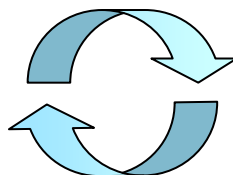


„Umweltschutztechnik“ - Mikrobiologisches Praktikum -

Betrieb

[Ausbildungsrahmenplan II.18](#)



Berufsschule

Rahmenlehrplan Lernfeld
[Wahlpfichtlernfeld 8](#)

Inhalt

„Umweltschutztechnik“ - Mikrobiologisches Praktikum -	1
1. Allgemeines zum Anfang	3
1.1 Laborregeln und Sicherheitsaspekte beim Umgang mit Mikroorganismen	3
1.2 Hinweise zum Anfertigen eines Versuchsprotokolls	4
2. Grundlagen mikroskopischen Arbeitens	5
2.1 Aufbau und Funktionsweise eines Lichtmikroskops	5
2.2 Arbeitsschritte zur Herstellung und Betrachtung eines mikroskopischen Präparates	6
2.3 Lichtmikroskopische Untersuchung von Pflanzenzellen	7
2.4 Lichtmikroskopische Untersuchung von Pflanzenzellen	8
2.5 Lichtmikroskopische Untersuchung von tierischen Zellen	9
2.6 Lichtmikroskopische Untersuchung von Mikroorganismen	10
2.7 Anfärben von mikroskopischen Präparaten	11
3. Lernen an Stationen	12
3.1 Checkliste zum Lernen an Stationen	12
3.2 Laufzettel zum Lernzirkel „FEINBAU DER ZELLE“	13
Station 1	14
Station 2	15
Station 3	16
Station 4	19
Station 5	21
Station 6	22
Station 7	24
Station 8	26
4. Arbeiten mit Hefen	27
4.1 Alkoholische Gärung	27
4.2 Verdünnungsreihe	29
4.3 Lichtmikroskopische Untersuchung von Hefezellen	30
4.4 Biomassebestimmung mittels Zählkammer	31
5. Nachweis von Mikroorganismen	33
5.1 Nachweis von Mikroorganismen in der Luft	33
5.2 Nachweis von Mikroorganismen auf der menschlichen Haut - vor und nach Desinfektionsmaßnahmen	34
5.3 Nachweis von Mikroorganismen in einer Wasserprobe und der Sterilisationswirkung durch Abkochen	35

5.4 Lebendzellzahlbestimmung - Auswertung	37
5.5 Morphologische und cytologische Untersuchung von Mikroorganismen	38
5.6 Einteilung der Mikroorganismen (Aussehen und Größe der Kolonien)	39
5.7 Sterilisation	40
5.8 Desinfektion	42
5.9 Desinfektion - Sterilisation	44
6. Biotechnologie	46
6.1 Der biotechnologische Produktionsprozess	46
6.2 Herstellung von Bioalkohol durch alkoholische Gärung	47

Mikrobiologisches Praktikum

1. Allgemeines zum Anfang

1.1 Laborregeln und Sicherheitsaspekte beim Umgang mit Mikroorganismen

Mikroorganismen existieren überall in unserer Umgebung. Um einerseits sich selbst beim Arbeiten mit Mikroorganismen vor einer Infektion zu schützen und andererseits eine Kontamination der Proben und eigenen Kulturen zu vermeiden, sind folgende Regeln beim Umgang mit Mikroorganismen zu beachten:

1. Der **Arbeitsplatz** muss **sauber (Desinfektionslösung!)** und **übersichtlich** aufgebaut sein. **Fenster und Türen** sind während der Untersuchungen zu **schließen**, unnötiges Herumgehen ist zu vermeiden, um das Aufwirbeln der Luftkeime zu reduzieren.
2. **Essen und Trinken** sind am Arbeitsplatz zu **unterlassen**. Im Labor sind stets **Kittel** - und bei Bedarf Schutzbrille und Schutzhandschule - zu **tragen**.
3. Am **Arbeitsplatz** befinden sich nur die für die Untersuchung unmittelbar benötigten **Geräte und Chemikalien**. Taschen, Kleidungsstücke u.ä. sind gesondert aufzubewahren.
4. Vor Arbeitsbeginn sind die **Hände** zu waschen und gegebenenfalls zu desinfizieren.
5. Behandeln Sie jede **Probe** so, als ob sich **pathogene Keime** darin befänden.
6. **Flüssigkeiten** werden nie mit dem Mund sondern stets **mit Pipettierhilfen** angesaugt.
7. **Agrarplatten** werden vor dem Beimpfen mit einem **wasserunlöslichen Stift** auf dem Petrischalenboden mit Name, Klasse, Datum (ggf. Art des Mediums, Art und Verdünnung der Probe) beschriftet.
8. **Gefäße**, die sterile Lösungen, Proben oder Reinkulturen enthalten sind stets so **kurz** wie möglich und immer in Brennernähe zu öffnen, um die Sedimentation von Luftkeimen zu vermeiden.
9. Wenn versehentlich **keimhaltiges Material auf die Arbeitsplatte gelangt, wird diese durch Übergießen** mit einer **Desinfektionslösung** gereinigt.
10. Geräte (Glas-Petrischalen etc.), die mit keimhaltigem Material kontaminiert sind, werden vor dem Reinigen abgekocht. Nach dem Spülen und zweifachem Klarspülen werden die Geräte in der Hitze sterilisiert. Kulturen in Kunststoffpetrischalen werden in speziellen Vernichtungsbeuteln autoklaviert und anschließend wie normaler Hausmüll entsorgt.
11. Die **Hände** werden nach Abschluss der Arbeiten - spätestens beim Verlassen des Labors - mit einer geeigneten Lösung **desinfiziert**.

*Unter dem Begriff **Sterilisation** werden die Maßnahmen zusammengefasst, die der Entfernung aller Mikroorganismen (Abtötung oder Abtrennung) dienen. Durch verschiedene Sterilisationsverfahren werden Gegenstände, Einrichtungen und Arbeitsstoffe von vermehrungsfähigen Mikroorganismen befreit (Entkeimung).*

*Unter dem Begriff **Desinfektion** werden alle Maßnahmen zusammengefasst, die einen Gegenstand in einen Zustand versetzen, in dem er nicht mehr infizieren kann. Die verschiedenen Desinfektionsverfahren bezwecken die Entfernung von krankheitserregenden Mikroorganismen (Abtötung oder Inaktivierung).*

Ich bestätige hiermit, dass ich die Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit Mikroorganismen verstanden habe und mich danach richten werde.

Name: _____

Datum: _____

Unterschrift

1.2 Hinweise zum Anfertigen eines Versuchsprotokolls

- Regeln zur Gestaltung des Protokolls

Name:
Datum:

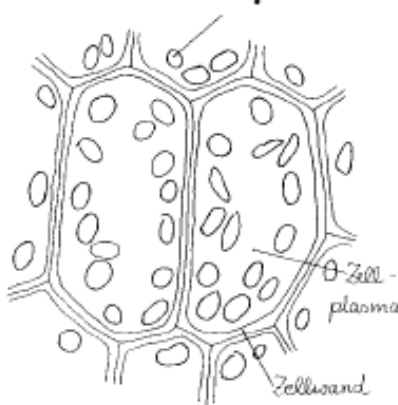
- Überschrift:
- (Thema angeben)
- Geräte:
- z.B. Pipette, Pinzette
- Chemikalien/Hilfsmittel:
- Was wird benötigt?
- Präparat:
- Was wird untersucht?
- Versuchsdurchführung:
- siehe Versuchsvorschrift
- Abweichungen angeben
- Versuchsbeobachtung:
- siehe Skizze

Unterschrift:
Datum:

Name:
Datum:

Objekt: Wasserpest (Elodea)
Objektteil: Blatt; Aufsicht
Färbemittel: ungefärbt
Vergrößerung: 250 x

?

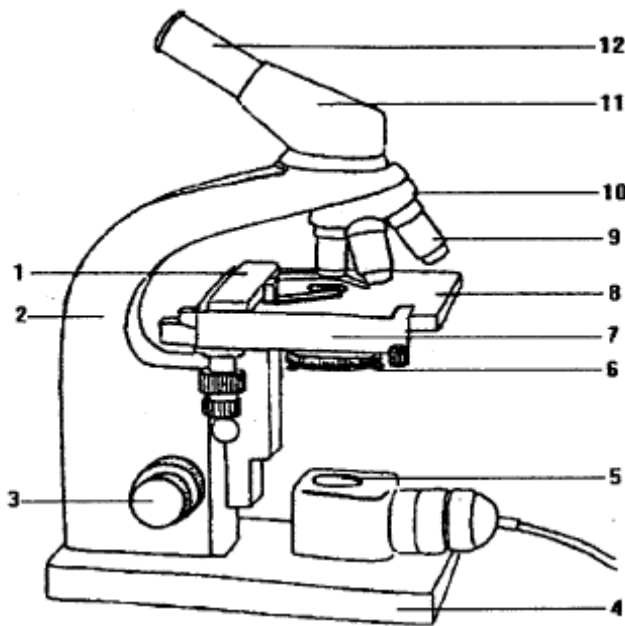


Unterschrift:
Datum:

- Regeln zum Anfertigen von mikroskopischen Zeichnungen
 1. Verwenden Sie stets unlinierte, weißes Zeichenpapier (Format DIN A 4)
 2. Zeichnen Sie mit einem spitzen, mittelharten Bleistift! Verwenden Sie keinen Kugelschreiber, Filzstift oder Buntstift!
 3. Zeichnen Sie von den Objekten nur einfache Umriss (keine Schattierungen!)
 4. Die Zeichnung sollte mindestens eine halbe DIN A 4-Seite groß sein!
 5. Jede Zeichnung muss beschriftet werden! Dabei sind stets anzugeben: das Untersuchungsobjekt; der Objektanteil; Färbemittel; die Vergrößerung des Mikroskops, bei der gezeichnet wurde.

2. Grundlagen mikroskopischen Arbeitens


2.1 Aufbau und Funktionsweise eines Lichtmikroskops



Aufgabe: Beschriften Sie entsprechend der Nummerierung die wichtigsten Bauteile eines Lichtmikroskops durch Ausfüllen der Tabelle. Geben Sie dabei die Funktion der einzelnen Bauteile an.


Nummer	Bauteil	Funktion
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		

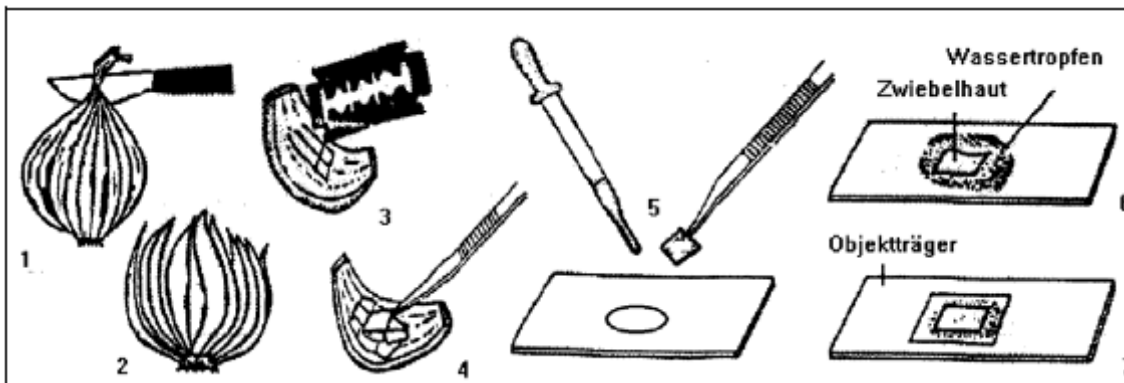
2.2 Arbeitsschritte zur Herstellung und Betrachtung eines mikroskopischen Präparates


 Aufgabe: Schneiden Sie die vorgegebenen Arbeitsschritte aus und bringen Sie sie in die richtige Reihenfolge. Ergänzen Sie gegebenenfalls wichtige Schritte. Sie können dazu die freien Kästchen benutzen.

Objekt auf den Wassertropfen legen	Mit der Blende und Dimmer Licht optimieren
Mikroskopisch säubern	Blende schließen
Objekt mittig platzieren	Mit dem Feintrieb scharf stellen
Mit dem Grobtrieb scharf stellen	Nächste Vergrößerung wählen
Mikroskop aufbauen	Beleuchtung etwas abdunkeln
Deckgläschen reinigen	Objekt präparieren
Objekt mittig platzieren	Kondensator nach oben drehen
Strom einschalten	Objektträger reinigen
Objekt skizzieren	Kleinste Vergrößerung wählen
Strom ausschalten	Deckgläschen auflegen
Objektträger auf den Mikroskopisch legen	Tropfen Wasser auf den Objektträger geben

2.3 Lichtmikroskopische Untersuchung von PflanzenzellenPräparat: Die rote Küchenzwiebel

-  Aufgabe: 1. Stellen Sie ein Lebendpräparat von der Zwiebelschuppenepidermis (Zwiebelschuppenhaut) der roten Küchenzwiebel her: Eine Zwiebel wird in Längsrichtung durchgeschnitten. Nach dem Entfernen der vertrockneten Außenschuppen wird eine saftige Innenschuppe abgebrochen. Mit dem Messer oder der Rasierklinge ist die Konkavfläche der Zwiebelschuppe mehrmals einzuschneiden, so dass die Oberhaut in kleine quadratische Stücke zergliedert wird (siehe Abb.). Mit der Pinzette wird ein Stückchen Oberhaut seitlich erfasst und von der Zwiebelschuppe abgehoben.



