird der 2. Objektträger der Breite nach gekippt, sodass der Tropfen von der einen zur anderen Seite rollt. Die Lösung des 2. Objektträgers sollte nicht trüb sein, da sonst eine zu hohe Bakterienanzahl vorliegt. Der 2. Objektträger wird an eine ruhige Stelle gelegt und man wartet, bis die Flüssigkeit verdunstet ist. Jetzt wird ober- und unterhalb des getrockneten Ausstrichs mit Wachs eine Linie gezogen, sodass die Färbelösung begrenzt bleibt.

Im Anschluss werden ca. 0,5 ml der Farbstofflösung aufgetropft. Die Färbedauer beträgt maximal 90 Sekunden, besser 50-60 Sekunden. Eine genaue Angabe der Färbedauer ist schwer

möglich und es bedarf einer Versuchsreihe zur Ermittlung der optimalen Dauer. Nach abgelaufener Zeit wird die Lösung schnell abgespült. Auf dem Objektträger haben sich einige Farbstoffniederschläge gebildet. Die Gegenfärbung erfolgt entweder mit einer 1% Kristallviolett-Lösung oder einer 1% Malachitgrün G-Lösung in Wasser. Dafür wird 5 Minuten bei Raumtemperatur überschichtet und danach noch 1 Minute bei 70°C auf der Wärmplatte und im Anschluss mit dest. Wasser abgespült. Dabei löst sich ein Teil der Niederschläge im Hintergrund. Danach wird der Objektträger auf die warme Wärmplatte gelegt, zügig getrocknet, ein Tropfen Immersionsöl aufgetragen und kann bei 1000-facher Vergrößerung betrachtet werden.

Erklärung:

Durch die Behandlung mit Tannin verdickt die bakterielle Geißel und wird schließlich Lichtmikroskopisch sichtbar und durch das Fuchsin gefärbt. Das Tannin lagert sich dabei an dem Flagellin, dem Protein, aus dem die Geißeln hauptsächlich besteht, an. Die Geißeln färben sich dabei immer rot. Der Bakterienzellkörper wird durch die Gegenfärbung entweder violett, oder grün gefärbt, wobei sich aber nicht jedes Bakterium gleich gut anfärbt. Für die Gegenfärbung kann auch Malachitgrün verwendet werden (ist nicht dasselbe wie das hier verwendete Malachitgrün G). Auch Methylblau n. Löffler ist sehr gut zur Gegenfärbung geeignet.

Generell ist zu sagen, dass diese Färbung nicht immer gelingt, trotz anscheinend gleicher Ausgangsbedingungen. Das Gelingen hängt von vielen Faktoren ab (überschichtet man mit zu viel, oder zu wenig Farbstofflösung, der Einwirkzeit, der Anzahl der Flagellen [sie brechen leicht ab und man findet mehr abgebrochene als schön anhaftende], der Anzahl der Bakterien, ob überhaupt ausreichend Geißeln vorhanden sind, pH-Wert,..). Die besten Resultate erzielt man mit frühen Kolonien (16-24 Stunden alt), danach scheint die Anzahl der Flagellen abzunehmen (aus 48 Stunden alten Kolonien konnte kaum noch verwertbare Bakterien gefunden werden). Die Färbedauer kann durchaus bis zu 8 Minuten betragen, je nach verwendeten Bakterien, hier ist eine experimentelle Feststellung der optimalen Zeit notwendig, sie liegt aber meist zwischen 30 Sekunden und 8 Minuten, danach überwiegt die Bildung von störenden Niederschlägen.

Eine aufwändige Reinigung der Objektträger (wie in der Literatur oft angegeben) ist nicht notwendig und die Färbung funktioniert mit günstigen, neuen Objektträgern genauso gut.

Beobachtungstipps:

Beim Mikroskopieren ist es ratsam an den Randbereichen des eingetrockneten Ausstriches nach

schönen Ausschnitten zu suchen. Das Präparat ist meistens uneinheitlich gut gefärbt und man muss etwas suchen, bis man schöne Bereiche findet. Sind die Geißeln an einer Stelle schön dargestellt, sind sie oft wenige Mikrometer daneben schon schlecht gefärbt, von Niederschlägen überlagert oder gar nicht vorhanden. Meistens wird man mehr abgebrochene Geißeln beobachten können, die bei zu konzentrierten Ausstrichen das Bild überlagern.

4.4.2. Versilberung

Die Versilberung der bakteriellen Geißeln beruht auf demselben Prinzip wie in der klassischen Methode. Durch Tannin werden die Geißeln verdickt und es lagert sich ein Tannin-Eisen(III)chlorid-Komplex an den Geißeln an (vgl. Eisengallustinte). Im zweiten Schritt wird mit ammoniakalischer Silbernitrat Lösung überdeckt, wobei sich unlösliches Silberchlorid an den Geißeln niederschlägt, die dadurch gut kontrastiert werden. Auch bei dieser Färbung bilden sich zu einem gewissen Grad Farbstoffniederschläge, das lässt sich aber nicht verhindern. Die Methode stammt von „Simplified Silver-Plating Stain for Flagella Marcia West, Nicholas M. Burdash,² And Frank Freimuth²“ Auch hierbei gilt es die oben erwähnten Beobachtungstipps zu beachten. Für alle nachfolgenden Schritte muss zwingend destilliertes Wasser verwendet werden.

