



Mikroorganismen und Moleküle

EINHEIT
1

European Initiative for Biotechnology Education

Verfasser dieser Einheit

Eckhard R. Lucius (Koodinator der Einheit)

Catherine Adley, Jan Frings, Cecily Leonard, Dean Madden, Markus Müller, Uta Nellen, Patricia Nevers, John Schollar, Marleen van Strydonck, Paul Wymer.



Die Europäische Initiative für den Unterricht (EIBE) hat sich die Aufgabe gestellt, durch einen neuartigen Unterricht in Schule und Lehrerbildung das Verständnis der Biotechnik zu fördern sowie Beiträge zu einer fundierten öffentlichen Debatte über dieses Gebiet zu liefern.

EIBE



BELGIEN

| Vic Damen / Marleen Van Strydonck, R&D Groep VEO, Afdeling Didactiek en Kritiek, Universiteit Antwerpen, Universiteitsplein 1, B-2610 WILRIJK.



DÄNEMARK

| Dorte Hammelev, Biotechnology Education Group, Foreningen af Danske Biologer, Sønderengen 20, DK-2860 SØBORG.
| Lisbet Marcussen, Biotechnology Education Group, Foreningen af Danske Biologer, Lindevej 21, DK-5800 NYBORG.



DEUTSCHLAND

| Horst Bayrhuber / Eckhard R. Lucius / Regina Rojek / Ute Harms / Angela Kroß, Institut für die Pädagogik der Naturwissenschaften an der Universität Kiel, Olshausenstraße 62, D-24098 KIEL.
| Ognian Serafimov, UNESCO-INCS, c/o Jörg-Zürn-Gewerbeschule, Rauensteinstraße 17, D-88662 ÜBERLINGEN.
| Eberhard Todt, Fachbereich Psychologie, Universität Gießen, Otto-Behagel-Straße 10, D-35394 GIEßEN.



FRANKREICH

| Gérard Coutouly, LEGTP Jean Rostand, 18 Boulevard de la Victoire, F-67084 STRASBOURG Cedex.
| Laurence Simonneaux / Jean-Baptiste Puel, Ecole Nationale de Formation Agronomique, Toulouse-Auzeville, Boîte Postale 87, F-31326 CASTANET TOLOSAN Cedex.



IRLAND

| Catherine Adley / Cecily Leonard, University of Limerick, LIMERICK.



ITALIEN

| Antonio Bargellesi-Severi / Alessandra Corda Mannino / Stefania Uccelli, Centro di Biotecnologie Avanzate, Largo Rosanna Benzi 10, I-16132 GENOVA.



LUXEMBURG

| John Watson, Ecole Européenne de Luxembourg, Département de Biologie, 23 Boulevard Konrad Adenauer, L-1115 LUXEMBOURG.



NIEDERLANDE

| David Bennett, Cambridge Biomedical Consultants, Schuytstraat 12, NL-2517 XE DEN HAAG.
| Fred Brinkman, Hogeschool Holland, Academy for Communication, Postbus 261, NL-1110 AG DIEMEN.
| Liesbeth van de Grint / Jan Frings, Hogeschool van Utrecht, Educatie Centrum voor Biotechnologie, FEO, Afdeling Exacte Vakken, Biologie, Postbus 14007, NL-3508 SB UTRECHT.



ÖSTERREICH

| Rainhart Berner, Höhere Bundeslehr- und Versuchsanstalt für Chemische Industrie Wien, Abt. für Biochemie, Biotechnologie und Gentechnik, Rosensteingasse 79, A-1170 WIEN.



SPANIEN

| María Sáez Brezmes / Angela Gómez-Niño, Rosa Villamañán, Facultad de Educación, Universidad de Valladolid, Geologo Hernández Pacheco 1, ES-47014 VALLADOLID.



SCHWEDEN

| Margareta Johansson, Föreningen Gensyn, PO Box 37, S-26881 SVALÖV.
| Elisabeth Strömberg, Östrabo Gymnasiet, S-45181 UDDEVALLA.



VEREINIGTES KÖNIGREICH

| Wilbert Garvin, Northern Ireland Centre for School Biosciences, NIESU, School of Education, The Queen's University of Belfast, BELFAST, BT7 1NN.
| John Grainger / John Schollar / Caroline Shearer, National Centre for Biotechnology Education, The University of Reading, PO Box 228, Whiteknights, READING, RG6 6AJ.
| Jill Turner, Department of Science and Technology Studies, University College London, Gower Street, LONDON, WC1 6BT.
| Paul Wymer, Society for General Microbiology, Marlborough House, Basingstoke Road, READING RG7 1AE.

EIBE Koordinator

Horst Bayrhuber, Institut für die Pädagogik der Naturwissenschaften an der Universität Kiel, Olshausenstraße 62, D-24098 KIEL, Germany. Telephone: + 49 431 880 3166 (EIBE Secretary: Regina Rojek). Facsimile: + 49 431 880 3132.



Mikroorganismen und moleküle

EINHEIT 1

European Initiative for Biotechnology Education

INHALT

Inhalt



Sicherheitsbestimmungen, Urheberrecht und Dank-sagungen	4
Über diese Unit	
Einleitung	5
Herstellen von Modellen	
Ausschneidemodell einer DNA	6
Modelle von Mikroorganismen	8
Extraktion von DNA	
Isolation von DNA aus Bakterien	10
Isolation von DNA aus Zwiebeln	12
Produktive Mikroorganismen	
Amylase-Produktion	14
Zellulase-Produktion	16
Antibiotika-Produktion	18
Darstellung mikrobieller Leistungen	
Brotteig herstellen	22
Mikrobielle Energiezelle	25
Gentransfer	
Bakterielle Konjugation	27
Gentransfer durch <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	32
Anhang 1	
Rezepte für mikrobiologische Medien	34
Anhang 2	
Grundlagen mikrobiologischer Arbeitstechniken	35
Anhang 3	
Öffnen einer Ampulle	35

Unit 1DE 11/98

World Wide Web



Wenige Gebiete entwickeln sich so schnell wie die Biotechnologie. Damit sie ständig überarbeitet und auf dem neuesten Stand gehalten und dann möglichst preiswert verbreitet werden können, werden die EIBE - Unterrichtseinheiten mit Hilfe elektronischer Medien verbreitet.

Die vorliegenden Seiten (und auch alle anderen EIBE-Unterrichtseinheiten) stehen in ganz Europa und weltweit im World Wide Web zur Verfügung. Sie sind zu finden unter:

<http://www.reading.ac.uk:8001/>

Alle EIBE Unterrichtseinheiten im World Wide Web sind Portable Document Format (PDF) - Dateien. Das bedeutet, daß die hohe Qualität der Abbildungen, der farblichen Darstellung, des Schriftbildes und des Layouts der Materialien unabhängig von der Verwendung des Systems erhalten bleibt (Macintosh - einschließlich Power PC, Windows, DOS oder Unix).

PDF-Dateien sind ebenfalls kleiner als ihre Ursprungsdateien, so daß Sie sie schneller laden können. Damit Sie sich die EIBE Unterrichtseinheiten ansehen können, benötigen Sie jedoch eine geeignete Kopie des Adobe Acrobat, Leseprogramms.

Das Adobe Acrobat, Leseprogramm ist kostenlos in mehreren Sprachen (Holländisch, Britisches Englisch, Französisch, Deutsch, Spanisch, Schwedisch und Italienisch) erhältlich. Es kann geladen werden von:

<http://www.adobe.com/>

Mit Hilfe dieser Software können Sie sich die EIBE Unterrichtseinheiten ansehen oder ausdrucken. Außerdem können Sie damit "surfen" und die Materialien leicht finden.

ZUR BEACHTUNG: *Adobe* und *Acrobat* sind eingetragene Warenzeichen der Adobe Systems Incorporated und sind urheberrechtlich geschützt. *Macintosh* ist als Warenzeichen der Apple Computer Incorporated registriert.

Sicherheitsbestimmungen

In allen EIBE-Units haben wir uns bemüht, alle möglicherweise vorkommenden Risiken zu identifizieren und entsprechende Sicherheitsvorkehrungen vorgeschlagen.

Soweit als möglich stehen die vorgeschlagenen Versuche mit allgemeingültigen Sicherheitsempfehlungen der EU in Übereinstimmung. Bei besonderen Risiken wurden diese berücksichtigt. Anhang 2 dieser Unit liefert zusätzliche Sicherheitsrichtlinien.

Benutzer sollten sich bewußt sein, daß Irrtümer und Auslassungen vorkommen können. Zudem haben verschiedene Arbeitgeber und Ausbildungsinstitutionen verschiedene Standards. Daher sollten Benutzer vor der Durchführung eines Versuchs *immer* ihren eigenen Sicherheitsempfehlungen folgen. Das bedeutet, daß jede vom Arbeitgeber oder einer Institution der Bildungsverwaltung geforderte Regel Folge geleistet werden MUSS, unabhängig von den Vorschlägen der EIBE-Unit.

Sollten die Anleitungen nichts anderes vorgeben, wird vorausgesetzt, daß

- Versuche in einem entsprechend ausgerüsteten und gewarteten naturwissenschaftlichen Arbeitsraum durchgeführt werden;
- alle Arbeitsgeräte sorgfältig gewartet werden; normale Laborarbeiten (wie das Erhitzen von Flüssigkeiten) mit Vorsicht ausgeführt werden;
- auf genaue Arbeitsausführung geachtet wird, wenn Chemikalien oder lebende Organismen benutzt werden;
- bei erkennbaren Risiken für die Augen müssen Schutzbrillen getragen werden;
- Schüler und / oder Studenten mit der sicheren Handhabung von Chemikalien und Mikroorganismen in Versuchen vertraut gemacht werden.

© **Copyright**

Die EIBE-Units unterliegen dem Copyright, sind aber für den nicht-kommerziellen Einsatz durch Ausbildungsinstitutionen frei verfügbar.

Sollten Sie dieses Material teilweise oder ganz für kommerzielle Zwecke nutzen oder es in beliebiger Form weiterveröffentlichen wollen, kontaktieren Sie:

Regina Rojek
Institut für die Pädagogik der
Naturwissenschaften an der Universität Kiel
Olshausenstr. 62
D- 24098 KIEL
Deutschland
Telefon: + 49 (0) 431 880 3166
Telefax: + 49 (0) 431 880 3132
E-Mail: rojek@ipn.uni-kiel.de

Kerngruppe

- **Catherine Adley**
The University of Limerick, Irland
- **Jan Frings**
Hogeschool van Gelderland, Niederlande
- **Cecily Leonard**
The University of Limerick, Irland
- **Eckhard R. Lucius (Koordinator)** IPN
an der Universität Kiel, Deutschland
- **Marleen van Strydonck**
The University of Antwerp, Belgien
- **Paul E.O. Wymer**
The Wellcome Trust for Medical Science
London, Großbritannien

Design, Illustration, Schriftbild, ergänzende Texte und Druck: Dean Madden, Caroline Shearer, NCBE, The University of Reading, Großbritannien
Illustrations Copyright © Dean Madden 1997
Übersetzung: Ursula Goertz.

Danksagungen

EIBE ist den nachfolgenden Personen für ihre Hilfe bei der Erstellung dieses Materials besonders dankbar: Liesbeth van de Grint (Hogeschool van Utrecht, Niederlande) und John Schollar (National Centre for Biotechnology Education, The University of Reading, Großbritannien) arrangierten und führten einen multinationalen Workshop durch, in dem die Materialien dieser Unit getestet wurden. Folgende Lehrer nahmen teil und gaben hilfreiche Kommentare zum Rohentwurf: E. Vergants, L. Daniels, L. Neels (Belgien); Dorte Hammelev (Dänemark), Lucienne Diemer, Gerard Coutouly (Frankreich); Thomas Jeß, Dr. U.Schnack, Dr. E. Lipkow (Deutschland); A. de Graaf, Guus Smid, J. Gradener (Niederlande); Rebecca Weston, Jane Gent, Derek Mackie, Sarah Whitethread, Maggie Parson (Großbritannien).

Über diese Unit



Diese Unit faßt eine Sammlung von praktischen Arbeiten zusammen, die unabhängig voneinander oder aufeinanderfolgend als Teil einer Unterrichtseinheit eingesetzt werden könne. Sie sind durch Lehrer und Ausbilder verschiedener europäischer Länder erstellt und unter der Schirmherrschaft von EIBE (*European Initiative for Biotechnology Education*) mit Unterstützung des DGXII der Europäischen Kommission zusammengetragen worden.

Alle Übungen sind unter Einbeziehung von Lehrern aus verschiedenen Teilen Europas extensiv in praktischen Workshops getestet worden.

Die Übungen dieser Einheit bestehen aus:

1. Modellen eines DNA-Moleküls und verschiedener Mikroorganismen. Sie sollen die wesentlichen Merkmale dieser Lebensformen aufzeigen und den Schülern die Möglichkeit geben, die relative Größe von Mikroorganismen zu erkennen.
2. einfachen, sicheren und kostenfreien Methoden zur Extraktion der DNA, um die Schüler mit den dazu benötigten Grund-techniken vertraut zu machen und ihnen zu ermöglichen, das genetische Material zu betrachten.
3. einer Vielzahl von Versuchen zur Veranschaulichung
 - a) der Präsenz von Mikroorganismen in der Umwelt und der Auswahl nützlicher Stämme
 - b) einiger von Mikroorganismen hergestellter Produkte (Enzyme und Antibiotika). Zwei Untersuchungen sind qualitativ ausgerichtet, eine erlaubt die quantitative Bestimmung der Enzymproduktion.
4. verschiedene Untersuchungen zur Auswirkung mikrobiellen Wachstums, beginnend bei der einfachen Arbeit mit Brotteig, über die Arbeit zur Fermentation und schließlich der direkten Messung der Stoffwechsellätigkeit in Hefe. Jeder dieser Versuche bietet die Möglichkeit für weitere, ausgedehntere Untersuchungen. Zur Motivation der Schüler wurde Arbeitsweisen mit biotechnischer Bedeutung der Vorrang vor eher theoretischen Prinzipien gegeben.
5. zwei Demonstrationsversuchen, die natürliche Methoden des Gentransfers zeigen, um eine praktische Einführung in die Grundlagen genetischer Modifikation zu geben.

Da zwei der praktischen Versuche die Produktion und Wirkungsweise von Antibiotika, sowie den

Transfer antibiotischer Resistenz beinhalten, sind diesen Anleitungen Zusatzinformationen beigelegt.

Die Autoren haben versucht, eine Kombination aus einfachen und anspruchsvolleren Übungen zu erstellen und hoffen, daß Biologielehrer darin Interessantes und Einsetzbares finden. Zwei Anhänge enthalten einige grundlegende Informationen zum Einsatz mikrobiologischer Arbeitstechniken in Schularbeitsräumen.

In nächster Zukunft werden ergänzende Anleitungen verfügbar sein: Curriculum-Verknüpfungen, Sicherheitsbestimmungen, Materialbeschaffung und andere relevante Informationen für die verschiedenen Teile der Europäischen Union.

Anmerkungen zu den vorliegenden Materialien sind sehr willkommen, besonders von Lehrern, auf die sie hauptsächlich ausgerichtet sind. Kommentare und Fragen oder dringende Nachrichten bezüglich der Sicherheitsempfehlungen dieser Unterlagen sollten gerichtet werden an:

Dr. Eckhard R. Lucius
 Institut für die Pädagogik der
 Naturwissenschaften an der Universität Kiel
 Olshausenstr. 62
 D- 24098 KIEL
 Deutschland
 Telefon: + 49 431 880 3137
 Telefax: + 49 431 880 1521
 E-Mail: lucius@ipn.uni-kiel.de

National Centre for Biotechnology Education
 The University of Reading
 The United Kingdom

Telefon: + 44 1734 873743
 Telefax: + 44 1734 750140
 E-Mail: D.R. Madden@reading.ac.uk

Ausschneidemodell einer DNA



Ziel

- Aufzeigen der wesentlichen Merkmale der DNA-Struktur (Desoxyribonukleinsäure)

Zeitbedarf

Die Anfertigung des Modells dauert etwa 30 Minuten. Sollen die (entgegengesetzten) Ausschnitte koloriert werden, muß mehr Zeit angesetzt werden.

Geräte und Materialien

Bedarf für jeden Schüler oder jede Arbeitsgruppe

- Scheren
- starker Papierkleber, Klebestreifen oder ein kleiner Hefter
- Faden (um die Elemente des Modells aufzuhängen oder um das fertiggestellte Modell aufzuhängen)

Anmerkung: Um ein stabileres Modell zu erhalten, können je zwei Sätze des Zucker-Phosphorsäure-Gerüsts aneinandergeklebt werden.

Bauanleitung

1. Die Zucker- /Phosphorsäuregerüste A und B werden ausgeschnitten.
2. Die Basenpaar- 'Sprossen' werden ausgeschnitten.
3. Die Anhänge der Sprossen werden wie gezeigt gefaltet.
4. Die Anhänge werden an einem Ende jeder Sprosse auf die nummerierten Abschnitte des Gerüsts A geklebt. Die Sprossen können in beliebiger Reihenfolge befestigt werden.
5. Die Anhänge werden am anderen Sprossenende an den entsprechenden Nummern des Gerüsts B befestigt.
6. Die Schilder werden mit Fäden am Doppelhelix-Modell befestigt. Das Diagramm unten kann benutzt werden, um das Modell zu beschriften.

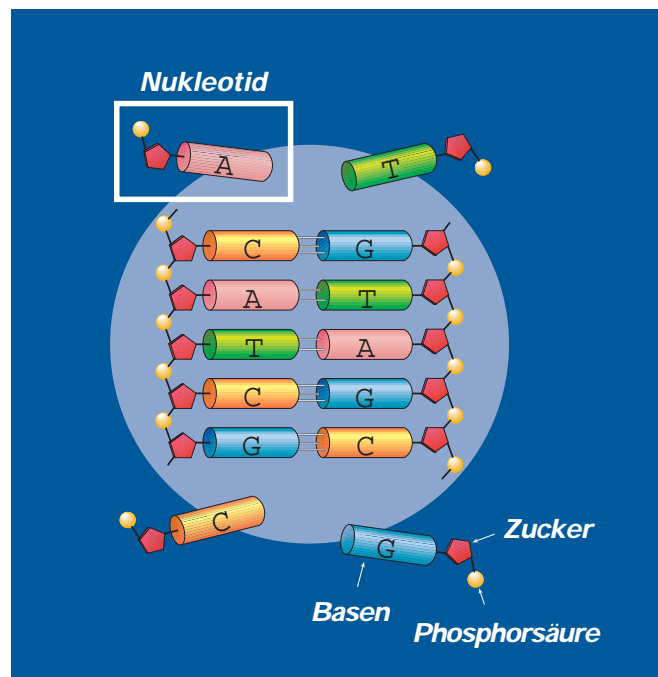
Danksagung

Dieses Modell wurde übernommen von der Regierungsforschungsorganisation CSIRO, Australien, die es für ihren 'Double Helix' Science Club erarbeitete. EIBE dankt CSIRO für die Idee und die Erlaubnis, das Modell verwenden zu dürfen.

