



ZÜRCHER HOCHSCHULE FÜR ANGEWANDTE WISSENSCHAFTEN

DEPARTEMENT LIFE SCIENCES UND FACILITY MANAGEMENT

INSTITUT BTCH

ZF Mikrobiologie

Semester 2

von

Katja Mutter

Bachelorstudiengang 2020

Studienrichtung Biotechnologie

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1. Sicherheit..... | 3 |
| 2. Kultivierung von Mikroorganismen..... | 6 |
| 3. Keimzahlbestimmung | 8 |
| 4. Auswertung mikrobiologischer Ansätze | 10 |
| 5. Mikroskopie | 12 |
| 6. Grobdifferenzierung..... | 14 |
| 7. Feinidentifikation | 16 |
| 8. Elektiv und Selektiv Nährmedien | 17 |
| 9. Sporenbildner..... | 20 |
| 10. Hygienemonitoring..... | 21 |
| 11. Wachstum von Mikroorganismen | 22 |
| 12. Literaturverzeichnis..... | 23 |

1. Sicherheit

Sie kennen die Sicherheitsmassnahmen, die in einem Mikrobiologielabor getroffen werden und könne diese korrekt anwenden. Weiter können Sie die Massnahmen aufzeigen, die in einer Notfallsituation getroffen werden müssen.

Sicherheitsmassnahmen:

- Türen und Fenster während der Arbeit geschlossen
- Essen, Trinken, rauchen, schnupfen, schminken und aufbewahren von Lebensmitteln Verboten.
- Schutzkleider, Labormäntel
- Mit Mund pipettieren verboten
- Spritzen und Kanülen wenn möglich vermeiden und richtig entsorgen als Sonderabfall
- Aerosole vermeiden
- Händewaschen nach der Arbeit und beim Verlassen des Raumes
- Sauberkeit der Arbeitsräume
- Periodische Überprüfung der Identität der Keime
- Ausbildung des Personals (mind. 1 mal pro Jahr)
- Unerfahrene Arbeitnehmende müssen informiert, sorgfältig angeleitet und überwacht werden.
- Periodische Bekämpfung von Ungeziefer

Bei einem Notfall:

- Biosicherheits -Notfallkit
- Jeder der im Labor arbeitet muss bei folgenden Problemen wissen was er zu tun hat
 - Infektiöses Material auf Boden
 - Infektiöses Material im Mund
 - Infektiöses Material im Auge
- Hautverletzungen mit kontaminierten Gegenständen oder Infektionsmaterial
- Notfalls einen Arzt aufsuchen

Sie sind in der Lage, die Begriffe Reinigung, Desinfektion und Sterilisation zu definieren und können unterschiedliche Arten der Desinfektion und Sterilisation beschreiben.

Reinigung: Entfernen von Schmutz und optischen Verunreinigungen

Desinfektion: Reduktion von pathogenen Mikroorganismen auf der zuvor gereinigten Fläche durch mechanische oder chemische Verfahren.

Sterilisation: Abtötung von MO durch Hitze durch Denaturierung der Zellproteine, bei trockener Hitze auf der Oxidation intrazellulärer Bestandteile.

Sie kennen die verschiedenen Methoden zur Sterilitätsprüfung von Medien und Laborgeräten.

Physikalische Sterilisation:

- Feuchte Hitze (Autoklavieren)
 - bei 121°C und 2 bar für 15-20 Minuten
 - Für Nährmedien und wässrige Lösungen
- Trockene Hitze (Heissluftsterilisation)
 - Bei 160-165°C für 2 Stunden
 - Bei 170-180°C für 1 Stunde

- Es muss langsam aufgeheizt werden, um die Materialien nicht zu beschädigen
- Für Gerätschaften aus Glas und Metall

Mechanische Sterilisation

- Sterilfiltration
 - Abtrennung der in Flüssigkeiten oder Gasen vorhandenen MO
 - Zur Entkeimung von Hitzeempfindlichen Präparaten

Chemische Sterilisation

- Es werden Natronlauge, mikrobiozide Gase, Wasserstoffperoxid und Ozon verwendet
- z.B für die Sterilisation von Operationssälen

Sie kennen die verschiedenen Methoden zur Sterilitätsprüfung von Medien und Laborgeräten.

Konventionelle Steriltests:

- Die sterilisierten Medien werden bei 30°C, bzw. bei der Arbeit mit thermophilen Mikroorganismen bei 50°C, während 48 Stunden bebrütet und anschliessend noch während 48 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen.
- Pipetten, Reagenzgläser, Gefässe werden mit Nährbouillon ausspült. Die Bouillon wird anschliessend während 48 Stunden bei 30°C bebrütet.
- 2 ml Verdünnungslösung werden mit ca. 15 ml Nähragar in eine leere sterile Petrischale gegossen und bei 30°C während 48 Stunden bebrütet.

Bioindikatoren:

- Es werden dem zu sterilisierenden Medium MO-Kulturen beigesetzt. Das Medium wird nach der Sterilisation auf den bestimmten Keim untersucht.

Sterilkontrolle durch Farbumschlag

- Zur routinemässigen Sterilisationskontrolle werden Klebebänder verwendet, die bei ausreichender Hitze einwirkung einen Farbumschlag aufweisen.

Sie wissen, was steriles Arbeiten bedeutet, und können es in der Praxis anwenden.