Farbstoff

Folgende Lösungen werden frisch (nach einer Zeit funktioniert die Färbung sonst nicht mehr) zubereitet:

- A) 5 ml einer 10% Tannin Lösung in dest. Wasser
- B) 2,5 ml einer gesättigten Aluminiumkaliumsulfat (Alaun) Lösung
- C) 5 ml einer 5% Eisen(III)chlorid Lösung in dest. Wasser
- D) 0,05 g Silbernitrat in 1 ml dest. Wasser lösen, kleine Tropfen 25% Ammoniak zugeben, sodass sich der Niederschlag gerade auflöst. Danach werden einzeln kleine Kriställchen Silbernitrat zugegeben und geschüttelt, sodass die Lösung milchi weiß getrübt bleibt. **Diese Lösung darf nur in kleinen Mengen hergestellt werden und darf auch nicht gelagert werden, da die Gefahr der Bildung explosiver Silberverbindungen besteht!**

² West M, Burdash NM, Freimuth F. Simplified silver-plating stain for flagella. J Clin Microbiol. 1977 Oct;6(4):414-9. doi: 10.1128/jcm.6.4.414-419.1977. PMID: 72075; PMCID: PMC274784.

Zur Herstellung der Beize werden die Lösungen A) und B) gut gemischt und am Ende Lösung C) zugesetzt. Dabei bildet sich ein schwarzer Niederschlag, der in der Lösung möglichst suspendiert wird.

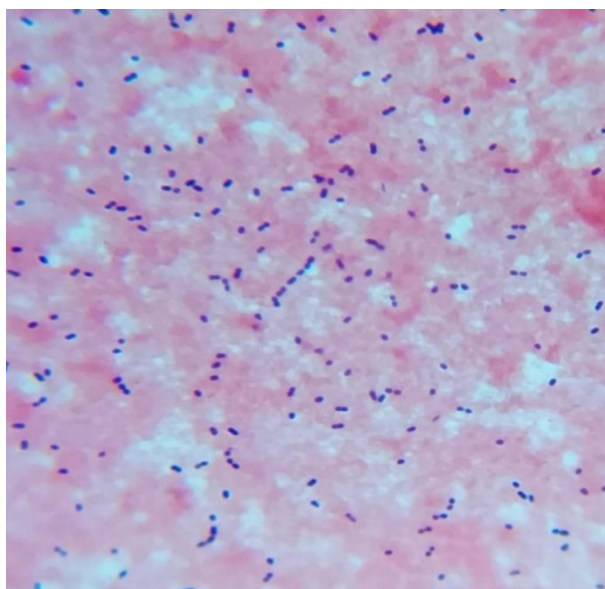
Färbung:

Nicht hitzefixierte Ausstriche werden mit der Beize für ca. 4 Minuten überdeckt und im Anschluss mit destilliertem Wasser abgespült. Daraufhin wird für 4 Minuten mit ammoniakalischer Silbernitratlösung überdeckt, wobei sich am Objektträger eine dunkelbraune Schicht absetzt. Am Ende der 4 Minuten wird der Objektträger noch für ca. 20 Sekunden auf eine 80°C heiße Herdplatte gelegt, sodass Dampf aufsteigt. Im Anschluss wird mit dest. Wasser abgespült und das Präparat kann nach dem Trocknen betrachtet werden.

V1 Bakterien aus Joghurt – Laktobazillen

Aus einem gewöhnlichen Milchjoghurt stellt man einen Ausstrich her. Dazu wird ein kleiner Tropfen Joghurt mit einem 2. Objektträger dünn auf dem ersten ausgestrichen. Den Ausstrich lässt man gut trocknen und stellt ihn zum Entfetten für ca. 30 Minuten in ein Präparateglas mit Wundbenzin oder Diethylether ein (nicht zwingen notwendig).

Im Anschluss wird eine Methylenblau-Färbung, oder Gram-Färbung durchgeführt. Man kann die in Paaren, oder kurzen Ketten liegenden, gram positiven, Laktokokken gut erkennen. Laktokokken sind wichtige Mikroorganismen für die Lebensmittelindustrie. Durch die Milchsäuregärung wird Glucose (auch andere Substrate wie Lactose, Maltose, Saccharose,.. sind möglich) zu Milchsäure umgewandelt was zur Ausflockung von Milch führt. Laktokokken kann man auch in anderen Milchprodukten nachweisen (Sauerrahm, Quark, Milch für ein paar Tage bei Zimmertemperatur stehen lassen,..).