	Erste Position	Zweite Position	Dritte Position		
	T	C	A	G	
T	PHE PHE LEU LEU	SER SER SER SER	TYR TYR STOP STOP	CYS CYS STOP TRP	T C A G
C	LEU LEU LEU LEU	PRO PRO PRO PRO	HIS HIS GLN GLN	ARG ARG ARG ARG	T C A G
A	ILE ILE ILE MET	THR THR THR THR	ASN ASN LYS LYS	SER SER ARG ARG	T C A G
G	VAL VAL VAL VAL	ALA ALA ALA ALA	ASP ASP GLU GLU	GLY GLY GLY GLY	T C A G

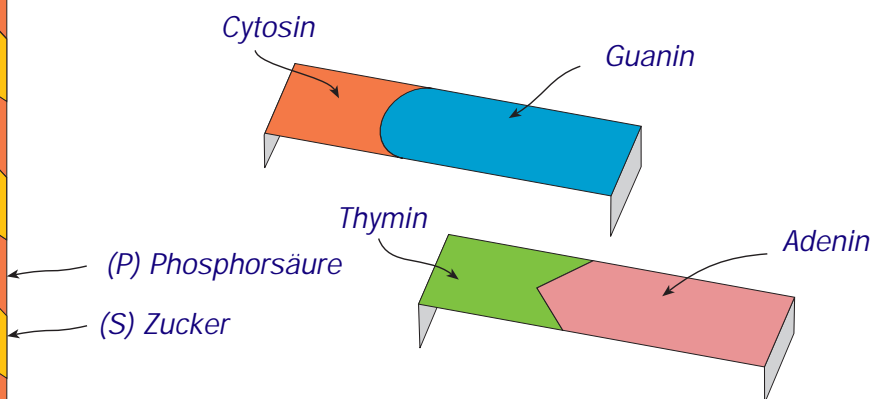
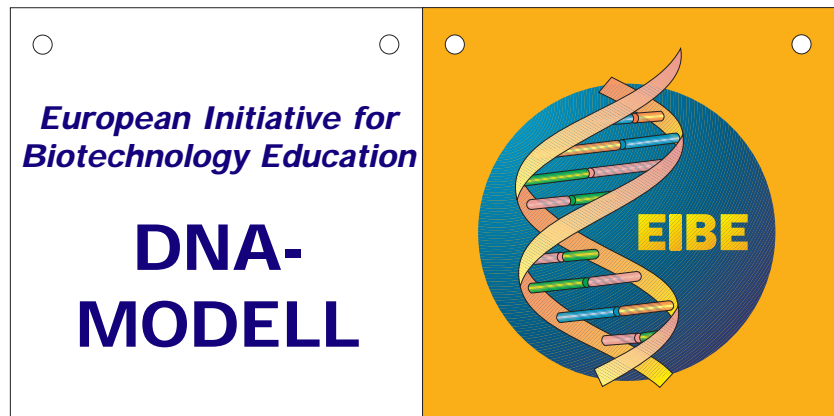
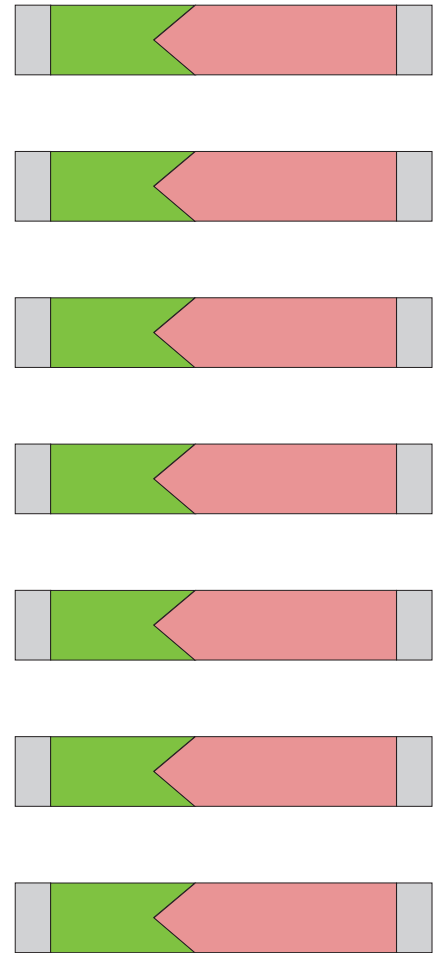
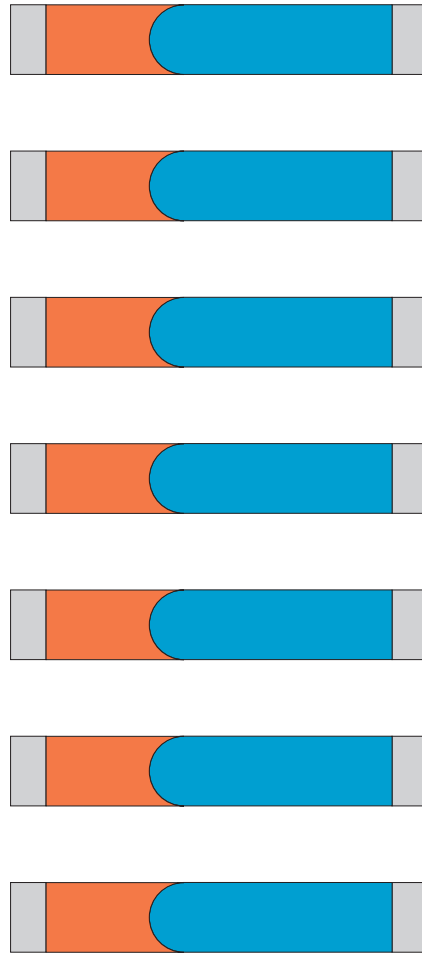
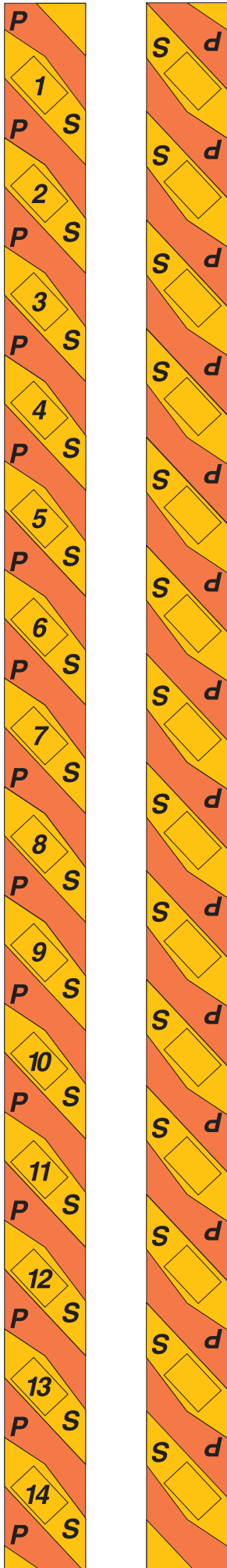
Der genetische Code

Jede Sequenz aus drei Basen auf der DNA-Doppelhelix codiert eine der zwanzig Aminosäuren, hier in der Mitte dargestellt durch eine Abkürzung aus drei Buchstaben.



Die DNA-Struktur

Ketten aus Zucker- und Phosphorsäure-Molekülen bilden die beiden 'Gerüste' der DNA. Zwischen ihnen die vier Basen: Thymin (T), Cytosin (C), Adenin (A) und Guanin (G), die über Wasserstoffverbindungen verbunden sind.



Modelle von Mikroorganismen



Für Schüler ist es oft schwierig, die Größe von Mikroorganismen einzuschätzen. Zudem fällt es ihnen schwer, die dreidimensionale Struktur eines Mikroorganismus nach dem zweidimensionalen Betrachten durch ein Mikroskop zu begreifen.

Das Herstellen von Modellen erleichtert Schülern den Zugang zu den wesentlichen Kennzeichen und der relativen Größe von Mikroorganismen.

Dieser Arbeitsauftrag ist dann besonders erfolgreich, wenn den Schülern freigestellt wird, ihre eigenen Modelle zu entwickeln, und sie nicht genauen Vorgaben folgen müssen. Daraus ergibt sich, daß dieser Arbeitsauftrag am besten Zuhause vervollständigt wird (wo eine größere Materialauswahl und mehr Zeit zur Verfügung stehen).

Anmerkung: Für jene Lernende, die glauben, daß das Bauen von Modellen unter ihrer Würde ist, mag es nötig sein, auf die herausragende Geschichte des Modellbaus in der Molekularbiologie hinzuweisen, obwohl heutzutage räumliche Modelle weitestgehend durch Computerdarstellungen ersetzt worden sind.

Ziel

- Aufzeigen der wichtigsten Merkmale eines Lambda-Bakteriophagen und einer Auswahl von Bakterien
- Hilfestellung zur Einschätzung der relativen Größe von Viren und Bakterien

Zeitbedarf

Es dauert ca. 30 Minuten, ein Bakteriophagen-Modell anzufertigen. Soll das Schema koloriert werden, muß mehr Zeit eingeplant werden. Je nach Sorgfalt kann der Bau eines Bakterienmodells eine Stunde oder länger dauern.

Anmerkung: Diese Aufgabe könnte sinnvoll als Hausaufgabe eingesetzt werden.

Geräte und Materialien

Bedarf für jeden Schüler oder jede Arbeitsgruppe

- Bücher mit Abbildungen des Viren- und Bakterienaufbaus
- diverse Materialien zum Modellbau, z.B. Karton, aussortiertes Verpackungsmaterial, Tischtennisbälle, Perlen u.ä.
- Scheren
- Klebstoff, Klebestreifen oder ein kleiner Hefter
- Farbstifte

Arbeitsanleitungen

Virus

Aus dem vorgelegten Ausschneideplan wird das Modell eines Lambda-Bakteriophagen gebaut.

Bakterium

Aus den bereitgestellten Arbeitsmaterialien wird ein Bakterienmodell (Stäbchen und Kokken) entwickelt.

Für jedes Modell:

1. Die aufgezeigten Hauptmerkmale, z.B. Zellmembran und genetisches Material sollen identifiziert werden.
2. Die Größe des dargestellten Organismus soll ermittelt werden.
3. Einfache Möglichkeiten, jüngeren Schülern die Modellgröße zu erklären, sollen erläutert werden, z.B. 'Hätte ein Bakterium diese Größe, würde es vergleichbar so groß wie ein Haus sein.'

Erläuterungen und Hinweise

Schüler könnten ebenfalls aufgefordert werden, Modelle von Tier- oder Pflanzenzellen zu bauen. Diese Modelle könnten die Unterschiede zwischen Prokaryonten und Eukaryonten stärker verdeutlichen und die immer wieder herangezogene Endosymbiontenhypothese (die den stammesgeschichtlichen Ursprung der Eukaryonten erklärt) nachdrücklich hervorheben.

Zusatzinformation

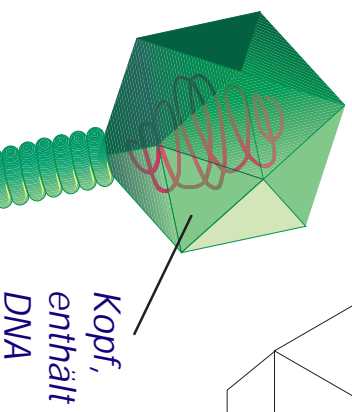
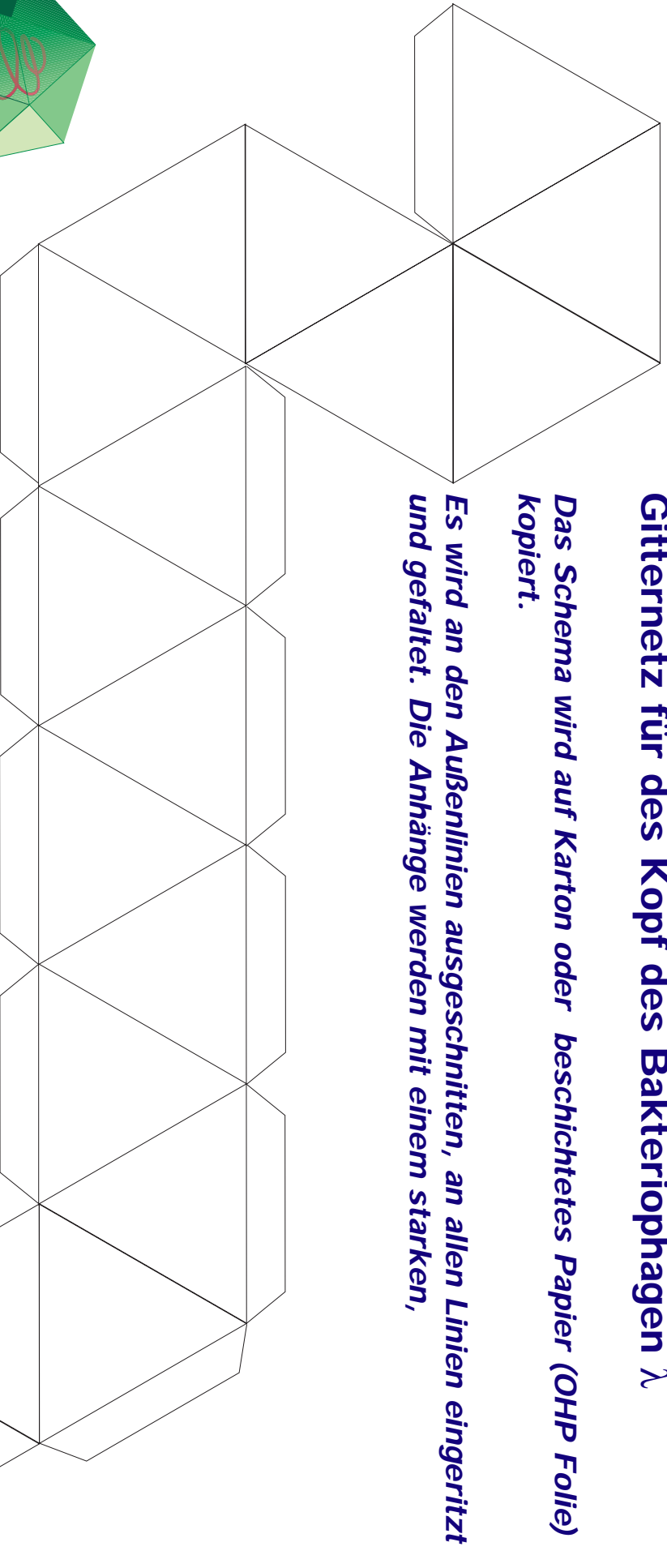
Anleitungen zum Bauen von Modellen sind auch in folgender Veröffentlichung beschrieben:

Nicholl, L. and Nicholl, D. (1987) Modelling the eukaryotic chromosome: a stepped approach. *Journal of Biological Education* 21 (2) 99 - 104.

Gitternetz für des Kopf des Bakteriophagen λ

Das Schema wird auf Karton oder beschichtetes Papier (OHP Folie) kopiert.

Es wird an den Außenlinien ausgeschnitten, an allen Linien eingeritzt und gefaltet. Die Anhänge werden mit einem starken,



Kopf,
enthält
DNA

Der DNA-Strang kann durch einen starken Faden oder Draht dargestellt werden.

Ein Trinkhalm wird als Schwanz benutzt (bewegliche, ausziehbare Halme machen das Modell realistischer).

Isolation von DNA aus Bakterien



In diesem Versuch wird Lysozym (ein Enzym) zum Abbau der Zellwände des Bakteriums benutzt und Spülmittel zum Aufbrechen der inneren Zellmembranen, die dann Nukleinsäuren freisetzen (DNA und RNA).

Ziel

- Isolierung von DNA aus dem Bakterium *Escherichia coli* K-12.

Vorbereitung

Bakterienkulturen müssen wenigstens 4 Tage zuvor in Nährbouillon angesetzt werden (nur voll entwickelte Kulturen erzeugen signifikante Nukleinsäuremengen).

Zeitbedarf

Dieser Versuch dauert 50 Minuten (einschließlich der 30 Minuten, in denen die Bakterien mit dem Enzym bebrütet werden).

Geräte und Materialien

Bedarf für jeden Schüler oder jede Arbeitsgruppe

- Voll entwickelte Kultur *Escherichia coli* K-12 (vgl. *Vorbereitung*, oben)
- Lysozym-Pulver (eine kleine Spatelspitze ist ausreichend)
- 6 ml Ethanol (eiskühlt) vergällter Ethanol oder Brennspiritus sind ausreichend
- 0,5 ml Spülmittel, z.B. *Pril* (Henkel)
- Impföse
- 2 Reagenzgläser
- Pipette oder 1 ml-Einwegspritze zur Dispersion von Wasser und Lysozymlösung
- Wasserbad, eingestellt auf 60 °C
- Brutschrank, eingestellt auf 37 °C

Durchführung

1. Wenigstens 4 Tage vor Versuchsbeginn wird eine Kultur von *Escherichia coli* K-12 angesetzt.
2. Eine kleine Menge Lysozym wird dem 5 ml der Bakteriensuspension beigelegt und sorgfältig gemischt.
3. Die Mischung wird bei 37 °C für 30

Minuten bebrütet.

4. Der Bakteriensuspension wird 0,5 ml des Spülmittels zugefügt.
5. Die Mischung wird in einem Becherglas mit Wasser bei 60 °C für 2 Minuten bebrütet.
6. Die Mischung wird einige Minuten in kaltem Wasser heruntergekühlt.
7. Die Oberfläche der Mischung wird sorgfältig und langsam mit eiskaltem Ethanol überschichtet.
8. Die Nukleinsäuren (DNA und RNA) werden in die obere (Ethanol-)Schicht ausfallen.

Erläuterungen und Hinweise

1. Die DNA kann durch fuchsin-schwefelige Säure oder Methylenblaulösung gefärbt werden.

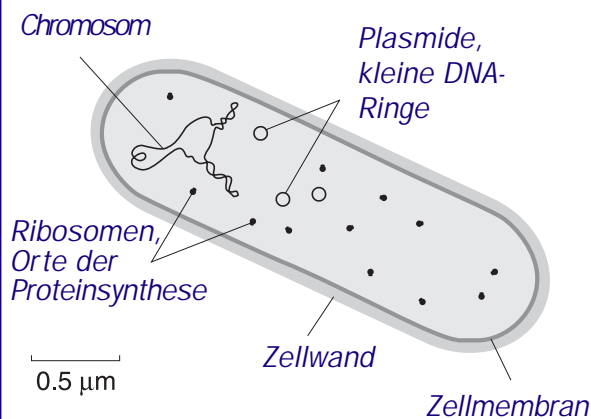
Sicherheitsvorkehrungen

Die allgemein gültigen Sicherheitsmaßnahmen für mikrobiologisches Arbeiten sollten bei der Handhabung von Kulturen eingehalten werden. Vorsicht beim Benutzen des heißen Wassers (Arbeitsschritt 5)

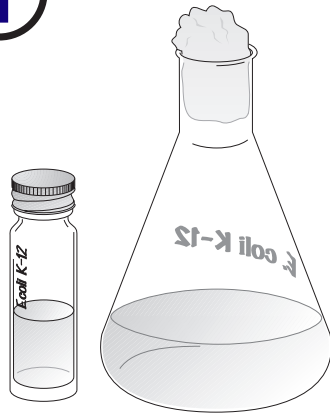
Danksagung

Dieser Versuch basiert auf einem von Hertel *et al.* und Süßmuth *et al.* erarbeiteten Versuch, die DNA aus *Bacillus subtilis* zu isolieren. Wir danken Professor Joseph Lengeler, Osnabrück, für den Vorschlag, Spülmittel im Versuch einzusetzen.

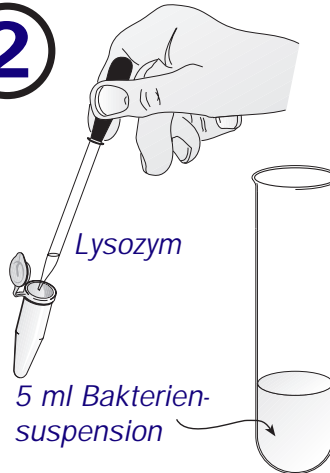
Eine typische Bakterienzelle mit den Nukleinsäuren und den Wirkorten des Lysozyms und des Haushaltsreinigers (auf die Zellwand und -membran).



1



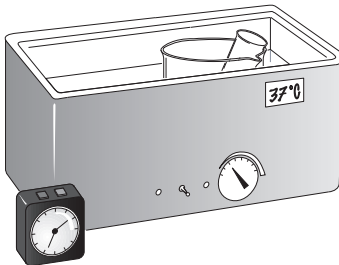
2



1. **Bereite eine Kultur von E.coli K-12 in Nährbouillon vor. Bebrüte sie 3-7 Tage bei 37 °C.**

2. **Gib eine geringe Menge Lysozym zu 5 ml der Bakteriensuspension und mische sorgfältig.**

3



4

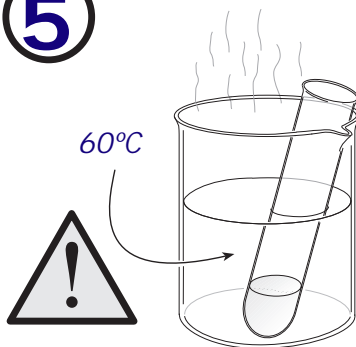


3. **Bebrüte die Mischung 30 min bei 37 °C.**

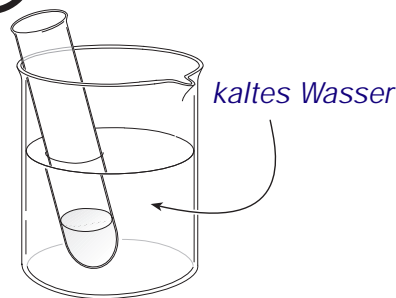
4. **Gib 0,5 ml Spülmittel in die Bakteriensuspension.**

5. **Bebrüte die Mischung 2 min bei 60 °C in einem Becherglas mit Wasser.**

5



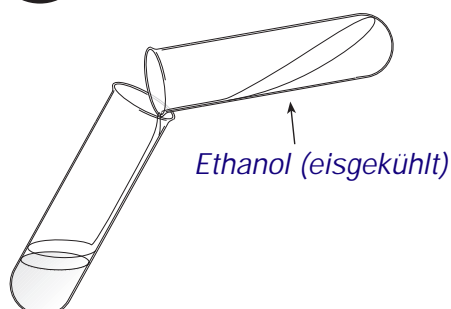
6



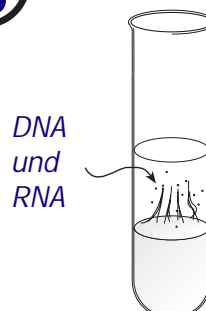
6. **Laß die Mischung einige Minuten in kaltem Wasser abkühlen.**

7. **Überschichte die Oberfläche langsam und sehr vorsichtig mit eiskaltem Ethanol.**

7



8



8. **Die Nukleinsäuren (feine, weiße Stränge) werden in die obere (Ethanol-) Schicht ausfällen.**

Isolation von DNA aus Zwiebeln



Dies ist eine Methode, um DNA und RNA aus pflanzlichem Gewebe zu isolieren. Das Gewebe wird zunächst mechanisch aufgelöst. Ein Haushaltsreiniger zerstört sowohl die Zellmembranen als auch die Kernmembranen. Die Zellreste werden herausgefiltert; die Nucleinsäuren und lösliche Proteine bleiben zurück. Ein Enzym greift die Proteine an, und dann fällt die Nucleinsäure in eiskaltem Ethanol aus.

Ziel

- Isolierung der Nucleinsäuren aus Zwiebelgewebe.

Anmerkung: Auf diesem Wege präparierte Nucleinsäuren sind nicht rein. Die eigentliche Absicht der beschriebenen Methode ist die Demonstration der Grundprinzipien zur Extraktion von DNA aus Gewebe.

Vorbereitung

Der Ethanol muß eiskalt sein. Er sollte wenigstens 24 Stunden vor Versuchsbeginn in einer Kunststoffflasche in einen Gefrierer gestellt worden sein.

Zeitbedarf

Der Versuch dauert 35 Minuten (einschließlich der Bebrütungszeit von 15 Minuten).

