

Materialien zum Artikel

Experimente mit Knöllchenbakterien

W. Grahl, R. Dahmen, J. Jahnke, J. Bohrmann

Tabelle 1.5: MPN-Referenztable (nach de Man, 1983)

10^{-x}	$10^{-(x+1)}$	$10^{-(x+2)}$	MPN pro mL der Verdünnung 10^{-x}
3	3	3	> 110
3	3	2	110
3	3	1	46
3	3	0	24
3	2	2	21
3	2	1	15
3	2	0	9,3
3	1	1	7,5
3	1	0	4,3
3	0	1	3,8
3	0	0	2,3
2	2	0	2,1
2	1	1	2,0
2	1	0	1,5
2	0	1	1,4
2	0	0	0,9
1	2	0	1,1
1	1	0	0,74
1	0	1	0,72
1	0	0	0,36
0	1	0	0,30
0	0	0	< 0,30

Material 6: Gram-Färbung

Kurzinformation:

Die Gram-Färbung dient der Zuordnung von Bakterien zu zwei großen Gruppen. Die Unterscheidung in grampositive und gramnegative Bakterien beruht auf einem unterschiedlichen Zellwandaufbau. Dieser unterschiedliche Aufbau macht sich bei der Anfärbung mit Kristallviolett und Iod deutlich bemerkbar: Grampositive Bakterien erscheinen dunkel-violett bis blau, gramnegative rot.

Versuchsmaterialien:

- Wurzelknöllchen von Leguminosen
- Ethanol (96%)
- sterile Pinzette (abgeflämmt)
- Tiegelzange
- Lösung 1 (Kristallviolett)
- Lösung 3 (Safranin)
- Immersionsöl
- Mikroreaktionsgefäß („Eppi“)
- steriles Leitungswasser
- Bunsenbrenner
- Objektträger
- sterile Impföse (abgeflämmt)
- Stoppuhr
- Lösung 2 (Iod)
- steriles Wasser (abgekocht)
- Mikroskop
- Papiertaschentücher

Durchführung:

1. Man löst die Wurzel einer Leguminose vorsichtig aus der Erde oder dem Agar und spült sie mit Leitungswasser ab.
2. Ein Wurzelknöllchen wird abgeschnitten und mit Ethanol (96%) gewaschen (sterilisiert).
3. Das Wurzelknöllchen wird mit einer sterilen Pinzette in ein Eppi überführt und darin mit der Pinzette zerquetscht (Quetschpräparat).
4. Ein sehr sauberer Objektträger wird langsam mit einer Tiegelzange durch die Bunsenbrennerflamme gezogen und so vom Fettfilm befreit.
5. Auf dem abgekühlten Objektträger verteilt man mit einer sterilen Impföse einen dünnen Ausstrich der Bakterioide aus dem Quetschpräparat.
6. Das Präparat wird durch Hitze fixiert, indem der Objektträger dreimal mit der Probenseite nach oben rasch durch die Bunsenbrennerflamme gezogen wird.
7. Mit einigen Tropfen Lösung 1 (Kristallviolett) wird für 2-3 min gefärbt. Die Färbelösung darf auf keinen Fall antrocknen!
8. Lösung 1 wird mit wenig sterilem Wasser leicht abgespült und mit Lösung 2 (Iod) ca. 1 min lang überschichtet. Lösung 2 wird ebenfalls mit sterilem Wasser gründlich entfernt.

9. Für 5-15 sec (bei dickeren Ausstrichen bis zu 30 sec) wird das Präparat mit Ethanol (96%) entfärbt (bis sich keine Farbwolken mehr ablösen). Danach wird das Präparat mit Wasser abgespült und mit einem Papiertaschentuch vorsichtig trocken getupft.
10. Die Gegenfärbung mit einigen Tropfen Lösung 3 (Safranin) benötigt ca. 1 min.
11. Abschließend wird wieder mit Wasser abgespült und der Ausstrich an der Luft trocknen gelassen.
12. Die Färbung kann ohne Deckglas mikroskopiert werden, am besten mit Ölimmersion 100x.

Material 7: Berliner-Blau-Färbung

Kurzinformation:

In Wurzelknöllchen verarbeitet ein spezielles Enzym, die Nitrogenase, den atmosphärischen Stickstoff. Die Nitrogenase ist empfindlich gegenüber Sauerstoff und denaturiert in dessen Gegenwart. Im Wurzelknöllchen muss daher die Sauerstoffkonzentration einige Zehnerpotenzen niedriger sein als außerhalb. Der freie Sauerstoff wird von einem eisenhaltigen Hämoprotein, dem Leghämoglobin, gebunden und zu den Bakteroiden transportiert. Aufgrund einer Diffusionsbarriere kann Sauerstoff nur über den Apex, das der Wurzel abgewandte Ende des Knöllchens, eindringen. Hier findet sich eine besonders hohe Konzentration von Leghämoglobin, weshalb aktive Knöllchen in diesem Bereich rosa gefärbt sind. Noch deutlicher lassen sich das Leghämoglobin und auch die eisenhaltige Nitrogenase mit der Berliner-Blau-Reaktion sichtbar machen.

Versuchsmaterial:

- **Plastik**-Pinzette (Metall-Pinzetten enthalten Eisen, wodurch sich alles blau färben würde!)
- Gummihandschuhe und Kittel (falls vorhanden)
- Wurzelknöllchen von Leguminosen
- Skalpell oder Rasierklinge
- Holundermark
- Objektträger
- Blockschälchen oder Petrischalen
- Mikroskop
- Pasteurpipette
- Berliner-Blau-Färbelösung
- Deckgläser
- destilliertes Wasser

Durchführung:

1. Ein Knöllchen wird vorsichtig mit einem kleinen Rest der Wurzel abgeschnitten.
2. Das Knöllchen wird in eine Kerbe des Holundermarks eingeklemmt, so dass man Längsschnitte („Brötchenschnitte“) herstellen kann. Wenn die Knöllchen sehr groß sind, muss man eventuell vorher eine Höhlung in das Holundermark schneiden.
3. Mit dem Skalpell oder der Rasierklinge wird nun das Holundermark mitsamt dem Knöllchen in dünne Scheiben geschnitten.
4. Die Knöllchenschnitte werden direkt mit der Plastik-Pinzette in ein Blockschälchen oder in eine Petrischale mit destilliertem Wasser überführt.
5. Ein besonders dünner Schnitt, möglichst aus der Knöllchenmitte, wird ausgewählt und mit der Plastik-Pinzette in ein mit Färbelösung gefülltes Blockschälchen oder eine Petrischale gegeben.
6. Der Schnitt verbleibt etwa 10 min in der Färbelösung.

7. Mit der Plastik-Pinzette wird der Schnitt auf einen Objektträger überführt, ein Tropfen destilliertes Wasser wird hinzu gegeben und das Präparat mit einem Deckglas bedeckt.
8. Mit geringer Vergrößerung (z. B. Objektiv 10x) wird mikroskopiert.