- Das Arbeiten mit Mikroorganismen sollte in einem keimarmen Labor oder in einer Impfkabine erfolgen.
- Zugluft im Labor ist zu vermeiden. Durch regelmässige Desinfektion von Oberflächen (Arbeitsflächen und Fussböden) und bei Impfkabinen ev. UV-Bestrahlung vor der Arbeit sollte der Mikroorganismengehalt der Raumluft möglichst geringgehalten werden
- Die Ränder von Glasgefässen vor und nach der Entnahme oder Zugabe von Material in der Bunsenbrennerflamme abflammen. ACHTUNG: Flaschen mit einem Plastik-Dichtungsring dürfen nicht abgeflammt werden. In dem durchgeführten Praktikum wird dies nicht gemacht, da die Verbrennungsgefahr zu gross ist und die Temperatur des Raumes sich zu stark erwärmen würde.
- Gefässe nur so lange geöffnet lassen wie unbedingt nötig. Beim Beimpfen von Nährbodenplatten Deckel schräg über den Agar halten. Während des Beimpfens nicht sprechen oder husten (Mundschutz!?)
- Die Sedimentation von Mikroorganismen aus der Raumluft kann durch ständiges Brennen des Bunsenbrenners verringert werden. ABER: Gefahr von Verbrennungen bei Studentenpraktika, zudem massive Raumluft-Erwärmung. Deshalb ist im Rahmen von Praktika mit Studierenden empfohlen, den Bunsenbrenner bei Nichtgebrauch auf Sparflamme zu stellen
- DEMONSTRATION: Niemals sterile Stopfen oder andere Geräte z.B. Pipetten, Spatel usw., die noch weiterverwendet werden, auf die Arbeitsfläche legen. Sterile Stopfen werden am oberen, aus dem

Gefäss ragenden Teil angefasst und während der Arbeit zwischen kleinem Finger und Handballen der rechten Hand gehalten, wobei darauf zu achten ist, dass man nirgends mit dem sterilen Teil des Stopfens anstösst

- Entnommene Pipetten oder Spatel sind am oberen Ende in der Hand zu halten, darauf achten, dass nirgends angestossen wird. Vor Verwendung kurz durch die Flamme ziehen. Nach Gebrauch in Desinfektionsmittellösung stellen. Im Praktikum wird mit Einwegösen und –spateln gearbeitet, wodurch das Abflammen weggelassen werden kann.

2. Kultivierung von Mikroorganismen

Nach welchen 3 Kriterien werden die Nährmedien eingeteilt?

Konsistenz:

- Flüssige Nährmedien (Anreicherungsmedien) sind komplexe Medien, die vorwiegend dazu dienen:
 - Bakterien anzureichern
 - Bei Reinkulturen zur Prüfung physiologischer Eigenschaften
 - Zur Gewinnung grösser Zellmengen
- Feste Nährmedien (Isolierungsmedien) werden eingesetzt für:
 - Keimzahlbestimmung
 - Gewinnung, Überprüfung und Aufbewahrung von Reinkulturen

Zusammensetzung:

- synthetisches Medium: enthält ausschliesslich chemisch exakt definierte Bestandteile in bekannter Konzentration (Zucker, Stärke, Alkohole, Fettsäuren usw. & Stickstoffquellen wie Ammoniumverbindungen, Aminosäuren und Nitrat).
- Komplexnährboden: enthalten ein oder mehrere organische Bestandteile, deren chemische Zusammensetzung nicht genau bestimmt ist (meist komplexe, schlecht definierte Naturprodukte wie Hefeextrakt oder Pepton).

Verwendungszweck:

- Das Universalmedium ist ein Komplexmedium, das für das Wachstum von vielen MOs geeignet ist.
- Selektivnährmedien (Elektivnährmedien) enthalten selektive Zusätze, die möglichst nur eine MO-Gattung oder MO-Art vermehren lässt & andere Keime hemmt. Sie können in flüssiger oder in fester der halbfester Form eingesetzt werden.
- Differenzierungsmedien (Indikatornährböden) enthalten Zusätze, z.B. Farbstoffe, die bestimmte, diagnostisch wichtige StoffwechsellLeistungen von Mikroorganismen sichtbar machen, indem sie mit Stoffwechselprodukten reagieren, die in diesem Medien nur von bestimmten Organismen gebildet werden. Dabei kann es zu einer Veränderung (z. B. Verfärbung) des Mediums oder der Kolonie kommen.

Sie können Nährmedien (BHI-Bouillon, PC-Agar) diesen 3 Kriterien zuordnen.

| Nährmedium | Konsistenz | Zusammensetzung | Verwendungszweck |
|----------------------------|------------|-----------------------|------------------|
| Brain heart Infusion (BHI) | Flüssig | Komplex | Universell |
| Plate Count (PC) | Fest | synthetisch | Universell |
| Malz-Agar (MA) | Fest | Komplex Vollmedium | selektiv |

Was sind die Unterschiede zwischen einem Minimalmedium und einem Vollmedium?

- Minimal: Mindestanteil an benötigten Nährmedien. Jeder Bestandteil ist definiert.
- Vollmedium: enthält weitere, nicht lebensnotwendige Verbindungen.

Sie wissen, wie Bakterien angezüchtet, gelagert, revitalisiert, gereinigt und aufbewahrt werden können.

Zucht: passende Umweltbedingungen (Temperatur, aerob/anaerob, Dauer, Nährstoffe), Passende Kultur (Bouillon, Schrägagar, Stichkultur, Schüttelkultur, Plattenausstrich, Gusskultur)

Lagerung: Agarplatten mit dem Deckel nach unten, Reagenzgläser aufrecht in einem Gestell,

Revitalisierung: Lyophilisat (pulverförmig) → long-term storage → Working Stock → Transfer 1 → Transfer 2
Endosporen können durch aufkochen zum Keimen gebracht werden.

Reinigung: Mit dem Drei-Ösen-Ausstrich hergestellte Einzelkolonien werden Überimpft, auf eine weitere Agar-Platte aufgetragen, bis das Wachstum vom Keim homogen ist. Wenn genaue Isolierung nötig, muss am Ende der Keim der Einzelkultur noch identifiziert werden.