Geräte und Materialien

Bedarf für jeden Schüler oder jede Arbeitsgruppe

- Mixer (Haushaltsmixer)
- scharfes Kartoffelschälmesser, Schneideunterlage
- Wasserbad, eingestellt auf 60 °C
- Krug mit Eis
- 2 Bechergläser, 250 ml
- Kaffeefilterpapier (kein Laborfilterpapier)
- mittelgroße Zwiebel
- Geschirrspülmittel, 10 ml (kein Konzentrat)
- Kochsalz, 3 g
- destilliertes Wasser, 100 ml
- 10 ml-Einwegspritze zum Abmessen der Flüssigkeiten
- Reagenzglas
- Glasstab
- Protease-Enzyme, z.B. *Neutrase* (Novo Nordisk) 2-3 Tropfen
- eiskaltes Ethanol, ca. 6 ml (vergälltes Ethanol bzw. Brennspiritus sind geeignet)

Durchführung

1. Dem Spülmittel wird das Kochsalz zugefügt.
2. Die Zwiebel wird kleingewürfelt, aber nicht kleiner als 10 mm x 10 mm
3. Die zerkleinerte Zwiebel wird in die Salz-Spülmittel-Lösung gegeben.
4. Das Becherglas wird für 15 Minuten in das Wasserbad (60 °C) gestellt.
5. Das Becherglas wird zum Abkühlen in Eiswasser gestellt und darin für 5 Minuten ständig umgerührt.
6. Die Mischung wird in den Mixer gegossen und *nicht länger als 5 Sekunden* durchgemixt.
7. Die Mischung wird in ein zweites Becherglas gefiltert. Es muß gewährleistet sein, daß der Schaum an der Oberfläche der Flüssigkeit das Filtrat nicht kontaminiert.
8. 2-3 Tropfen Protease werden zu 6 ml des Zwiebelgewebeextrakts in ein Reagenzglas gegeben und sorgfältig gemischt.
9. Eiskalter Ethanol wird sorgfältig am Reagenzglas entlang gegossen, um den Zwiebelextrakt zu überschichten. Das Reagenzglas bleibt einige Minuten ungestört stehen.
10. Nucleinsäuren werden in die obere (Ethanol-) Schicht ausfallen.

Erläuterungen und Hinweise

1. Die DNA kann mit fuchsin-schwefeliger Säure oder Methylenblaulösung gefärbt werden.
2. DNA kann ebenfalls aus tierischem Gewebe gewonnen werden (z.B. Dorschrogen, Leber, Pankreas von Kalb oder Lamm). Dabei werden sanftere Methoden zum Aufbrechen des Gewebes in Form von Mörser und Stößel (mit Seesand) eingesetzt, um die DNA nicht zu verkürzen.

Sicherheitsvorkehrungen

Der Versuch enthält keine besonderen Sicherheitsrisiken, aber das Zwiebelschneiden und die Benutzung des Mixers sollten mit Vorsicht durchgeführt werden.

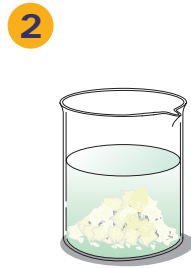
Danksagung

Dieser Versuch wurde übernommen aus *A Sourcebook of Biotechnology Activities* von Alison Rasmussen und Robert Matheson (1990), National Association of Biology Teachers / North Carolina Biotechnology Center. ISBN: 0 94121209
Die vollständige Veröffentlichung ist erhältlich über: NABT, 11250 Roger Bacon Drive # 19, Reston, Virginia 22090, USA



1
 10 ml Geschirrspülmittel
 3 g Kochsalz
 100 ml Wasser
 1 mittelgr. Zwiebel

Gib Kochsalz in das Spülmittel. Fülle mit Wasser auf 100 ml auf. Rühre gut um, damit sich das Salz auflöst.



2
 Gib die zerkleinerte Zwiebel in die salzige Spülmittellösung.

Die Spülmittellösung löst die Zellmembranen auf und entläßt DNA aus dem Nucleus jeder Zelle.



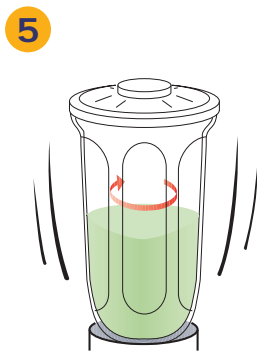
3
 Stelle das Becherglas 15 min bei 60 °C in heißes Wasser.

Hitze beschleunigt den Prozeß ... läßt die DNAsen unwirksam werden, die die DNA zerstören könnten.



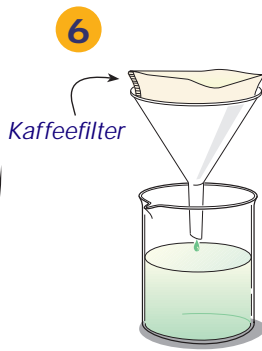
4
 Kühle die Mischung für einige Minuten durch Stelle das Becherglas in ein Gefäß mit Eiswasser.

...aber zu lange Hitzeeinwirkung zerstört auch die DNA .. deshalb ist ein Eisbad nötig.



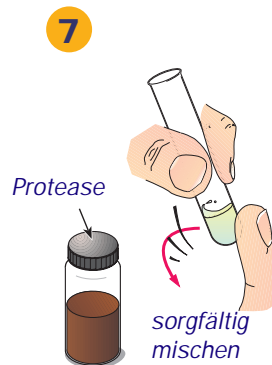
5
 Nicht länger als 5 Sekunden mixen.

Der Mixer hilft beim Öffnen der Zwiebelzellen - zu langes Mixen beschädigt die DNA.



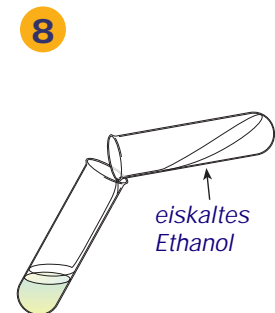
6
 Filtriere die gesamte Mischung.

Dies trennt das Zellwandmaterial von der DNA und den Proteinen, die jetzt in Lösung vorliegen.



7
 Gib 2-3 Tropfen des Protease-Enzyms zu 6 ml des Zwiebel-extrakts.

Die Protease zerstört Proteine in der Lösung. Eine kleine Menge ist ausreichend.



8
 Gieße die gleiche Menge eiskaltes Ethanol vorsichtig auf die Oberfläche des Zwiebel-extrakts.

Das Ethanol MUSS eiskalt sein. Er sollte über Nacht im Gefrierschrank stehen.*

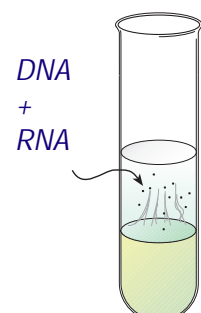
** Der Einsatz von Brennspritus ist möglich.*

Isolation von DNA aus Zwiebeln

9

DNA-Fäden in der oberen (Alkohol-) Schicht

DNA löst sich nicht in Alkohol . Deshalb fällt sie aus der Lösung in die obere Schicht aus.



Amylaseproduktion durch Bodenmikroorganismen



Stärke wird aus Glucosebausteinen gebildet, die entweder ein lineares Polymer namens Amylose oder ein verzweigtes Polymer namens Amylopektin bilden. Das Aufbrechen dieser Polymere gelingt durch zellfremde Amylasen, die von vielen Organismen, einschließlich der Bakterien und Pilze, gebildet werden. Zahlreiche Mikroorganismen wurden untersucht, um diejenigen zu finden, die für die kommerzielle Enzymproduktion geeignet sind. In dem vorliegenden Versuch wurden bodenlebende Mikroorganismen auf ihre Enzymproduktion außerhalb der Zelle untersucht.

Stellen der Enzymtätigkeit auf Amylopektin

Glucose-Bausteine in Amylose und Amylopektin werden durch α -1,4-Bindungen geschaffen, Verzweigungen sind diesen Ketten durch α -1,6-Verbindungen angefügt. Die wichtigsten kommerziell erhältlichen Amylasen sind:

α -Amylase - hydrolisiert α -1,4-Verbindungen ausschließlich in den Ketten, so daß kürzere Ketten (Dextrine) entstehen. Kommerziell gewonnen aus Bakterien (z.B. *Bacillus* spp.).

β -Amylase - hydrolisiert α -1,4-Verbindungen in Glucose-Polymeren, die die nachfolgenden Maltose-Bausteine von den Enden der Ketten abspalten. Sie können die α -1,6-Verbindungen nicht überwinden. Kommerziell gewonnen aus Gerste und Malz.

Amyloglucosidase - bricht α -1,4-Verbindungen auf, spaltet dabei Glucose-Bausteine von den Kettenenden und hydrolisiert ebenfalls α -1,6-Verbindungen, allerdings nur langsam. Kommerziell gewonnen aus den Pilzen *Aspergillus* spp. und *Rhizopus oryzae*.

Pullulanase - hydrolisiert α -1,6-Verbindungen. Kommerziell gewonnen aus den Bakterien *Bacillus acidopullulyticus* und *Klebsiell*.

Ziel

- Screenen natürlich auftretender Mikroorganismen zur Amylaseproduktion.

Erforderliche Vorkenntnisse

Die Schüler sollten Grundkenntnisse mikrobiologischer Arbeitsweisen, einschließlich steriler Arbeitstechniken haben. Die Kenntnis der Stärke-Jod-Reaktion ist wünschenswert.

Vorbereitung

Jod-Kalium-Jodid-(JKJ)-Lösung nach Lugol sollte Spätestens am Vortag vorbereitet werden, wenn keine gebrauchsfertige Lösung vorhanden ist. Die Jodkristalle benötigen einige Zeit bis zur Auflösung.

Stärke-Nähragar und Flaschen mit sterilem Wasser sollten vor der Unterrichtsstunde vorbereitet werden. Im Idealfall sollten die Bodenproben vor dem Gebrauch luftgetrocknet werden.

Sterile Wattestäbchen. Die Kunststoffstiele gekaufter Wattestäbchen schmelzen beim Autoklavieren. Einige kommerzielle Wattestäbchen könnten zudem antimikrobiell behandelt sein. Für diesen Versuch wird eine kleine Menge Stäbchen selbst angefertigt, indem ein Baumwollfaden um die Spitze eines Zahnstochers gewickelt wird. Sie werden in einer McCartney-Flasche oder lose in Alufolie eingeschlagen für 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

Zeitbedarf

Präparation und Bebrüten der Petrischalen:	45 Minuten
Erkundung der Ergebnisse, 2-3 Tage später:	15 Minuten

Geräte und Materialien

Bedarf für jeden Schüler oder jede Arbeitsgruppe (Eine normale Arbeitsraumausstattung wird vorausgesetzt)

- Sterile Petrischalen mit 15- 20 ml sterilem Stärke-Nähragar, aus kommerziellem Nähragar unter Zugabe von 0,2 %iger löslicher Stärke hergestellt
- 1 g trockener Boden, 10 cm unter der Oberfläche entnommen
- Jod-Kalium-Jodid-Lösung, durch Auflösen von 1 g Jod und 2 g Kaliumjodid in 300 ml destilliertem Wasser hergestellt
- 15 ml steriles destilliertes Wasser in einer McCartney-Flasche
- sterile, selbsthergestellte Wattestäbchen (vgl. Vorbereitung, oben)
- wasserfester Filzstift (zum Beschriften der Petrischalen)

Durchführung


1. 1 g trockener Boden wird in 15 ml steriles, destilliertes Wasser gegeben und zum Durchmischen gut durchgeschüttelt.
2. Beimpfen der Stärke-Nähragar-Platte: Ein steriles Wattestäbchen dient zum Ausstreichen der Bodensuspension auf der Agaroberfläche.
3. Die Petrischale wird mit den Initialen, dem Datum und der Quelle des Impfgutes beschriftet.
4. Die umgedrehte, beimpfte Platte wird für 2-3 Tage bei 30 °C bebrütet.
5. Jodlösung wird vorsichtig auf die bebrütete Platte gegossen, bis die gesamte Oberfläche ca. 1 mm hoch bedeckt ist. Die Stellen, an denen noch Stärke vorhanden ist, sind blauschwarz gefärbt (Jodmoleküle dringen in

den Innenbereich der Glucose-Molekülketten der Stärke ein). Hellbraune Bereiche (Farbe der Jod-kalium-jodid-lösung) entstehen entlang der Kolonienränder, wenn die Mikroorganismen Stärke abgebaut haben.

Sicherheitsvorkehrungen

WICHTIG: In Deutschland ist es nicht erlaubt, diesen Versuch so durchzuführen, weil die mit unbestimmten Organismen beimpften Platten nach dem Bebrüten geöffnet werden. Dabei sollten Kolonien von *Bacillus subtilis* DSM 402 statt der Bodenorganismen benutzt werden. Die allgemeingültigen Sicherheitsvorkehrungen sollten während dieses Versuchs und bei der Entsorgung der Kulturen befolgt werden. Es ist nicht ratsam, von den beimpften Platten Eigenisolate anzufertigen. Jod ist giftig und muß mit Vorsicht behandelt werden.


1



Bereite eine Petrischale mit sterilem Stärke/ Nähragar vor

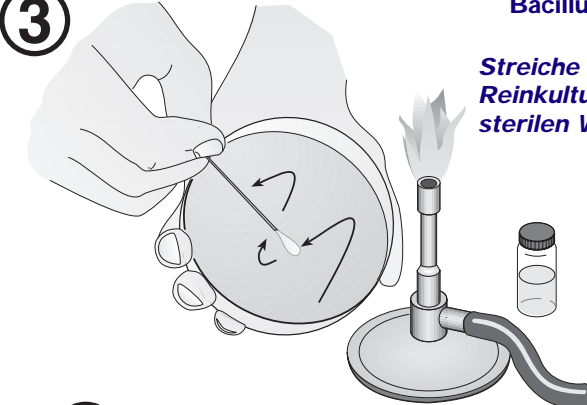
Amylaseproduktion durch Bodenmikroorganismen

2



Suspendiere 1 g Erde in 15 ml sterilem Wasser (verwende an deutschen Schulen eine Flüssigkultur von Bacillus subtilis)

3




Streiche die Erdsuspension oder eine Reinkultur von Bacillus subtilis mit einem sterilen Wattestäbchen auf das Nährmedium

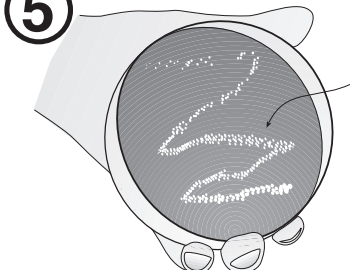
4

Bebrüte die Platte bei 30 °C für 2- 3 Tage

Bebrüte die umgedrehten Platten



5



Helle Bereiche ohne Stärke

Überschichte die Platte mit Jodlösung um aufzuzeigen, wo Stärke abgebaut wurde

Zellulase- produktion



Es besteht ein großes Interesse, Zelluloseabfälle aus der Papierherstellung als Nahrungsvorräte für Fermentationsprozesse zu nutzen; hierbei werden preiswerte Starterkulturen in sehr wertvolle Produkte umgewandelt. Die meisten kommerziell hergestellten Zellulosen werden durch die Fermentation flüssiger Zellulosen durch den Pilz *Trichoderma reesei* produziert. Das Bakterium *Cellulomonas* wächst jedoch schneller in Petrischalen und seine Produktion extrazellulärer Zellulasen ist leicht meßbar.

Ziel

- Herstellung einer quantitativen Zellulaseprobe durch *Cellulomonas*.

Vorbereitung

Für den Gebrauch im Klassenzimmer sollten Kulturen von *Cellulomonas uda* (DSM 20107) in Nährbouillon (z.B. in McCartney-Flaschen) vorbereitet werden. Das sollte zwei oder drei Tage vor Versuchsdurchführung erfolgen. Die Kulturen werden bei 25 - 30 °C bebrütet. CMC-Medium enthält:
0,5 g Carboxymethylcellulose (eine lösliche Form der Zellulose); 0,1 g NaNO₃; 0,1 g K₂HPO₄; 0,1 g KCl; 0,05 g MgSO₄; 0,05 g Hefeextrakt und 0,1 g Glucose in 100 ml Wasser. Das Medium sollte mit 1,7 % Agar angedickt werden.

Zeitbedarf

Vorbereitung und Bebrüten der Petrischalen:
45 Minuten
Erkundung der Ergebnisse, 2-3 Tage später:
15 Minuten

Geräte und Materialien

Bedarf für jeden Schüler oder jede Arbeitsgruppe (Der Zugang zu einer normalen Arbeitsraumausstattung wird vorausgesetzt)

- Schrägkultur von *Cellulomonas uda* (DSM 20107)
- Sterile Petrischalen mit 15 ml des sterilen CMC Mediums (vgl. Vorbereitung, oben)
- Steriles Wasser (in einer McCartney-Flasche)
- Sterile 1 ml-Einwegspritze (ohne Nadel) oder eine Pipettierhilfe und 2 sterile, verschlossene Pipetten

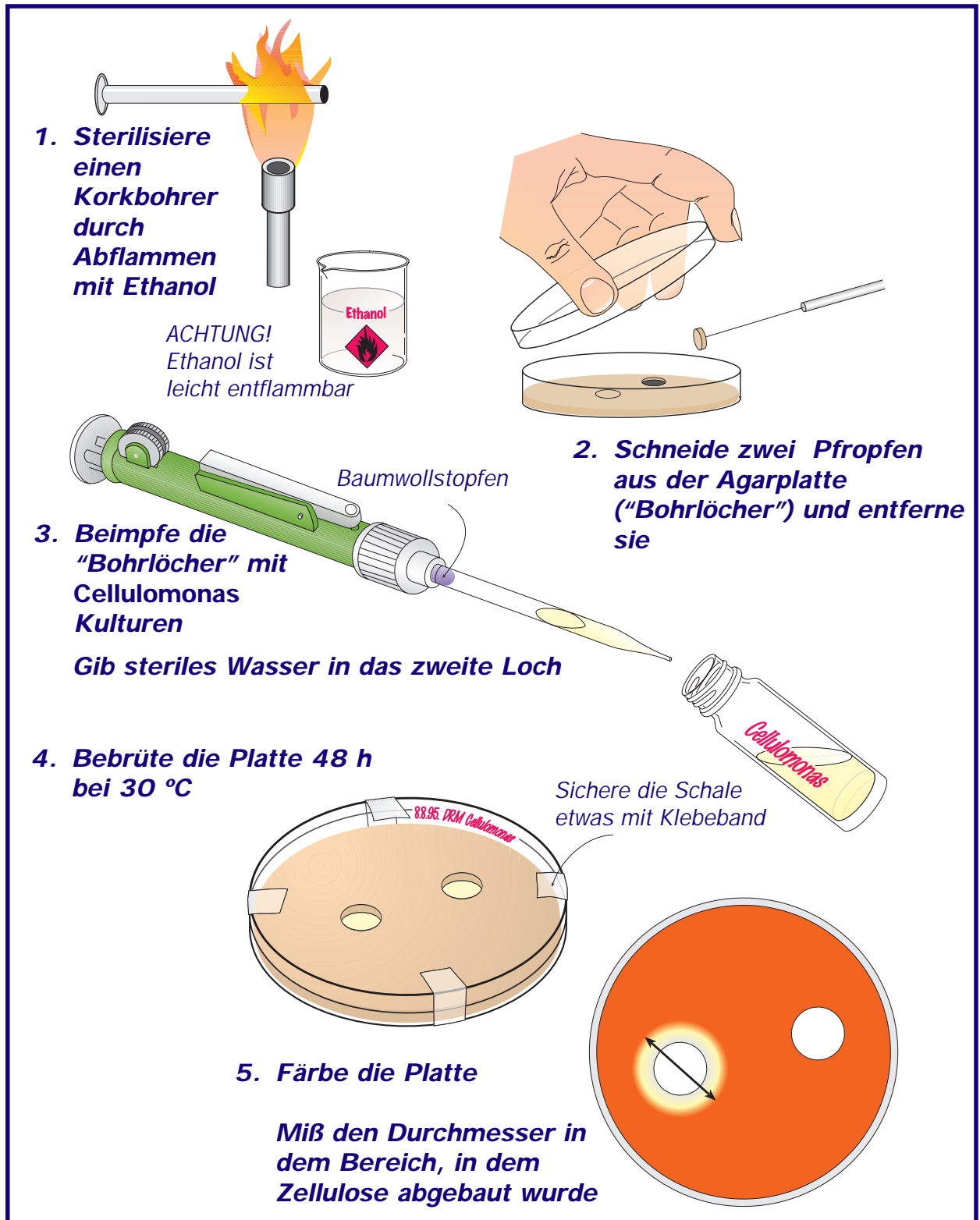
- Becherglas mit 5 % iger Hypochloritlösung, z.B. Domestos (Lever)
- Kongo Rot Lösung (aus 1 mg pro ml Wasser)
- 1 M Natriumchloridlösung
- Ethanol (zum Abflammen des Korkbohrers)
- Korkbohrer, 5 mm Durchmesser
- Brutschrank, eingestellt auf 25- 30 °C
- Filzstift zum Beschriften der Petrischalen

Durchführung

1. Der Korkbohrer (5 mm Durchmesser) wird in Alkohol getaucht und der Alkohol abgebrannt.
ACHTUNG: Der Bohrer muß während dieses Vorganges waagrecht gehalten werden, damit die Flammen nicht über die Bohrermitte nach oben laufen und die Hand verbrennen kann.
2. Der Deckel einer CMC-Platte wird an einer Seite leicht angehoben und dann mit dem Bohrer ein Loch in den Agar gestanzt. Der Agarpfropfen wird vom Bohrer entfernt, falls nötig mit einer gebogenen Nadel.
3. Die Arbeitsschritte 1 und 2 werden wiederholt, um zwei Löcher im Agar zu erhalten.
4. Jeder Ausschnitt wird genau auf der Unterseite der Petrischale beschriftet. Eine geeignete Abkürzung wäre: C (*Cellulomonas*), W (steriles Wasser, Kontrolle)
5. In das entsprechende Loch werden entweder 0,2 ml der mikrobiellen Kultur oder des sterilen Wassers gegeben. Es muß jeweils eine sterile Einwegspritze oder Pipette benutzt werden. Die benutzten Geräte kommen in ein Becherglas mit Desinfektionsmittel.
6. Die Platten werden bei 25- 30 °C bis zueiner Woche bebrütet. *Cellulomonas* produziert bei 30 °C nach 48 Stunden helle Höfe bis zu einem Durchmesser von 16 mm.