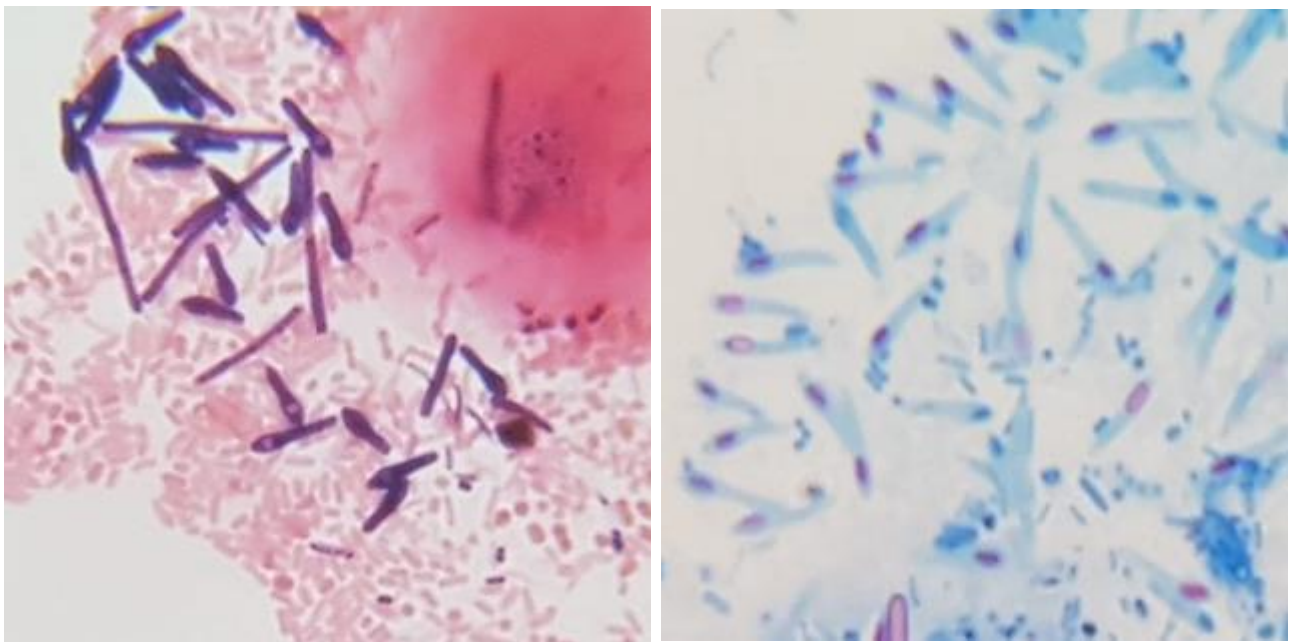
Laktokokken aus Joghurt; Gram-Färbung

V2 Anaerobier aus einer Kartoffel

Diesen Versuch führt man zweckmäßig im Sommer durch, da man die Kartoffelkultur im Freien lagern kann. Eine möglichst ungewaschene Kartoffel wird mit einem Messer seitlich einige Male angestochen. Daraufhin wird sie in ein großes Becherglas gelegt, welches mit etwas Frischhaltefolie gegen das Verdunsten geschützt wird.

Nach 2 Wochen wird die Frischhaltefolie entfernt. Vom Inneren der zerfallenden Kartoffel wird mit einer Pipette etwas Untersuchungsmaterial entnommen und auf einem Objektträger ausgestrichen. Nach Hitzefixierung wird eine Gram-Färbung und eine Endosporen-Färbung durchgeführt.

Man beobachtet eine Vielzahl verschiedener Bakterien. Die Mehrheit der Bakterien ist gram negativ. Auffällig sind große gram positive Bacillus sp., von denen viele an einem Ende aufgetrieben sind. Dabei handelt es sich um Endosporen des Buttersäuregärs *Clostridium butyricum*. Clostridien sind strikt anaerob wachsende Bakterien. Ihre Sporen befinden sich überall im Boden. Beim Lagern der Kartoffel unter Wasser werden anaerobe Bedingungen geschaffen, sodass die Sporen auskeimen und sich wieder vitale Zellen bilden. Die Buttersäuresynthese macht sich durch den üblen Geruch des Ansatzes bald bemerkbar. Unter anaeroben Bedingungen wie sie in Fleischkonserven zu finden sind, kann bei Kontamination der verwandte Keim *Clostridium botulinum* zu schwerwiegenden Vergiftungen führen.

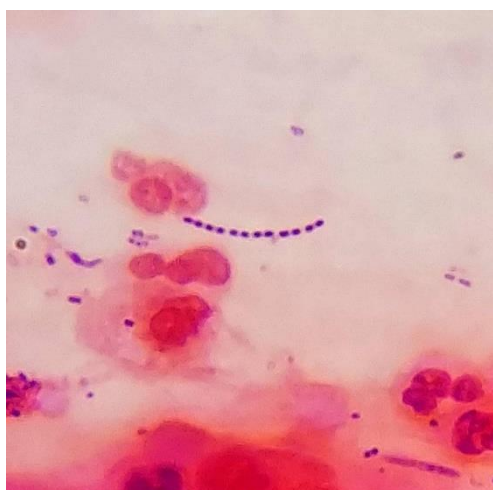


Clostridium butyricum Endosporen; links Gram-Färbung und rechts Endosporenfärbung n. Moeller

V3 Zahnbelag und Mundhöhle

Ein einfaches Präparat zur Gram-Färbung, oder Methylenblau-Färbung lässt sich auch aus der Mundhöhle gewinnen. Mit einem Zahnstocher wird etwas Material von (nicht ganz frisch geputzten) Zähnen und der Wange entnommen und auf einem Objektträger ausgestrichen. Nachdem der Ausstrich getrocknet und hitzefixiert ist, wird eine Gram-Färbung durchgeführt.