Aufbewahrung:

Langfristig:

- Trockenkonservierung:
 - Gefriertrocknung
 - Konserviert auf Silikagel bei 4°C
 - Konserviert auf Gelatineblatt

| Methode | Geeignet für | Durchschnittliche Überlebensdauer |
|--|--|--|
| Vakuumentrocknung ohne vorheriges Einfrieren | Bakterien (vor allem gram positive Arten); sporenbildende Pilze | Mehr als 10 Jahre |
| L- Trocknung (liquid-drying) | Bakterien, die die Gefriertrocknung nicht vertragen | Bis zu 15 Jahre |
| Gefriertrocknung | Ca. 95% der Bakterien; die meisten Hefen; mehr als 90% der sporenbildenden Pilze | Bakterien 10 bis mehr als 30 Jahren; Spore |

- Gefrierkonservierung:
 - Flüssigstickstoff -195°C
 - Konserv. auf Glasperlen bei -70°C

| Methode | Geeignet für | Durchschnittliche Überlebensdauer |
|---|-------------------------------|-----------------------------------|
| Aufbewahrung auf im Tiefkühlschrank bei weniger als -70°C | Viele Bakterien, einige Hefen | Bis zu 10 Jahre und länger |
| Aufbewahrung in Flüssigstickstoff bei -130°C | Die meisten Mikroorganismen | Länger als 30 Jahre |

Kurz- & mittelfristig:

- Schrägagarkulturen
- Agarstichkulturen
- Bouillonkultur
- Konservierung unter Paraffinöl

Tabelle 1: Kurz- und mittelfristige Aufbewahrungsmethoden.

| Methode | Geeignet für | Durchschnittliche Überlebensdauer |
|---|--|---|
| Periodisches Überimpfen in Bouillon oder auf Agarplatte | Arbeitskulturen (weniger für Stammkulturen) | Vegetative Bakterienzellen je nach Organismus: wenige Tage bis 6 Monate; Endosporen: 1 bis 10 Jahre; Pilze: ½ bis 2 Jahre |
| Aufbewahrung unter Paraffinöl | Viele Bakterien; Hefen; myzelbildende nichtsporulierende Pilze | Bakterien: 1-4 Jahre; Pilze: 2 bis 5 Jahre; |
| Trocknen, z. B. in Gelatine | Heterotrophe Bakterien, sporenbildende Pilze | Mehrere Monaten bis Jahre |

Sie kennen alle wichtigen Überimpfungsmethoden und können bei der praktischen Arbeit selbständig eine geeignete Methode wählen und anwenden.

- flüssig-flüssig mit Öse: Vortexen → Probe entnehmen → Impföse in Nährlösung einbringen, schwenken
- flüssig-flüssig mit Pipette: Pipette desinfizieren → Vortexen → Probe entnehmen → in Nährlösung einbringen
- fest-flüssig mit Öse: über Kultur fahren → an RG-Wand reiben & dann aufschwemmen
- fest-fest oder flüssig-fest mit Öse: Entnahme des Impfgutes → auf Agar von unten nach oben in Wellenlinien ausstreichen

3. Keimzahlbestimmung

Sie können die Begriffe Gesamtzellzahl & Lebendzellzahl (Lebendkeimzahl, Kolonie bildende Einheiten (KBE), Gesamtkeimzahl und Gesamtkoloniezahl) erklären und wissen mit welchen mikrobiologischen Verfahren Sie diese beiden Zahlen bestimmen können.

Gesamtzellzahl: Alle lebenden und toten Zellen im Medium → Mikroskopisch (Zählkammer)

Lebendzellzahl: Alle lebenden Zellen → Kulturelle Nachweismethoden (OF & Gussverfahren)

Sie können erläutern, wie und warum eine dezimale Verdünnungsreihe erstellt wird.

- Häufig liegt die MO-Konzentration in der Probe oberhalb des Erfassungsbereichs der Bestimmungsmethode. In solchen Fällen muss man die Suspension verdünnen.
- Die Anzahl der Verdünnungen richtet sich nach der zu erwartenden Keimzahl.
- Normalerweise verdünnt man in Dezimalschritten im Verhältnis 1:10 (10^{-1}), 1:100 (10^{-2}), 1:1000 (10^{-3}) usw..
- 1 mL Probe + 9 ml Verdünnungsmittel = In Mikrobiologie sagt man 1:10, in Chemie 1:9

Sie können die zwei Methoden für die Bestimmung der Gesamtkeimzahl mit Worten und anhand einer Skizze beschreiben. Sie können die Vor- und Nachteile des Guss- & Oberflächenverfahrens erläutern.

Gussplattenverfahren nach Koch:

- fakultativ anaeroben Keime
- 1mL Probe wird auf eine Petrischale pipettiert. Dann 20 - 25 ml warmen Agar dazu giessen. Vermischen. Brüten.

| Vorteile | Nachteile |
|--|---|
| Zuverlässigste Methode zur KBE-Bestimmung | Temperatur des Agars |
| Referenzmethode zum Nw von Aerobier | ungleichmässige Verteilung |
| untere Nw-Grenze: feste Probe: 10 KBE/g / flüssige Probe: 1 KBE/ml | mögliche Störung des Nährbodens durch bewegliche Keime => können diesen überwachsen (Schwärmer) |
| | schwierig bei automatischer Zählung |

Oberflächenausstrich-Verfahren:

- aeroben und fakultativ anaeroben Keime
- 20 -25ml Agar in Petrischale giessen. Danach 0.1 ml Probe abzupipettieren. Mit Spatel ausstreichen. inkubieren.

| Vorteile | Nachteile |
|--|--|
| Einsparung von Material und Zeit | untere Nw-Grenze: feste Probe: 100 KBE/g / flüssige Probe: 10 KBE/g |
| Weniger Verdünnungen | beschränkte Haltbarkeit bei vorgegossenen Agarplatten |
| Gefahr einer Hitzeschädigung nicht vorhanden | |
| bestens geeignet für Übersichtsuntersuchung | |
| Bakterien in einer Schicht | |
| Vorbereitete Platten → schneller | |

Sie können erklären für welche Art von Proben die Membranfiltration geeignet ist.

Für flüssige Proben, die hitzeempfindliche Bestandteile enthalten und erwartungsmässig niedrige Koloniezahlen haben.

4. Auswertung mikrobiologischer Ansätze

Sie kennen das gewogene arithmetische Mittel und können es anwenden.

