Begleittext Filme Nährmedien

1.) Zusammensetzung von Nährmedien

Die meisten kultivierbaren Mikroorganismen wachsen in Flüssigkulturen oder auf festen Agarmedien. Diese Medien sollten alle Nährstoffe enthalten, die für das mikrobielle Wachstum nötig sind. Ein typisches Komplexmedium, das für viele Mikroorganismen eingesetzt werden kann, besteht aus Hefeextrakt, Fleischextrakt, Peptiden aus Milcheiweißeextrakt und zusätzlich häufig noch einem Kohlenhydrat (meist Glucose oder Sucrose). Die Extrakte enthalten Proteine, Peptide, Kohlenhydrate, Lipide, Nucleotide Vitamine, Kofaktoren und Spurenelemente, so wie sie in den Organismen, aus denen die Extrakte hergestellt wurden, vorkommen. Die genaue Zusammensetzung der Extrakte ist daher sehr komplex und undefiniert. Daher werden nach Möglichkeit Mineralmedien eingesetzt, wenn mit definierten Organismen Experimente, z. B. zur Enzymregulation, durchgeführt werden sollen. Auch Minimalmedien (die nur die notwendigsten Substrate für das Wachstum eines jeweiligen Organismus enthalten) und einige Selektivmedien sind Mineralmedien.

Film -> Herstellung von Festmedium

Ein typisches Komplexmedium ist der FP-Agar (**F**leischextrakt-**P**epton; im Praktikum zur Anzucht von *Bacillus* spp. verwendet):

FP-Agar:

Fleischextrakt	3	g
Pepton	5	g
Spurenelemente-Lsg.	1	ml
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	10	mg
Agar	15	g
pH-Wert 7,2		

Fleischextrakt und Pepton einhalten alle notwendigen Nährstoffe, auch Vitamine und Spurenelemente. Dennoch wird in diesem Fall noch etwas Spurenelement-Lösung hinzugegeben, um Mangelsituationen auszuschließen. Die meisten Stämme würden aber auch ohne diese Zugabe wachsen können. Die Zugabe von Manganchlorid ist nur notwendig, um die Bacilli zur Sporenbildung anzuregen. Ist der pH-Wert für ein Medium angegeben, sollte er in jedem Fall überprüft und ggf. eingestellt werden. Ein neutraler bist leicht alkalischer pH ist geeignet für die meisten kultivierbaren Bakterien.

Wie wird Pepton hergestellt?

meg-Agar: (Farbcode: BLAU)

Glucose	10	g
K_2HPO_4	1	g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5	g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,05	g
Spurenelemente-Lsg.	1	ml
NH_4Cl	1	g
Agar	15	g
pH-Wert 7,2		

Der meg-Agar (z.B. für das Wachstum von *Bacillus megaterium*) besteht aus chemisch definierten Einzelkomponenten. Es ist ein Minimalmedium ohne komplexe Bestandteile. Vitamine, Aminosäuren oder Nucleotide, die alle in den komplexen Bestandteilen enthalten sind, fehlen. Sie können von Organismen, die auf diesem Minimalmedium wachsen, alle *de novo* synthetisiert werden. In jedem Medium müssen jedoch ausreichende Mengen der

Makroelemente (C, H, N, O, P, S) vorhanden sein. Schwefel und Phosphor werden meist als Sulfate und Phosphate dem Medium zugegeben, Stickstoff als Ammonium oder Nitrat. Kohlenstoff wird bei heterotrophen Organismen meist als Kohlenhydrat (hier Glucose) zugegeben. Daneben sind ein- und zweiwertige Ionen (K^+ oder Na^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}) und Spurenelemente essentiell.