Nach dem Bebrüten ...

7. Die Platten werden mit Kongo-Rot-Lösung für 15 Minuten überschichtet und für 10-15 Minuten durch die Salzlösung entfärbt. Ungefärbte Bereiche zeigen auf, wo das CMC-Medium zu β -(1,4)-Glucan abgebaut wurde, das sieben oder weniger Glucose-Reste enthält. Der Durchmesser der hellen Höfe kann gemessen werden, um einen quantitativen Vergleich der zelluloseabbauenden Aktivität zu erhalten.



Erläuterungen und Hinweise

1. Bodensuspensionen können in die Ausschnitte der Platten pipettiert werden, um ihre mikrobielle Flora bei der Zelluloseherstellung aufzuzeigen.
2. Die gleiche Verfahrensweise kann eingesetzt werden, um die Aktivität kommerzieller Zellulosepräparate zu untersuchen.
3. Der Vorgang des Zelluloseabbaus kann über mehrere Tage durch das Ansetzen von Zweitplatten verfolgt werden.

Sicherheitsvorkehrungen

Grundlegende mikrobiologische Sicherheitsvorkehrungen (Entsorgung der Platten am Ende des Versuchs) einschließlich keimfreier Arbeitstechniken müssen während des Versuchs beachtet werden.

WICHTIG: Beim Einsatz von Bodenproben als Zellulosehersteller (Erläuterungen und Hinweise, Arbeitsschritt 1) ist in Deutschland das erneute Öffnen der Platten verboten.

Antibiotika- produktion



Viele Mikroorganismen produzieren Antibiotika - Substanzen, die das Wachstum ihrer bakteriellen Konkurrenten hemmen oder sie abtöten. Seit der Entwicklung des Penicillins in den 40er Jahren (produziert durch den Pilz *Penicillium*) waren diese Substanzen hochgradig erfolgreich in der Krankheitsbekämpfung. Heutzutage werden die wichtigsten Antibiotika vom Bakterium *Streptomyces* gebildet. Weitere Informationen über die Wirkungsweise von Antibiotika und dem Phänomen der Bakterienresistenz sind dem Begleitmaterial zu entnehmen.

Ziel

- Herstellung des Antibiotikums Streptomycin durch *Streptomyces griseus* und Aufzeigen seiner Wirkungsweise auf das Wachstum einer Vielzahl von Mikroorganismen.

Vorkenntnisse

Ursprung und Wirkung von Antibiotika, die Entwicklung und Verbreitung der Resistenz gegen Antibiotika (vgl. Begleittext).

Unten: Eine drei Tage alte Kultur von *Streptomyces griseus* (links). Die Testorganismen sind (von oben nach unten): *Candida utilis*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus mycoides*, *Escherichia coli*.



Vorbereitung

Lebende Kulturen von *Streptomyces griseus* werden benötigt. Sie müssen 2 - 3 Tage auf Platten mit 15 - 20 ml Standardagar gezüchtet werden.

Eine Kultur, mit der diese Platten beimpft werden sollen, muß vorbereitet werden. Dazu wird eine Öse voll *Streptomyces* aus einer Schrägkultur gelöst und erneut in 1 ml sterilen Nährbouillon suspendiert, danach in ein Reagenzglas mit 5 ml steriler Nährbouillon gegeben. Diese Kultur wird für 24 Stunden bei 30 °C bebrütet.

Die Petrischalen werden mit der Übernachtskultur von *Streptomyces griseus* durch Ausstreichen auf der Platte mit einem einzigen vertikalen Strich so weit links als möglich auf der Platte beimpft, daß der rechte Teil des Nährmediums steril bleibt.

Die Platten werden bei 30 °C für 3 -4 Tage bebrütet.

Zusätzlich werden Übernachtskulturen von Testorganismen (*Bacillus mycoides*, *Candida utilis*, *Escherichia coli* K-12, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*) angelegt.

Zeitbedarf

Vorbereitung der Medien und Bebrütung:
60 Minuten +
Erstbebrütung der *Streptomyces* Kultur:
24 Stunden, dann weitere 72 - 96 Stunden
Beimpfen der Platten: 20 Minuten
Bebrüten: 24 - 72 Stunden

Geräte und Materialien

Bedarf für jeden Schüler oder jede Arbeitsgruppe (Der Zugang zur normalen Arbeitsraumausstattung wird vorausgesetzt).

- Zugang zu einem Brutschrank, eingestellt auf 30 °C
- Impföse
- sterile Petrischalen mit 15-20 ml Standardagar, auf die *Streptomyces griseus* (DSM 40236) ausgestrichen wurde und 48-72 Stunden gewachsen ist (vgl. *Vorbereitung*, oben)
- eine Auswahl Testorganismen* auf Schrägkulturen, wie
 - Candida utilis* (eine Hefe), DSM 02361
 - Micrococcus luteus* (ein Bakterium), DSM 20030
 - Pseudomonas fluorescens* (ein Bakterium), DSM 50090
 - Bacillus mycoides* (ein Bakterium), DSM 2048
 - Escherichia coli* K-12 (ein Bakterium) DSM 498

* Es muß den regionalen Bestimmungen in Bezug auf den Einsatz dieser Organismen in der Schule Folge geleistet werden. (in Deutschland ist der Einsatz erlaubt).

Durchführung

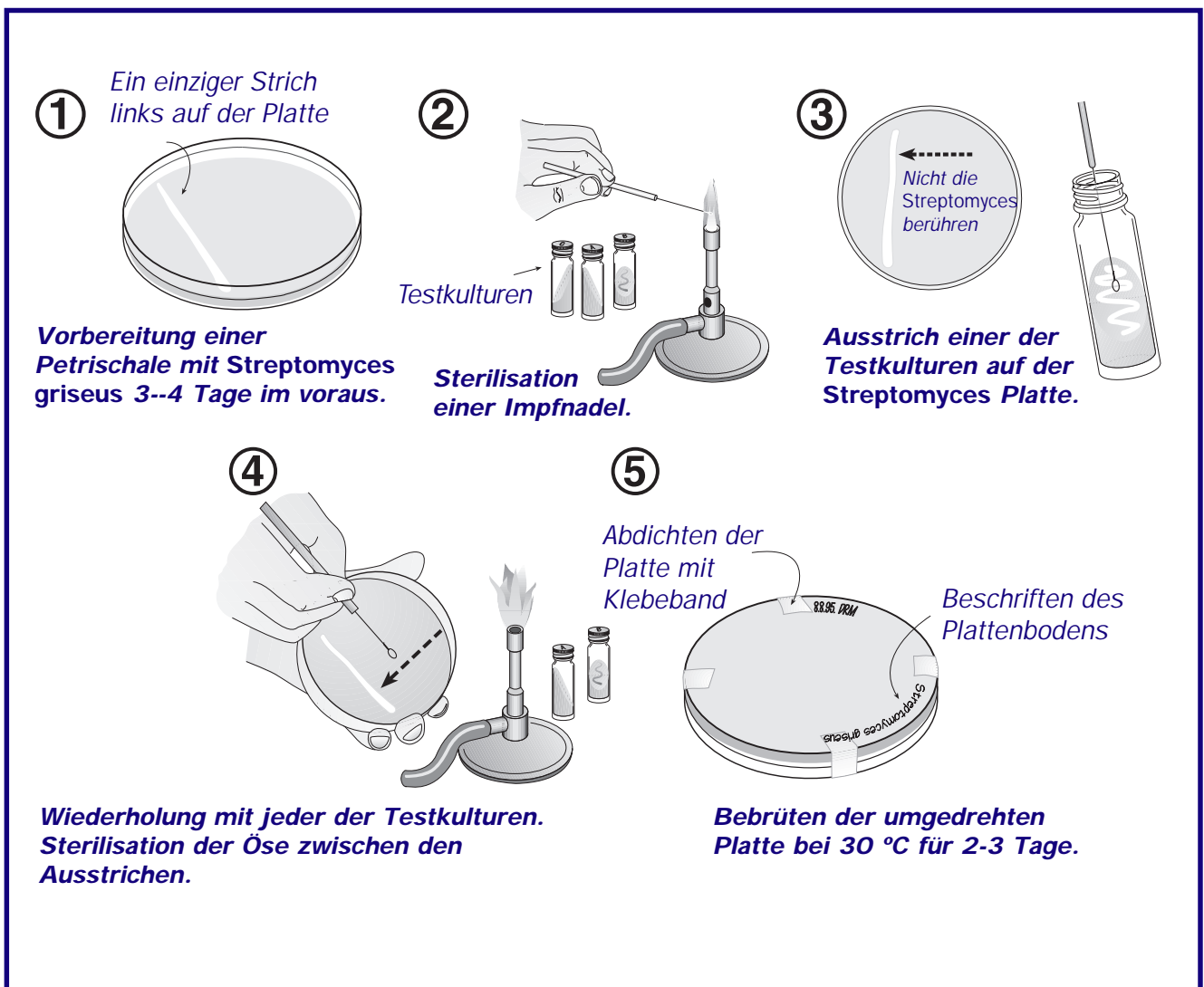
1. Jeder vorbereitete *Streptomyces* Nährboden wird wie folgt mit den Testorganismen beimpft:
 - a) Eine Impföse wird durch die Flamme eines Bunsenbrenners gezogen und kurz abgekühlt.
 - b) Kulturen der Testorganismen werden mit der sterilen Impföse entnommen und jeweils einmal horizontal auf dem hellen Teil des Nährmediums ausgestrichen (rechts von *Streptomyces*). Die Ausstriche müssen immer im rechten Winkel zu den *Streptomyces*-Kulturen ausgebracht werden und bis dicht an sie heranreichen.
WICHTIG! Die *Streptomyces*-Kulturen dürfen nicht mit der Öse berührt werden.
 - c) Die Impföse wird erneut abgeflammt. Die Schritte a) - c) werden für jede Testkultur wiederholt.
2. Die Platten werden 2 Tage bei 30 °C für 2 Tage bebrütet.
3. Untersuchung der Platten

Sicherheitsvorkehrungen

Diese Arbeit muß in einem Arbeitsraum durchgeführt werden. Grundlegende mikrobiologische Sicherheitsvorkehrungen sollten während der Arbeit und bei der Entsorgung der Kulturen befolgt werden. Die während des Versuchs erzeugte Antibiotikamenge stellt kein Sicherheitsrisiko dar.

Anmerkungen

Streptomyces griseus erzeugt das Antibiotikum Streptomycin, das in das Kulturmedium diffundiert. Streptomycin und verwandte Antibiotika stören die Proteinsynthese durch ihre Anbindung an die 30S Komponente der bakteriellen Ribosomen. Einige Organismen (*Bacillus mycoides*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*) reagieren sensitiv, andere (*Pseudomonas fluorescens*) sind resistent. Hefen (*Candida utilis*) werden durch Streptomycin nicht angegriffen, da sie Eukaryonten mit einer anderen Ribosomenstruktur sind. Für weitere Informationen steht der begleitende Text zur Verfügung, der die Antibiotikaproduktion und Wirkungsweise detailliert beschreibt.



Brotteig herstellen



Berichte über Brot aus Sauerteig, die bis ins antike Ägypten (4.000 v. Chr.) zurückgehen, zeigen, daß die Brotherstellung eines der ältesten biotechnologischen Beispiele überhaupt ist. Traditionell wird Brot in Großbritannien aus Weizenmehl, Wasser, Salz und möglicherweise Fett - abhängig vom Rezept - hergestellt. Diese Zutaten bilden einen Teig, in dem Hefe gebunden ist. Amylasen im feuchten Mehl bilden Stärke zu Glucose um, die die immobilisierten Hefezellen ernährt.

Zusätzlich benötigt Hefe eine Stickstoffquelle. Peptone und Aminosäuren werden durch eine partielle Hydrolyse der Mehlproteine (Gluten) zur Verfügung gestellt. Die anaerobe Atmung der Hefe erzeugt Kohlenstoffdioxid und Alkohol.

Gluten trägt zur Elastizität und Formbarkeit des Teiges bei und sichert den Einschluß des Kohlenstoffdioxids, der die Luftblasen im Teig vergrößert, damit der Teig "gehen" kann.

Ziel

- Die vorgeschlagene Verfahrensweise bietet die Möglichkeit, die Wirkungsweise unterschiedlicher Rezeptvarianten zu untersuchen, die entweder die Mehlproteine oder die Enzymtätigkeit modifizieren.

Zeitbedarf

Abhängig von den Bedingungen (Wärme etc.) kann der Versuch in 50 Minuten abgeschlossen werden.

Geräte und Materialien

Für jedes Brot

- Trockenhefe, 1 g
- Weizenmehl (Type 405), 75 g
- Wasser, 50 ml
- weitere Zutaten nach Wunsch, z.B. Ascorbinsäure, α -Amylase, Kaliumbromat (vgl. *Erläuterungen und Hinweise*, unten)
- kleine Bechergläser zum Teigmischen
- kräftige Glasstäbe zum Umrühren
- 2 Meßzylinder, 100 ml
- Stoppuhr

Durchführung

1. Die Trockenhefe wird in Wasser aktiviert, Mehl zugefügt und gut durchgemischt.
2. Der Teig wird wurstförmig gerollt und in einen Meßzylinder gegeben.
3. Die Teighöhe wird alle 10 Minuten über einen Zeitraum von 1 Stunde gemessen.

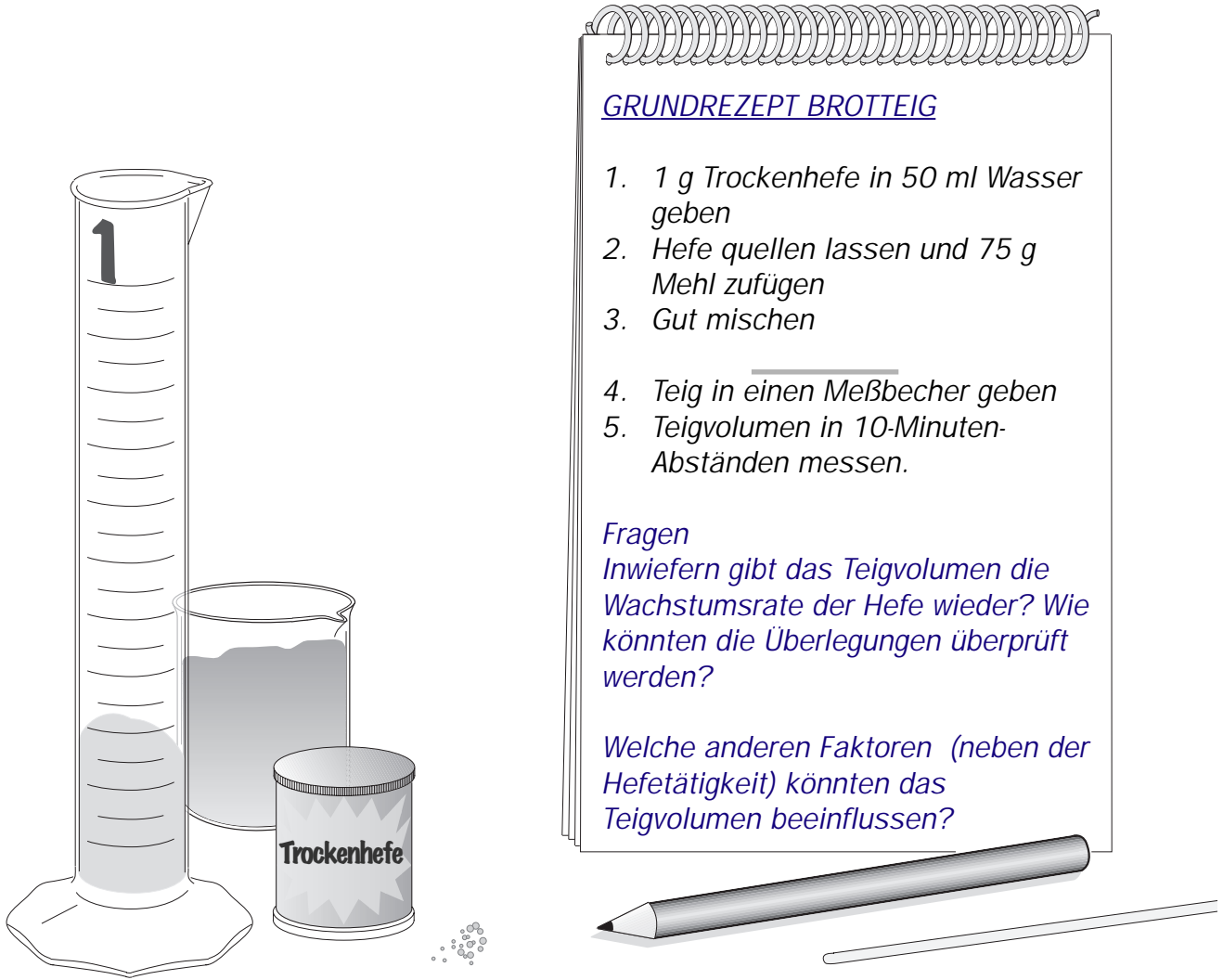
Erläuterungen und Hinweise

1. Welchen Effekt zeigen unterschiedliche Formen von Trockenhefe auf das Ausmaß des "Gehens" (z.B. gewöhnliche Trockenhefe im Vergleich zu der neueren 'Einrührhefe').
2. Welche Unterschiede beim "Gehen" des Teiges ergeben sich aus unterschiedlichen Mehlsorten (z.B. Roggen-, Weizen- und Vollkornmehl). Weizenmehlsorten enthalten viel Gluten, aber wenig α -Amylase. Vollkornmehl weist viel α -Amylase auf.
3. Welchen Effekt hat der Mehlverbesserer Ascorbinsäure (Vitamin C) auf den Grad des "Gehens"? Ascorbinsäure reagiert mit Enzymen im Teig und begrenzt die Schwefelwasserstoffbrückenbildung zwischen den Glutenproteinen. (1 g kann dem Brotteigrezept beigefügt werden).
4. Welchen Effekt hat die Beigabe von α -Amylase auf den Grad des "Gehens"? Wie können beobachtete Unterschiede erklärt werden?
5. Der Mehlverbesserer Kaliumbromat ermöglicht die Schwefelwasserstoffbrückenbildung angrenzender Glutenproteine, so daß elastischere, besser "gehende" Teige entstehen. Allerdings würde ein zu starkes Aufgehen den Teig schwächen. Teige, die mit bzw. ohne diese Zutat hergestellt wurden, können verglichen werden.
6. Salz hemmt die Wirkung von Proteasen und verhindert so die Veränderung von Gluten zu einer klebrigen Masse, die kein Kohlenstoffdioxid speichern kann. Ein Übermaß an Salz erzeugt starke Ionenbindungen mit den seitlichen Ketten der Proteinmoleküle, die sie weniger dehnbar machen und zu festem Teig führen. Zuviel Salz hemmt zudem das "Gehen" der Hefe. Die optimale Salzmenge für den Teig könnte bestimmt werden.

Literaturangabe

On food and cooking. The science and lore of the kitchen von Harold McGee (1991) Harper Collins Publishers. ISBN: 0 00412657 2

Pritchard, P.E. (1992) *Studies on the bread-improving mechanism of fungal alpha-amylase* Journal of Biological Education **26**, (1) 12-18



GRUNDREZEPT BROTEIG

1. 1 g Trockenhefe in 50 ml Wasser geben
2. Hefe quellen lassen und 75 g Mehl zufügen
3. Gut mischen
4. Teig in einen Meßbecher geben
5. Teigvolumen in 10-Minuten-Abständen messen.

Fragen
Inwiefern gibt das Teigvolumen die Wachstumsrate der Hefe wieder? Wie könnten die Überlegungen überprüft werden?

Welche anderen Faktoren (neben der Hefetätigkeit) könnten das Teigvolumen beeinflussen?

Immobilisierte Hefezellen



Gewöhnliche Backhefe, *Saccharomyces cerevisiae* ist nicht in der Lage, den Zucker Lactose zu fermentieren. Das Enzym β -Galactosidase spaltet Lactose zu Glucose und Galactose. Hefe, die mit diesem Enzym immobilisiert ist, kann in einem Medium, das Lactose enthält, gedeihen. Von den beiden Zuckern, die durch die Enzymtätigkeit entstehen, wird bevorzugt Glucose benutzt. Wenn die Vorräte dieses Zuckers verbraucht sind, verändert die Hefe ihren Stoffwechsel und verwendet das andere Spaltungsprodukt der Lactose, Galactose. Die Hefetätigkeit läßt sich schnell durch das Messen der bei der Fermentation gebildeten Kohlenstoffdioxidmenge überprüfen.

Ziel

- Einführung in die quantitative Untersuchung einer Fermentation.