Man berücksichtigt, dass man bei Verdünnungen immer ein Fehler mitgenommen wird. Darum wird die Gewichtung eingeführt. Berechnung von Einzelmessungen ungleicher Genauigkeit, welche durch untersch. Gewichte gekennzeichnet sind.

$$N = \frac{\Sigma C}{V * G * d}$$

- C = Anzahl Kolonien
- V = Volumen Inokulums [mL]
- G = Gewichtung
- d = Faktor der niedrigsten Verdünnung

$$N = \frac{168 + 14}{1ml \cdot 1,1 \cdot 10^{-2}} = \frac{182}{0,011} = 16545 = 1,7 \cdot 10^4 \text{ KBE/g}$$

z.B.

Sie können den Begriff „untere Nachweisgrenze“ erklären.

kleinst möglich nachweisbare Anzahl MOs. (Angaben in : < Zahl KB/g)

Die wissen wie die Membranfiltration ausgewertet wird.

Zählen: Das Netz hilft bei Auszählung

Die Platten mit 10-150 KBE werden genommen und aus denen wird das arithmetische Mittel berechnet.

Bei Guss und OF-Verfahren werden 10 - 300 gezählt.

Sie wissen wie beim MPN Verfahren der Keimtiter zustande kommt und können die Ergebnisse mit Hilfe der Auswertungstabelle herleiten und interpretieren.

Der Keimtiter gibt das kleinste Volumen der Probe an, in dem gerade noch ein MO durch seine Vermehrung nachweisbar ist.

Probemengen werden in abfallenden 10er-Potenzen erstellt, durch direktes abwägen / pipettieren (falls möglich). Kleinste Probemengen werden durch Verdünnungsreihen erhalten → Keimtiter.

Auswertungstabelle und BSP-Rechnung sind im Skript Kapitel 3 zu finden.

Sie wissen wie Sie unkonventionelle Ergebnisse (Koloniezahl zu tief / zu hoch) berechnen sollten.

Bei ($4 < x < 10$ KBE):

- arithmetisches Mittel ausrechnen

Bei ($2 < x < 4$ KBE):

- Beschrieb: «Mikroorganismen sind in der Probe vorhanden» einfügen

Die Platte der kleineren Verdünnung zählt 300 - 334 KBE und die Platte der darauf folgende Verdünnung zeigt < 10 KBE:

- arithmetisches Mittel ausrechnen

Die Koloniezahl auf der Platte der kleineren Verdünnung ist grösser als 334 und die der darauf folgenden Verdünnung zeigt $< 10 \text{ KBE} > 8 \text{ KBE}$:

- Es wird das gewogene arithmetischen Mittels errechnet mit dem Wert der grösseren Verdünnung wobei die Bemerkung „geschätzter Wert“ angegeben wird.

Die Platte der kleineren Verdünnung (Bsp. -2) zählt mehr als 334 KBE und die darauf folgende Verdünnung zählt weniger als 8 KBE.

- Resultat nicht zulässig

Spezialfall bei präsumtiven Keimen: Auf der Platte, die mit der kleinsten Verdünnung beimpft ist, sind mehr als 300 typische (präsumtive) und atypische Kolonien zu zählen. Auf der darauf folgenden Verdünnung sind weniger als 300 Kolonien ersichtlich aber keine typischen (präsumtiven) Kolonien mehr zu zählen.

Verdünnung -2: > 300 total Kolonien, präsumtive Kolonien erkennbar, aber nicht auszählbar

Verdünnung -3: < 300 total Kolonien, keine präsumtiven Kolonien erkennbar

- In diesem Fall wird das Resultat als Bereich angegeben. In dem Vorliegenden Beispiel wäre das > 102 und < 103 präsumtive Kolonien pro Milliliter oder Gramm der Probe.

5. Mikroskopie

Sie kennen die Vorteile und die Nachteile des Mikroskopierens von Mikroorganismen

Vorteile:

- rasche Ergebnisse, billig & einfach durchführbar
- gewisse Aussagen über Mikroorganismengruppen möglich

Nachteile:

- Zählung erst bei relativ hohen Zellzahlen möglich (Hefen ab 10^5 pro ml, Bakterien ab 10^6 pro ml)
- nur geringe Probemengen können untersucht werden
- ungleichmässige Mikroorganismenverteilung in der Probe liefert oft falsche Aussagen
- Erfassung von lebenden & toten Zellen

Sie kennen die Begriffe:

Vergrösserung: Verhältnis zwischen der scheinbaren Grösse (Grösse des Bilds) & der wahren Grösse eines Objekts. 1x vergrössert: ein Objekt, das von 25 cm Abstand betrachtet wird

Auflösung: Vermögen zwei Objektdetails im Präparat auch im mikroskopischen Bild noch getrennt darzustellen. Die mit Lichtmikroskopen theoretisch erreichbare Auflösung beträgt etwa $0.20 \mu\text{m}$

Kontrast: Unterschied zwischen hellen & dunklen Bereichen eines Bildes

(Grössenangabe in $10 \mu\text{m}$)

Sie kennen die wichtigsten Bestandteile eines Mikroskops

- 1) **Stativ und Grundplatte:** dient als stabile Basis und verbindet die verschiedenen optischen Systeme miteinander.
- 2) **Leuchtfeldblende:** mit ihr kann das von der Lichtquelle erzeugte Licht auf- und abgeblendet, sowie zentriert werden.
- 3) **Universalkondensator:** dient der optimalen Ausleuchtung der Objektivapertur, besitzt eine Aperturblende und eine Revolverscheibe mit verschiedenen Lichtringen zur Hellfeld-, Phasenkontrast- und Dunkelfeldoptik.
- 4) **Objektstisch:** dient als Unterlage für den Objektträger. Der Objektstisch kann durch zwei Zentrierschrauben im Kreuz verschoben werden.
- 5) **Objektivrevolver:** ist in der Regel mit vier Planfeldobjektiven ausgestattet. Jedes dieses Planfeldobjektivs besteht seinerseits aus einem Linsensystem, welches ein vergrössertes Bild des zur Betrachtung vorgelegten Präparates entwirft.