-  Aufgabe: 2. Verschaffen Sie sich mit dem mittleren Objektiv (10x) einen Überblick über die Zellen des Zwiebelhäutchens. Welche Form haben die Zwiebelzellen? Wie sind sie zueinander angeordnet? Fertigen Sie eine Skizze von 4 bis 5 aneinanderliegenden Zellen an. (Skizze beschriften!!!)
- Aufgabe: 3. Bringen Sie eine in Details gut erkennbare Zelle in die Gesichtsfeldmitte, und untersuchen Sie diese mit dem nächst größeren Objektiv (40x). Welche Einzelheiten sind zu erkennen? Fertigen Sie von dieser Zelle eine möglichst genaue Skizze an. (Skizze beschriften!!!)
- Aufgabe: 4. Geben Sie zum Präparat KNO_3 -Lösung ($c=1\text{mol/L}$). Die Lösung wird unter dem Deckglas hindurchgesaugt. Beobachten Sie mit dem Objektiv 40x. Welche Unterschiede ergeben sich? Fertigen Sie eine beschriftete Skizze an.
- Aufgabe: 5. Saugen Sie die KNO_3 -Lösung ab und geben Sie wieder Wasser zum Präparat. Welche Beobachtungen können Sie nun machen?

2.4 Lichtmikroskopische Untersuchung von Pflanzenzellen


Präparat: Blattzellen der Wasserpest/Laubmoos

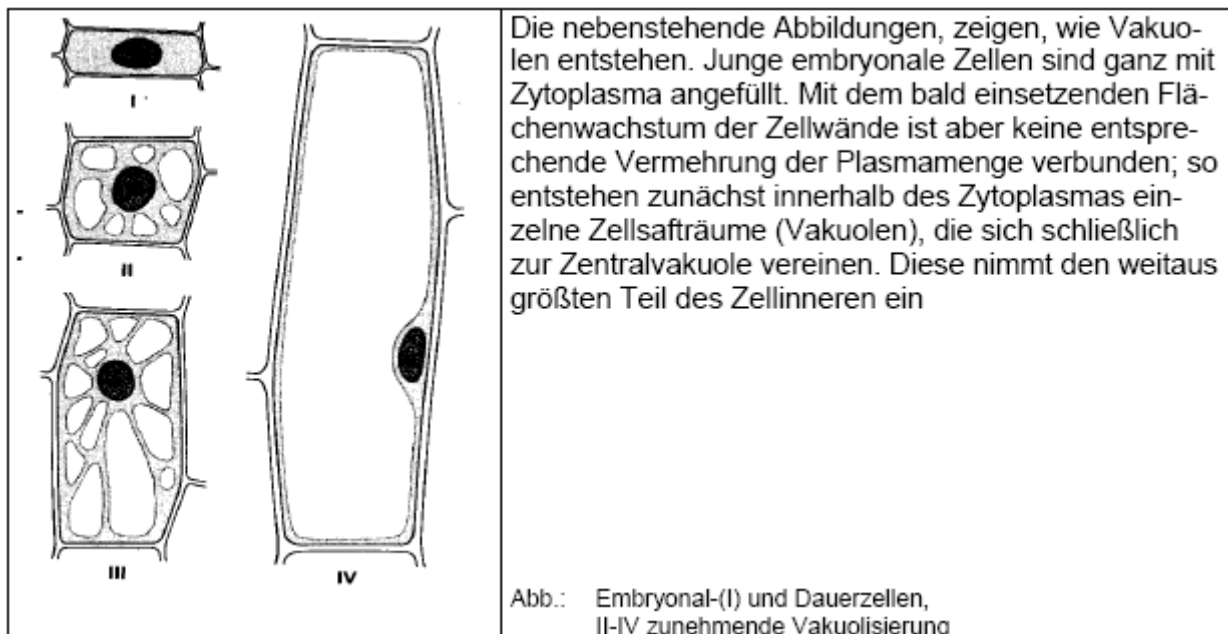
Blattzellen der Wasserpest

Es wird vom Spross der Wasserpest ein jüngeres Blättchen mit der Pinzette abgetrennt und in einen Wassertropfen auf einen Objektträger gelegt. Das Blättchen muss auch auf der Oberseite von Wasser bedeckt sein. Das Präparat wird mit einem Deckglas bedeckt, auf den Mikroskopisch gelegt und zunächst bei schwacher Vergrößerung betrachtet.

Zur weiteren Untersuchung wählt man eine Stelle des Blattes mit unverletzten Zellen aus. Das Zellmuster ist bei mittlerer Vergrößerung zu ermitteln. Anschließend wird mit der stärksten Vergrößerung beobachtet. Das Blatt der Wasserpest besteht aus drei Zellschichten. Deshalb ist es wichtig, die Einstellung exakt für nur eine dieser Zellschichten vorzunehmen.


Nach Beobachtung einer Zelle und deren Zeichnung ist wieder auf eine geringere Vergrößerung zurückzugehen, um Zellen zu suchen, in denen die Chloroplasten eine deutliche Bewegung zeigen. Eine solche Zelle ist bei stärkster Vergrößerung genau zu beobachten. Dabei ist auf Form und Geschwindigkeit der Bewegung zu achten.

-  Aufgabe: 1. Es ist eine Wasserpestzelle mit ihren Organellen zu zeichnen.
2. Benennen Sie die Organellen!
3. Die Bewegung der Chloroplasten ist in einer Skizze zu verdeutlichen. Geben Sie Gründe für diese Erscheinung an!



Blattzellen von Laubmoos


Von einem Laubmoospflänzchen wird mit der Pinzette ein Blatt abgezupft und in einen Wassertropfen auf den Objektträger gelegt. Die Lage des Blättchens kann mit Präpariernadeln korrigiert werden.

-  Aufgabe: 1. Zeichnen Sie einen Ausschnitt von Zellen aus der Mitte des Moosblattes und anschließend Zellen vom Blattrand
2. Vergleichen Sie Anzahl, Größe und Form der Chloroplasten mit denen in der Wasserpestzelle

2.5 Lichtmikroskopische Untersuchung von tierischen Zellen


Präparat: Mundschleimhaut

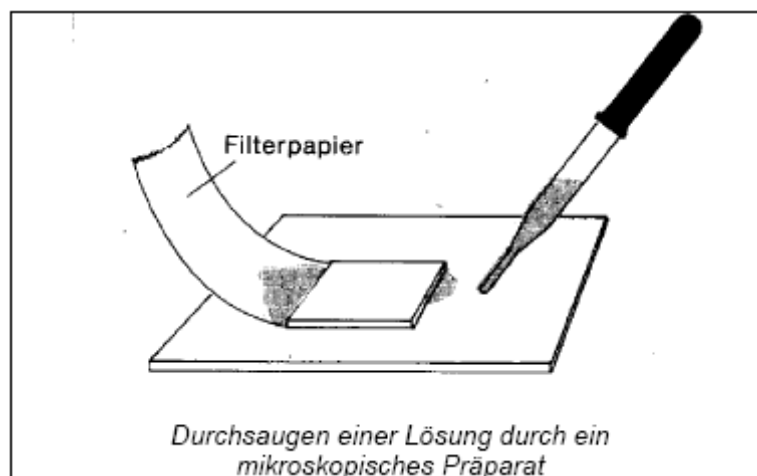
Zellen der Mundschleimhaut

-  Aufgabe: 1. Stellen Sie ein Lebendpräparat von den Zellen der Mundschleimhaut her. Man schabt mit einem Trinkstrohhalm, Teelöffel oder ähnlichem über die Schleimhaut des Mundinneren (Wangenbereich) und gibt das Abgeschabte in einen kleinen Tropfen Wasser auf dem Objektträger.
2. Betrachten Sie das Präparat mit dem Objektiv 40x.
3. Färben Sie das Präparat mit der ausstehenden Methyleneblau-Lösung ein, in dem Sie diese unter dem Deckglas hindurchsaugen.
4. Fertigen Sie von dem gefärbten Präparat eine beschriftete Skizze an. Welche Details sind besonders gut gefärbt?

Präparat: Schweineleber

Zellen der Leber

-  Aufgabe: 1. Stellen Sie ein Lebendpräparat von den Zellen der Schweineleber her. Ein Stück Leber wird frisch angeschnitten. An der Schnittfläche bleiben einige Zellen haften. Diese Zellen werden in einen Tropfen Wasser auf einen Objektträger überführt.
2. Betrachten Sie das Präparat mit dem Objektiv 40x.
3. Färben Sie das Präparat mit der ausstehenden Methyleneblau-Lösung ein, in dem Sie diese unter dem Deckglas hindurchsaugen.
4. Fertigen Sie von dem gefärbten Präparat eine beschriftete Skizze an. Welche Details sind besonders gut angefärbt?

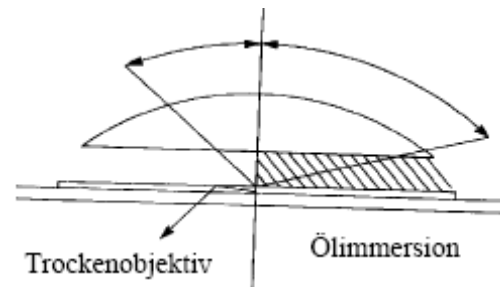


2.6 Lichtmikroskopische Untersuchung von Mikroorganismen

Arbeiten mit dem Ölimmersionsobjektiv


Durch Einwirkung der Bakterien *Lactobacillus bulgaricus* und *Streptococcus thermophilus* wird aus Trink- und Frischmilch das Sauermilchprodukt Joghurt gewonnen. Weisen Sie Milchsäurebakterien in der Milch nach! Richten Sie sich dabei nach folgender Anweisung!


Seitlich auftreffende Lichtstrahlen werden an der Grenzfläche zwischen einem optisch dichteren Material (Glas) und einem optisch dünneren (Luft) im gleichen Winkel reflektiert. Vor allem bei starken Vergrößerungen benötigt man beim Mikroskopieren viel Licht.



Viel Licht geht beim Übergang von Luft in Glas und von Glas in Luft verloren. Daher bringt man zwischen Objektträger und Objekt einen Tropfen Öl. Dieses Immersionsöl hat die gleiche optische Dichte wie Glas. Auf diese Weise kann beim Übergang vom Objektträger zum Objekt kein Licht verloren gehen.

Milchsäurebakterien im Joghurt/Kefir

 **Aufgabe:** Stellen Sie entsprechend der Vorschrift ein Dünnschichtpräparat her und fertigen Sie ein Versuchsprotokoll an.

 **Material:**

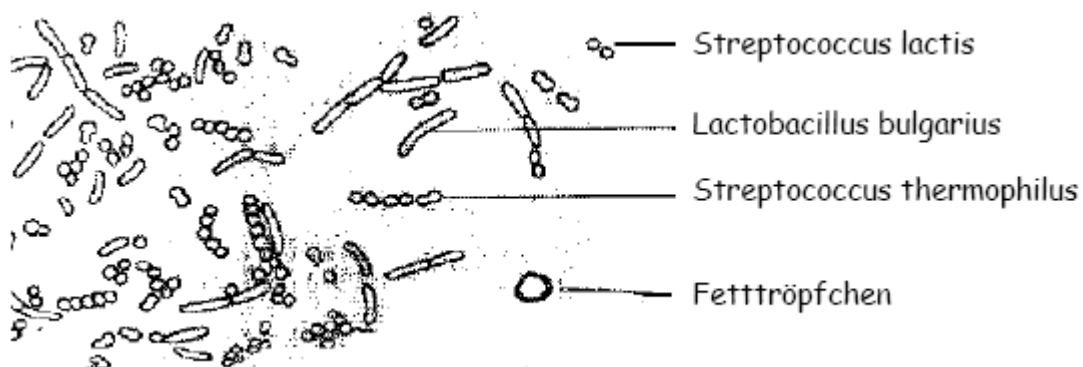
- Joghurt (kein Frucht-Joghurt)	- Objektträger
- Methyleneblau	- Deckgläser
- Immersionsöl	- Glasstab

Durchführung:


- Streichen Sie auf einen Objektträger etwas Joghurt dünn aus.
- Lassen Sie den Ausstrich antrocknen.
- Färben Sie diesen mindestens 3 Minuten mit Methyleneblaulösung und spülen Sie anschließend den überschüssigen Farbstoff mit Wasser ab.
- Beobachten Sie das Präparat nach Auflegen eines Deckglases wenn möglich mit dem Objektiv 100x (Ölimmersionsobjektiv) und fertigen Sie eine beschriftete Skizze an.