Spurenelemente-Lsg.: (SL10, nach PFENNIG)

HCl 25 % (w/v)	10	ml	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	190	mg
$FeCl_2 \cdot 4H_2O$	1,5	g	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	2	mg
$ZnCl_2$	70	mg	$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	24	mg
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	100	mg	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	36	mg
H_3BO_3	6	mg			

Eine typische Spurenelementlösung (SL 10 - die Nummer bezeichnet hier nicht die Anzahl der Spurenelemente) ist hier angegeben. Eisen steht nach den Konzentrationen erster Stelle (Endkozentration in der Lösung 1,5 mg). Daneben finden sich eine Reihe Übergangsmetalle und Bor in den Spurenelementlösungen, die nur in Größenordnungen von µg vorhanden sind. Eine Reihe weiterer Elemente (wie z.B. Selen) sind ebenfalls von Bedeutung. Hier reichen allerdings die Spuren von Verunreinigungen aus, die sich im Agar oder im Wasser befinden oder aus dem Glas des Kulturgefäßes herausgelöst werden.
Film ->Herstellung von Stammlösungen für Medien
Spurenelement-Lösungen werden als Stammlösungen angesetzt. Sollte es notwendig sein, auch Vitamine oder andere definierte organische Bestandteile dem Medium hinzuzufügen, werden die Stammlösungen sterilfiltriert und nicht autoklaviert
Film -> Sterilfiltrieren

Schließlich werden die Bestandteile der Medien steril zusammengegeben.

Film -> Steriles Pipettieren

Welche Aufgaben erfüllen die Spurenelemente im Einzelnen?

2. Gewinnung von Reinkulturen

Unter einer Reinkultur versteht man die Nachkommenschaft (Klon) einer einzigen Zelle. Die Zellen tragen somit eine einheitliche genetische Ausstattung. Daraus ergibt sich zwangsläufig, dass eine Reinkultur frei von anderen Organismen sein muss.
Das Prinzip ihrer Gewinnung besteht in der **Vereinzelung** der Zellen der Organismen aus einer Probe bzw. Anreicherung und ihrer Kultivierung auf oder in festen Agar-Nährböden, so dass isolierte Kolonien entstehen. Kolonien, welche allein aus der Nachkommenschaft einer einzigen Zelle bestehen, stellen nach ihrer Abimpfung Reinkulturen dar. Den Kolonien ist allerdings oft nicht anzusehen, ob sie diese Voraussetzung erfüllen oder ob sie aus der heterogenen Nachkommenschaft mehrerer assoziierter Mikroorganismenzellen zusammengesetzt sind.
Zur Kontrolle der Vereinzelung eignet sich v.a. die mikroskopische Untersuchung des Koloniematerials. Solange die Zellen unterschiedliche Zellmorphologien aufweisen, liegt mit Sicherheit keine Reinkultur vor. Da sich allerdings viele Organismen morphologisch stark ähneln, ist eine entsprechende Einheitlichkeit nicht hinreichend, um eine Reinkultur zu belegen. Zudem werden oft Kontaminanten - also unerwünschte Beimischungen von anderen Mikroorganismen - in so niedrigen Konzentrationen mitgeschleppt, dass sie in der mikroskopischen Kontrolle nicht erfasst werden. In der Praxis wird dem so Rechnung getragen, dass das Vereinzelungsverfahren ein- oder mehrfach wiederholt wird. Damit wächst die Wahrscheinlichkeit, dass sich schließlich Reinkulturen entwickeln. In der Regel wird dabei Koloniematerial über Vereinzelungsausstriche soweit verdünnt, dass sich einzeln liegende Kolonien auf dem festen Agarmedium entwickeln können.

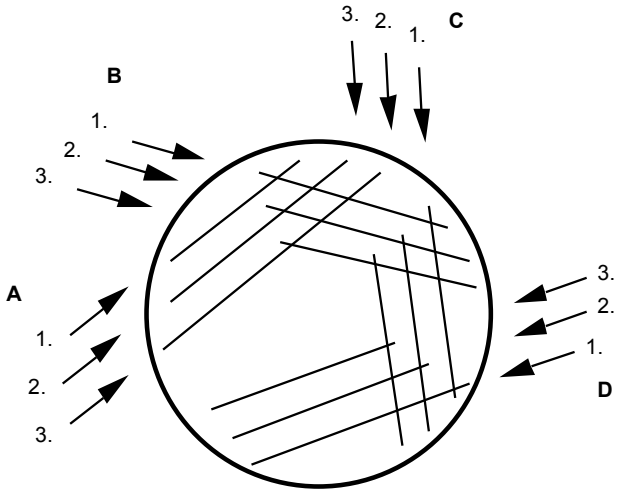
Nur Reinkulturen werden verwendet, um Flüssigmedien anzuimpfen. Der Vorteil bei Flüssigkulturen ist, dass nahezu beliebig große Mengen von Zellmaterial leicht angezogen werden können.