Nebst der eigentlichen Vergrösserung sind, je nach Qualität des Objektivs, noch folgende Abbildungsfehler mehr oder weniger korrigierbar:

- 6) **Okular:** es vergrössert das vom Objektiv gelieferte Bild um einen Faktor 10 und wandelt es in ein virtuelles Bild um. Das Okular wirkt also wie eine Lupe.
- 7) **Grob- und Feintrieb:** dient zur Positionierung des Kreuztisches und bei gewissen Mikroskopen auch des Objektivs.
- 8) **Lampengehäuse:** es enthält die vorzentrierte Halogenlampe.
- 9) **Rändelkopf:** damit lässt sich die Lampenhelligkeit dem Präparat angepasst verstellen.
- 10) **Zentrierschrauben:** zum Zentrieren der Leuchtfeldblende.
- 11) **Zentrierschrauben:** zum Zentrieren des Phasenringes.

Sie kennen die zwei wichtigsten Mikroskopie-arten und Sie können mikroskopische Präparate mit der korrekten Technik anschauen.

Hellfeldmikroskopie: Vorwiegend für gefärbte Präparate/Schimmelpilze oder Objekte mit starker Eigenpigmentierung verwendet, meist leben die MO nicht mehr

Phasenkontrastmikroskopie: Vorwiegend für durchsichtige, kontrastarme, lebende Präparate. Hintergrund grau & die Objekte sind mit einem Halo umrandet.

Welche sind die vier Merkmale von Bakterien, die mittels mikroskopieren bestimmt werden können?

1. Untersuchung innerer Zellstrukturen
2. Gesamtkoloniezahl
3. Gesamtkeimzahl → Qualität
4. Art der MO's
5. Charakterisierung
 - a. Form
 - b. Bewegung/Beweglichkeit
 - c. Zellverbände/Anordnung
 - d. Gramfärbung
 - e. Sporen: immer Stäbchen
 - i. Bacillus
 - ii. Clostridium (anerob)
 - f. Anzahl
 - g. Grösse

6. Grobdifferentenzierung

Erklären Sie die Unterschiede zwischen der Numerischen und der Klassischen Taxonomie. Welches sind die Vor- bzw. Nachteile?

Klassische Taxonomie: Prinzip der Ähnlichkeit, Einteilung nach Aussehen

- Vorteile: einfach zu bestimmen
- Nachteile: subjektiv,

Numerische Taxonomie:

- durch morphologische, physiologische & biochemische Eigenschaften charakterisiert.
- Vorteile: nicht subjektiv,
- Nachteile: werden viele Eigenschaften untersucht, kann die Auswertung sehr schwierig werden.

Welches ist das Ziel der Grobdifferentenzierung?

- Rascher Überblick über die Flora einer Probe

Welches sind die Vor- bzw. Nachteile der Grobdifferentenzierung?

- Vorteile: einfache Durchführung der Tests, Keim kann einer bestimmten Familie/Gattung zugeordnet werden
- Nachteile: Bakterien können nicht eindeutig identifiziert werden,

Bis aus welcher Ebene der Taxonomie kann man Bakterien mit den Tests der Grobdifferentenzierung bestimmen?

- Mit verschiedenen Tests können die MO einer bestimmten Familie / Gattung zugeteilt werden

Welche Voraussetzungen sind zwingend damit eine Grobdifferentenzierung gelingen kann?

- genügend Keime
- Reinkultur
- Bakterien in log-Phase für Gramfärbung
- Jung (18-48h) da sie ihr Verhalten ändern können

Welche Tests werden in Rahmen der Grobdifferentenzierung durchgeführt?

- Mikroskopische Beurteilung
- Gramverhalten: Gram-Färbung, Aminopeptidase-Test, KOH-Test
- Verhalten gegenüber dem Sauerstoff: Katalasetest, Cytochrom-Oxidase-Test
- Stoffwechseleigenschaften : Oxidations-Fermentations-Test

Nennen sie die Grenzen bzw. Schwierigkeiten die bei den einzelnen Tests auftreten können.

- Gram Färbung : Die Gram-Reaktion ist meist nur bei jungen Kulturen (log-Phase) eindeutig & reproduzierbar. Ältere Zellen sind oft gramlabil. Gewisse Bakterien lassen sich nicht Gramfärben.
- KOH-Test : alte Kulturen verlieren ihre Katalase-Aktivität oft, es sollten deshalb nur 18 bis 24 Stunden alte Kulturen verwendet werden. Bei der Verwendung von Flüssigkulturen ist die Reaktion aufgrund der ungenügenden Zellkonzentration oft zu undeutlich.

- Cytochrom-Oxidase Test : die Reaktion sollte innerhalb der angegebenen Zeit abgelesen werden, da durch den Luftsauerstoff ebenfalls eine Blaufärbung eintritt und somit falsch positive Ergebnisse vortäuscht. Bei der Verwendung von Flüssigkulturen ist die Reaktion aufgrund der ungenügenden Zellkonzentration oft undeutlich.

7. Feinidentifikation

Welche Ebene der Taxonomie kann mit der Feinidentifizierung erreicht werden?

Bis zur Ebene der Spezies (Art)

Welches sind die zwei wichtigsten Voraussetzungen für die Durchführung einer biochemischen Identifikation?

Reinkultur mit Stoffwechseleigenschaften (→ log-Phase)

Eintrag in einer Stammdatenbank

Zudem muss die richtige Testreihe verwendet werden(Bei API-Tests z.B zuerst eine Gramfärbung um den richtigen Test auszuwählen).

Welche Methoden für die Identifikation von Bakterien bis zur Art-Ebene haben Sie im Praktikum kennengelernt und auf welchen Prinzipien basieren diese?