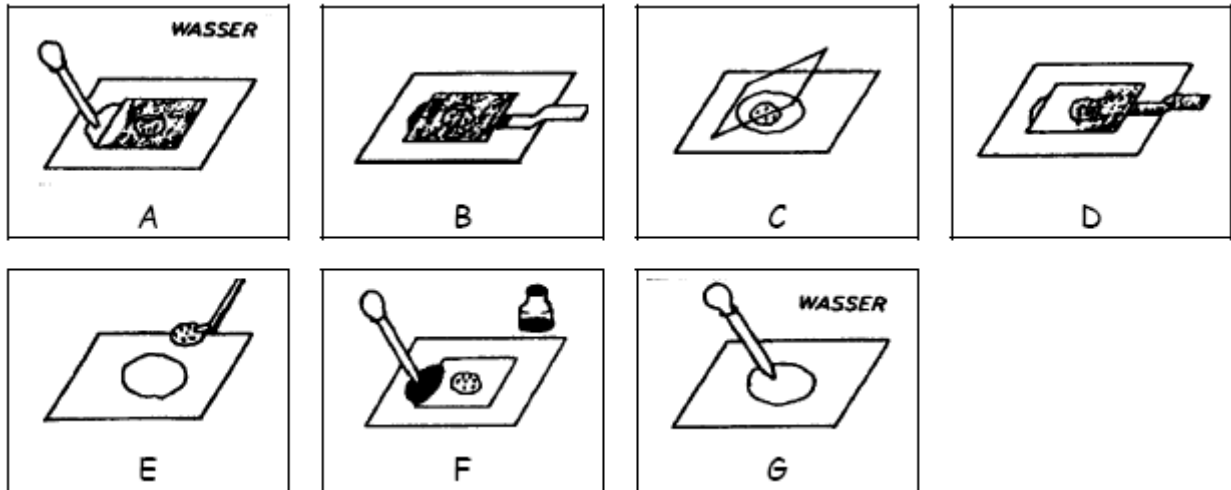
Auswertung:

Zeichnen Sie die im Joghurt vorkommenden Bakterienformen und prägen Sie sich besonders die für den Joghurt typischen Milchsäurebakterien ein.



2.7 Anfärben von mikroskopischen Präparaten

 Aufgabe: 1. Ordnen Sie die Bilder, die das Anfärben von Präparaten darstellen, in der richtigen Reihenfolge.
2. Formulieren Sie anhand der Bilderabfolge eine Arbeitsanweisung zum Anfärben von mikroskopischen Präparaten.



Arbeitsschritt	Bild	Arbeitsanweisung
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		











3. Lernen an Stationen

3.1 Checkliste zum Lernen an Stationen

Beachten Sie folgende Punkte!

- Suchen Sie sich einen Partner (Dreiergruppen gibt es nur als Ausnahme).
- Suchen Sie sich eine freie Station aus. Die Stationen können (in der Regel) in beliebiger Reihenfolge bearbeitet werden. An bestimmten Stationen können auch zwei Gruppen gleichzeitig arbeiten
- Lesen Sie gemeinsam die Aufgabenstellung und bearbeiten Sie diese dann sorgfältig.
- Denken Sie an die Sicherheitsbestimmungen wenn Versuche durchgeführt werden sollen.
- Informieren Sie sich, bevor Sie einen Versuch beginnen, über die Gefährlichkeit der verwendeten Chemikalien (Warnsymbole) und andere mögliche Gefahren (z.B. Herausspritzen beim Erhitzen).
- Halten Sie die Sicherheitsmaßnahmen ein! Tragen Sie bei Experimenten immer eine Schutzbrille!
- Achten Sie auf eine sachgerechte Entsorgung!
- Bearbeiten Sie alle Aufgaben gründlich und sorgfältig.
- Laminierte oder in Klarsichthüllen vorhandene Anleitungen oder Materialien müssen an der Station bleiben.
- Wenn Sie nicht weiterkommen, diskutieren Sie zuerst mit Ihrem Partner, Ihrer Partnerin.
- Führen Sie Gespräche und Diskussionen so, dass die Mitschüler nicht gestört werden.
- Gehen Sie mit dem Material sorgfältig um. Legen Sie alles wieder an seinen Platz zurück. Falls etwas fehlt, informieren Sie den Lehrer bzw. die Lehrerin.
- Wenn die Station vollständig bearbeitet ist, gehen Sie zur nächsten Station.
- Haken Sie auf Ihrem Laufzettel die bearbeiteten Stationen nach Beendigung ab.
- Zu jeder Station muss mindestens ein bearbeitetes Arbeitsblatt, ein Protokoll oder ein anderes Ergebnis in die Arbeitsmappe abgeheftet werden.
- Geben Sie zum Schluss die Aufgaben oder Protokolle aller bearbeiteten Stationen gesammelt in der Projektmappe ab.

3.2 Laufzettel zum Lernzirkel „FEINBAU DER ZELLE“


Station	Medien	Sozialform	Zeitaufwand	Ort	erledigt
1. Gesichtsfeldruchmesser-Größe von Zellen	Experiment Arbeitsblatt		15 min		
2. Räumliches Sehen beim Mikroskopieren - Aspekte der Dreidimensionalität	Experiment Arbeitsblatt		15 min		
3. Zellwand-Zellmembran	Arbeitsblatt		30 min		
4. Dictyosomen-Lysosomen	Infoblatt Memory-Spiel		30 min		
5. Chloroplasten und Mitochondrien	Arbeitsblatt Modelle		30 min		
6. Steuerzentrum der Zelle - Der Zellkern	Arbeitsblatt Hörspiel		30 min		
7. Ribosomen - Endoplasmatisches Retikulum-	Arbeitsblatt		30 min		
8. Die Zelle eine Fabrik? Bau einer pflanzlichen Zelle und Funktion ihrer Zellorganellen	Arbeitsblatt		30 min		
9. Alles nur ein Spiel? Das Zellorganellenspiel	Würfelspiel		15-30 min		
10. Elektra - Aufbau einer Zelle	Elektronisches Spiel		15 min		


Achtung!

Station 1-8 sind Pflichtstationen
 Station 1-7 Bearbeitung in beliebiger Reihenfolge
 Station 8-10 Bearbeitung zum Schluss
 Station 9+10 sind Wahlstationen

Station 1

**Bestimmungen des Gesichtsfelddurchmessers
Messen von Größen mit dem Mikroskop**

 Aufgabe: 1. Führen Sie folgenden Versuch durch.


-  Geräte und Materialien: - transparentes Millimeterpapier
- Lichtmikroskop

Durchführung:

- Legen Sie zunächst einen Streifen transparentes Millimeterpapier mittig über die Lichtöffnung auf dem Objektisch.
- Mit Hilfe von Grob- und Feintrieb wird bei kleinster Vergrößerung eine scharfe Abbildung eingestellt.
- Messen Sie den Durchmesser des kreisrunden Blickfeldes (=Gesichtsfeld).
- Halten Sie den Wert in der unten aufgeführten Tabelle fest.
- Verfahren Sie ebenso bei den nächst höheren Vergrößerungen.

Versuchsbeobachtung/Versuchsauswertung

Objektiv	Okular	Gesamtvergrößerung	Gesichtsfelddurchmesser
4	10		
10	10		
40	10		
100	10		

 Aufgabe: 2. Füllen Sie folgenden Lückentext aus.

Den.....beleuchteten Lichtfleck, den man....., wenn
Man als..... schaut, bezeichnet man als.....
Indem man den..... des Gesichtsfeldes bestimmt, gewinnt man
eine Vorstellung von der tatsächlichen Größe der Objekte, die man gerade bei den
unterschiedlichen mikroskopiert.

Kleine Vergrößerung → Bildausschnitt


.....Vergrößerung → kleiner.....


 Aufgabe : 3. Untersuchen Sie eines Ihrer Kopfhaare und ermitteln Sie die Dicke.

.....

Station 2

Räumliches Sehen beim Mikroskopieren - Aspekte der Dreidimensionalität

 **Aufgabe:** 1. Führen Sie folgenden Versuch durch.
2. Halten Sie Ihre Beobachtungen in der unten aufgeführten Tabelle fest.
3. Füllen Sie den Lückentext aus.

-  **Geräte und Materialien:**
- Legosteine verschiedener Farben und Formen
 - rechteckige Glasschale (pneumatische Wanne)
 - durchsichtige Plastiktüte
 - Tageslichtschreiber

Durchführung:

- Die Glasschale wird auf den Tageslichtschreiber gestellt.
- Die einzelnen Gegenstände werden mit dem Tageslichtschreiber vergrößert (s.Abb.)
- Den durchsichtigen Plastikbeutel mit Wasser füllen und gut verschließen.
- Ebenfalls mit dem Tageslichtschreiber vergrößern.




Versuchsbeobachtung/Versuchsauswertung:

In der Wirklichkeit	Nach der Vergrößerung mit dem Tageslichtschreiber
Roter Legostein (Quader)	
Grüner Legostein	
Kugel	
Röhrchen	
Durchsichtige mit Wasser gefüllte Tüte	

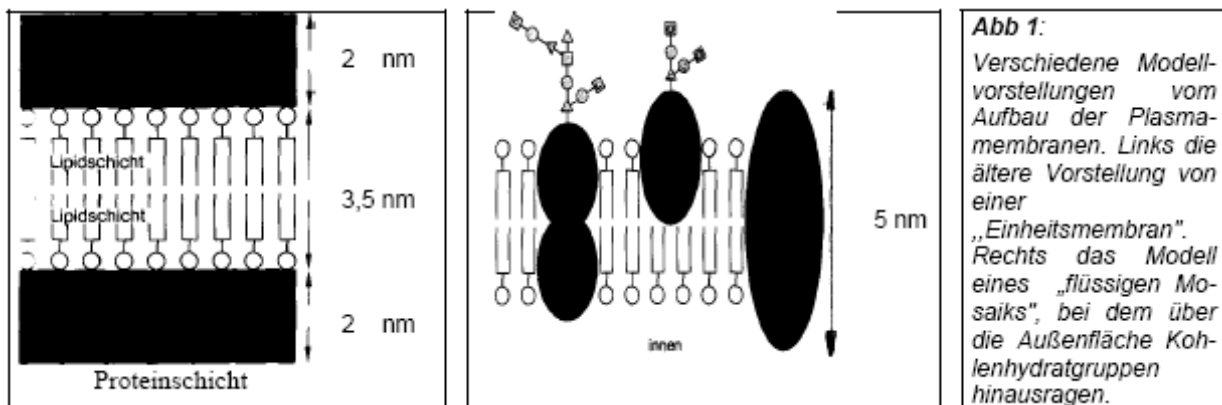
- Körper (dreidimensionale Strukturen) werden grundsätzlich nur als.....
..... dimensionale Strukturen) abgebildet.
- Farbliche Unterschiede sind (oft) sichtbar.
- Nur Strukturen die sich..... der Bildebene befinden werden scharf abgebildet, damit ist immer nur ein Teil.....

Station 3

Zellwand/Zellmembran

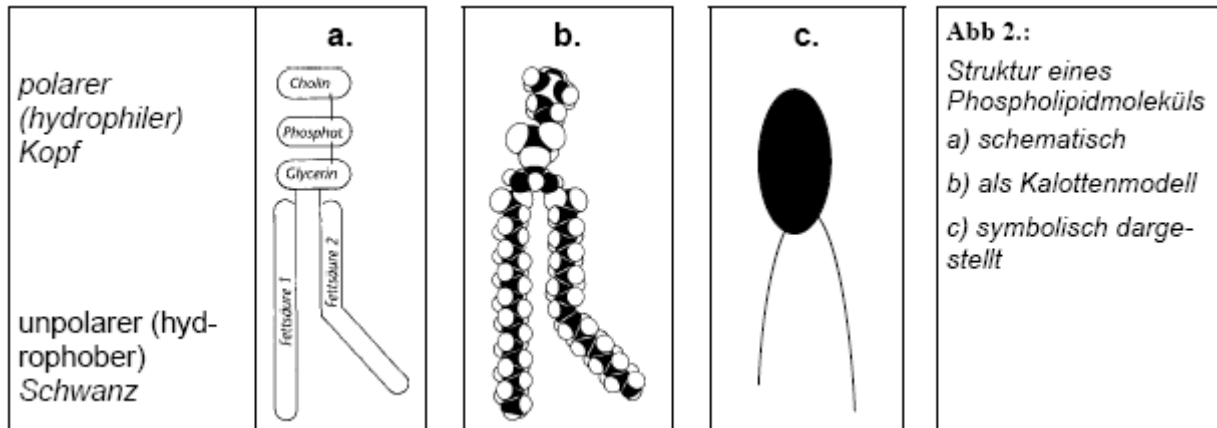
-  Aufgabe: 1. Übertragen Sie die Skizzen vom Aufbau einer Membran (Abb. 1) maßstabsgetreu in Ihre Projektmappe (Vorschlag 1nm=1cm). Beschriften Sie mit Hilfe des gegebenen Textes die einzelnen Bauelemente.
2. Welche Aufgaben haben Membranen in der Zelle? Geben Sie diese mit Hilfe des gegebenen Textes unter der von Ihnen angefertigten Skizze vom Aufbau einer Membran an.
3. Machen Sie, in Form eines Zuordnungsschemas, Angaben zum Aufbau und zu den Aufgaben einer Zellwand.

In vielen elektronenmikroskopischen Bildern von Zellen fallen dunkle Linien auf. Dies sind angeschnittene, 4-10 nm dicke Membranen. Bis zu 60% des Cytoplasmas kann aus solchen Membranen bestehen. Die Plasmamembran umschließt das Cytoplasma und grenzt es gegen seine Umwelt ab. Entsprechende Membranen umhüllen auch die größeren Organellen im Zellinneren und gliedern das Grundplasma in zahlreiche einzelne Reaktionsräume (Kompartimente). Bei hoher Auflösung erkennt man die Membranen als feine, dunkle Doppellinien. Vor allem Phospholipide und Proteine sind an ihrem Aufbau beteiligt.