Film -> Kultivierung in Flüssigmedien

Mikroskopische Untersuchung:
Der Bunsenbrenner wird so (in einer Mittelstellung) einreguliert, dass die Flamme weder leuchtet noch prasselt. Die Impföse aus Platindraht wird **kurz** ausgeglüht, indem sie in einem spitzen Winkel in die Flamme gehalten wird. Der untere (metallene) Teil des Halters wird dabei mit einer raschen Bewegung **einmal** durch die Flamme gezogen. Außerhalb der Flamme kühlt die Impföse rasch ab. (Zur schnellen Abkühlung auf Raumtemperatur kann man die Impföse leicht auf die Agaroberfläche der vorliegenden Petrischale drücken, wobei man sich einen äußeren, nicht zu beimpfenden Bereich aussucht.) Danach wird von **einer einzeln liegenden Kolonie** etwas Material abgenommen und dieses in ein "Wasserröhrchen" (= Reagenzglas mit einem Tropfen Wasser) übertragen. Das Koloniematerial verreibt man zunächst mit der Öse an der inneren Wandung des Reagenzglases, um dann durch Schütteln des Glases eine Suspendierung der Zellen zu erreichen. Die Zelldichte muss so hoch sein, dass eine deutliche Trübung im Wassertropfen erkennbar wird. Für ein mikroskopisches Präparat werden aus dieser Suspension mit der Impföse ein oder mehrere Tröpfchen auf einen Objektträger gebracht und mit einem Deckglas bedeckt. Mikroskopiert wird mit einer Phasenkontrastoptik. Wenn die Zellmorphologie den Erwartungen entspricht und einheitlich ist, lohnt sich ein weiterer Vereinzelungsausstrich

Vereinzelungsausstrich
Die ausgeglühte Impföse wird im "Wasserröhrchen" mit der Zellsuspension benetzt und dann über die Agaroberfläche einer Petrischale gezogen. Oft wird hierbei das "3-Strich-Verfahren" angewendet:
Man verfährt, wie die Abbildung es verdeutlicht. Nach den drei A-Strichen wird die Impföse wieder ausgeglüht, abgekühlt und bei B-1. ansetzend erneut dreimal über den Agar geführt. Das Gleiche wiederholt sich vor den C- und D-Strichen. Zwischen den jeweiligen Strichsegmenten wird **keine** neue Probesuspension mit der Öse aufgenommen

Beim Ausstreichen sollte unbedingt auf folgendes geachtet werden: Der Deckel der Petrischale darf nicht auf dem Tisch abgelegt werden. Er wird mit den mittleren Fingern und dem Daumen der anderen Hand schützend über die Petrischale gehalten, während die beiden äußeren Finger die Petrischale nicht verrutschen lassen. Ein "Pflügen" des Agars läßt sich leicht vermeiden, wenn man die Impföse in einem möglichst spitzen Winkel und **ohne Druck** über die Oberfläche gleiten läßt.



Die fertig ausgestrichenen Platten werden zur späteren sicheren Identifikation am Boden der Agarplatte beschriftet (Versuch, Organismus, Datum) und anschließend im Brutraum bzw. Brutschrank bei der angegebenen Temperatur inkubiert. Dabei werden sie mit dem Deckel nach unten gelagert. Dadurch kann vermieden werden, dass das mit der Zeit sich im Deckel sammelnde Kondenswasser auf die Agaroberfläche tropft und dort zum Verlaufen der Kolonien führt.

Film -> Vereinzelungsausstrich auf Agarmedium

Jedes in Reinkultur gebrachte Isolat wird nach der Identifizierung als Stamm bezeichnet und üblicherweise mit einer Stammbezeichnung (= Buchstaben-Ziffern-Kombination hinter dem Speziesnamen) versehen. Dieses Vorgehen berücksichtigt, dass verschiedene Isolate eines Mikroorganismus in der Regel nicht vollkommen identisch sind und mindestens auf genetischer Ebene Unterschiede aufweisen.

Vergleichen Sie den Vereinzelungsausstrich mit dem im Praktikum durchgeführten "Kochschen Plattengussverfahren" hinsichtlich Quantifizierbarkeit der Ergebnisse und Praktikabilität