Grobdifferenzierung. Diese Methode basiert auf der Morphologie, Verhalten gegenüber Sauerstoff & Grameigenschaften von bestehenden Arten.

Vitek: Eine „Karte“ welche Probenkammern für bis zu 60 verschiedene Substrate, Enzyme und pH-Indikatoren enthält, wird zusammen mit der beimpften Lösung ins Gerät gestellt und dort automatische befüllt und inkubiert. Durch Trübungsmessungen und Vergleich mit Referenzdatenbanken wird das Gerät in Betrieb gehalten, bis ein «Match» erzielt wird.

Biolog: Eine 96-Well Platte welche Probenkammern für bis zu 96 verschiedene Substrate, Enzyme und Supplemente enthält, wird beimpft und bei der gewünschten Temperatur inkubiert. Anschliessend wird diese Platte in einem Photometer ausgewertet und die Daten mit der Referenzdatenbank verglichen. Auf ein Match stoppt das Gerät.

MALDI TOF MS: Steht für Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time Of Flight Mass Spectrometry. Der Analyt wird in eine UV-absorbierende Matrix eingebettet, die durch Laserbeschuss schlagartig verdampft und ionisiert wird. Die Ionen werden unter Vakuum in einem elektrischen Feld beschleunigt und nach der Flugstrecke detektiert. Leichtere Ionen erreichen eine höhere Geschwindigkeit. Deshalb kann aus der Flugzeit die Molekülmasse errechnet werden. Diese Proteinprofile werden mit den in einer Datenbank hinterlegten Profilen verglichen und den Profilen mit der grössten Ähnlichkeit zugeordnet.

Fettsäureprofil (Sherlock-System): Bakterien weisen Artenspezifische Fettsäure Zusammensetzungen ihrer Membran auf. Die Fettsäure kann isoliert werden, sie wird dann methyliert, verestert und anschliessend im GC aufgetrennt. Gemessen werden die Fettsäuremethylester (FAME). Diese Methode findet jedoch weniger gebrauch wie andere Analytische Verfahren, da das Fettsäureprofil Nährstoffs und Umgebungsbedingt Variieren kann. Viele Faktoren müssen optimal gehalten werden, um reproduzierbare Resultate zu erhalten.

DNA-Sequenzierung: Die DNA eines jeder Art unterscheidet sich immer in einem gewissen Mass von allen anderen Arten. Um Anhand einer DNA-Sequenz eine Art genau zu identifizieren zu können muss eine Region der DNA gefunden werden (Datenbanken), die in keiner anderen Art aufzutreffen ist und in allen Individuen einer Art vorhanden ist. Diese Zielregion wird durch Primer markiert und amplifiziert. Die Primers binden Artsspezifisch, und solange es sich nicht um die gesuchte Art handelt findet keine Amplifikation statt und das Resultat wird negativ.

8. Elektiv und Selektiv Nährmedien

Sie können die Definitionen von elektiv, selektiv und differenzial erklären.

- Elektiv:
 - Fördert spezifisch das Wachstum einer MO-Gruppe.
 - Selektivität ist nicht sehr hoch.
 - Zur Züchtung vieler, nicht verwandter Arten, deren gemeinsames Merkmal eine bestimmte biochemische Stoffwechsellistung ist.
 - Elektive Substanzen: Pepton (TBX-Agar), Lecithinase (Casein-Agar), Glucose
- Selektiv:
 - Unterdrückt das Wachstum unerwünschter Begleitflora
 - bieten nur stoffwechselphysiologisch gleichen Organismengruppen gute Wachstumsbedingungen
 - Enthalten Hemmstoffe (Gallensalze, Antibiotika, Kristallviolett ...)
- Differential:
 - Unterscheidung bestimmter MOs aufgrund unterschiedlicher stoffwechselphysiologischer Leistungen (mit Indikatoren)
 - Der Nachweis der stoffwechselphysiologischen Leistungen wird hauptsächlich durch den Zusatz bestimmter Komponenten wie z.B. Farbstoffen erreicht.
 - Differential-Substanzen
 - Gallensalze und Kristallviolett (Mac-Conkey-Agar)
 - Colistin, Nalidixinsäure (CNA-Agar)

Es gibt Nährmedien, die gleichzeitig elektiv, selektiv und differentiell sind

Welche sind die Vorteile und die Nachteile von der Grobdifferenzierung gegenüber den Elektiven-Selektiven Nachweise?

| Grobdifferenzierung: Wenn noch nicht klar ist, wonach gesucht wird | | Elektiv/Selektiv: Wenn ich bereits weiss, welche Keime ich suche | |
|---|--|--|---|
| Vorteile | Nachteile | Vorteile | Nachteile |
| Schon mit wenigen Tests kann eine recht genaue Bestimmung der Gattung oder Art durchgeführt werden. | Bedeutender Material- und Zeitaufwand. | Erhebliche Zeitersparnis. | Es existieren nicht für alle Mikroorganismengruppen zuverlässige Selektivmedien. |
| | Nur der Anteil der erfassten Gruppen an der Gesamtkoloniezahl ermittelt werden. | Dank Hemm- und Elektivsubstanzen werden auch geringe Koloniezahlen erfasst, da die Begleitflora weitgehend ausgeschaltet wird. | teuer |
| | Bei 50 untersuchten Isolaten pro Zählplatte werden nur Arten erfasst, die mindestens 2% der Flora ausmachen, d.h. deren Koloniezahl nicht mehr als 2 Zehnerpotenzen unter der Gesamtkoloniezahl liegt. | Es wird die absolute Grösse der selektierten Keime erfasst. | Eine 100%ige Selektivität wird nie erreicht. Oft werden auch andere Keime erfasst. Zur Absicherung der Befunde müssen deshalb Bestätigungsreaktionen durchgeführt werden. |
| | Keimgruppen, die sich weniger stark vermehren, oder die von der Begleitflora stark konkurrenziert werden, können nicht erfasst werden. | | |

Wann führen Sie eine Grobdifferenzierung und wann verwenden Sie Elektiven und Selektiven Nährmedien?