Lipidmoleküle haben eine gemeinsame Eigenschaft, die sich auf ihr Verhalten gegenüber Wasser bezieht. Ein Ende des Moleküls ist in Wasser löslich; es wird als hydrophil (=wasserliebend) bezeichnet. Das andere Ende besteht aus Kohlenwasserstoffketten, die nicht in Wasser, aber in Fett löslich sind; sie werden als hydrophob (=wassermeidend) bezeichnet. Die meisten Membranlipide gehören zur Klasse der Phospholipide. Sie leiten sich chemisch von den Fetten (Triglyceride) ab. Bei Phospholipiden hängen an einem Molekül Glycerin aber nur zwei Fettsäureketten, die den hydrophoben „Schwanz“ des Moleküls bilden, während der hydrophile „Kopf“ von einer Phosphatgruppe und einem weiteren wasserlöslichen Molekülteil gebildet wird. Im abgebildeten Beispiel ist dieses weitere Molekül ein Cholinrest (andere Phospholipide enthalten anstelle von Cholin entweder Ethanoiamin, Serin oder Inosit).

Phospholipide variieren aber nicht nur in ihrer Kopfgruppe, sondern auch im Schwanzteil. Die beiden angehängten Fettsäureketten können unterschiedlich lang sein (gewöhnlich 14 bis 24 Kohlenstoffatome) und einer der beiden Fettsäuren enthält in der Regel ein bis zwei Doppelbindungen, ist also ungesättigt. Diese Unterschiede in der Länge und dem Gehalt an gesättigten und ungesättigten Fettsäuren sind nicht bedeutungslos.



Phospholipide haben eine bemerkenswerte Eigenschaft. Sie lagern sich in wässriger Umgebung spontan zu einer Doppelschicht zusammen

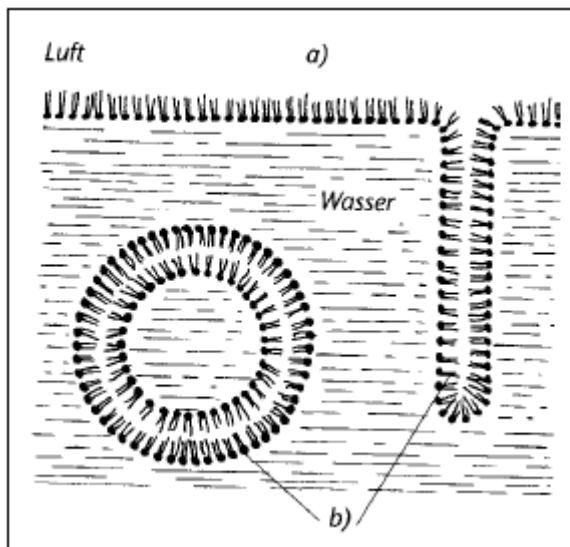


Abb 3:

Schematische Darstellung von

a) einer monomolekularen Phospholipidschicht an der Grenzfläche Wasser/ Luft und

b) Phospholipid-Doppelschichten in wässriger Umgebung

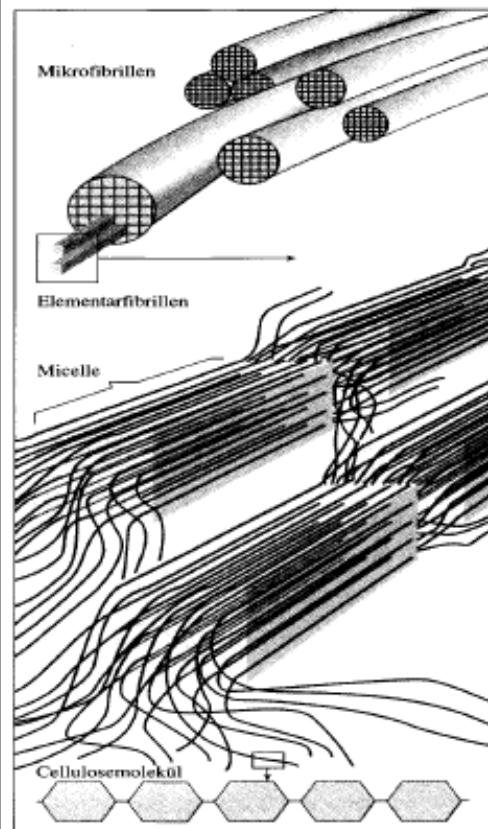
Durch die Biomembranen wird der Stoffaustausch zwischen der Zelle und ihrer Umgebung, aber auch innerhalb der Zelle gesteuert. In Anpassung an den jeweiligen Entwicklungszustand und die Aktivität einer Zelle ändern die Membranen ihre Struktur und damit ihre Permeabilität (Durchlässigkeit). Dem jeweiligen Bedarf entsprechend können auf diese Weise Stoffe aus dem Angebot ausgewählt werden. Membranen wählen aus, sie wirken selektiv. Die selektive Wirkung wird oft durch Akzeptorstellen und durch besondere Transportmoleküle, sogenannte Carrier, verstärkt.

Bei manchen Zelltypen bildet die Plasmamembran feine Ausstülpungen. Durch diese Mikrozotten oder Mikrovilli wird die Zelloberfläche und damit die Fähigkeit zum Stoffaustausch mit der Umgebung erheblich vergrößert. Oft sind die Plasmamembranen benachbarter Zellen miteinander verzahnt. Auf diese Weise wird der Kontakt und Zusammenhalt des Zellverbandes verstärkt.

Die typische Pflanzenzelle ist im Gegensatz zur tierischen Zelle von einer vom Zellplasma abgesonderten **Zellwand** umschlossen. Die Zellwand erfüllt zwei wesentliche Aufgaben:

1. Sie schließt den lebenden Inhalt der Pflanzenzelle, den Protoplasten, nach außen ab und verhindert, dass dieser sich durch Wasseraufnahme zu stark ausdehnt und platzt.
2. Sie festigt die einzelne Zelle und bewirkt damit die Stabilität bestimmter Pflanzenteile oder der ganzen Pflanze. Die **Cellulose** ist mengenmäßig und strukturell der wichtigste Baustoff der Zellwand. Sie ist dadurch auch die häufigste organische Substanz auf der Erde. Chemisch ist sie ein Polysaccharid, bei dem 10^3 bis 10^4 Glucosemoleküle unter Wasseraustritt zu einem langen, fadenförmigen Molekül verbunden sind. Eine große Anzahl solcher Fadenmoleküle ist nach einem besonderen Anordnungsprinzip jeweils zu einem Bündel zusammengelagert, das als **Mikrofibrille** bezeichnet wird. Die Mikrofibrillen kann man mit dem Elektronenmikroskop sichtbar machen. Die Cellulose ist als Gerüstsubstanz in eine Grundsubstanz eingebettet. Diese Grundsubstanz besteht vorwiegend aus quellbaren Polysacchariden wie Pektinen und Hemicellulosen, aber auch aus Proteinen.


Bei der Verholzung der Zellwand wird die Grundsubstanz durch das *Lignin* (Holzstoff) ersetzt. Dadurch wird die Druckfestigkeit der Zellen wesentlich erhöht.



Jede einzelne Mikrofibrille mit einer Dicke von 20 bis 30 nm ist selbst wieder aus 15 bis 20 Elementarfibrillen oder Micellarsträngen zusammengesetzt. Dies sind unscharf begrenzte Bündel von je 50 bis 100 Fadenmolekülen der Cellulose, die in ihrem Längsverlauf abschnittsweise parallel angeordnet sind. Diese Abschnitte werden als Micellen bezeichnet. In den Bereichen zwischen diesen Micellen sind die Cellulosemoleküle weniger straff geordnet. Die Micellarstränge sind untereinander durch hinüber- und herüberziehende Cellulosemoleküle vernetzt.

Station 4

Dictyosomen - Lysosomen

-  Aufgabe: 1. Lesen Sie den folgenden Text aufmerksam durch.
2. Spielen Sie anschließend mit Ihrem Partner das dazugehörige Memory-Spiel.

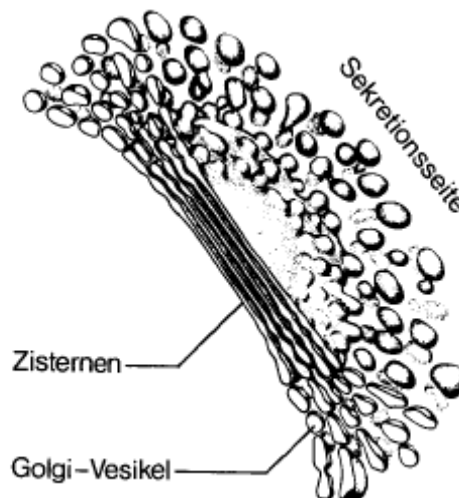
Über Dictyosomen (gr. diktyon = Netz; gr. Soma = Körper) verfügen, soweit bis heute bekannt ist, alle tierischen und pflanzlichen Zellen - mit wenigen Ausnahmen, zum Beispiel den roten Blutkörperchen.

Ein Dictyosom besteht aus mehreren flachen, sackförmigen Hohlräumen - wie beim ER Zisternen genannt -, die übereinander gestapelt sind. Die Hohlräume sind durch Biomembranen begrenzt. An dem charakteristischen, stapelartigen Aussehen ist das Organell im elektronenmikroskopischen Schnittbild meist leicht zu erkennen. Die Anzahl der Dictyosomen ist bei den verschiedenen Zelltypen sehr unterschiedlich. Bestimmte pflanzliche Zellen können mehrere Hundert besitzen. Stark entwickelt sind die Dictyosomen im Allgemeinen in Drüsenzellen. Die Gesamtheit der Dictyosomen in einer Zelle wird als Golgi-Apparat bezeichnet. Camillo GOLGI, italienischer Anatom, berichtete 1898 zum ersten Mal von diesen Strukturen. Bestimmte Fixierungsmittel verändern diese Strukturen so, dass sie vielfach schon lichtmikroskopisch nachweisbar sind.


Ein Beispiel für die Funktionen der Dictyosomen ist die Bildung der mit Enzymen gefüllten Lysosomen. An den Dictyosomen lässt sich eine Bildungsseite von einer Sekretionsseite unterscheiden. An der Bildungsseite vereinigen sich die vom endoplasmatischen Retikulum kommenden, mit Proteinen gefüllten Transportvakuolen. So entstehen fortwährend neue Zisternen, in denen die Proteine angereichert und zum Teil noch mit anderen Stoffen chemisch verbunden werden. An der Sekretionsseite werden die Zisternen wieder zerlegt; dort schnüren sich Bläschen ab, die sogenannten Golgi-Vesikel (lat. vesicula = Bläschen). Zumindest ein Teil der Lysosomen in einer Zelle ist identisch mit solchen Golgi-Vesikeln.

In den Dictyosomen werden nicht nur die genannten Enzym-Eiweiße angereichert. Bestimmte, kompliziert gebaute Kohlenhydrate - Polysaccharide - werden in den Dictyosomen selbst synthetisiert. Sie gelangen von dort, ebenfalls eingeschlossen in Golgi-Vesikel, an die Stellen ihrer Verwendung in der Zelle.

Bei Pflanzen werden in den Dictyosomen Zucker zu verschiedenen Polysacchariden - zum Beispiel Pektinen - polymerisiert - die zur Bildung der Zellwand dienen.



Übungsblatt

-  Aufgabe: 3. Was gehört zusammen?
4. Tragen Sie die entsprechenden Zahlen wie im Memory - Spiel ein.

	Bauelemente der Dictyosomen
	Der Golgi-Apparat ist
	Bedeutung des Wortes Dictyosom
	In Drüsenzellen
	Die Aufgabe der Dictyosomen ist
	Pflanzenzellen
	In Gogli Zisternen
	Lysosmen sind
	Dictyosomen synthetisieren auch
	Sekrete
	Dictyosomen bilden
	Die Membran der Golgi-Vesikel
	Lysosomen sind zum Teil identisch mit
	Bei Pflanzenzellen werden in den Dictyosomen
	Golgi Vesikel

	Die Gesamtheit der Dictyosomen in einer Zelle
	Sind Abschnürungen von Bläschen
	Werden nach außen abgeschieden
	findet eine Anreicherung von Proteinen und chemischen Verbindungen von Proteinen mit anderen Stoffen statt
	Verschmilzt mit der Plasmamembran
	Polysaccharide - kompliziert gebaute Kohlenhydrate
	Zucker zu verschiedenen Polysacchariden (.z.B. Pektinen) polymerisiert
	(gr). Diktyon=Netz, (gr.) soma=Körper
	Zellwände
	die Bildung der mit Enzymen gefüllten Lysosomen
	Sind Dictyosomen stark entwickelt
	Golgi Vesikeln, vesicula (lat.) = Bläschen
	Können mehrere Hundert Dictyosomen besitzen
	Mit Enzymen gefüllte Bläschen
	Sind flache sackförmige Hohlräume (Zisternen)

Station 5**Chloroplast - Mitochondrium**


Mitochondrien gibt es in allen eukaryotischen Zellen (Zellen mit echtem Zellkern, d.h. mit Kernhülle). Sie werden von zwei Membranen begrenzt. Die äußere Membran umhüllt das gesamte Mitochondrium. Die innere Membran ist stark gefaltet.

Ihre Einstülpungen in den Innenraum des Mitochondriums werden Cristae genannt. Die Oberflächenvergrößerung steht in engem Zusammenhang mit den Stoffwechselfvorgängen, die an der inneren Mitochondrienmembran ablaufen. In die innere Membran sind unter anderem die Enzyme der für die Zellatmung wichtigen Atmungskette eingebunden. Das Zellplasma der Mitochondrien bezeichnet man Matrix. Jedes Mitochondrium verfügt über ein ringförmiges DNA-Molekül. Darauf sind einige der Erbinformationen gespeichert, die im Mitochondrium gebraucht werden.