Vorbereitung

Natriumalginat ist schwer wasserlöslich. Es wird in heißem Wasser unter Umrühren aufgelöst. Daher muß Natriumalginat im voraus hergestellt werden. Natriumalginat sollte vor längerer Aufbewahrung autoklaviert werden. *Wichtig: Destilliertes oder deionisiertes Wasser sollte für alle Lösungen verwendet werden, da Calciumionen in Leitungswasser das Alginat zum Absetzen bringen.*

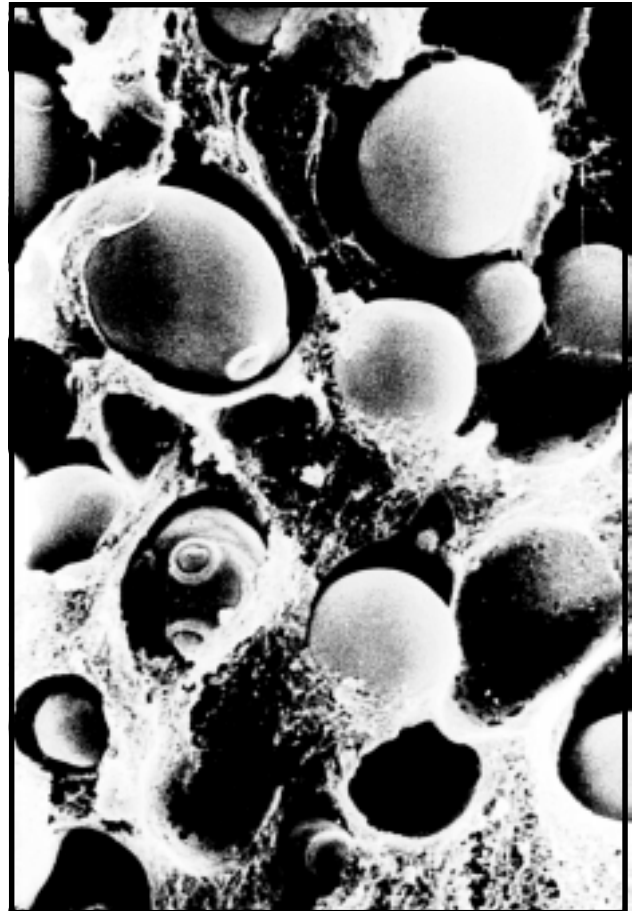
Zeitbedarf

Immobilisierte Hefezellen können in 10-15 Minuten präpariert werden. Die Fermentation kann bis zu einer Woche dauern.

Geräte und Materialien

Bedarf für jeden Schüler oder jede Arbeitsgruppe

- 4%ige Natriumalginatlösung, 10-15 ml
- 1,5%ige Calciumchloridlösung, 100 ml
- 10 ml Einwegspritze ohne Nadel
- Teesieb
- 2 Bechergläser, 200 ml
- 2 Erlenmeyerkolben, 250 ml
- 2 doppelt durchbohrte Stopfen
- 2 große Bechergläser, z.B. 500 ml
- 2 Meßbecher, 100 ml



Photograph courtesy Dr Duncan Casson

Immobilisierte Hefezellen in einer Matrix aus Calciumalginat

- chemische Sterilisationslösung, z.B. *Domestos* oder *Sagrotan*
- 13%ige Natriumchloridlösung, ca. 1 l (normale Kochsalzlösung ist ausreichend)
- 100 ml Medium, mit 2 g Glucose, 1 g Hefeextrakt und 1 g Pepton
- 100 ml Medium mit 2 g Lactose, 1 g Hefeextrakt und 1 g Pepton
- β -Galactosidase-Enzym, z.B. *Lactozym* (Novo Nordisk), 2 ml
- Bäckerhefe oder Trockenhefe

Durchführung

Die immobilisierten Enzyme und Hefepellets werden wie folgt präpariert:

1. Die Trockenhefe wird mit 25 ml destilliertem Wasser in einem kleinen Becherglas aufgelöst und für 10 Minuten bei Raumtemperatur quellen gelassen
2. Im anderen Becherglas werden Natriumalginat und β -Galactosidase gemischt und in 10 ml der Hefelösung eingerührt.
3. Die Hefe-Enzym-Alginat-Mischung wird in der Einwegspritze aufgezogen und tropfenweise der Calciumchloridlösung im zweiten großen Becherglas zugefügt.

- Die immobilisierten Enzym-Hefe-Kugeln bleiben zum Erhärten für 10 Minuten in der Calciumchloridlösung.
- Die Kugeln werden mit einem Teesieb aus der Lösung gefiltert und sorgfältig mit Leitungswasser abgespült.

Die Kugeln können in sterilem Wasser bis zu 3 Tage vor Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt werden

Einrichtung des Fermentationsgefäßes:

- Die Kolben werden mit *Sagrotan* oder *Domestos* sterilisiert und danach mit Wasser ausgespült.
- Steriles Nährmedium wird in die Kolben gefüllt. Das Glucosemedium wird in den einen (als Kontrolle) und das Lactosemedium in den anderen gefüllt.
- Die gleiche Anzahl Kugeln wird in jeden Kolben gegeben.
- Die Kolben werden mit dem doppelt durchbohrten Stopfen verschlossen.
- Die Kolben werden auf 21-25 °C gehalten.

Das Gas, das sich über der 13%igen Natriumchloridlösung bildet, wird aufgefangen (Kohlenstoffdioxid ist nicht in dieser Lösung löslich) und in regelmäßigen Abständen gemessen.

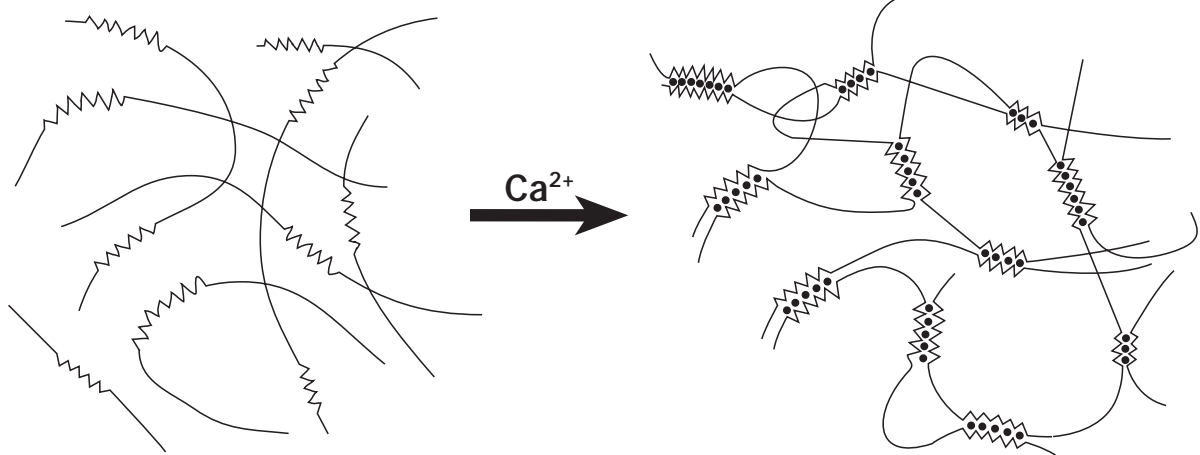
- Es wird eine Grafik erstellt, die die Gasmenge im Verhältnis zur Zeit darstellt.

Erläuterungen und Hinweise

- Verschiedene Hefearten, z.B. Bäckerhefe oder "Weinhefe" können eingesetzt werden.
- Die Konzentration der β -Galactosidase, die Bebrütungszeit oder andere Variablen können verändert werden.

Sicherheitsvorkehrungen

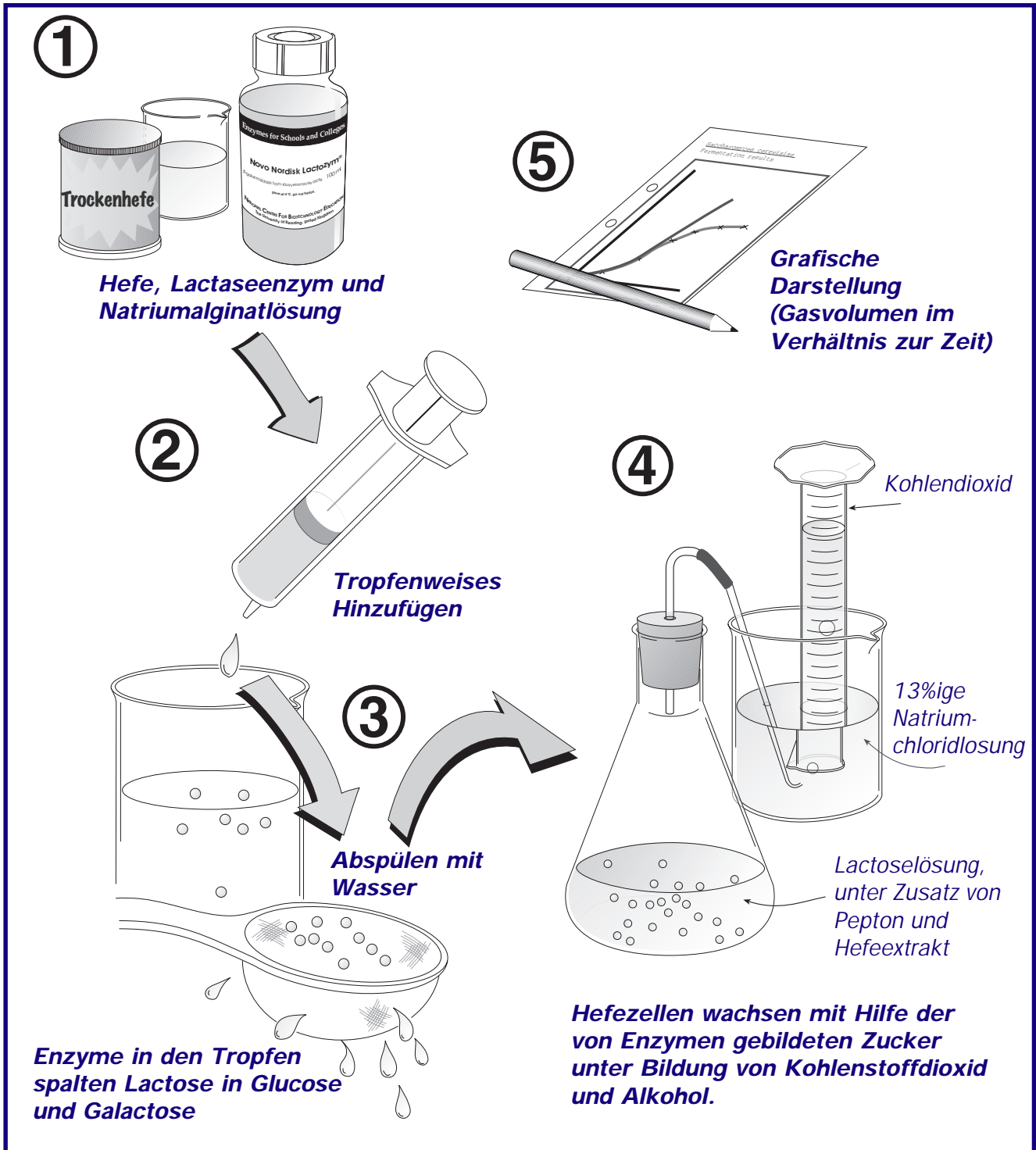
Die Bildung von Gas in Glasgefäßen könnte gefährlich sein. Es sollte sichergestellt werden, daß die Fermentationsgefäße entsprechend geöffnet sind. Chemische Wirkstoffe zur Sterilisation sollten vorsichtig eingesetzt werden, und alle Gebrauchsanweisungen seitens der Hersteller müssen befolgt werden.



Die üblichste Technik zum Immobilisieren von Zellen ist der Einschluß in Calciumalginate. Sie ist aufgrund ihrer sanften Bedingungen besonders für lebende Zellen geeignet. Diese vielseitige Methode wird angewandt zur Immobilisierung lebender oder toter Zellen in Bioreaktoren, zum Verschmelzen von pflanzlichen Protoplasten und Pflanzenembryonen ('künstliche Samen'), zur Mikrovermehrung, zur Immobilisierung von Hybridzellen für die Produktion monoklonaler Antikörper und zum Einschluß von Enzymen und Arzneimitteln. (siehe Auflistung, nächste Seite).

Die zu verschmelzenden Zellen oder Enzyme werden zunächst mit einer Natriumalginate-Lösung vermischt. Diese Mischung wird dann in eine Lösung mit mehrwertigen Kationen (üblicherweise Ca^{2+}) getropft. Die Tröpfchen bilden beim Hineinfallen automatisch Kügelchen, die die Zellen in einem dreidimensionalen Gitter aus ionisch kreuzweise verbundenem Alginate einbinden (siehe Darstellung, oben).

Weitere Informationen in Smidrod, O. und Skjak-Brak, G. (1990) Alginates as an immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology* 8 (3) 71-78.



Beispiele für den Einsatz alginatimmobilisierter Zellen (nach Smidsrød und Skjak-Bræk, 1990)

Zellen	Produkte/ Einsatzorte	Zellen	Produkte/ Einsatzorte
Bakterien		Algen	
<i>Erwinia rhapsontice</i>	Isomaltulose	<i>Botryococcus braunii</i>	Kohlenwasserstoffe
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	Trinkwasserreinigung	Pflanzenzellen	
<i>Zymomonas mobilis</i>	Ethanol	<i>Chatharanthus roseus</i>	Alkaloide zur Krebstherapie
Cyanobakterien		Diverse Pflanzen	Künstliche Samen
<i>Anabena</i> sp.	Ammoniak	Pflanzl. Protoplasten	Handhabung von Zellen, Mikroskopie
Pilze		Säugetierzellen	
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Hydrolyse von Lactose	Hybride	Monoklonale Antikörper
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ethanol	Langerhans'sche Inseln	Insulin / Implantation
<i>Saccharomyces bayanus</i>	Champagnerherstellung	Fibroblasten oder Lymphzellen	Interferone (α oder β)

Die mikrobielle Energiezelle



Stromerzeugende Mikroorganismen waren jahrzehntlang eine biologische Kuriosität. Heutzutage sehen Forscher ihren Einsatz in Uhren und Kameras, als Energiequelle in der 3. Welt und in Bioreaktoren zur Umwandlung von Industrieabfällen in Elektrizität voraus. Die hier beschriebene mikrobielle Energiezelle erzeugt elektrischen Strom in geringer Menge durch die Elektronenabgabe aus der Atmungskette von Hefe. Sie kann zur Untersuchung der Atmung auf neuartige und anregende Weise dienen. Weitere Informationen finden sich in *BIO/technology Education*, B and 1, Nummer 4, Seite 163-168.

Ziel

- Motivierende Einführung in die Untersuchung der Atmung
- Mögliche Untersuchung einiger Einflußfaktoren auf die mikrobielle Atmung
- Bedeutung des Einsatzes von organischem Abfall zur Elektrizitätserzeugung

Vorbereitung

Lösungen aus Reagenzien sollten vorbereitet werden. Vor Gebrauch der Kationenaustauschmembran sollte sie 24 Stunden in destilliertem Wasser eingeweicht werden. Die Trockenhefe ist zu aktivieren, wenn die Energiezelle zusammengebaut ist.

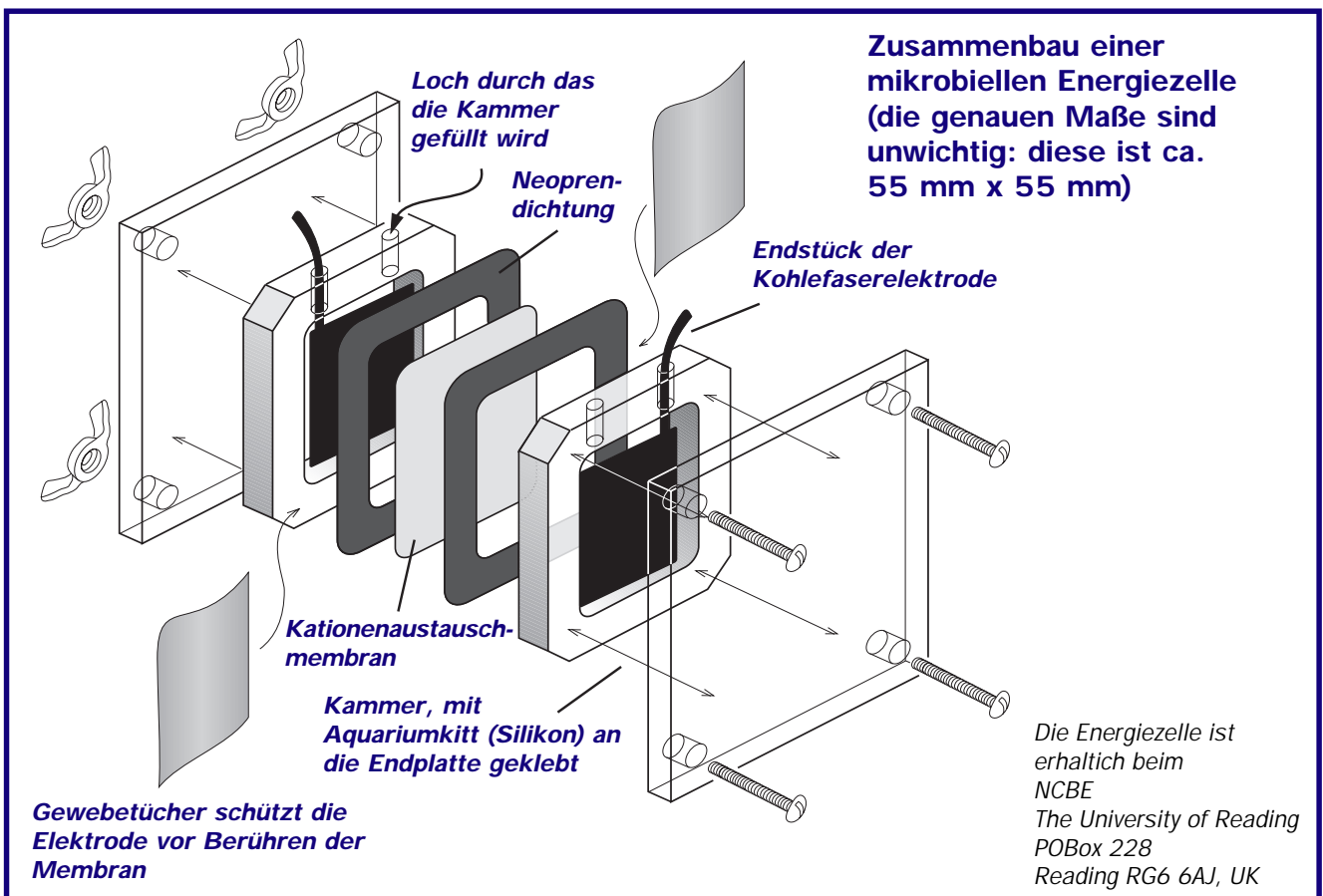
Zeitbedarf

Der Aufbau (bis zur Stromerzeugung) dauert ca. 30 Minuten.

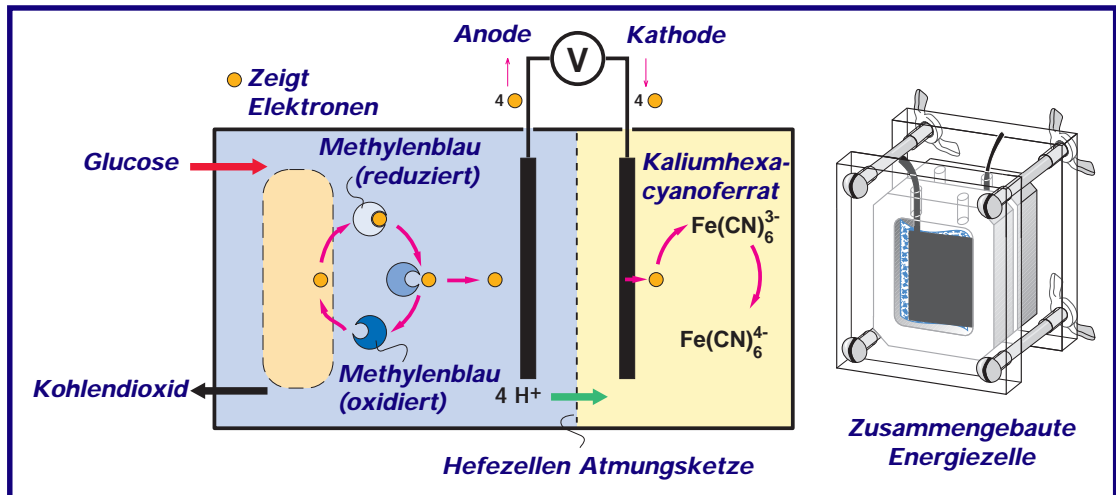
Geräte und Materialien

Bedarf für jeden Schüler oder jede Arbeitsgruppe

- *Perspex* (ICI) Energiezelle, aus 4 mm dickem Material ausgeschnitten
- Neoprendichtungen, 2
- Kationenaustauschmembran, passend auf den Zwischenraum der Kammern zugeschnitten
- Elektroden aus Kohlefaser, passend zugeschnitten
- Haushaltstuch (Gewebetuch), zugeschnitten auf das Innenmaß der Zelle, 2 Stück
- 10 ml Einwegspritze, 2, zum Verteilen der Flüssigkeiten
- Petrischalenboden oder -deckel als Unterlage der Energiezelle
- Elektrische Anschlüsse mit Krokodilklemmen, 2



Wie die Energiezelle funktioniert



- 0-5 V Voltmeter oder Spannungsmesser und / oder Schwachstrommotor
- Scheren

Alle nachfolgenden Lösungen sollten nicht in Wasser, sondern in 0.1 M Phosphatpuffer hergestellt werden

- Trockenhefe, mit 0.1 M Phosphatpuffer angedickt (kein Zufügen von Glucoselösung ohne vorheriges Aktivieren der Hefe in der Pufferlösung)
- 10 mM Methyleneblaulösung, 5 ml 1 M Glucoselösung, 5 ml
- 0.02 Kaliumhexacyanoferrat III- Lösung, 10 ml (auch rotes Blutlaugensalz genannt)

Herstellung von 0.1 M Phosphatpuffer, pH 7.0

Auflösen von 4.08 g Na_2HPO_4 und 3.29 g NaH_2PO_4 in 500 ml destilliertem Wasser.