- Grobdifferenzierung: grober Überblick über Gesamtflora
- Die mikrobiologische Untersuchung einer Probe (Lebensmittelprobe, Abwasser u.a.) beinhaltet in erster Linie den Nachweis der mesophilen aeroben Gesamtkoloniezahl.

Anhand dieser Untersuchungen lassen sich jedoch nur eingeschränkte Aussagen machen über die hygienische Bedenklichkeit, Verarbeitungs- und Vertriebshygiene und eventuell über die Genussfähigkeit. Eine wesentlich schnellere Arbeitstechnik ist die Elektiv- Selektiv- Differenzialplattenmethode.

Sie sind in der Lage diese vier Begriffe erklären zu können:

| | |
|------------------------|---|
| <u>Spezifität:</u> | Das Ziel eines Nährmediums ist, die 100%ige Spezifität. Dies bedeutet, dass die Begleitflora unterdrückt wird oder deutlich von der gesuchten Keimgruppe zu differenzieren ist. 100% Spezifität heisst keine falsch positiven Ergebnisse. |
| <u>Sensitivität:</u> | Das Ziel ist eine 100%ige Sensitivität. Dies bedeutet, dass der Zielorganismus erkannt wird. 100% Sensitivität bedeutet keine falsch negativen Ergebnisse. |
| <u>Falsch positiv:</u> | Die Begleitflora zeigt auf einem Nährmedium die gleiche Reaktion wie der gesuchte Zielorganismus. |
| <u>Falsch negativ:</u> | Der Nachweis der Zielorganismus gelingt nicht, obwohl er in der Probe vorhanden ist. |

Sie kennen den Ablauf für die Nachweismethode von verschiedenen Keimen:

- Aerobe mesophile Keime : Gusskultur, Medium PC-Agar
- Enterobacteriaceae : Oberflächenausstrich, Medium VRBD
- Escherichia coli : Oberflächenausstrich, Medium MCA
- Pseudomonas aeruginosa : Oberflächenausstrich, Medium CNA
- Staphylococcus aureus : Oberflächenausstrich, Medium MSA
- Laktobazillen : Oberflächenausstrich, Medium MRS
- Hefen : Oberflächenausstrich, Medium SDA

Im Anschluss an Elektiv-Selektivnachweismethoden müssen in der Regel Bestätigungsreaktionen durchgeführt werden. Was muss bei der Wahl von Bestätigungsreaktionen beachtet werden.

- Das Vorhandensein bestimmter Enzyme zur Verwertung oder Produktion definierter Substanzen.
- Die Toleranz gegenüber bestimmter Umweltbedingungen (pH, a_w- Wert, Temperatur, usw.).
- Den antigenen Charakter zelleigener Makromoleküle bei serologischen Tests (Oberflächen- Geissel- und Kapselantigene).

Sie wissen welches Nährmedium zur Isolation von welcher Keimgruppe bzw. welchem Keim verwendet wird.

| Mikroorganismus | Nährmedium | Wachstumsförderung | Hemmung |
|-------------------------------|-------------------------------------|--|------------------------------|
| Enterobacteriaceae | Violet red bile glucose agar (VRBD) | <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| <i>Escherichia coli</i> | MacConkey Agar (MCA) | <i>Escherichia coli</i> | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Cetrimid Agar (CNA) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Mannitol salt Agar (MSA) | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| Hefen | Sabouraud dextrose Agar (SDA) | Hefen | Hefen |

Sie können die Begriffe präsumtiv und bestätigt anhand von einem Beispiel erklären

| | |
|-------------------|---|
| Präsumtiv: | Als Präsumtiv gelten Kolonien auf einem Agar, die das typische Bild der gesuchten Keimgruppe aufweisen. Es sind Verdachtskeime. Als präsumtive Enterobacteriaceae gelten dunkelrote bis rotviolette Kolonien mit oder ohne Präzipitathof. |
| Bestätigt: | Sind präsumtive (verdächtige) Keime bei denen die Bestätigungsreaktion positiv ausgefallen ist. |

Sie kennen einige Beispiele für elektive Substanzen;

Polysorbat, Acetat, Magnesium und Mangan, Glucose

Sie kennen einige Beispiele für selektive Substanzen;

- Triphenylmethanfarbstoffe, Kristallviolett, Gentianaviolett, Brilliantgrün, Fuchsin
- Galle und Gallensalze
- Oberflächenaktive Substanzen (Natriumlaurylsulfat)
- Antibiotika (Penicillin)

Sie wissen mit welchen Verfahren man auch eine Selektion erreichen kann und können diese anhand der gelernten Nachweismethoden zwei Beispiele davon erklären.

Temperatur & anaerob

9. Sporenbildner

Definieren Sie den Begriff „Endosporen“.

Einige Gram-positive Bakterien bilden als Reaktion auf einen Hungerzustand Endosporen. Dies ist eine Überdauerungsform, die innerhalb eines Organismus / einer Zelle gebildet wird. Ihre Funktion ist das Erhalten der Zelle in einem inaktiven Zustand.

Wo kommen Endosporen vor?

Ursprünglich im Boden → Überall

Welche zwei relevanten Gattungen von Bakterien in der Mikrobiologie bilden Endosporen?

Bacillus (aerob) & Clostridium (obligat anaerob)

Wann werden Endosporen gebildet?

Unter Stress (Fehlende Nährstoffe oder Anhäufung von Stoffwechselprodukten)

Welche sind die Eigenschaften der Endosporen?

- Resistent gegenüber
 - Hitze / Kälte
 - Strahlung
 - pH-Änderung
 - Chemikalien
- Flüssigkeit (Medium ist egal)

Welcher ist der Zusammenhang zwischen Hitzeresistenz und Dipicolinsäuregehalt in den Endosporen?

Je höher der Dipicolinsäuregehalt, desto höher die Hitzeresistenz.

Wie kann man Endosporen nachweisen?