Der menschliche Mund ist voll mit verschiedensten Bakterien und man kann gram positive und gram negative Kokken, Streptokokken und Bazillen beobachten. Abgestorbene Epithelzellen der Mundhöhle sind meist voll mit Bakterien. Es können auch Abstriche aus dem Rachen oder von Mandeln genommen werden. Das Vorhandensein bestimmter Bakterien besitzt nicht automatisch Krankheitswert. So können auch bei völlig gesunden Personen z.B. Streptokokken und Meningokokken vorkommen. Das Erstellen medizinischer Diagnosen über Abstriche und Gram-Färbung kann nicht ohne weiteres durchgeführt werden.



Streptokokken aus einem Mandelabstrich während einer eitrigen Mandelentzündung neben neutrophilen Granulozyten

V4 Geißelfärbung an *Bacillus* sp.

Bakterien-Kultur

Eine einfache, sichere und auch zielführende Bakterienkultur wird hergestellt, indem 5 ca. 1 cm dicke Scheiben einer Karotte für ca. 5 Minuten in Wasser weichgekocht werden. Die Karottenscheiben legt man dann in eine Petrischale, die mit etwas befeuchteter Watte ausgelegt wurde. Nach 24 Stunden bei 33°C im Brutschrank bilden sich an der Oberfläche, schleimig, klebrige Kolonien, aus denen nach oben beschriebener Weise Ausstriche hergestellt werden können. Bebrütet man die Karottenscheiben weiter (für ca. weitere 48 Stunden) kann man auch

die Bildung von bakteriellen Endosporen beobachten. Hierbei wachsen vermutlich entweder *Bacillus megaterium* oder *Bacillus cereus* an.

Anzucht/Nährboden:

Für die Anzucht einer geeigneten Bakterienkolonie wird ein improvisierter Nährboden gegossen (es kann jeder andere Nährboden genauso verwendet werden). In einem 100 ml-Becherglas werden 50 ml dest. Wasser, 5 g fein zerhacktes Hühnerfleisch, 0,5 g Natriumchlorid, 0,5 g Glucose, ca. 3 ml Milch und eine Spatelspitze Harnstoff für 15 Minuten zum Sieden erhitzt. Danach wird die Lösung filtriert, mit 0,5 g Agar versetzt und für weitere 15 Minuten erhitzt, wobei sich der Agar rückstandslos auflöst.

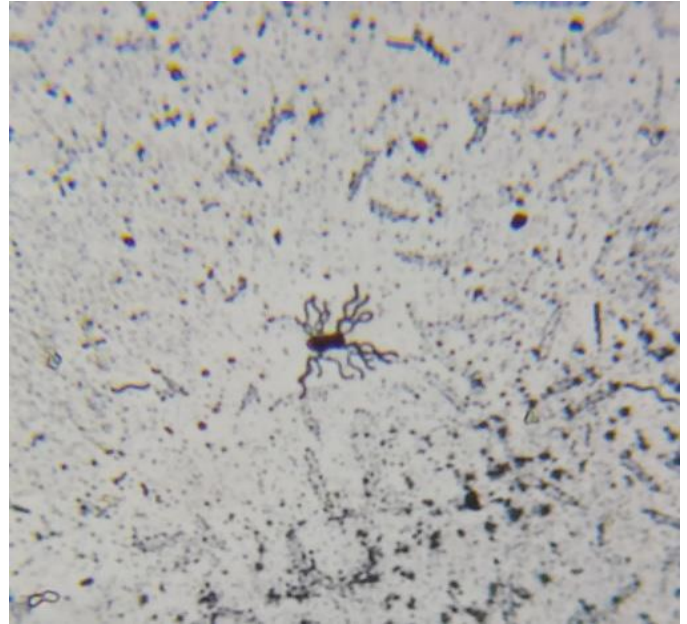
Währenddessen wird eine improvisiert desinfizierte Petrischale vorbereitet. Dazu wird eine Petrischale mit ca. 7 ml 70%-Isopropanol ausgegossen, der Deckel aufgesetzt und solange geschüttelt, bis der ganze Isopropanol durch den Rand aus der geschlossenen Schale hinausgeflossen ist. Im Anschluss wird die geschlossene Schale mit einem Haarföhn von außen auf beiden Seiten so lange erwärmt, bis die Schale trocken ist. Dabei darf die Schale nicht mehr geöffnet werden.