Durchführung

1. Zwei Kohlefaser Elektroden werden entsprechend der Abbildung zugeschnitten.
2. Zwei in die Energiezelle passende Gewebetücher werden zugeschnitten.
3. Die Energiezelle wird entsprechend der Abbildung zusammengebaut.
4. Die Energiezelle wird in einen Petrischalenboden oderdeckel gestellt, um evtl. heraustropfende Flüssigkeit aufzufangen.
5. Die Hefeverbindung, Glucose- und Methyleneblaulösung werden gemischt und in eine Kammer der Energiezelle pipettiert (Einwegspritze).
6. Kaliumhexacyanoferrat (III)-Lösung wird in die andere Kammer pipettiert.
7. Über die Krokodilklemmen wird ein Voltmeter oder Spannungsmesser an die Elektrodenendstücke angeschlossen. Energiezellen dieser Bauart erzeugen

gewöhnlich zwischen 0,4-0,6 V. Stromfluß sollte sofort meßbar sein. Zeigt das Meßgerät 0, müssen die Anschlüsse überprüft und sichergestellt werden, daß die Kohlefaser Elektroden die Kationenaustauschmembran nicht berühren.

Erläuterungen und Hinweise

1. Mehrere Energiezellen können aneinandergeschlossen werden, um eine höhere Spannung zu erzeugen. Eine Vergrößerung der Zelle (oder des Elektrodenbereichs) erhöht die Strommenge (nicht aber die Spannung).
2. Unterschiedliche Mittler und / oder Hefearten wie Bäckerhefe oder Weinhefe können eingesetzt werden. Anmerkung: Aus Sicherheitsgründen wird der Einsatz anderer Mikroorganismen nicht empfohlen.
3. Die Wirkung von Wärme auf die Wirkungsweise der Energiezelle kann untersucht werden. (Es wird an die entsprechenden 'Kontrollen' erinnert, die bei derartigen Vergleichen notwendig werden).

Sicherheitsvorkehrungen



Kaliumhexacyanoferrat (III) ist giftig. Bei seiner Benutzung sollte eine Schutzbrille getragen werden. Bei Kontakt mit den Augen müssen die Augen ausgespült und ein Arzt aufgesucht werden. Wenn Kaliumhexacyanoferrat verschluckt wurde, muß viel Wasser getrunken und ein Arzt aufgesucht werden. Die regionalen Bestimmungen zur Entsorgung benutzter Lösungen sollten befolgt werden.

Danksagung

Die mikrobielle Energiezelle wurde von Dr. Peter Bennetto am King's College, London, entwickelt. Bestellanschrift s. Abbildung s. 25

Natürlicher Gentransfer durch bakterielle Konjugation



Es gibt viele natürliche Methoden des Gentransfers zwischen Bakterien. Sie wurden wahrscheinlich entwickelt, um den Organismen zu ermöglichen, sich den schnell wechselnden Umweltbedingungen anzupassen. In der Regel sind Gene mit der größten Mobilität auf den Plasmiden lokalisiert. Plasmide sind zusätzliche DNA-Ringe, die sich unabhängig vom Bakterienchromosom verdoppeln. Sie enthalten eine kleine Anzahl von Genen, die auf ihren Träger u.a. die Fähigkeit übertragen, schädliche Substanzen aus der Umwelt - wie Schwermetalle oder Antibiotika - abzubauen.

Drei verschiedene Arten des natürlichen Gentransfers sind bekannt:

Transformation ist die Aufnahme freier DNA aus der Zellumgebung.

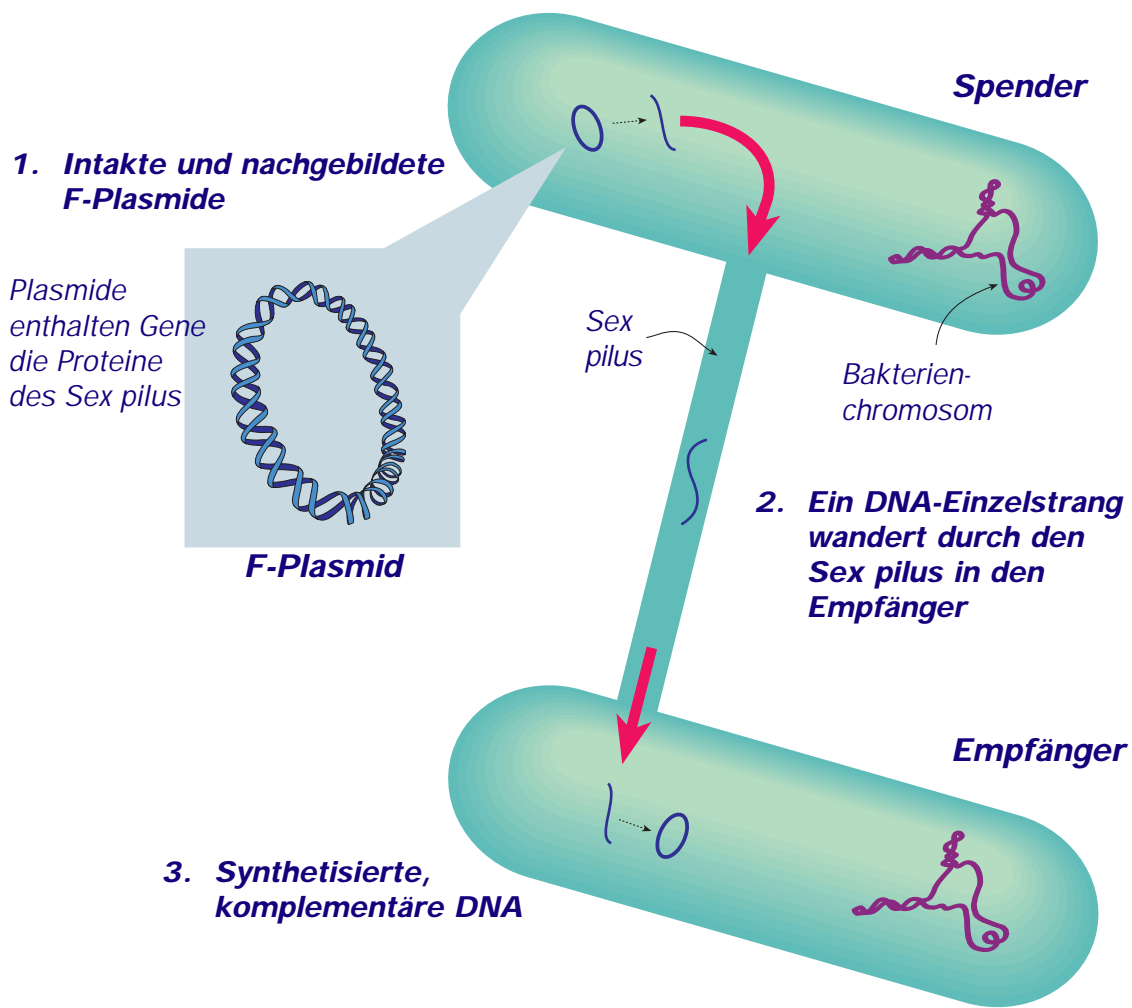
Transduktion ist das Wandern der DNA unter Mithilfe eines Bakteriophagen von einer Zelle zur anderen.

Konjugation ist der Transfer spezialisierter 'F-Plasmide' durch einen engen Verbindungsschlauch (Sex pilus), der zwei Bakterienzellen verbindet. (s. Abb. 1)

Alle diese Mechanismen (besonders die Transformation) werden von Gentechnikern zur Einschleusung ausgewählter Gene in Bakterien benutzt. Der folgende Versuch untersucht die Konjugation zwischen zwei natürlich auftretenden Bakterienstämmen.

Anmerkung: Der Versuch beruht auf natürlich vorkommenden Bakterien, Plasmiden und Vorgängen und ist deshalb keine 'Gentechnik'.

Abbildung 1: Konjugation und Transfer von F-Plasmiden zwischen



F-Plasmide

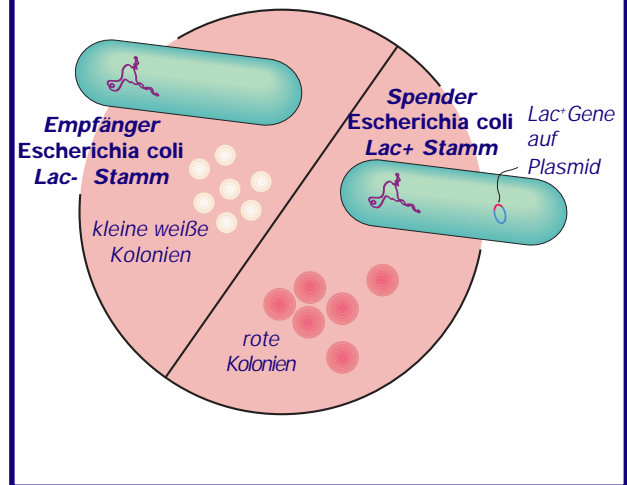
Die sogenannten 'F-Plasmide' (F steht für fruchtbar, fertil) enthalten Gene, die den Transfer einer Plasmidkopie zwischen einer Spender- und einer Empfängerzelle ermöglichen (anders ausgedrückt: bakterielle Konjugation).

F-Plasmide können ebenfalls andere Gene beinhalten. In dem hier beschriebenen Versuch enthält der Spender z.B. ein Plasmid namens F Lac. Es heißt so, weil es seinen bakteriellen Wirt befähigt, Lactose umzuwandeln. (Das Bakterium gehört deshalb zu einem Lac^+ Stamm. Im Gegensatz dazu ist der Empfängerstamm (ohne Plasmid) nicht in der Lage, Lactose umzuwandeln. (ein Lac^- Stamm).

Auf Nährböden mit MacConkey-Agar können diese verschiedenen Stämme am Erscheinungsbild unterschieden werden: der Spenderstamm bildet rote Kolonien, der Empfängerstamm weiße (s. Abb. 2).

Beim Mischen von Spender und Empfängerstamm werden F-Lac-Plasmide vom Spender zum Empfänger übertragen. Auf diese Weise erwirbt der Empfänger die Fähigkeit zur Umwandlung von Lactose. Ein genetischer 'Trick' befähigt den

Abbildung 2: Erscheinungsbild der Spender- und Empfängerstämme auf MacConkey-Agar



Spender, den Empfänger und transkonjugante Stämme zu erkennen. Es wird ein Empfängerstamm mit einem Chromosomen-Gen ausgewählt, das seine Unempfindlichkeit gegenüber dem Antibiotikum Streptomycin abgibt. Der Spenderstamm besitzt dieses Gen nicht, beinhaltet aber Streptomycin. Daher können der Empfängerstamm und Transkonjuganten an ihrer Fähigkeit identifiziert werden, auf einem streptomycinhaltigen Medium zu wachsen (Abb. 3).

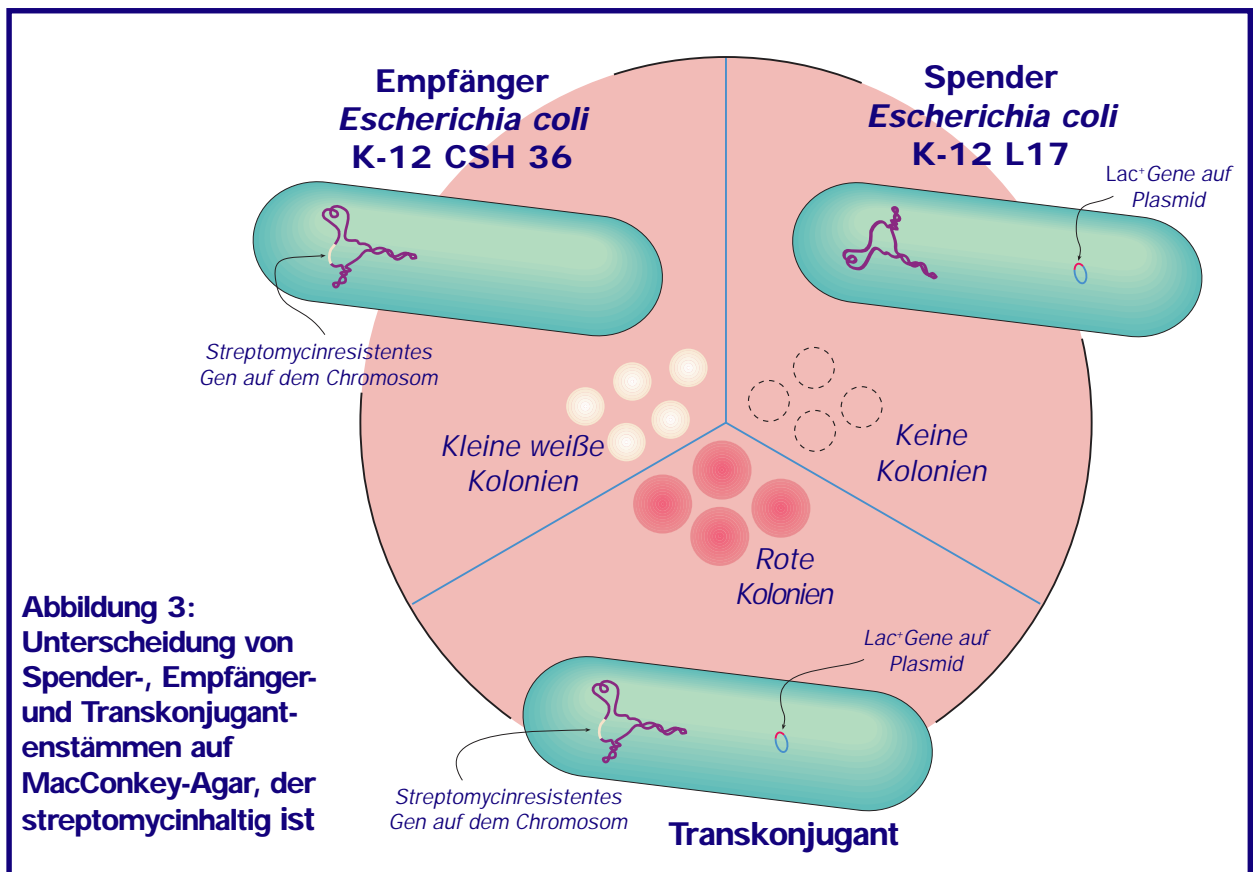


Abbildung 3: Unterscheidung von Spender-, Empfänger- und Transkonjugantstämmen auf MacConkey-Agar, der streptomycinhaltig ist

Ziel

- Motivierende Einführung in bakterielle Genetik
- Diskussion von Fragen, die sich aus dem Gentransfer (z.B. Ausbreitung der Antibiotikaresistenz) und der 'Risiko-einschätzung' in Bezug auf die Gentechnologie ergeben.

Vorbereitung

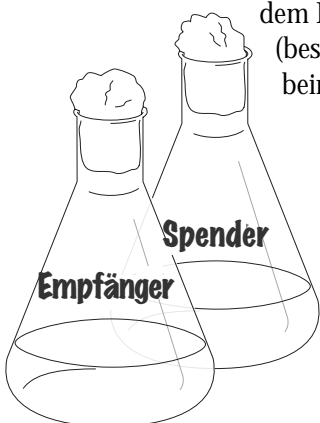
Folgende Materialien sollten vorbereitet und sterilisiert werden:

- 3 kleine (z.B. 100 ml) Erlenmeyerkolben mit jeweils 10 ml sterilem Nährbouillon
- steriler MacConkey-Agar unter Zusatz von Streptomycinsulfat (200 mg pro ml). Nach dem Abkühlen des Agars auf 50 °C (Handrückenstest!) sollte er auf sterile Petrischalen verteilt werden (ca. 15-20 ml pro Schale).
- Die benutzten Kulturen sind:
Spenderstamm: *Escherichia coli* K-12 CSH36 (DSM Nummer 6253)
Empfängerstamm: *Escherichia coli* K-12 L17 (DSM Nummer 6254)

Diese natürlich vorkommenden Stämme werden von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH in Braunschweig) bezogen. Beide Stämme werden gefriergetrocknet in Ampullen geliefert. Die Ampullen müssen auf richtige Weise geöffnet werden um sicherzustellen, daß ihre Inhalte nicht kontaminiert sind und der Benutzer keinen unnötigen Risiken ausgesetzt wird. (vgl. begleitende Anleitungen). Der Spenderstamm läßt sich schwer auf einer Schrägkultur halten; daher sollte eine frisch aufbereitete Kultur verwendet werden.

Übernachtulturen des Spenders sollten folgendermaßen vorbereitet werden:

1. Ein Kolben mit sterilem Nährbouillon wird mit dem Spenderstamm (beschriftet mit 'Spender'), ein anderer mit dem Empfängerstamm (beschriftet mit 'Empfänger') beimpft.
2. Beide Kolben werden über Nacht bei 37 °C bebrütet - vorzugsweise in einem Wasserbad mit Laborrührer.



“Paarung” beider Kulturen:

1. Mit einer sterilen Pipette werden 0,8 ml des Spenderstamms steril einem dritten Erlenmeyerkolben mit 10 ml des sterilen Nährbouillon beigefügt.
2. Mit einer sterilen Pipette werden 0,2 ml des Empfängerstamms steril demselben Erlenmeyerkolben beigefügt.
3. Der Kolben wird entsprechend beschriftet und bei 30 °C für 16- 24 Stunden bebrütet.
Anmerkung: Der Kolben muß nicht unbedingt aber darf auch während der Inkubation nur SEHR SANFT geschüttelt werden - heftige Bewegungen zerstören den Pilus, der die Konjuganten verbindet.

Sterile Wattestäbchen werden vorbereitet, indem etwas Baumwolle um die Spitze eines Zahnstochers gewickelt wird. Sie werden in einer McCartney-Flasche oder leicht in Alufolie gewickelt bei 121 °C für 15 Minuten autoklaviert.

Zeitbedarf

Vorbereitung der Medien:	60 Minuten
Erstinkubation:	48 Stunden
Beimpfen der Nährböden:	15 Minuten
Inkubation:	24 Stunden
Betrachten der Ergebnisse:	20 Minuten

Geräte und Materialien

Bedarf für jeden Schüler oder jede Arbeitsgruppe (Der Zugang zu einer normalen Arbeitsraumausstattung wird vorausgesetzt)

- Zugang zu einem Brutschrank, eingestellt auf 30 °C
- sterile Petrischalen mit 15-20 ml MacConkey-Agar und beigefügtem Streptomycin
- Folgende Kulturen, die sich zuvor in Nährbouillon gebildet haben:
 - Spenderstamm
 - Empfängerstamm
 - Gemisch der sich “paarenden” Spender- und Empfängerstämme
- 3 sterile, selbstangefertigte Wattestäbchen
- kleine Bechergläser mit Desinfektionslösung, z.B. 3% *Domestos* (Lever) für die Ablage benutzter Wattestäbchen
- Wasserfester Filzstift (zur Beschriftung der Petrischalen)

Durchführung

1. Eine Streptomycin-MacConkey-Agarplatte wird auf der Unterseite mit dem Filzstift in drei gleiche Abschnitte eingeteilt
2. In die Mitte eines jeden Abschnittes wird ein Kreis gezeichnet (ca. 10 mm Durchmesser) und beschriftet: S (Spender), E (Empfänger) und M (Mischung).
3. Jeder gekennzeichnete Bereich wird mit dem entsprechenden Bakterienstamm beimpft. Es muß unbedingt jeweils ein neues Wattestäbchen für jeden Stamm benutzt werden. Die Stäbchen werden in der Desinfektionslösung entsorgt.
4. Die Platten bleiben einige Minuten stehen, bis keine Flüssigkeit mehr auf dem Nährboden zu sehen ist. Die umgedrehten Platten werden bei 30 °C für ein bis zwei Tage bebrütet.