Chloroplasten finden sich nur in Pflanzenzellen. Diese Zellorganellen gehören zur Gruppe der Plastiden. Auch Chloroplasten sind von zwei Membranen umgeben. Von der inneren Membran schnüren sich so genannte Thylakoide ab, die untereinander verbunden sind. An manchen Stellen liegen die Thylakoide wie Geldrollen dicht übereinander gestapelt. Dann nennt man sie Grana-Thylakoide. Langgestreckte Thylakoide bezeichnet man hingegen als Stroma-Thylakoide.

In den Chloroplasten gibt es drei voneinander abgegrenzte Räume: den nicht plasmatischen Intermembranraum (Raum zwischen innerer und äußerer Membran), den Thylakoid-Innenraum und das Stroma (Plasma des Chloroplasten).

Im Chloroplasten laufen die Prozesse der Photosynthese ab. Auch die Chloroplasten verfügen wie die Mitochondrien über ringförmige DNA-Moleküle. Im Stroma sind außerdem Fetttropfen und Stärkekörner zu erkennen.


-  Aufgabe: 1. Zeichnen Sie mithilfe der bereitliegenden Modelle jeweils einen schematischen Längsschnitt von einem Mitochondrium und einem Chloroplasten und beschriften Sie Ihre Zeichen unter Verwendung der Informationstexte.
2. Vergleichen Sie Mitochondrien und Chloroplasten. Legen Sie dazu mit Hilfe der obigen Texte eine Tabelle nach folgendem Muster an:

Muster:

Vergleichskriterium	Mitochondrium	Chloroplast
Vorkommen		
Aufbau		
Funktion in der Zelle		

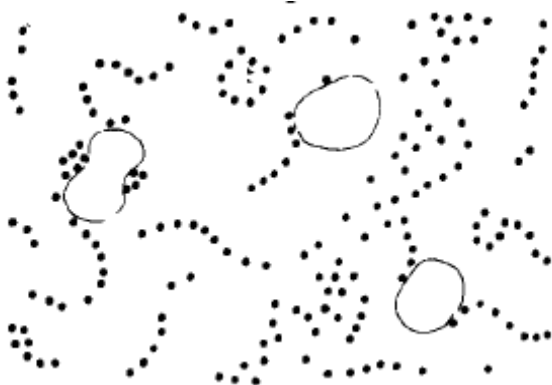
Station 7

Ribosomen - Endoplasmatisches Retikulum

 **Aufgabe:** Der Lernstoff dieser Lernstation ist in viele kleine Lernschritte aufgeteilt. Nach jedem Lernschritt können Sie selbst kontrollieren, ob Sie den neuen Stoff verstanden haben, indem Sie die freigelassenen Stellen des Textes ergänzen und die fehlenden Wörter einsetzen

Um das Bild der Zelle zu vervollständigen fehlen noch einige Zellorganellen, die man nur im Elektronenmikroskop beobachten kann. Elektronenmikroskopische Bilder unterscheiden sich von lichtmikroskopischen Bildern dadurch, dass sie nur aus hellen und dunklen Bildpunkten bestehen.

Betrachten Sie bitte folgendes Bild:



Dieses Bild zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme einer Zelle mit ca. 50.000facher Vergrößerung. Sie sehen auffällig viele kleine schwarze Pünktchen, die sogenannten Ribosomen.

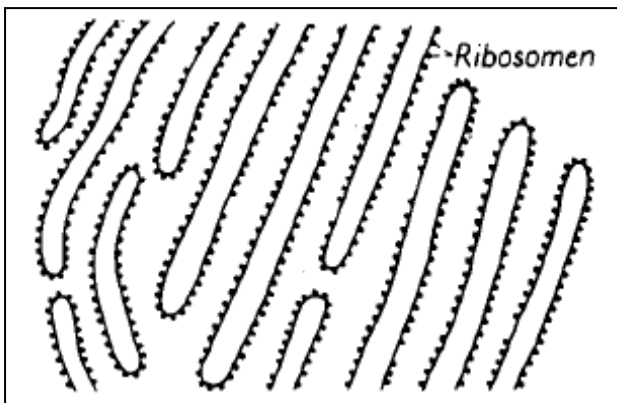
Ribosomen gehören zu den Zellorganellen. Sie müssen daher eine in den Zellen erfüllen. Um dieser Aufgabe auf die Spur zu kommen, wurden die Ribosomen chemisch untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Ribosomen sehr viele Eiweißstoffe Proteine enthielten.

Da bekannt war, dass Zellen auch Eiweiß (Protein) herstellen, lag die Vermutung nahe, dass die Ribosomen an der Eiweiß beteiligt sind.

Die Ribosomen sind die „Eiweißfabrik“ der Zelle. Eine Fabrik benötigt zur Herstellung gewisser Produkte vor allem Rohstoffe und ein Transportsystem, das die Rohstoffe anliefert.

Die Ribosomen der Zelle werden durch ein kompliziertes Transportsystem mit Rohstoffen versorgt, um aus den Rohstoffenaufzubauen.

Betrachten Sie bitte folgendes Bild:



Es zeigt das Transportsystem der Zelle ganz deutlich. Sie werden selbst schon vermuten, was auf dem Bild das Transportsystem der Zelle darstellt.

Das Transportsystem der Zelle besteht aus sehr vielen dünnen Natürlich hat auch dieses Organell einen wissenschaftlichen Namen. Das Transportsystem der Zelle wird als Endoplasmatisches Retikulum (Abkürzung ER) bezeichnet.

(Endo = innen), Plasma-Grundsubstanz der Zelle, Retikulum = Netz)

Wie würden Sie „ER“ sinngemäß übersetzen?

.....

Das Endoplasmatische Retikulum übernimmt in der Zelle die Aufgabe des Transports. Es werden vor allem „Rohstoffe“ zu den Teilen der Zelle gebracht, die bestimmte Stoffe produzieren. Das Endoplasmatische Retikulum beliefert zum Beispiel die „Eiweißfabrik“ der Zelle.

Die Ribosomen sitzen am ER(=) besonders dicht. Auch das hat seinen speziellen Grund. Das ER kann auf diese Weise die von den Ribosomen produzierten - stoffe in der Zelle gleich weitertransportieren.

Außer den Ribosomen haben Sie ein weiteres Zellorganell kennengelernt, das sogenannte Es setzt sich aus vielen kleinen Röhren zusammen. In den kleinen Röhren werden vor allem die Eiweißstoffe im Zellplasma (Cytoplasma) Damit haben Sie zwei wichtige Bestandteile der Zelle kennen gelernt, die man nur im Elektronenmikroskop beobachten kann. Solche kleinen Bestandteile der Zelle, die praktisch die Funktion von Organen ausüben, nennt man auch

Die Zellorganellen, die die Eiweißsysteme durchführen, erhielten den Namen

Machen Sie bitte folgenden Zwischentest. Welche Zellorganellen werden in dieser Lernstation bearbeitet und welche Aufgaben werden von ihnen erfüllt?

1.a.....


b. Aufgabe

2.a

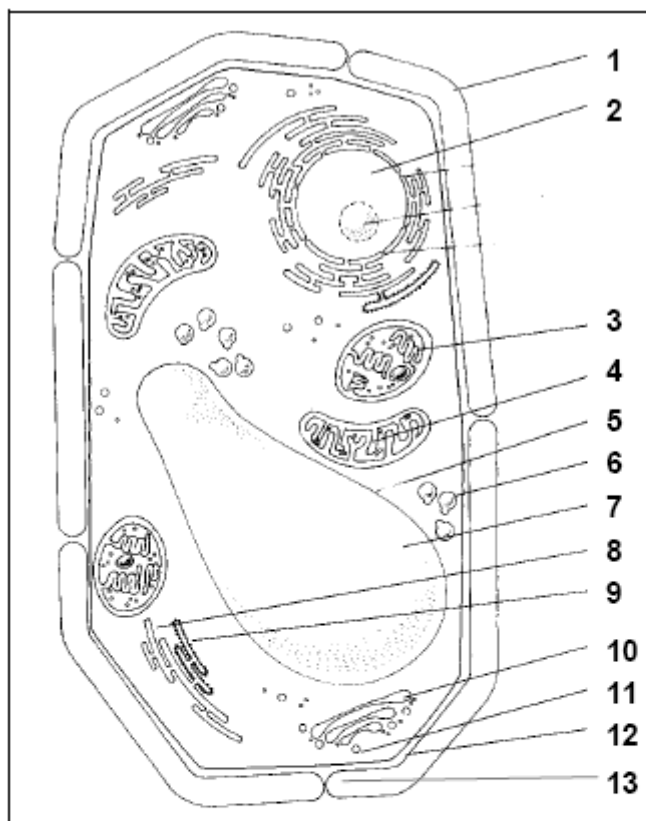
b. Aufgabe

Station 8

**Die Zelle eine Fabrik?
Bau einer pflanzlichen Zelle und Funktion ihrer Zellorganellen**

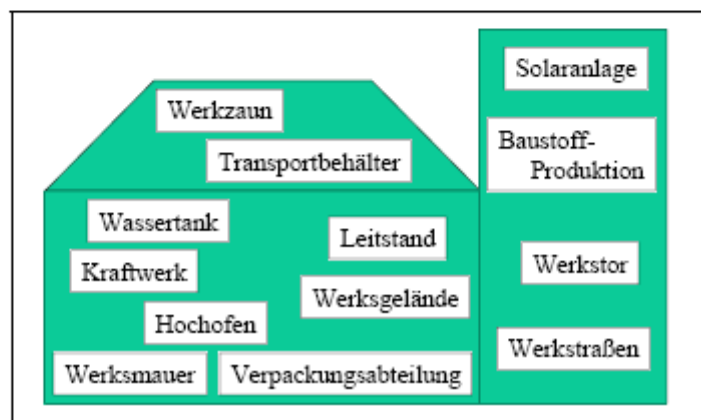
 **Aufgabe:** Legen Sie eine Tabelle an, in der Sie:

1. die Zellorganellen der abgebildeten Pflanzenteile benennen
2. die Funktion der Zellorganellen für das Überleben der Zelle stichwortartig angeben
3. den Zellorganellen die Bereiche der Fabrik zuordnen



	Zellorganell	Funktion	Vergleich mit Fabrik
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			


Muster




4. Arbeiten mit Hefen

4.1 Alkoholische Gärung

Untersuchung einer biochemischen Stoffwechselleistung bei Pilzen

-  Aufgabe:
1. Mit Hilfe von Hefezellen ist Zucker in Ethanol und Kohlenstoffdioxid umzusetzen. Führen Sie den Versuch gemäß Versuchsvorschrift durch.
 2. Fertigen Sie eine beschriftete Skizze vom Versuchsaufbau an.
 3. Bestimmen Sie die Anzahl der Hefezellen zu Beginn des Versuchs (Praktikumstag) und am Ende des Versuchs (folgender Praktikumstag) durch Auszählen mittels Bürker-Kammer (s. folgende Kapitel).
 4. Die Reaktionsprodukte Ethanol und Kohlenstoffdioxid sind nachzuweisen.
 5. Werten Sie den Versuch zur alkoholischen Gärung gemäß den Anweisungen zur Versuchsauswertung aus.

-  Material:
- | | |
|---------------------------------|-----------------------|
| - 500 mL Schliffenmeyerkolben | - Mikroskop |
| - 100 mL Erlenmeyerkolben | - Tropfpipette |
| - Reagenzglas | - Objektträger |
| - Watte | - Deckglas |
| - Schliffstopfen NS 29 | - 100 mL Messzylinder |
| - Gasableitungsrohr mit Schliff | - 1 mL Pipette |
| - Gaseinleitungsrohr | - 10 mL Pipette |
| | - Peleusball |

-  Substanzen:
- | | |
|-----------------------|-----------------------------------|
| - Zucker oder Glucose | - Barytwasser |
| - Hefe | - Cerammoniumnitrat-Reagenzlösung |
| - Wasser | - Ethanol |

Versuchsdurchführung:

1. Aufbau der Apparatur
2. In einem 500 mL Schliff - Erlenmeyerkolben werden 20 g Zucker oder Glucose in 90 mL VE-Wasser gelöst.
3. In einem kleinen Erlenmeyerkolben suspendiert am 4 g Backhefe in 10 mL VE-Wasser und fügt die homogene Suspension der Zuckerlösung zu.
4. 1 mL der Suspension zum Mikroskopieren und für die Bestimmung der Zellzahl (Zählkammer-Verfahren) aufheben! (Siehe unter Punkt 8!)
5. Das Gasableitungsrohr der Apparatur taucht in ein Reagenzglas mit kaltgesättigtem, frisch filtriertem Barytwasser ein. (Reagenzglas locker mit Watte oder Zellstoff verschließen).
6. Der Ablauf der Gärung ist von Zeit zu Zeit zu beobachten und zu protokollieren.
7. Die aufgehobenen Hefezellen werden mikroskopiert; Skizze und Beschreibung sollen im Protokoll enthalten sein.
8. Die Anzahl der Hefezellen pro Liter zu Beginn der Gärung wird durch Auszählen mittels Zählkammer bestimmt. Für Zellzahlen unter 2×10^6 pro mL ist dieses Zählkammer-Verfahren ungünstig. Bei größeren Zellzahlen müssen geeignete Verdünnungen ausgezählt werden. (siehe Kapitel 4.2)

Versuchsauswertung:

Werten Sie den Versuch zur alkoholischen Gärung aus indem Sie:

1. die Reaktionsgleichung zum CO₂ - Nachweis formulieren

Barytwasser ist ein Nachweisreagenz auf Kohlenstoffdioxid

2. Ethanol in der Lösung nachweisen

In ein Reagenzglas werden 6 Tropfen Cerammoniumnitrat-Reagenzlösung und 10 Tropfen VE-Wasser gegeben. Zu der klaren Lösung werden 1-2 Tropfen des Überstandes gegeben. Bei Anwesenheit von Ethanol entsteht eine Rotfärbung.