Direkt: Mikroskopisch (Phasenkontrast) ab min. 10^5 – 10^6

Indirekt: Oberflächenausstrich nach Aktivierung (und Bestätigungsreaktion)

Was versteht man unter „indirekter Nachweis von Endosporen“?

5min; 80°C Pasteurisieren (Hitzeschock) oder EtOH-Aktivierung → Ausplattieren mit OF oder Guss

Sie können die Phasen der Endosporenaktivierung auflisten und erklären.

1. Aktivierung: die Keimbereitschaft wird durch entsprechende Keimstimulation (Erhitzung bei sublethalen Temperaturen, anschließende Lagerung bei Zimmertemperatur) erhöht.
2. Keimung: die Keimung erfolgt innerhalb weniger Minuten durch Wasseraufnahme (Quellung) und geht einher mit dem Verlust der Resistenzen. Atmung und Enzymaktivitäten setzen wieder ein, Aminosäuren und Dipicolinsäure werden ausgeschieden, die Cortex wird abgebaut und die neue vegetative Zelle tritt als Keimschlauch aus der Spore aus.
3. postgerminative Entwicklung zu einer vegetativen Zelle: sichtbares Anschwellen der vegetativen Zelle durch Wasseraufnahme, die RNA- und Proteinsynthese beginnt wieder. Anfänglich ist der Keimschlauch nur von einer dünnen, unvollständigen Zellwand umgeben

10. Hygienemonitoring

Was ist Reinraumtechnik?

Reinraumtechnik ist die Kette aller technischen und organisatorischen Maßnahmen, um den schädigenden Einfluss von Kontamination von einem bestimmten Ort fernzuhalten. Eines oder beide der folgenden Schutzziele gilt es dabei zu erreichen:

- den Schutz des arbeitenden Menschen vor gesundheitsgefährdenden Prozesse → Personenschutz
- den Schutz von Prozessen und Produkten vor Schäden durch Kontamination → Produktschutz
- den Schutz der Umgebung, der Umwelt vor schädigenden oder lästigen Einflüssen → Umweltschutz

Welche Methoden gibt es und welche Ergebnisse liefern sie?

- Sedimentationsverfahren (passive Luftuntersuchungsmethode) = **qualitative** Ergebnisse
- Impaction-Verfahren (Aufprallverfahren) (aktive Luftuntersuchungsmethode) = **quantitative** Ergebnisse
- Abstrich- oder Tupferverfahren (DIN 10113-2) = **halbquantitative** Aussagen
- Abklatsch- oder Kontaktverfahren (DIN 10113-3) = **halbquantitative** Ergebnisse.
- Spülmethode und Rollflaschen-Methode = **halbquantitative** Ergebnisse
- Abschwemmverfahren = **quantitative** Aussagen
- Aufgussverfahren (Überschichtungsverfahren) = **halbquantitative** Aussagen
- Biolumineszenztechnologie (ATP) = **quantitative** Bestimmung

Was sind Mögliche Kontaminationsquellen?

- unzureichende Personalhygiene
- mangelnde Reinigung und Desinfektion der Produktionslinien
- kontaminierte Verpackungsmaterialien
- fehlerhaft arbeitende / konstruierte Maschinen (z.B. Leckagen bei Ventilen / strömungsarme Räume)

11. Wachstum von Mikroorganismen

Sie wissen, wie und warum ein Wachstumsversuch im Schüttelkolben durchgeführt wird.

Diese Methode wird entweder zur Anreicherung einer bestimmten Spezies oder zur Gewinnung grösserer Mengen an Zellmasse verwendet.

Sie kennen 2 Methoden zur Bestimmung der Gesamtzellzahl.

Optische Dichte & Zählkammer im Mikroskop

Sie können eine Methode beschreiben, mit der man überprüfen kann, ob am Ende des Versuchs noch eine Reinkultur vorliegt.

Zweites Nährmedium ansetzen, welches Färbungen für verschiedene MO hervorruft (Chromagar)

Sie können die Generationszeit (bzw. die Wachstumsrate) basierend auf der Gesamtkeimzahl berechnen.

$$n = \frac{\log N(t_2) - \log N(t_1)}{\log 2} \quad v = n/t \quad g = t/n$$

- n = Anzahl Generationen
- v = Wachstumsrate
- g = Generationszeit
- $N(t) = OD_{600}$
- t = Zeit

Planen Sie die Materialmengen welche für den Wachstumsversuch 2 mit Escherichia coli benötigt werden.

Siehe Materialliste Göpf

Was ist Diauxie?*

Das Nährmedium beinhaltet einen bestimmten Nährstoff (Zucker). Wenn dieser von den Bakterien verbraucht wurde, wird der Stoffwechsel auf einen anderen Zucker / Nährstoff umgestellt. Es gibt eine zweite log-Phase.

Wie berechnet man die benötigte Menge Inokulum, um im Schüttelkolben eine definierte optische Dichte einzustellen?*

$$C_{\text{inokulum}} * V_{\text{inokulum}} + C_{\text{Kolben}} * V_{\text{Kolben}} = C_{\text{total}} * V_{\text{Total}}$$

- $C_{\text{inokulum}} = OD \text{ der Vorkultur} * 10 \rightarrow \text{z.B. } 0.808 * 10$
- $V_{\text{inokulum}} = \text{gesucht}$
- $C_{\text{Kolben}} * V_{\text{Kolben}} = 0$
- $C_{\text{total}} = \text{gewünschte OD} \rightarrow 0.075$
- $V_{\text{Total}} = \text{Volumen im Schüttelkolben} \rightarrow \text{z.B. } 400 \text{ mL}$

$$(0.808 * 10) / 0.075 = 107.73 \rightarrow \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$400 \text{ mL} / \text{Verdünnungsfaktor } 107.73 = \underline{\underline{3.72 \text{ mL}}}$$

12. Literaturverzeichnis

Dasen, G., Frasson, D., & Spielmann-Prada, G. (2020). *Skript und Unterricht des Kurses Mikrobiologie 2*. Wädenswil.