Erläuterungen und Hinweise

Verschiedene quantitative Abwandlungen dieses Versuchs sind durchführbar, z.B.:

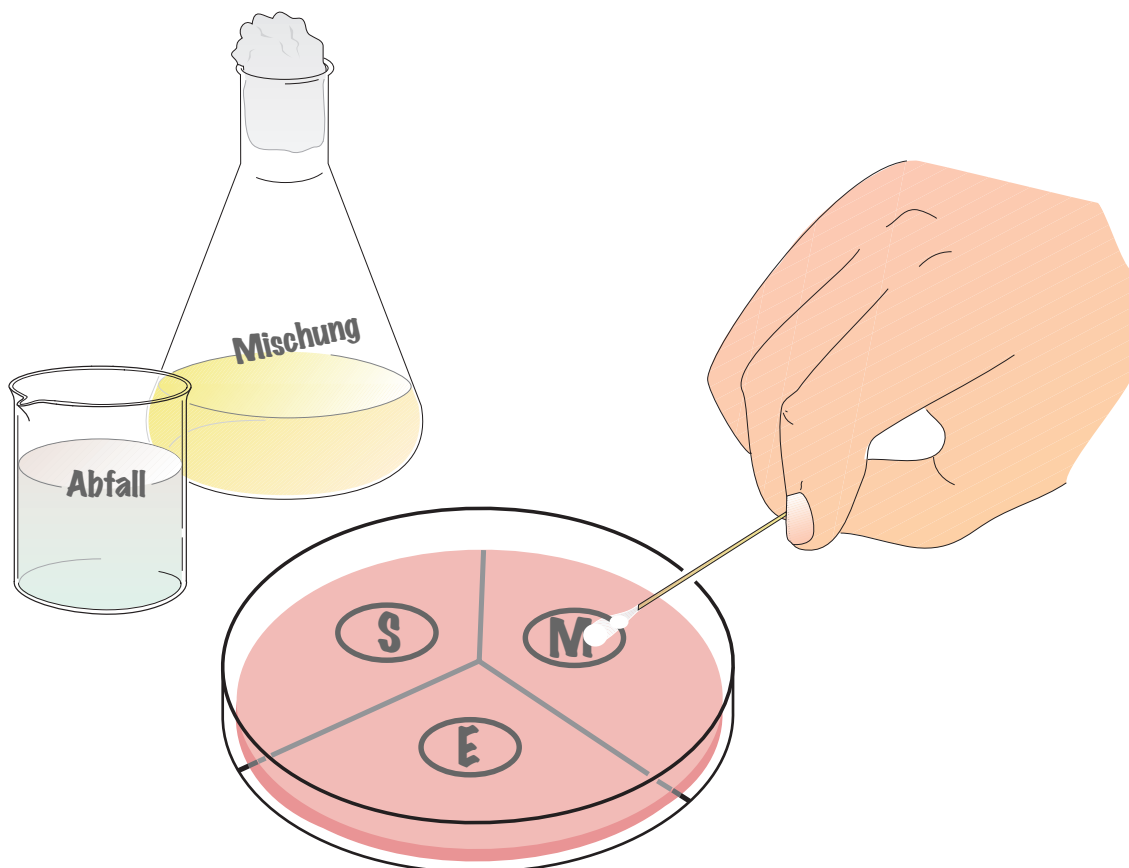
1. Durch Verdünnung der Spender- und Empfängerkulturen mit steriler Ringer- oder 0,001 mol $MgSO_4$ -Lösung kann das optimale Verhältnis von Spender und Empfänger bestimmt werden.
2. Es kann die optimale "Paarungszeit" für die Konjuganten ermittelt werden.

Sicherheitsvorkehrungen

Der Versuch muß in einem Arbeitsraum durchgeführt werden. Die grundlegenden Sicherheitsvorkehrungen (einschließlich steriler Arbeitstechniken) beider Versuchsdurchführung und Entsorgung der Kulturen sollten eingehalten werden.

Danksagung

Dieser Versuch ist die vereinfachte Version eines Versuchs von Professor Patricia Nevers der Universität Hamburg. Professor Nevers Protokoll basiert auf einem von E. Härle und R. Hausmann der Universität Freiburg.



Natürlicher Gentransfer durch *Agrobacterium tumefaciens*



Pflanzliche Tumore sind ein ernstzunehmendes Ärgernis in Landwirtschaft, Gartenbau und Forstwirtschaft. Häufig entwickeln sie sich nach winzigen Verletzungen, die durch die Bodenbearbeitung, Frostschäden oder beim Verpflanzen entstehen.

Um die Jahrhundertwende wurde beobachtet, daß bestimmte Tumore immer in Verbindung mit bakteriellen Infektionen standen. Die involvierten Bakterien wurden *Agrobacterium tumefaciens* (latein: *agar* = Boden, *tumor* = Anschwellung, *facere* = machen) genannt. Erst gegen Ende der 1970er Jahre wurde endlich Licht auf die komplexe gegenseitige Wechselbeziehung zwischen Pflanzen und *Agrobacterium* geworfen.

Die infektiösen Bakterien führen ein kleines Stück ihrer genetischen Information (ein Plasmid) in den Chromosomensatz der Pflanzenzelle ein und zwingen die infizierten Zellen damit, einem bakterienfreundlichen Programm zu folgen. Jede angegriffene Pflanzenzelle teilt sich daraufhin. Ein Tumor entwickelt sich, der als Lebensraum dient und ungewöhnliche Aminosäuren liefert, die von den unerwünschten bakteriellen Gästen benötigt werden.

Die Methoden von *Agrobacterium* zum Gentransfer wurden von Pflanzenzüchtern adaptiert und werden zum gewollten Gentransfer statt des zeitaufwendigen Kreuzens eingesetzt. Aus diesem Grund sind modifizierte Formen von *Agrobacterium* ein wichtiges Werkzeug in der Gentechnologie geworden.

Agrobacterium ist stäbchenförmig und hat etwa die Größe wie *E. coli* (1 - 3 mm lang). *Agrobacterium* speichert seine Giftigkeit im Boden, wo es aerobisch in den oberen Schichten lebt. Es ist ein Saphrophyt, obwohl es anorganischen Stickstoff nutzen kann. *Agrobacterium* greift nur Dikotyledonae an

und kann nur dann eindringen und die Pflanze infizieren, wenn Wunden vorhanden sind. Dieses ist so, weil das Bakterium unfähig ist, eine intakte pflanzliche Zellwand zu durchdringen. Der Saft beschädigter Zellen "lockt" Bakterien aus näherer Umgebung an und aktiviert den Gentransfer. Die Bakterien vermehren sich um das Wundgebiet herum und durchdringen den interzellulären Bereich, indem sie sich an der pflanzlichen Zellwand anheften. *Agrobacterium's* Plasmid wird übertragen und schließlich in das pflanzliche Chromosom integriert, von wo aus es die Produktion von Opinen steuert, die das *Agrobacterium* als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle nutzt.

Ziel

- Infektion von *Bryophyllum* = *Calanchoe* sp. (die schnell gezogen und vermehrt werden kann) durch die natürlich vorkommende Form von *Agrobacterium* unter verschiedenen Bedingungen. Innerhalb von 4 Wochen kann das Tumorwachstum beobachtet werden. Folgende Variationen der Arbeitsanleitung können untersucht werden:

A. Infektionsmodus

- Ein Kratzer wird angebracht und sofort mit *Agrobacterium* infiziert.
- Ein Kratzer wird angebracht und am folgenden Tag mit *Agrobacterium* infiziert.
- Ein Kratzer wird angebracht, mit *Agrobacterium* infiziert und mit einem feuchten Papiertuch abgedeckt.
- Ein Kratzer wird angebracht und NICHT mit dem Bakterium infiziert.
- *Agrobacterium* wird auf intakte Pflanzenteile aufgebracht.

B. Stellen der Infektion:

- Stiel
- Blattoberfläche
- Sproßspitze

Vorbereitung

1. Vermehrung der Wirtspflanze (kann von Schülern evtl. Zuhause durchgeführt werden).
2. Vorbereitung des Nährmediums und der *Agrobacterium* Kultur. Neue Kulturen müssen wenigstens 2 Wochen vor Gebrauch vorbereitet worden sein.

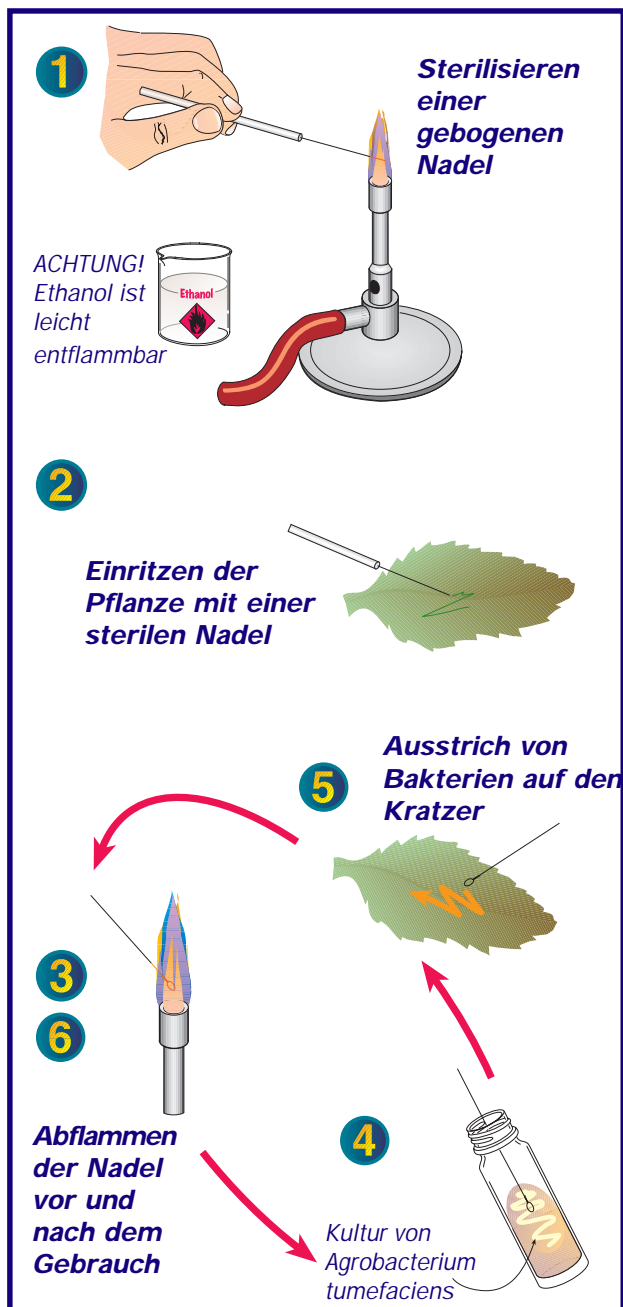
Zeitbedarf

Aufzucht der Wirtspflanzen /falls nötig): 4 Monate
 Vorbereitung *Agrobacterium* Kultur: 2 Wochen
 Infizieren mit *Agrobacterium*: 20 Minuten
 Beobachtung des Tumorwachstums: 3-4 Wochen

Geräte und Materialien

Bedarf für jeden Schüler oder jede Arbeitsgruppe (Der Zugang zu einer normalen Arbeitsraumausstattung wird vorausgesetzt)

- Steriles Wasser (in McCartney-Flasche)
- Impfnadel
- Impföse
- Binokulare
- Schere
- Aufklebeetiketten und wasserfester Filzstift
- Papiertaschentücher
- Klebeband
- Ethanol zum Abflammen der Instrumente
- *Agrobacterium tumefaciens* Kultur auf Nähragar
- *Kalanchoe* (Bryophyllum) Pflanzen, etwa 3-4 Monate alt



Durchführung

Die Versuchspflanzen werden auf verschiedene Weisen behandelt (vgl. Einleitung und nachfolgende Anleitung).

1. Jede Pflanze wird mit dem Datum und der erhaltenen Behandlung beschriftet. Falls nötig, werden die infizierten Teile gekennzeichnet, z.B. mit Aufklebern.
2. Die behandelten Pflanzen werden an einem gut beleuchteten Ort aufgestellt und feucht gehalten (nicht überwässern).
3. Während der folgenden 4-6 Wochen wird die Tumorbildung beobachtet und schriftlich festgehalten. Ein Stück des Tumorgewebes wird mittels Binokular untersucht und mit einem Stück normalen Blattgewebes verglichen.

Infektion der Pflanzen mit *Agrobacterium*:

Method 1 (Sofortige Infektion der Wunden)

1. Die Impfnadel wird in Alkohol getaucht und der Alkohol abgebrannt. Die Oberfläche der Pflanze wird einmal oder mehrere Male eingeritzt.
2. Die Wunde wird mit *Agrobacterium* direkt aus der Kultur infiziert. Dazu wird die Impföse abgeflammt und kurz abgekühlt. Von der weißlichen Bakterienkultur wird eine kleine Menge mit der Impföse entnommen und über der Wunde ausgestrichen. Die Öse wird erneut abgeflammt.

Method 2 (Infektion der Pflanze 24 Stunden nach ihrer Verletzung)

1. Verletzung der Pflanze (s. Methode 1)
2. Am darauffolgenden Tag wird die Wunde mit *Agrobacterium* infiziert.

Method 3 (Infektion der Wunden und anschließendes Abdecken mit feuchtem Papiertuch)

1. Verletzung und Infektion der Pflanze (s. Methode 1).
2. Aus einem Papiertuch werden Stücke herausgeschnitten und mit sterilem Leitungswasser befeuchtet. Diese Stücke werden auf die Verletzungen gelegt und mit Klebestreifen befestigt. Die Papierstücke sollten feucht gehalten werden.

Method 4 (keine Wundinfektion)

1. Die Pflanze wird an der Oberfläche (s. Methode 1) verletzt. Eine zweite Verletzung wird an ähnlicher Stelle angebracht und mit feuchtem Papier abgedeckt. Die Verletzungen werden nicht mit *Agrobacterium* behandelt.

Method 5 (Infektion ohne Verletzung)

1. Die Pflanze wird nicht verletzt.
2. Mit der Impföse wird steril *Agrobacterium* an einer oder mehreren Stellen der unbeschädigten Oberfläche ausgestrichen.

Sicherheitsvorkehrungen

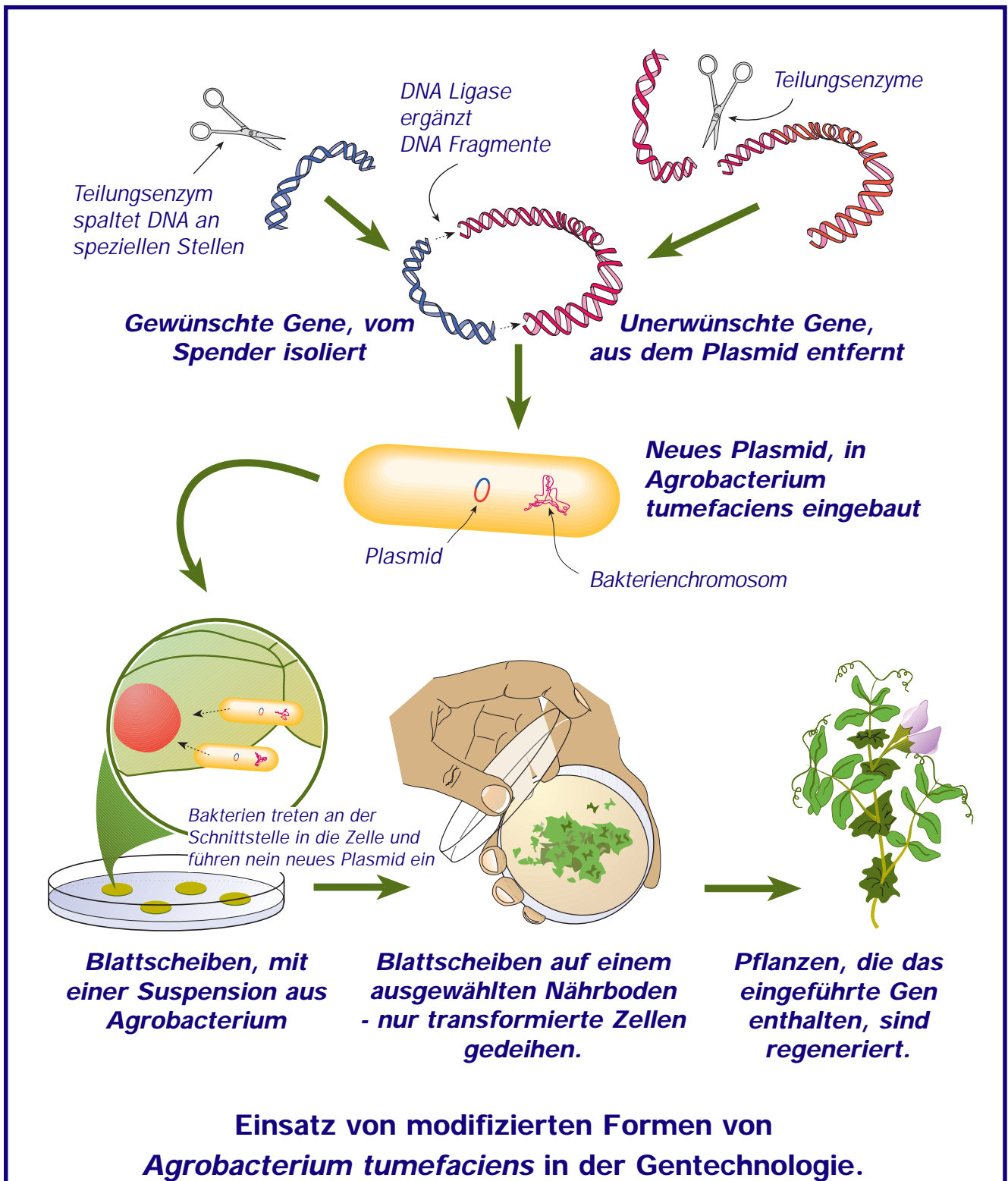
Die Versuche müssen in einem Arbeitsraum durchgeführt werden. Grundlegende mikrobiologische Sicherheitsvorkehrungen, einschließlich aseptischer Techniken sollten beim Umgang mit Mikroorganismen befolgt werden.

WICHTIG. *A. tumefaciens* ist ein ernstzunehmender Pflanzenschädling. Sein Einsatz wird in einigen Ländern und Landesteilen

streng überwacht. Bei der Durchführung dieser Versuche muß gewährleistet sein, daß sie mit den gültigen Sicherheitsbestimmungen übereinstimmen.

Danksagung

Uta Nellen am Zentrum für Schulbiologie und Umwelterziehung, Hamburg, hat diese Versuchsreihe erstellt. EIBE dankt für die Genehmigung, sie verwenden zu dürfen.





Anhang 1

Mikrobiologische Medien

European Initiative for Biotechnology Education

EINHEIT 1

Nähragarmedien und Nährbouillon sollten aus handelsüblichen Präparaten hergestellt werden, wobei den Herstelleranleitungen zu folgen ist. Vor Gebrauch sollten sie bei 121 °C für 15 Minuten autoklaviert werden. Vorbereitete Medien können in der Regel einige Monate bei ca. 4 °C gelagert werden.

Stärkeagarmedium

Nähragar	20,7	g
Lösliche Stärke	2,0	g

Mit destilliertem Wasser auf 1 l ergänzen und 15 Minuten bei 121 °C autoklavieren.

MacConkey-Agar mit Streptomycin

MacConkey-Agar	50,0	g
Destilliertes Wasser	990	ml

Nach dem Autoklavieren für 15 Minuten bei 121 °C auf 50 °C abkühlen, dann hinzufügen:

Streptomycinsulfatlösung 200 mg/10 ml

Diese Platten müssen frisch zubereitet werden. Sie können nicht länger als einige Tage im Kühlschrank bei ca. 4 °C gelagert werden.



Anhang 2

Mikrobiologische Techniken

EINHEIT 1

European Initiative for Biotechnology Education

Aerosole

Aerosole sind kleine, mit Mikroorganismen beladene Tröpfchen, die ungewollt in die Luft gelangen, für eine halbe Stunde oder länger Bestand haben und eingeatmet werden können. Sie sind vor allem die potentielle Ursache für Infektionen im Arbeitsraum. Aerosole aus verschütteten Kulturen können Haut- und Augeninfektionen verursachen. Das Herunterschlucken von Mikroorganismen ist schnell möglich, wenn Kulturen mit dem Mund pipettiert werden.

Grundsätzliche Laborarbeiten

Folgende Vorkehrungen sollten getroffen werden:

Es sollten keine Tätigkeiten von Hand zu Mund ausgeführt werden (z.B. Kauen von Bleistiften, Anlecken von Etiketten, Mundpipettieren). Essen, Trinken und Rauchen sind im Arbeitsraum nicht erlaubt.

Es wird empfohlen, daß alle Schüler Arbeitskittel tragen. Alle äußeren Schnitte und Abschürfungen sollten vor Beginn der praktischen Arbeit durch wasserfeste Wundverschlüsse (Pflaster) geschützt werden.

Vor und nach jeder praktischen Arbeit sollten die Arbeitsplätze mit einem Desinfektionsmittel abgewischt werden. Geeignete Desinfektionsmittel sind im Lehrmittelhandel erhältlich.

Lehrer und Schüler sollten nach der praktischen Arbeit ihre Hände waschen.

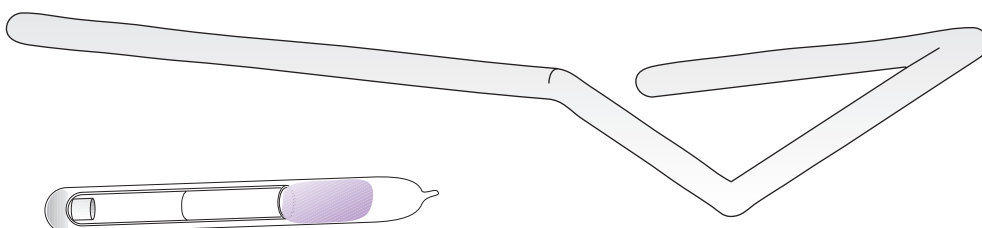
Verschüttungen und Brüche

Nach *Unfällen mit Kulturen* (Verschütten etc.) sollte folgendermaßen vorgegangen werden: Einweghandschuhe sollten getragen werden. Der zerbrochene Behälter und / oder die verschüttete Kultur sollten mit einem desinfektionsgetränkten Tuch abgedeckt werden. Nach nicht weniger als 10 Minuten müssen sie weggeräumt werden, indem Papiertücher oder eine Abfallschaufel eingesetzt werden. Das kontaminierte Material muß in einen Müllbehälter für infiziertes Material oder eine entsprechende Mülltüte gegeben werden. Beides muß vor der Entsorgung autoklaviert werden. Die Abfallschaufel sollte ebenfalls autoklaviert oder für 24 Stunden in ein Desinfektionsmittel gelegt werden.

Versehentliche Kontamination von Haut und Kleidung
Jeder, der Spritzer abbekommen hat, sollte sich so schnell es geht waschen. Stark kontaminierte Kleidung sollte vor der Wäsche mit Desinfektionsmittel behandelt werden. Kontaminierte Reinigungstücher sollten autoklaviert werden.