Versuchsbeobachtung:**Versuchsergebnis:**

3. Die Reaktionsgleichung für die alkoholische Gärung formulieren

4. abgestorbene Hefezellen schätzen

1 Tropfen Hefelösung wird mit 1 Tropfen Methylenblau angefärbt und mikroskopiert. Neben vielen blassblau gefärbten, lebenden Hefezellen zeigen sich eine Reihe kräftig blau gefärbter, toter Hefezellen. In den hellen Zellen wird durch reduzierende Enzyme das Methylenblau in die farblose Leukoform überführt. Toten Zellen fehlt die Reduktaseaktivität; sie färben sich kräftig blau.

In Gäransätzen soll die Menge der toten Zellen weniger als 5 % betragen.

Schätze Sie die Anzahl der toten Hefezellen in der von Ihnen gewonnenen Probe ab!

5. die Zellzahl zu Beginn und nach Beendigung der Gärung bestimmen:

Jeweils 1 mL der Hefesuspension werden für die Bestimmung der Zellzahl (Zählkammer-Verfahren) entnommen.

Die Anzahl der Hefezellen pro Liter werden bestimmt (Berechnungen siehe auch Kapitel 4.4). Vergleichen Sie die Zahl der Hefezellen zu Beginn und nach Beendigung der Gärung (Berechnung angeben!!)

4.2 Verdünnungsreihe

Häufig ist die Mikroorganismenzahl in einer Probelösung so hoch, dass man sie z.B. durch auszählen in der Bürker-Kammer nicht bestimmen kann. In solchen Fällen muss man die Suspension vor der Bestimmung verdünnen. Man legt gewöhnlich eine Verdünnungsreihe an, indem man die ursprüngliche Konzentration durch Verdünnen über mehrere, genau festgelegte Stufen schrittweise herabsetzt.

Am gebräuchlichsten ist das Verdünnen in Dezimalschritten, also das Anlegen einer Verdünnungsreihe mit Verdünnungen im Verhältnis 1:10 (10¹), 1:100 (10²), 1:1000 (10³) und so fort, bis die für die Bestimmung geeignete Verdünnungsstufe erreicht ist. Der reziproke Wert des Verdünnungsverhältnisses ist der Verdünnungsfaktor (in Klammern angegebene Wert). Die erste Dezimalverdünnungsstufe heißt auch Primär- oder Erstverdünnung, meist stellt man diese Dezimalverdünnung durch Zugabe von genau 10 mL Probelösung zu 90 mL Verdünnungslösung in einem Erlenmeyerkolben her. Die weiteren Dezimalverdünnungen werden durch Zugabe von jeweils genau 1 mL (oder 0,5 mL) Probensuspension zu 9 mL (bzw. 4,5 mL) Verdünnungslösung in einem Reagenzglas hergestellt.


Es muss auf eine gut Durchmischung der Lösungen geachtet werden, weil Mikroorganismen auch kleinste Klumpen Zellaggregate bilden können, was die gute Durchmischung behindert, daher die Lösungen vor Probeentnahme jeweils kräftig schütteln. Die gesamte Verdünnungsreihe zügig anlegen, um eine Sedimentation (Absinken) der Zellen zu vermeiden.

Verdünnungs-		
Stufe	Verhältnis	Faktor
1		
2		
3		
4		
5		
6		

Aufgabe: Geben Sie am obigen Beispiel das Verdünnungsverhältnis und den Verdünnungsfaktor für die einzelnen Verdünnungsstufen an (siehe Tabelle).

4.3 Lichtmikroskopische Untersuchung von Hefezellen

In der Qualitätskontrolle und bei der Überwachung des Betriebsablaufs einer Brauerei werden bei den mikrobiologischen Untersuchungen (Anzüchtung auf speziellen Nährböden) mit der mikroskopischen Überprüfung (quantitative und qualitative Feststellung der Mikroorganismen) verbunden.

-  Aufgabe: 1. Beobachten Sie verschiedene Sprossungsstadien von Hefezellen am Beispiel der Bäckerhefe
2. Skizzieren Sie die gefundenen Sprossungsstadien.

Versuchsdurchführung:

Auf einen Objektträger wird ein verdünnter Tropfen einer Lösung aus Malzextrakt (w=5%) und Hefe aufgetragen und unter dem Mikroskop betrachtet.

Anmerkung:

In dieser Nährlösung bilden die Hefezellen Ausbuchtungen aus, die bis zur Größe der Mutterzelle heranwachsen. Diese Art der Fortpflanzung wird Sprossung genannt. Die Tochterzelle kann nun gleich von der Mutterzelle abfallen und als eigenständige Zelle wiederum Tochterzellen bilden, oder es bleiben beide zusammen wobei die Tochterzelle wieder neue Tochterzellen bildet usw.

In diesem Fall kommt es dann zur Bildung von bäumchenartigen Sprossverbänden.

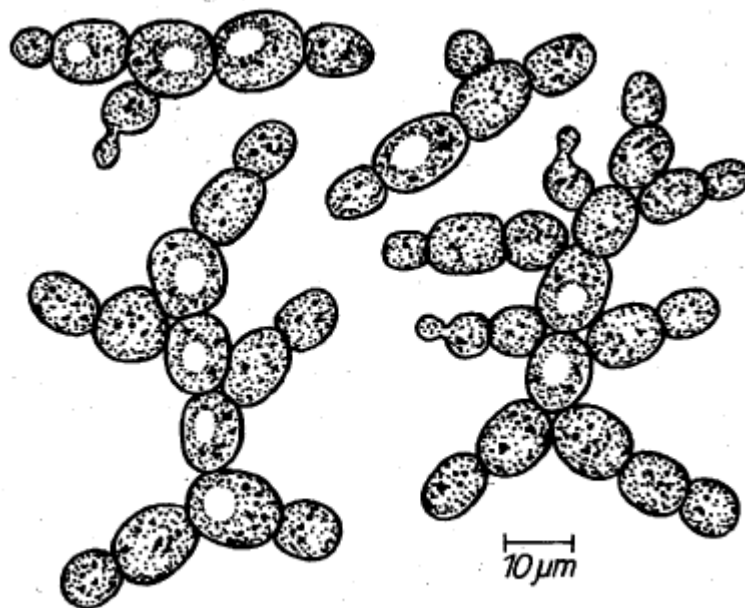

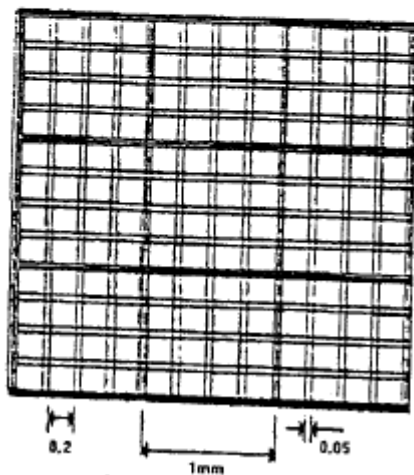
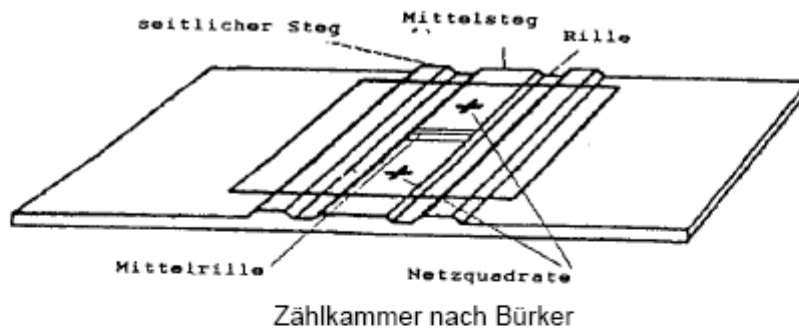


Abb.: *Saccharomyces cerevisiae*, Sprossung

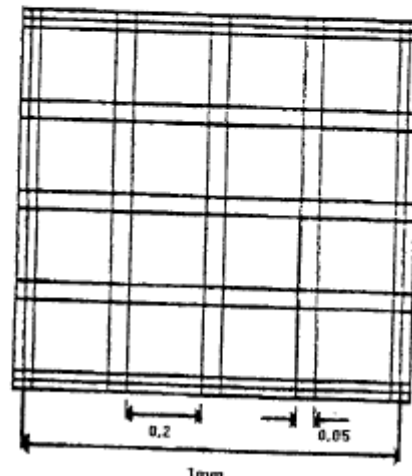
4.4 Biomassebestimmung mittels Zählkammer

-  Aufgabe: 1. Bestimmen Sie mit Hilfe der Zählkammer die Anzahl der Hefezellen pro L zu Beginn der Gärung (1. Praktikumstag).
2. Bestimmen Sie die Anzahl der Hefezellen nach Beendigung der Gärung (2. Praktikumstag)

Eine differenzierte Zählung von Mikroorganismen erfolgt mittels Zählkammer. Die in der Bakteriologie gebräuchteste Zählkammer trägt eine Netzeinteilung nach Thoma oder nach Bürker. Bei der Betrachtung gegen das Licht sind kreuzförmig eingeritzte Linien erkennbar, die das Zählfeld in 16 Großquadrate teilen. Unter dem Mikroskop lässt sich erkennen, dass jedes Großquadrat aus 16 Kleinquadraten besteht (siehe Abb.)



Bürker, doppelte Netzeinteilung



mittleres Großquadrat

Die Kleinquadrate haben eine Seitenlänge von 0,05 mm. Da zwischen dem korrekt aufgelegten eingeschliffenen Deckglas und dem Gitternetz ein Abstand von 0,1 mm besteht, ergibt sich folgendes Volumen über dem Großformat:

$$1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3$$

(0,1 mm³ = 0,0001 cm³ - Umrechnung auf 1 L = Faktor 10⁷)

Handhabung der Zählkammer

1. Verschmutzte Zählkammer und Spezial-Deckgläschen mit 70% Ethanol reinigen.
2. Zählkammer gegebenenfalls anhauchen. Spezialdeckgläschen auflegen und vorsichtig andrücken. Häufig erscheinen dabei an den Seitenstegen „Newton-Ringe“ (Regenbogenfarben). Die Höhe der Zählkammer ist dabei genau auf 0,1 mm eingestellt.

3. Zählkammer auf den Mikroskopisch legen, bei 40 x Vergrößerung voreinstellen, dann bei 100 x Vergrößerung so einstellen, dass die Netzteilung scharf zu erkennen ist. (Es kann ein ganzes Großquadrat gesehen werden).
4. Einen Tropfen der gut homogenisierten Zellsuspension mit einer Pipette auf den Mittelsteg, an den Rand des Deckgläschens bringen. Durch Kapillarkräfte gelangt die Zellsuspension eigenständig in die Zählkammer.
5. Um reproduzierbare Ergebnisse zu bekommen, müssen mindestens vier Großquadrate ausgezählt werden. Dabei werden Zellen, die oben und links auf der Grenzlinie liegen, mitgezählt. Zellen, die auf der unteren und auf der rechten Begrenzungslinie liegen, werden nicht mitgezählt. (Vergleiche Abb.).

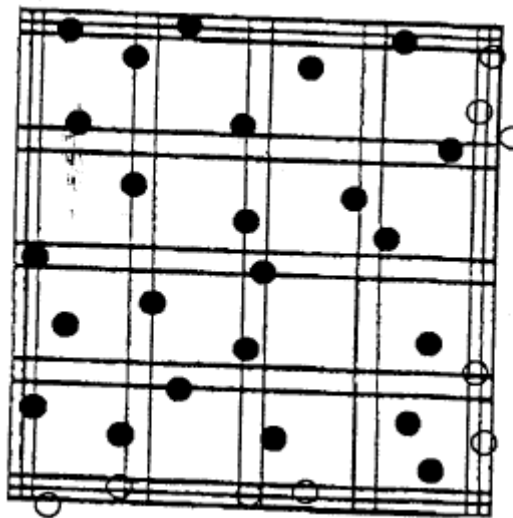


Abb.:


Die Zellen auf der rechten und unteren Linie werden nicht mitgezählt.

6. Der Mittelwert der Zählungen wird berechnet. Dieser entspricht der Anzahl der Mikroorganismen pro 0,0001 cm³. Dieser Mittelwert wird auf die Anzahl der Mikroorganismen pro Liter umgerechnet (siehe oben).
7. Für Zellzahlen unter 2×10^6 pro mL ist dieses Zählkammerverfahren ungünstig. Bei größeren Zellzahlen müssen geeignete Verdünnungen ausgezählt werden.

5. Nachweis von Mikroorganismen

5.1 Nachweis von Mikroorganismen in der Luft

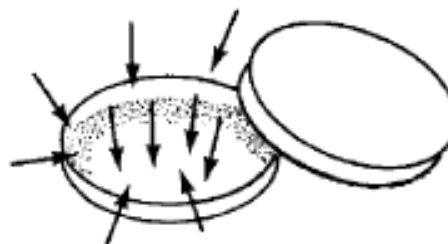
 Ziele: Es soll festgestellt werden, ob in der Luft Mikroorganismen nachgewiesen werden können.