Sobald die Petrischale trocken und abgekühlt ist, wird sie seitlich leicht geöffnet und das noch heiße Nährmedium zügig eingegossen und verschlossen. Nach 1 Stunde ist der Nährboden fest und kann beimpft werden. Dafür wird mit einer Öse zuerst entlang einer Blumenkiste in die Erde getaucht und im Anschluss 3-mal über den Nährboden gestrichen und die Öse daraufhin im Bunsenbrenner ausgeglüht. Sobald die Öse abgekühlt ist, wird wieder 3-mal über den Nährboden gestrichen, wobei durch die 3 Linien aus dem ersten Ausstrich gestrichen wird. Danach wird die Öse nochmals ausgeglüht und wie oben beschrieben ausgestrichen (3 Ösen-Ausstrich). Die Agarplatte wird daraufhin über Nacht bei 33°C in einen Brutschrank gelegt (Deckel nach unten). Nach 16 Stunden können die anwachsenden Kolonien für die Färbung verwendet werden.

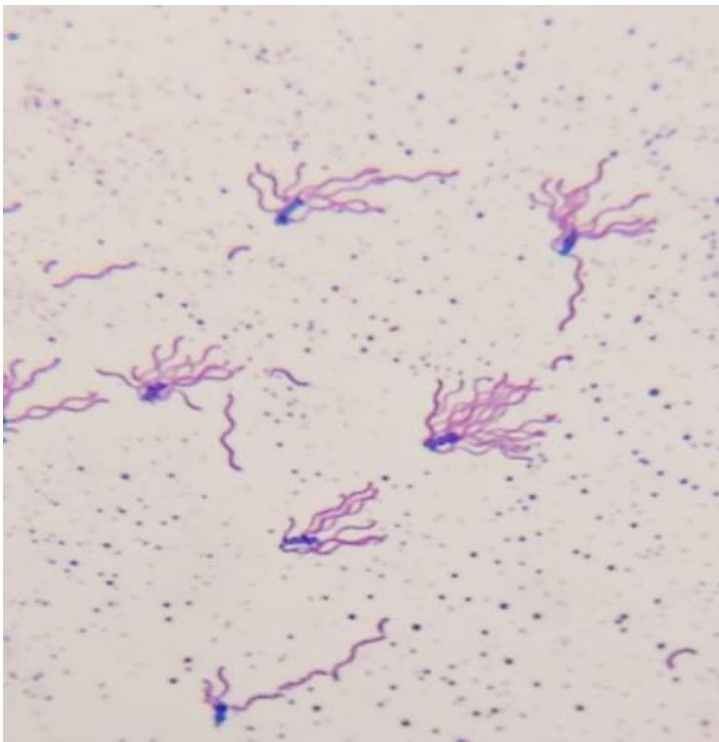
Erklärung:

Generell ist die dadurch hergestellte Bakterienkultur nicht optimal, da sie schwer gleich reproduzierbar ist und jedes Mal andere Keime anwachsen könnten. Viele gängige Bakterien sind aber begeißelt und man sollte damit Erfolg haben.

Bei der Kultivierung aus Gartenerde wachsen harmlose, peritrich begeißelte *Bacillus* sp. an. Die Bakterien breiten sich meist innerhalb kurzer Zeit über die ganze Platte aus, was für eine hohe Motilität spricht.



Versilberung - Versilberung



Färbung mit Methyleneblau Gegenfärbung

V5 Bacillus Endosporen

Wie in V4 beschrieben kann man Bakterien auf einer Kulturplatte aus Erde anzüchten, oder auf gekochten Karottenscheiben. Das Beimpfen der Nährböden erfolgt nach Pasteurisierung. Dazu wird in einem Reagenzglas ein kleiner Spatel Gartenerde suspendiert in für 10 Minuten in ein 80°C warmes Wasserbad getaucht. Nach 72 Stunden bebrüten sollten sich reichlich

Sporen und Endosporen finden lassen.

Identifizierung einer geeigneten Kolonie:

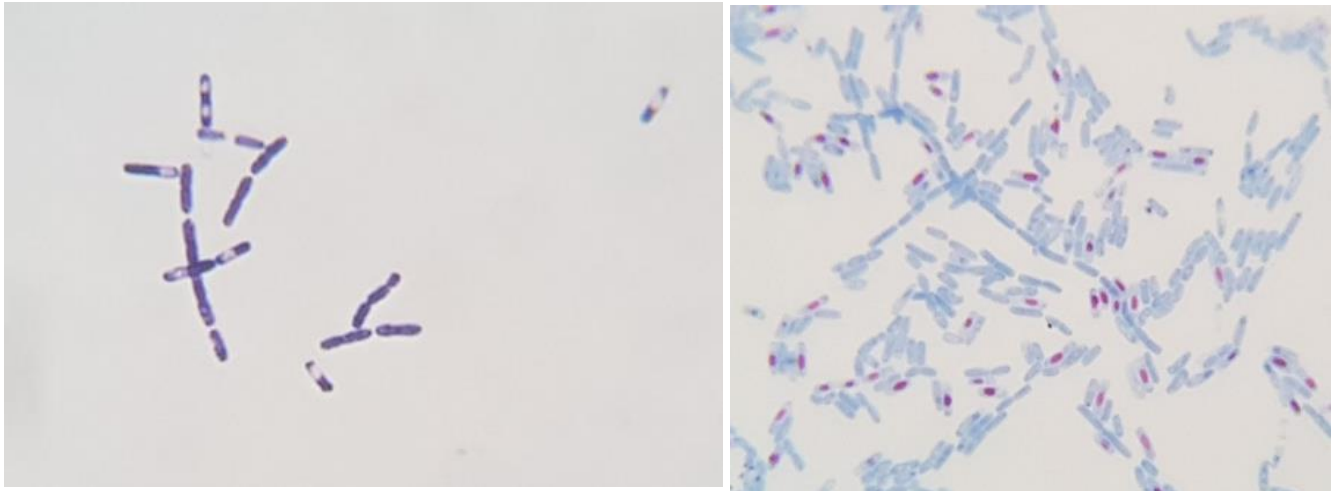
Jetzt muss man die einzelnen Kolonien untersuchen und herausfinden, ob sich Sporen gebildet haben. Zuerst bereitet man einen Objektträger vor, indem man einen kleinen Tropfen der Kochsalzlösung aufbringt. Danach glüht man die Präpariernadel aus, lässt sie abkühlen, öffnet die Petrischale seitlich, und fährt damit in die Kolonie. Danach streicht man die Spitze der Präpariernadel in der Kochsalzlösung auf dem Objektträger aus und verteilt so die Bakterien. Man verstreicht die Lösung, sodass ein dünner Film am Objektträger zurückbleibt, den man eintrocknen lässt. Die Präpariernadel wird danach in der Bunsenbrennerflamme ausgeglüht, bevor man die nächste Kolonie verwendet. Der so gewonnene Ausstrich wird hitzefixiert. Dazu wird er Objektträger, mit dem Ausstrich nach oben, 2-mal zügig durch die Flamme des Bunsenbrenners geführt. Man bleibt nicht mit dem Objektträger in der Flamme stehen! Nun werden die Bakterien gefärbt. Dazu kann man mit Löfflers Methylenblau arbeiten. Der hitzefixierte Ausstrich wird 30 Sekunden mit Löfflers Methylenblau überschichtet und danach mit Wasser abgewaschen. Danach wird der Ausstrich getrocknet. Man bringt einen Tropfen Immersionsöl auf und mikroskopiert unter Ölimmersion bei 1000x Vergrößerung. Endosporen erkennt man ausschließlich in Bazillen. Bazillen sind stäbchenförmig geformte Bakterien. Man erkennt sie daran, dass der Bazillus eine ungefärbte Stelle beinhaltet. Jetzt erst lohnt sich die Durchführung der aufwendigeren Möller Färbung. Alternativ kann sofort eine Färbung mit Malachitgrün durchgeführt werden.

Erklärung:

Endosporen sind die Überdauerungsformen der Bakterien. Sie werden innerhalb der Bakterienzelle gebildet. Den Vorgang der Endosporenbildung nennt man Sporulation. Unter ungünstigen Lebensbedingungen sind manche Spezies in der Lage, Endosporen auszubilden. Nur grampositive Bakterien sind dazu in der Lage. Endosporen besitzen sehr dicke Wände, weshalb sie nicht ohne weiteres angefärbt werden. Der besondere Wandaufbau erlaubt es den Endosporen selbst drastische Umweltbedingungen eine lange Zeit zu überdauern. Werden die Umweltbedingungen wieder günstiger, keimt die Endospore aus und bildet wieder ein völlig funktionsfähiges Bakterium.

Durch das Pasteurisieren werden alle anderen vitalen Bakterien abgetötet und es bleiben nur Endosporen zurück, die wieder auskeimen. Nach 72 Stunden beginnen die Bakterien meist

wieder Endosporen zu bilden. Dabei werden selektiv *Bacillus* sp. angezüchtet, meist *Bacillus subtilis* als einer der häufigsten, aeroben Bodenbakterien.



Endosporen: links Gram-Färbung - rechts Endosporenfärbung n. Moeller

V6 Fluoreszierende Bakterien – *Pseudomonas fluorescens*

Die Gattung *Pseudomonas* umfasst mehrere Arten, wobei alle gram negativ, polar begeißelt und aerob oder anaerob leben. Sie kommen ubiquitär im Boden vor und leben vor allem in Assoziation von pflanzlichen Wurzeln (Rhizosphäre) und ernähren sich von abgestorbenem organischem Material.

Die meisten *Pseudomonas* Arten sind harmlos, einige können aber als Krankheitserreger vor allem bei geschwächten Pflanzen und Tier auftreten. Vor allem *Pseudomonas aeruginosa*, als wichtigster Vertreter der Gattung, kann beim Vorliegen disponierender Erkrankungen (Immunschwäche, Mukoviszidose) zu wiederkehrenden, schweren Infekten führen.