Ursprung der Mikroorganismen

Alle Mikroorganismen sollten als potentiell schädlich angesehen werden. Die in den Versuchen dieser Unit eingesetzten Organismen stellen bei sorgfältiger Behandlung kein Risiko dar. Sie sollten nur von anerkannten Vertreibern (z.B. von der DSMZ, s. Anhang 3) bezogen werden.



Sterile Arbeitstechniken

Die Ziele steriler Arbeitstechniken sind:

- a) Gewinnung und Aufrechterhaltung von Reinkulturen der Mikroorganismen
- b) Sicheres Arbeiten mit Mikroorganismen

Eine Reinkultur besteht aus einem einzigen Stamm einer Art von Mikroorganismen, während eine Mischkultur zwei oder mehr Stämme enthält.

Die Kontamination von Kulturen ist eine allgegenwärtige Gefahr, da Mikroorganismen überall vorkommen: auf der Haut, in der Luft und auf leblosen Objekten. Um eine Reinkultur rein zu halten, müssen sterile Nährmedien und sterile Arbeitsgeräte benutzt und Verunreiniger (Kontaminanten) ausgeschaltet werden. Dies sind die grundlegenden Prinzipien steriler Arbeitstechniken.

Es ist unrealistisch anzunehmen, daß jüngere Schüler sterile Arbeitstechniken einwandfrei ausführen. Dennoch setzen einige Versuche dieser Unit voraus, daß Schüler Kulturen steril transferieren können. In diesen Fällen sollten die folgende Verfahrensweisen übernommen werden.

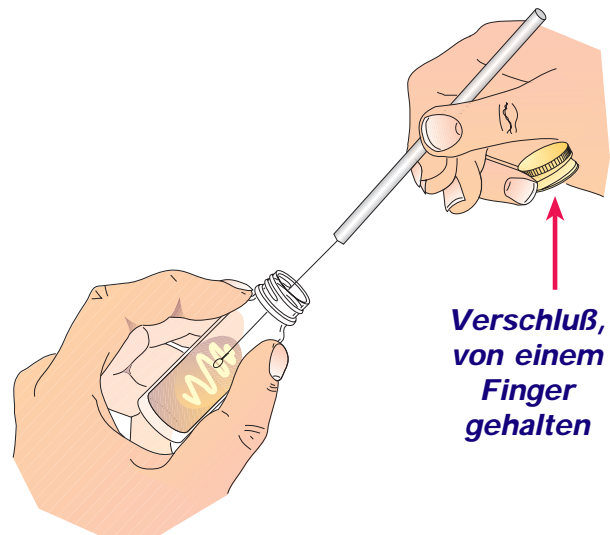
Nährmedien sollten vor dem Gebrauch durch Autoklavieren sterilisiert werden. Es müssen sterile Gefäße (Kolben, Petrischalen etc.) benutzt werden. Die Deckel müssen auf den Behältern belassen werden, um einer Kontamination entgegenzuwirken.

Die Arbeiten sollten in der Nähe eines Bunsenbrenners ausgeführt werden. Durch die Flamme steigen Luftströme auf und tragen Mikroorganismen, die das Nährmedium oder die Reinkulturen kontaminieren könnten, fort.

Beim Transfer von Kulturen sollten die Verschlüsse und Deckel nicht länger als unbedingt nötig geöffnet werden. Wird ein Flaschenverschluß geöffnet, sollte er bis zum Wiederverschließen in der Hand gehalten werden. Das schützt vor einer Kontamination des Arbeitsplatzes und der Kultur. Nach dem Entfernen des Verschlusses sollte der Hals der Kulturflasche für 1-2 Sekunden ausgeglüht werden. Dadurch werden dort vorhandene

Mikroorganismen abgetötet und Konvektionsströme erzeugt, die eine Kontamination durch zufällig in der Luft vorhandene Kulturen verhindern.

Mit Übung ist es möglich, die Flasche in der einen und ihren Metallverschluß in der anderen Hand zu halten, indem der kleine Finger den Verschluß gegen die Handfläche drückt. (Bei dieser Vorgehensweise ist es wichtig, daß der Flaschenverschluß leicht gelöst wurde, bevor die Impföse aufgenommen wird). Nötigenfalls können zwei Schüler zusammenarbeiten, um diesen Arbeitsschritt durchzuführen.



Impfösen sollten erhitzt werden, bis das ganze Metallstück glühend rot ist. Das muß vor und nach dem Transfer von Kulturen erfolgen. Die Ösen sollten langsam in die Flamme des Bunsenbrenners hineingeführt werden, um Spritzer und damit die Aerosolbildung zu vermeiden.

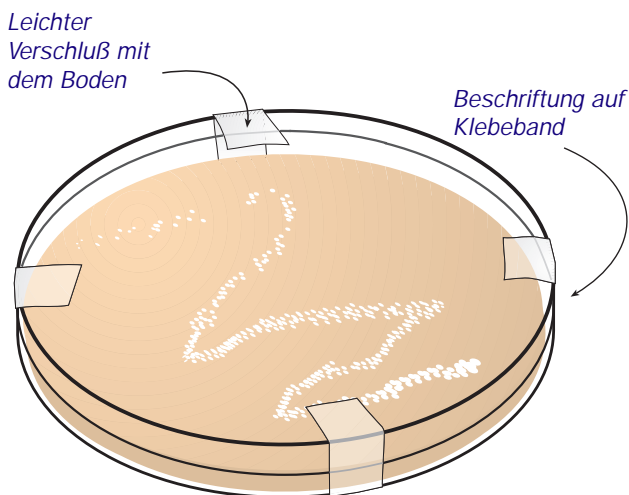
Bei Nichtgebrauch sollte der Bunsenbrenner auf gelber Flamme gehalten werden, so daß er nicht zu übersehen ist. Eine ca. 5 cm hohe blaue Flamme sollte zur Sterilisation von Ösen und zum Ausglühen von Flaschenhälsen benutzt werden.

Die Kontamination des Arbeitsplatzes sollte vermieden werden. Arbeitsgeräte sollten sofort nach Gebrauch sterilisiert und benutzt Pipetten unverzüglich in ein Gefäß mit Desinfektionslösung gegeben werden.

Bebrüten von Kulturen

Vor dem Bebrüten werden die Petrischalen auf der Unterseite beschriftet. Name, Datum und der Name der Kultur oder ihr Ursprung helfen, den Nährboden und seinen Inhalt zu identifizieren.

Wenn es angebracht ist (Bebrütung un - bekannter Kulturen), werden die Petrischalen wie unten gezeigt verschlossen:



Die Abdichtung stellt sicher, daß die Nährböden nicht versehentlich geöffnet oder unbefugt behandelt werden. *Anmerkung: Die Platten werden nicht vollständig abgedichtet, da sonst anaerobe Wachstumsbedingungen entstehen könnten.*

Bakterien

Bakterienkulturen in Petrischalen sollten normalerweise umgedreht bebrütet werden, so daß jede möglicherweise entstehende Kondensation in den Deckel und nicht in die Kultur gelangt (Sollte vor der Beimpfung eine starke Kondensation in der Petrischale entstanden sein, muß sie zunächst getrocknet werden).

Nach einer Inkubation von 2-3 Tagen bei 25-30 °C werden Bakterienkolonien sichtbar.

Pilze

Petrischalen mit Pilzen werden nicht umgedreht. Pilzkulturen sollten für ca. 7 Tage o.ä. bebrütet werden. Eine Raumtemperatur von ca. 21 °C ermöglicht ihr Wachstum, aber ein Brutschrank erlaubt eine genauere Kontrolle.

Entsorgung und Sterilisation

Es ist wichtig, alle im Versuch eingesetzten Arbeitsgeräte sorgfältig zu entsorgen, um die Kontamination von Arbeitsplätzen und Personen zu vermeiden. Alle Behältnisse, die zur Aufbewahrung und zum Wachstum von Kulturen benutzt wurden, müssen vor erneutem Gebrauch autoklaviert, dann in Desinfektionsmittel abgewaschen und ausgespült werden.

Zwei Tüten zum Autoklavieren sollten im Arbeitsraum vorhanden sein: eine für wiederverwendbare Glasgeräte, eine für Entsorgungsmaterial. Es sollte ein großer und ein kleiner Abfallbehälter für Pipetten und Objektträger an jedem Arbeitsplatz stehen. Zur Entsorgung zerbrochener Glasgeräte sollte ein Metalleimer zur Verfügung stehen. Entsorgbare Plastikpipetten, Objektträger und alle Flüssigkeiten aus Kulturen sollten in das kleine Gefäß mit Desinfektionslösung gegeben werden.

Kunststoffpipetten werden autoklaviert und entsorgt; Objektträger werden für 24 Stunden in Desinfektionslösung gelegt und vor Wiedergebrauch abgewaschen und ausgespült.

Glaspipetten sollten in das größere Gefäß gegeben werden. Der Pipettenkolben sollte erst herausgezogen werden, wenn sich die Spitze im Desinfektionsmittel befindet, da sich sonst Aerosole bilden können. Verschmutzte Pipetten sollten vor Wiedergebrauch autoklaviert, abgewaschen und ausgespült werden.

Kontaminierte Papiertücher, Kleidungsstücke und Petrischalen werden in die Tüte für Abfälle gegeben, die autoklaviert werden müssen.

Alle kontaminierten Glasgeräte (einschließlich benutzter Petrischalen) sollten in die Tüte für autoklavierbare Glasgeräte kommen.

Nichtkontaminierte Glasgeräte können normal ausgewaschen werden. Zerbrochene Glasgeräte sollten in einen extra dafür bereitgestellten Abfalleimer gegeben werden. Sollten die Glasgeräte kontaminiert sein, müssen sie vor der Entsorgung autoklaviert werden. Nichtkontaminierte zerbrochene Glasgeräte können ohne besondere Maßnahmen entsorgt werden.

Autoklavieren

Sterilisation bedeutet das vollständige Abtöten von Mikroorganismen und ihrer Sporen.

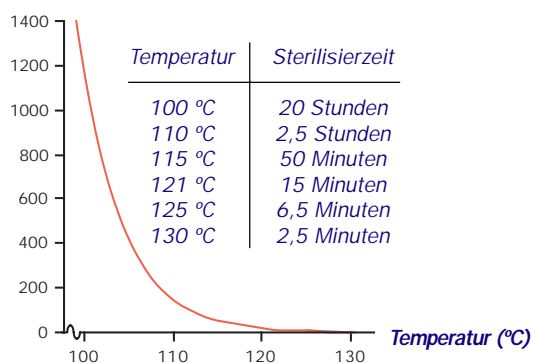
Alle Arbeitsmaterialien sollten vor Beginn der praktischen Arbeiten sterilisiert werden, um Kontaminationen zu vermeiden. Kulturen und kontaminiertes Material sollten ebenfalls vor der Entsorgung sterilisiert werden.

Autoklavieren ist die bevorzugte Methode zur Sterilisation von Kulturmedien, wässrigen Lösungen und eingesetzten Kulturen. In dieser Verfahrensweise wird Dampfdruck bei 121 °C benutzt (z.B. im Schnellkochtopf). Mikroorganismen werden leichter durch feuchte als durch trockene Hitze abgetötet, da der Dampf ihr Protein zerstört. Das Autoklavieren kann in einem Haushaltsdrucktopf oder in einem zu diesem Zweck gebauten Autoklaven durchgeführt werden. Drucktöpfe können in Schularbeitsräumen eingesetzt werden, aber ihr geringes Fassungsvermögen kann sich nachteilig beim Einsatz von Materialien im Klassensatz auswirken.

Prinzipien des Autoklavierens

Zwei Faktoren können die Effektivität ungünstig beeinflussen. Erstens muß die Luft aus dem Autoklaven entfernt werden. Dadurch wird sichergestellt, daß Dampf mit hoher Temperatur die zu sterilisierenden Oberflächen erreicht: bei noch vorhandener Luft verringert sich die Temperatur bei gleichem Dampfdruck. Die zu sterilisierende Geräte sollten nicht zu eng eingeräumt werden, damit die Luft verdunsten kann. Bei Flaschen und Gefäßen mit Schraubverschlüssen sollten die Deckel leicht gelöst sein, damit Luft entweichen kann und sich im Innenraum kein gefährlicher Druck aufbaut. Zweitens muß ausreichend Zeit angesetzt werden, damit die Hitze (durch Konduktion) in die Medien der Petrischalen oder anderer Behältnisse eindringen kann. Die verschiedenen Zeiten, für die die Medien oder Geräte bei unterschiedlichen Temperaturen zur Sterilisation zu autoklavieren sind, können der Abbildung unten entnommen werden.

Sterilisierzeit (Minuten)



Schon eine kleine Temperaturabweichung kann eine große Veränderung in der Sterilisationszeit bedeuten. Es ist ebenfalls wichtig, daß alle Geräte die Temperaturen für den angegebenen Zeitraum erreichen, z.B. Nährbouillon genau in der Mitte des Fermentationsgefäßes.

Demnach tragen drei Faktoren zur Dauer des Autoklavierprozesses bei:

- **Aufwärmphase:** die Zeit, die benötigt wird, damit die zentralen Bereiche des Autoklavierinhaltes die erforderliche Temperatur erreichen
- **Sterilisierphase:** die Mindestzeit, in der bei vorgegebener Temperatur alle lebenden Organismen abgetötet werden
- **Sicherheitsphase:** Sicherheitsspielraum; meist die Hälfte der Sterilisierzeit

Dampfdrucktöpfe arbeiten bei einer Temperatur von 121°C. Daraus ergibt sich für die Gesamtzeit der Sterilisation :
Aufwärmphase (z.B. 5 Minuten)
+ Sterilisierphase (z.B. 15 Minuten) + Sicherheitsphase (5 Minuten o.ä.) = 25 Minuten.

Gefäß	Volumen	Sterilisierzeit
Reagenzglas	20 ml	12-14 Minuten
Kolben	50 ml	12-14 Minuten
Kolben	200 ml	12-15 Minuten
Fermenter	1 Liter	20-25 Minuten

Karamelisation

Zweckgebunden gebaute Autoklaven arbeiten manchmal bei höheren Temperaturen als 121°C. Während einerseits die damit verbundene Zeitersparnis lohnend erscheint, sollte zum anderen bedacht werden, daß höhere Temperaturen sich schädlich auf bestimmte Medien auswirken. Glucoselösung z.B. karamelisiert bei hohen Temperaturen, indem sie Verbindungen bildet, die auf Mikroorganismen toxische Wirkung haben können. Im Falle der Glucose kann diese Reaktion durch die Einstellung des Mediums auf pH 4 vermieden werden. Nach der Sterilisation kann der pH-Wert wieder wie erforderlich eingestellt werden.

Maillard Reaktionen

Eine bräunende Reaktion (die Maillard Reaktion) kann durch die Interaktion der Stickstoffverbindungen und Kohlehydrate im Medium bei höheren Temperaturen einsetzen. Die hier entstehenden Verbindungen sind ebenfalls toxisch für einige Mikroorganismen, so daß es unter bestimmten Bedingungen nötig sein wird, die Kohlenhydrate und Rückstände des Mediums getrennt voneinander zu autoklavieren (Beispiel: bei der Präparation von Milchagar).

Gebrauch und sichere Handhabung des Autoklaven

Die Bedienungsanleitungen der Hersteller sollten bei Gebrauch eines Drucktopfes oder Autoklaven befolgt werden. Insbesondere ist darauf zu achten, daß eine ausreichende Wassermenge im Autoklaven enthalten ist, damit er während des Autoklavierens nicht trockenkocht. Ein Drucktopf erfordert 250 ml Wasser - größere Autoklaven brauchen eine vergleichsweise größere Menge. Der Gebrauch von destilliertem oder deionisiertem Wasser im Autoklaven verhindert den Aufbau von Kesselstein. Vor dem Wegräumen sollte der Autoklav sorgfältig getrocknet werden. Wird dies nicht gemacht, können sich Ablagerungen auf dem Autoklavboden bilden, die das Gerät ernsthaft schädigen und unter Druck das Auswölben nach außen hervorrufen können.

Bei Benutzung eines Autoklaven sollte Dampf für ungefähr eine Minute frei entweichen können, um die Luft aus dem Innenraum zu entfernen, bevor das Austrittsventil geschlossen

wird. Nach Abschluß des Autoklavierprozesses muß ausreichend Zeit für die Abkühlung des Inhalts und das Wiedererreichen eines normalen atmosphärischen Drucks gegeben werden. Die Gefäße oder Ventile sollten nicht unter Druck stehend geöffnet werden, da sonst Verbrühungen möglich sind. Das vorzeitige Öffnen des Deckels und die sich daraus ergebende Drucksenkung bringt jede Flüssigkeit im Inneren des Autoklaven zum Kochen. Die Nährböden oder -bouillon können aufschäumen und überlaufen.

Chemische Sterilisation

Viele verschiedene Chemikalien können für die Sterilisation eingesetzt werden. Die am häufigsten für Labortätigkeiten verwendeten Desinfektionsmittel sind reine phenol- und hypochloridhaltige Lösungen.

Reine phenolhaltige Lösungen wirken gegen Bakterien und Pilze, nicht aber gegen Sporen und einige Virenarten. Bis zu einem bestimmten Grad werden sie durch den Kontakt mit Holz, Gummi und Kunststoff inaktiviert. Die Benutzung in Arbeitsräumen schließt den Einsatz auf Abfallbehälter und die Desinfektion von Oberflächen ein.

Hypchlorithaltige Lösungen (z.B. Bleicher) sind für die Sterilisation von Petrischalen usw. nicht gut geeignet, da sie durch Protein und Kunststoffmaterialien inaktiviert werden können. Dennoch ist eine 5%ige *Domestos*- oder *Sagrotan*-Lösung für den Gebrauch in Abfallbehältern geeignet.



Anhang 3

Öffnen einer Ampulle

EINHEIT
1

European Initiative for Biotechnology Education

Bestellung der Kulturen bei:

DSMZ - Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und Zellkulturen
GmbH
Dr Barbara Lehnberg
Mascheroder Weg 1B
D-38124 Braunschweig

Öffnen einer Ampulle



ACHTUNG!
*Eine Schutzbrille muß
getragen werden, da beim
Öffnen einer Ampulle
Splitter streuen können.*

1. Die Ampullenspitze wird in der Flamme eines Bunsenbrenners erhitzt.
2. Mit einer Pipette werden höchstens zwei oder drei Tropfen kaltes Wasser auf die erhitzte Spitze aufgetropft. Das Glas müßte jetzt brechen.
3. Der gesprungene Ampullenteil wird fest, aber vorsichtig mit einer Pinzette abgeklopft und die Glassplitter in einer Petrischale aufgefangen. Die Glasstücke müssen entsprechend entsorgt werden.
4. Der innere Glaswollstopfen, der das innere Röhrchen in der Ampulle hält, wird vorsichtig mit einer Pinzette entfernt.
5. Das innere Röhrchen wird vorsichtig in eine sterile Petrischale gegeben und die Petrischale wieder verschlossen.

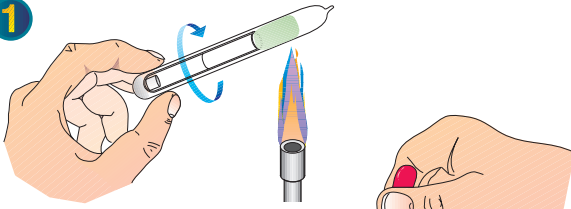
Aufbereitung einer gefriergetrockneten Kultur

1. Der Baumwollstopfen wird mit einer Pinzette entfernt und die Öffnung des inneren Röhrchens abgeflammt.
2. Dem Inhalt des inneren Röhrchens wird ca. 1 ml der sterilen Nährbouillon zugefügt.
3. Die Öffnung des inneren Röhrchens wird erneut abgeflammt und der Baumwollstopfen wieder aufgesetzt. Das Röhrchen bleibt 20 Minuten zur Aufbereitung der Kultur stehen.
4. Mit einer abgeflammt Öse wird der Inhalt des inneren Röhrchens gut durchgemischt und in ein steriles Reagenzglas mit ca. 5 ml Nährbouillon übertragen.
5. Die Kultur wird bei 30 °C über Nacht berüet.

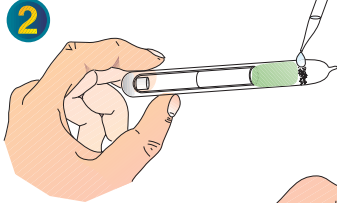
Am nächsten Tag ...

6. Ein Tropfen der vorbereiteten Lösung wird mit einer abgeflammt Impföse auf die Oberfläche einer Nähragarplatte ausgestrichen. Dieses dient der Überprüfung einer möglichen Kontamination der Platte nur eine der Kulturen sollte sich entwickelt haben.

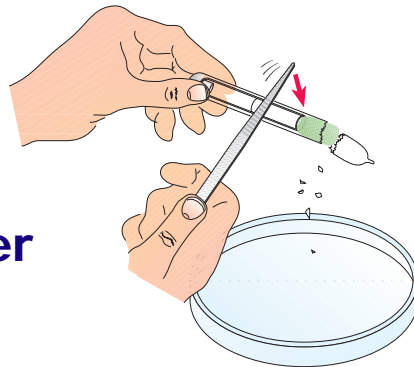
1



2

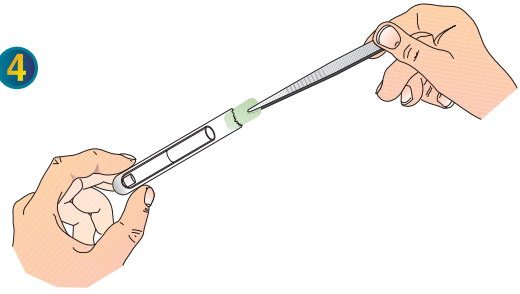


3



Öffnen einer Ampulle

4



5