 Aufgabe: 1. Untersuchen Sie die Keime in der Luft am besten, indem einfach eine bestimmte Zeit die Petrischale geöffnet wird.
2. Wählen Sie einen Ort, dessen Luft Sie untersuchen wollen. (Ausnahme: Sanitäre Einrichtungen)

 Material: - 1 Petrischale mit Stand I Agar (pH 7,5)

Durchführungen und Auswertung:

- Beschriften Sie die Petrischale am Boden (nicht am Decken, der könnte verwechselt werden) mit:
 - **Name**
 - **Datum**
 - **Ort**
 - **Expositionszeit**
- Öffnen Sie die Petrischale an dem gewählten Ort und lassen diese 1 Stunde stehen. (Der Deckel liegt mit der Innenseite nach unten!)



- Die Deckhälfte wird nun geschlossen und die Petrischale mit dem Deckel nach unten auf die Arbeitsfläche gestellt. (Eventuelles Kondensationswasser tropft dann nicht in die Kolonie).
- Die Agrarplatte wird nun einige Tage bei Zimmertemperatur inkubiert.
- Stellen Sie nach dieser Zeit fest, wie viele verschiedenartig aussehende Kolonien Sie auf den Platten unterscheiden können.
Unterscheiden Sie, unter Zuhilfenahme der Lupe und des Mikroskops, nach Form, Farbe, Größe, Kolonienrand und Glanz (siehe Einteilung Kapitel 5.5/5.6).


Legen Sie dazu eine Tabelle nach folgendem Muster an:


Anzahl	Größe (mm)	Farbe	Oberfläche (Profil)	Kolonie (Form und Rande)	Gruppe	Skizze


Die Platten sollen dazu **nicht geöffnet** werden.

- Nach der Auswertung werden die bakterienhaltigen Agrarplatten in einem Abfallbeutel gesammelt und nach dem Autoklavieren der Müllbeseitigung zugeführt.

5.2 Nachweis von Mikroorganismen auf der menschlichen Haut - vor und nach Desinfektionsmaßnahmen

 Ziele: Es soll festgestellt werden, ob auf der Körperoberfläche Mikroorganismen nachgewiesen werden können. (Verdeutlichung der Notwendigkeit von Hygienemaßnahmen).

 Aufgabe: Nachweis von Keimen auf den Fingerkuppen vor und nach Hygienemaßnahmen.

 Material: - 1 Platte mit Standard 1 Agar
- Händedesinfektionslösung (Manusept-Emulsion, Ethanol, Skinman soft)

Durchführung:


1. Die Platte wird auf der Unterseite mit einem Filzschreiber durch Radien in 3 Segmente geteilt. Die Segmente werden beschriftet:
 - unbehandelt
 - mit Wasser und Seife gewaschen
 - desinfiziert mit
-
2. Die Agar - Platte wird nun geöffnet indem man den Deckel anhebt und über die Platte hält damit keine Luftkeime auf den Nährboden fallen können. Nun drückt man die ersten Glieder von Daumen und Zeigefinger auf das Segment - unbehandelt - Platte schließen!
-
4. Die Hände werden nun gründlich mit Wasser und Seife gereinigt und mit Papierhandtüchern getrocknet.
 5. Daumen und Zeigefinger unter den gleichen keimfreien Bedingungen auf das Segment- mit Wasser und Seife gewaschen - drücken. Platte schließen!
 6. Desinfizieren Sie nun beide Hände gründlich mit einem Händedesinfizierens und trocknen Sie diese mit Papierhandtüchern.
 7. Nach Öffnen der Platte, Daumen und Zeigefinger auf das Segment - desinfiziert - drücken. Platte schließen!
 8. Das Inkubieren der Platte erfolgt einige Tage bei Zimmertemperatur. (Das Inkubieren bei Körpertemperatur 37o C fördert das Wachstum pathogener Keime)
 9. Protokollieren Sie das Ergebnis indem Sie die Zahl der verschiedenen Kolonien ermitteln und diese kurz beschreiben (siehe Einteilung Kapitel 5.5/5.6.).


Außerdem ist die Zahl der Kolonien pro Segment zu bestimmen. Legen Sie dazu eine Tabelle nach folgendem Muster an:


Anzahl	Größe (mm)	Farbe	Oberfläche (Profil)	Kolonie (Form und Rande)	Gruppe	Skizze

10. Beschreiben Sie das Ergebnis der verschiedenen Hygienemaßnahmen. - Die Platte wird dabei nicht geöffnet!
11. Nach der Auswertung wird die bebrütete Platte in einem Abfallbeutel gesammelt und nach dem Autoklavieren der Müllbeseitigung zugeführt.

5.3 Nachweis von Mikroorganismen in einer Wasserprobe und der Sterilisationswirkung durch Abkochen

-  Ziele: Es soll nachgewiesen werden, ob in der zu untersuchenden Wasserprobe Mikroorganismen vorhanden sind. Es soll der Einfluss der Temperatur auf die Keimzahl im Wasser deutlich gemacht werden.

 Aufgabe: Nachweis von Keimen in Wasser bei unterschiedlichen Temperaturen

-  Material:
- 1 x 250 mL Erlenmeyerkolben
 - 3 x 1 mL Messpipetten
 - 3 x 1 Drigalskispatel
 - 1 x 100 mL Messzylinder mit Desinfektionslösung
 - 3 x Agarplatten Standard 1
 - Ethanol

Durchführung und Auswertung:

1. Es werden die bereits sterilisierten Geräte benutzt.
2. Die Entnahme von ca. 100mL Wasserprobe erfolgt mit dem Erlenmeyerkolben. Dazu wird die Verschlussfolie abgenommen, der Gefäßrand abgeflammt, das Wasser eingefüllt, der Gefäßrand wieder abgeflammt und die Verschlussfolie sofort wieder aufgesetzt.
3. Den Boden der Agarplatte beschriften (Name, Datum, Probebezeichnung)
4. Die nun folgenden Arbeiten werden unter keimarmen Bedingungen durchgeführt, d.h. vorherige Desinfektion der Arbeitsfläche mit Incidin.
5. Der Erlenmeyerkolben wird geöffnet und der Gefäßrand abgeflammt.
6. Mit einer sterilen 1 mL Pipette werden 0,2 mL Wasserprobe entnommen und keimfrei auf die bereitgestellten Agarplatten pipettiert.
7. Benutzte Pipette in das Desinfektionsbad legen.
8. Mit einem Drigalskispatel wird die überpipettierte Wasserprobe gleichmäßig auf die Agarplatte verteilt.

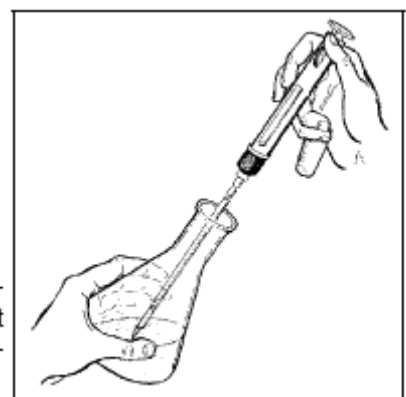


Abb.: Gleichzeitiges Halten dreier Gegenstände mit zwei Händen. Dieses ist eine in der Mikrobiologie übliche Arbeitstechnik beim sterilen Arbeiten

9. Die restliche Wasserprobe auf 50°C erwärmen, 5 min auf dieser Temperatur halten und auf Raumtemperatur abkühlen. Das Thermometer vor der Benutzung mit Ethanol desinfizieren.
10. Hiervon 0,2 mL in bekannter Weise auf die bereitgestellte beschriftete Agarplatte auftragen.
11. Die restliche Wasserprobe 5 min sieden lassen, abkühlen und 0,2 mL in bekannter Weise auf die Agarplatten auftragen.
12. Die Agarplatten werden einige Tage bei Zimmertemperatur inkubiert.

13. Die inkubierten Agrarplatten werden nach dieser Zeit ausgewertet (siehe Einteilung Kapitel 5.5/5.6).
14. Protokollieren Sie das Ergebnis indem Sie die Zahl der verschiedenen Kolonien ermitteln und diese kurz beschreiben (siehe Einteilung Kapitel 5.5/5.6.). Außerdem ist die Zahl der Kolonien pro Segment zu bestimmen. Legen Sie dazu eine Tabelle nach folgendem Muster an:

Anzahl	Größe (mm)	Farbe	Oberfläche (Profil)	Kolonie (Form und Rande)	Gruppe	Skizze

15. Beschreiben Sie das Ergebnis der verschiedenen Hygienemaßnahmen. Die Platte wird dabei nicht geöffnet!!
16. Nach der Auswertung wird die bebrütete Platte in einem Abfallbeutel gesammelt und nach dem Autoklavieren der Müllbeseitigung zugeführt.
17. Nach der Auswertung werden die bakterienhaltigen Agrarplatten in einem Abfallbeutel gesammelt und nach dem Autoklavieren der Müllbeseitigung zugeführt.
18. Bestimmen Sie die Lebendzellzahl (KBE siehe Kapitel 5.4).

5.5 Morphologische und cytologische Untersuchung von Mikroorganismen

Bakterien bilden auf festen Nährböden Kolonien. Man versteht darunter mit bloßem Auge sichtbare Zellaggregationen, die infolge ortgebundener Vermehrung einer einzelnen oder mehrerer aneinanderhaftender Bakterienzellen entstanden sind. Kolonien treten nicht nur unter Laborbedingungen (künstlichen Bedingungen) sondern auch unter natürlichen Bedingungen auf Substraten mit fester Oberfläche auf (z.B. auf Kartoffeln, Fleischwaren, Früchten).

Form, Struktur und Farbe der am Kolonieaufbau beteiligten Einzelzellen bestimmen u.a. die Koloniemerkmale. Da die Koloniebildung artspezifisch verläuft, ist es möglich, bei Konstanzhaltung der Nährboden-, Temperatur- und Luftfeuchtbedingungen in einer bestimmten Wachstumszeit nach Farbe, Größe, Höhe, Profil und Umriss einander ähnliche Kolonien eines Bakteriums zu erzielen. Die Kolonieeigenschaften sind Teil der Art- bzw. Stammbeschreibung und dienen dem Wiedererkennen eines bestimmten Bakteriums. Bei der Differenzierung von Bakterien werden oft spezielle Nährböden verwendet, auf denen besondere Koloniemerkmale ausgebildet werden. Meistens handelt es sich um Farbreaktionen im Koloniebereich, die Rückschlüsse auf bestimmte biochemische Reaktionen erlauben.

Kriterien für eine Koloniebeschreibung:

1. Farbe: Pigment wasserlöslich (von der Kolonie an die Umgebung abgegeben),
Pigment an die Zelle gebunden (nicht ins Medium ausgeschieden)
2. Koloniegroße: klein (punktförmig), mittelgroß (ca. 1-2 mm Durchmesser), groß
(Durchmesser > 2mm)
3. Oberfläche: durchsichtig, undurchsichtig, glatt, rau, granuliert, wellig, fädig

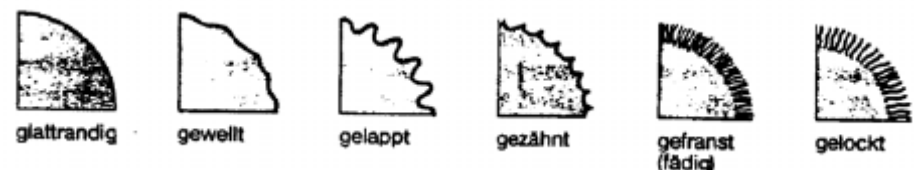
4. Profil:



5. Kolonieform:




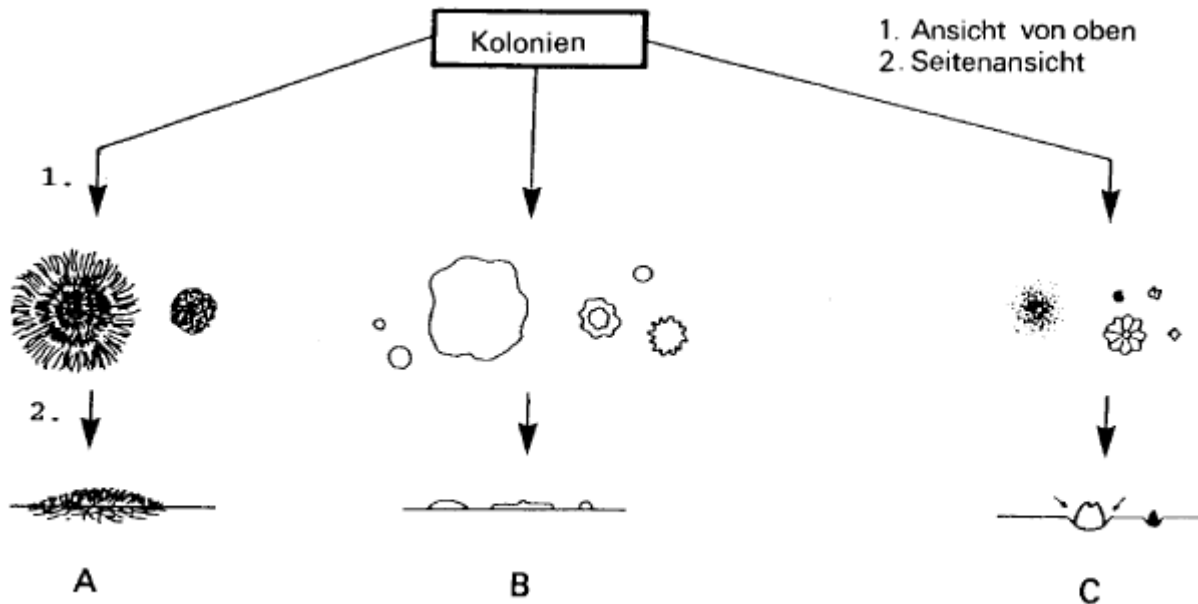
6. Kolonienrand:



Die Kolonien vieler Bakterien sind schleimig-glänzend und glattrandig; die der Schimmelpilze sind flaumig bis wattig und zeigen am Rand fädrige Strukturen. Streptomyceten bilden oft kleine Kolonien mit kreideartig rauer Oberfläche und von bröckeliger bis flaumiger Konsistenz.