In diesem Experiment, dessen Anleitung auch aus dem Buch „Mikrobiologisches Praktikum von Alexander Steinbüchel et al.“ Stammt, sollen grundlegende mikrobiologische Techniken erlernt werden. Zur Anzucht wird der häufig im Boden vorkommende *Pseudomonas fluorescens* aus einem Blumentopf (Orchidee) verwendet.

Chemikalien:

Kaliumphosphat-Monohydrat  

Pepton aus Casein

Agar

Glycerin

Magnesiumsulfat-Hepthydrat

Durchführung:

Nährmedium:

Man beginnt mit der Herstellung und Sterilisation des benötigten Nährmediums und der Petrischalen. Für die Anzucht von *Pseudomonas fluorescens* werden mindestens 3 Platten mit King's B Festmedium hergestellt. Dazu werden in 100 mL dest. Wasser 2 g Pepton, 1 g Glycerin, 0,15 g Kaliumphosphat, 0,15 g Magnesiumsulfat gelöst. Sollte die Lösung eine Trübung aufweisen wird filtriert. Das flüssige Nährmedium wird anschließend in einem 350 mL fassenden Erlenmeyerkolben vorgelegt, 1,5 g Agar und ein Magnetrührfisch beigegeben, mit einer Kappe aus Alufolie lose verschlossen und für 40 Minuten in einem Druckkochtopf bei 120°C (oder Autoklaven) sterilisiert.

Bevor man das Medium in die vorbereiteten Petrischalen gießt, lässt man es so weit abkühlen, dass es handwarm ist. Dadurch wird eine überschüssige Bildung von Kondenswasser auf den Platten vermieden. Das Gießen der Platten erfolgt neben einem Bunsenbrenner mit rauschender Flamme. Sobald der Nährboden erstarrt ist, werden die Platten auf den Kopf gedreht.

Anreicherungskultur:

Aus einem häuslichen Blumentopf wird in ca. 3 cm Tiefe in der Nähe der Wurzeln ein Spatel Erde entnommen und in 5 ml Saline suspendiert. Mit einer in der Bunsenbrenner Flamme sterilisierten Öse wird ein Nährboden flächig mit der Erdsuspension beimpft. Im Anschluss werden die Platten bei ca. 28°C bebrütet.

Vereinzeln/Reinkultur:

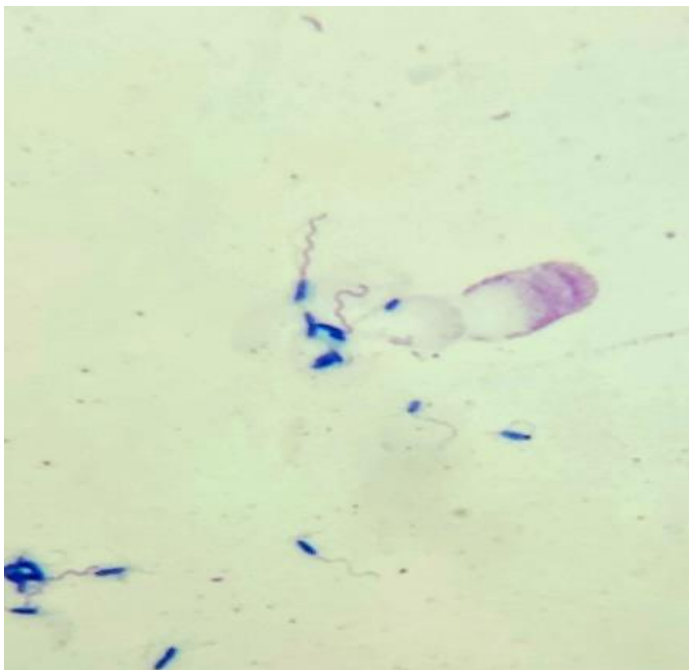
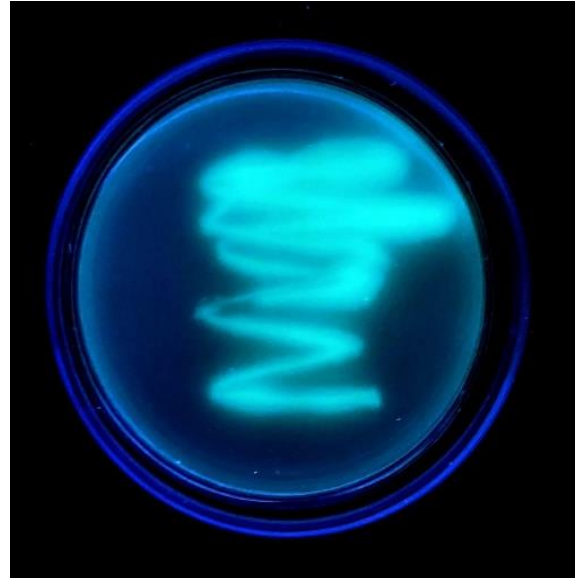
Schon nach wenigen Stunden ist ein Bakterienwachstum erkennbar. Nach 36 Stunden wird die Anreicherungskultur unter der UV-Lampe betrachtet und nach fluoreszierenden Bereichen Ausschau gehalten. Sollte nach 48 Stunden kein fluoreszierendes Areal erkennbar sein wird die Platte verworfen und ein neuer Anlauf unternommen. Aus einem fluoreszierenden Areal werden mit einer sterilen Öse Bakterien entnommen und in einem Eppendorf Gefäß mit 0,5 mL steriler Saline suspendiert. Mit der so gewonnen Bakteriensuspension wird auf einer frischen Agarplatte ein Kreuzausstrich, wie in Abbildung 1 gezeigt, angefertigt und die Platte für erneut für 36 Stunden bebrütet.

Erklärung:

Aus der Anreicherungskultur werden allerhand Bodenbakterien gewonnen unter anderem *Pseudomonas fluorescens*. Der zweite in diesem Experiment angereicherte Keim ist wahrscheinlich *Bacillus subtilis*, der innerhalb kurzer Zeit (schon nach 6 Stunden) den halben

Nährboden überwuchern kann. Auch *Pseudomonas fluorescens* ist motil und die Einzelkolonien breiten sich auch ziemlich schnell aus. *Pseudomonas fluorescens* kommt häufig im Bereich von Wurzeln vor und sezerniert verschiedene antibiotisch wirksame Substanzen in die Rhizosphäre. Dadurch wird die besiedelte Pflanze in einem gewissen Grad vor anderen Pathogenen geschützt. Dabei gibt *P. fluorescens* (wie auch *P. aeruginosa*) fluoreszierende Pyoverdine ab. Die sezernierten Pyoverdine dienen als Siderophore und binden Fe^{3+} Ionen im Boden. Der Pyoverdin- Fe^{3+} -Komplex kann im Anschluss durch spezifische Transporter wieder in die Bakterien Zelle aufgenommen werden. Durch den Entzug von Fe^{3+} Ionen und der antibiotischen Wirkung der Pyoverdine hemmt *P. fluorescens* das Wachstum anderer Keime im Bereich der Wurzeln. Man erkennt die Pyoverdin bei älteren Kulturen auch im Tageslicht an einer leichten Gelbfärbung. *Pseudomonas fluorescens* wächst psychrotolerant bei niedrigen Temperaturen 25-30°C am besten und wächst schlecht bei Temperaturen über 35°C und ab 42°C überhaupt nicht mehr. Die korrekte Einstellung der Temperatur ist wichtig. Ich hatte zuerst bei 35°C bebrütet und erst nach über 36 Stunden ein kleines fluoreszierendes Areal festgestellt und die Platte war binnen weniger Stunden durch *B. subtilis* überwachsen. Erst nachdem ich meinen Fehler bemerkt hatte und die Temperatur auf 28°C gesenkt habe, ist *P. fluorescens* sehr gut gewachsen. Andere *Pseudomonas* Arten, wie *P. aeruginosa* wachsen auch bei 42°C und verfärben den Nährboden eher blau/grün. Außerdem riecht *P. aeruginosa* charakteristisch, süßlich. Bei mit *P. aeruginosa* infizierte Wunden kann man manchmal schon makroskopisch eine Blau-/Grünfärbung erkennen. Das temperaturabhängige Wachstum von *P. fluorescens* kann zur Differenzierung von *P. aeruginosa* herangezogen werden.

In der Gramfärbung erkennt man kleine, gram negative Stäbchen. In der Geißelfärbung zeigt sich *P. fluorescens* monopolar begeißelt. Manchmal sieht man mehrere Geißeln, meist werden die Geißeln durch die Färbung aber nur als eine einzige dargestellt (außerdem kann man so kleine Strukturen lichtmikroskopisch kaum noch auflösen). Der Katalase Test fällt positiv aus.



Oben Vlnr.: Gram-Färbung, gram negative Stäbchen - Reinkultur unter UV-Licht – unten: Geißelfärbung, monopolar begeißelte Stäbchen

Weiterführende Literatur:

Steinbüchel, A., Oppermann-Sanio, F. B., Ewering, C. & Pötter, M. (2021). Mikrobiologisches Praktikum: Versuche und Theorie (German Edition) (3. Aufl. 2021 Aufl.). Springer Spektrum.

Bruno P. Kremer: Das große Kosmos Buch der Mikroskopie, 3. Auflage, Stuttgart 2015; Franckh-Kosmos Verlags-GmbH & Co. KG, S. 51-52

Forbes L. Rapid flagella stain. J Clin Microbiol. 1981 Apr;13(4):807-9. doi: 10.1128/jcm.13.4.807-809.1981. PMID: 6164691; PMCID: PMC273886.

West M, Burdash NM, Freimuth F. Simplified silver-plating stain for flagella. J Clin Microbiol. 1977 Oct;6(4):414-9. doi: 10.1128/jcm.6.4.414-419.1977. PMID: 72075; PMCID: PMC274784.