5.6 Einteilung der Mikroorganismen (Aussehen und Größe der Kolonien)

 Aufgabe: Teilen Sie die Kolonien nach genauer Betrachtung (Größe, Form, Kolonienrand, Farbe, Glanz, siehe Kapitel 5.5) mit Hilfe des folgenden Diagramms und der Erläuterungen und Hinweise dazu grob in Gruppen ein.



Von der Kolonieform zur makroskopischen Grobeinteilung der Mikroorganismen

Häufiges Aussehen der Formen einzelner Kolonien:

A - Fadenpilze

Wattig-fädige Kolonie; das farblose Mycel wächst auch im Nährboden; das Luftmycel besitzt meist farbige Sporen (blau-grün/gelb-braun/schwarz), Durchmesser 1 bis 9 cm.

B - Hefen oder Bakterien

Glänzend-matte oder schleimige Kolonie, oft oberhalb der Agar - Oberfläche liegen, graugelblich (meist Bakterien) oder rot/orange/gelb/braun (meist Hefen) Durchmesser 1 bis 30 mm.

C - Streptomyceten

Erdiger Geruch aus der Petrischale, stumpfe, kegelförmige Kolonien, durch Luftmycel und Sporenbildung wattig aussehend, in den Nährboden linsenförmig eingewachsen, oft grau- oder gelb-farbig, manchmal auch Braun- bis Schwarzfärbung des umgebenden Agars (Melaninausscheidung), Durchmesser 1 bis 5 mm.

Die Streptomyceten zählen mit den Actinomyceten zu einer Bakteriengruppe, die durch ihre Mycelbildung besonders auffällt.

5.7 Sterilisation

Aufgabe:

- Lesen Sie den Text sorgfältig durch.
- Fassen Sie das Wichtigste in Form eines kleinen „Spickzettels“ möglichst übersichtlich zusammen.
- Auf ihrem Spicker dürfen höchstens zehn Wörter stehen!
- Später müssen Sie den Sachtext mit Hilfe ihres Spickers in freier Rede nacherzählen.

Die Sterilisation kann mit **feuchter Hitze, trockener Hitze, Gasen, ionisierenden Strahlen** oder durch **Sterilfiltration** erfolgen

Feuchte Hitze

Die, mit feuchter Hitze (gespanntem Dampf) durchgeführte Sterilisation ist eine sehr sichere Methode und im Labor- und Produktionsbereich weit verbreitet. Temperaturen von mehr als 115 °C töten **alle** Mikroorganismen, selbst hitzebeständige Bakteriensporen, bei entsprechender Einwirkungszeit durch Inaktivierung der Proteine sicher ab. Bekanntestes Verfahren ist die **Dampfsterilisation im Autoklaven**.

Autoklaven sind Druckbehälter zum Sterilisieren. In ihnen wird Wasser zur Dampferzeugung solange erhitzt, bis sich bei einem Dampfdruck des gesättigten Wasserdampfes von 2,05 bar die zugehörige Temperatur von 121 °C einstellt. Diese Temperatur, die in allen Bereichen des zu sterilisierenden Materials erreicht werden muss, ist zur sicheren Abtötung der Mikroorganismen 15—20min zu halten (Sterilisationszeit).

Entscheidend für das Erreichen von 121 °C bei dem vorgegebenen Druck von 2,05 bar ist die völlige Verdrängung der Luft durch den gebildeten Wasserdampf im Autoklaven und im Sterilisiergut, was insbesondere bei porösem Material (z.B. Wattestopfen) oder bei Pipetten und ähnlichem oft nur schwer zu erreichen ist. Bleibt ein Luftanteil von 25% im Autoklaven, werden bei 2 bar lediglich 112 °C erreicht, also zu wenig für eine sichere Abtötung der Mikroorganismen.

Sicherheitshinweis

Beim Autoklavieren von Flüssigkeiten oder fest verschlossenen Glasgefäßen ist vor allem in der Abkühlphase besondere Vorsicht geboten. Zu schnelles Abkühlen führt zu Siedeverzug mit Überkochen und zu Glasbruch durch den schnellen Druckwechsel.

Anwendungsbereich

Grundsätzlich sind alle im mikrobiologischen Labor und Betrieb anfallenden Gegenstände autoklavierbar, soweit sie feuchte Hitze vertragen: so vor allem Glas-, Metall- und Kunststoffgeräte (Reagenzgläser einschließlich Wattestopfen oder Alukappen, Pipetten, Petrischalen, Erlenmeyerkolben und Pinzetten). Bei Kunststoffen ist die Temperaturbeständigkeit zu beachten. Die Gebrauchstemperatur vieler Kunststoffe liegt unter 100 °C. Nährmedien zur Züchtung von Zellen werden vor ihrer Verwendung ebenfalls autoklaviert.

Die Größe von Autoklaven reicht vom einfachen Dampftopf mit wenigen Litern Nutzvolumen über Laborautoklaven bis zu raumgroßen, begehbaren Autoklaven im Biobetrieb.

Entsorgung im Autoklaven

Benutzte und mit Mikroorganismen verunreinigte (kontaminierte) Petrischalen, Pipetten, Glasgeräte und Textilien werden einfach und sicher im Autoklaven entsorgt und damit zum Teil wieder gebrauchsfähig gemacht.

Trockene Hitze

Heißluftsterilisation. Sie erfolgt mit erhitzter, filtrierter Luft, die beispielsweise in einem Trockenschrank über das zu sterilisierende Gut geleitet wird. Zur sicheren Abtötung durch die Zerstörung der Proteine der Mikroorganismen sind 180 °C über einen Zeitraum von mindestens 30min erforderlich.

Anwendungsbereich Dieses apparativ einfache Verfahren ist nur für nichtflüssige und hitzefeste Materialien geeignet.

Ausglühen. Das Ausglühen in der Flamme eines Gas- oder Elektrobrenners bis zur **Rotglut** ist die zuverlässigste Methode zur Sterilisation von Impfnadeln oder Impfösen aus Metall.

Gase

Ethylenoxid und **Formaldehyd** töten Mikroorganismen bei direktem Kontakt zuverlässig ab. Da beide Stoffe giftig sind und im Verdacht stehen, Krebs zu erzeugen, sind sie in ihrer Anwendung allerdings eingeschränkt.

Anwendungsbereich Als schonendes Verfahren für hitzeempfindliches Sterilisiergut.

Ionisierende Strahlen

Gamma-Strahlen zerstören als energiereiche Strahlen die Erbsubstanz der Mikroorganismen. Hohe Sicherheitsanforderungen verursachen allerdings große Kosten.

Anwendungsbereich Wegen der guten Durchdringung der Materialien sind Gamma-Strahlen besonders zur Sterilisation von wärmeempfindlichen und porösen Stoffen geeignet, z. B. für Kunststoffeinwegartikel.

Sterilfiltration von Flüssigkeiten

Membranfilter (Porenweite 0,2 µm). Beim Sterilfiltrieren von Flüssigkeiten werden lebende und tote Mikroorganismen (mit Ausnahme kleiner Viren) auf der Filteroberfläche zurückgehalten (**Entkeimungsfiltration**), da die Membranfilterporen kleiner als die Mikroorganismen sind.

Anwendungsbereich Die Sterilfiltration ist besonders für hitzeempfindliche Nährmedien, Arzneimittellösungen, Wasser und Getränke geeignet. Zur Sterilfiltration werden die Flüssigkeiten entweder mit Stickstoff oder Druckluft durch die sterile Membranfiltereinheit gedrückt (Druckfiltration) oder mit Unterdruck durchgesaugt (Vakuumfiltration).

Sterilfiltration von Luft

Eine Luft- und Gassterilisation, beispielsweise bei der Zu- und Abluft von Bioreaktoren, erfolgt als Entkeimungsfiltration durch sterile **Membranfilter** mit einer Porenweite zwischen 0,2 µm und 0,45 µm.

5.8 Desinfektion

Aufgabe:

- Lesen Sie den Text sorgfältig durch.
- Fassen Sie das Wichtigste in Form eines kleinen „Spickzettels“ möglichst übersichtlich zusammen.
- Auf ihrem Spicker dürfen höchstens zehn Wörter stehen!
- Später müssen Sie den Sachtext mit Hilfe ihres Spickers in freier Rede nacherzählen.

Desinfektion. Das beste Desinfektionsverfahren ist die Sterilisation. Allerdings lassen sich weder die Haut noch die Raumluft im Betrieb noch Anlagen und Maschinen absolut keimfrei machen.

Vor allem im medizinischen Bereich, aber auch im Produktionsbereich der pharmazeutischen-, biotechnologischen- und Lebensmittelindustrie müssen Mikroorganismen so weit wie möglich entfernt (keimarm) und **Krankheitserreger völlig ausgeschlossen** werden (Desinfektion). Das gelingt mit entsprechenden **Desinfektionsverfahren** und **Desinfektionsmitteln**. Bei ihrer Auswahl und Anwendung sind viele Faktoren zu berücksichtigen — so beispielsweise die Keimzahl, die Keimart, das Desinfektionsgut, die verfügbare Desinfektionszeit, die Temperatur, die Feuchtigkeit und der pH-Wert.

Einer erfolgreichen Desinfektion muss eine sorgfältige Reinigung vorausgehen (z. B. Händewaschen, Putzen und Scheuern), da dadurch bereits ein Großteil der Mikroorganismen beseitigt wird. Für Produktionsanlagen gibt es häufig kombinierte Reinigungs- und Desinfektionsverfahren, die in geschlossenen Anlagen üblicherweise als CIP-Verfahren (Cleaning in Place) betrieben werden. In Produktionsbetrieben wird die Desinfektion anhand eines Desinfektionsplans durchgeführt. Ständige Betriebskontrollen überwachen dabei die Wirksamkeit der Desinfektionsprogramme.

Physikalische Verfahren

Physikalische Verfahren umfassen das **Verbrennen** (z. B. von Einweggeräten und Einwegarbeitskleidung), das **Auskochen** (z. B. von Wäsche), die gerätebetriebene **Dampfdesinfektion** (z. B. von Decken, Betten, Matratzen u.a.) und die **UV-Bestrahlung** (z.B. von Raumluft und Geräteoberflächen). Durch **Pasteurisieren** (kurzzeitiges Erhitzen auf 60—85°C) werden Produkte (z.B. Milch und andere Lebensmittel) schonend **keimarm** und in jedem Fall frei von Krankheitserregern gemacht.

Chemische Verfahren

Chemische Verfahren sind geeignet für die **Hautdesinfektion** (Hände), die **Fließwegdesinfektion** (geschlossene Leitungswege und Behälter), die **Flächendesinfektion** (offene Flächen und Behälter), die **Umgebungsdesinfektion** (nicht produktberührende Oberflächen von Anlagen, Maschinen, Böden, Wände u.a.), die **Raumdesinfektion** (Luft in geschlossenen Räumen), die **Wäschedesinfektion** und die **Wasserdessinfektion** (Trink- und Badewasser).

Gasförmige Desinfektionsmittel: Mit **Ozon** und **Chlor** wird Trink- und Badewasser desinfiziert. Zur Umgebungs- und Raumdesinfektion in Produktionsbetrieben wird mit geeigneten Sicherheitsvorkehrungen eine wässrige **Formaldehydlösung** verdampft oder vernebelt.

Flüssige Desinfektionsmittel: enthalten als Wirkstoffe alleine oder in Kombinationen: Aldehyde, Phenolderivate, Halogene, quartäre Ammoniumverbindungen oder Alkohole. Außerdem werden geeignete Säuren und Laugen als Desinfektionsmittel verwendet.

Aldehyde werden zur Umgebungs- und Raumdesinfektion in Betrieben benutzt, die Sterilprodukte herstellen (pharmazeutische Industrie) oder in denen biotechnologische Produktionsprozesse ablaufen.

Phenolderivate sind häufig in Flächen- und Händedesinfektionsmitteln enthalten.

Halogene und **Halogenverbindungen** (z. B. Natriumhypochloritlösung) werden für die Wasserdesinfektion verwendet.

Quartäre Ammoniumverbindungen (Quats) sind geruchsfrei und hautfreundlich. Sie werden deshalb häufig zur Hände- und Flächendesinfektion verwendet.


Alkohole (z. B. Ethanol; Volumenkonzentration σ C₂H₅OH = 70%) sind schnell wirkende Desinfektionsmittel und für die Hände und rückstandsfreie Flächendesinfektion geeignet.

Die Wirkungsweise der Desinfektionsmittel beruhen auf der Gerinnung des Mikrobeneiweißes (z.B. Alkohole, Aldehyde, Phenolderivate) oder auf der Veränderungen der Zellmembran von Bakterien (Tenside).

Hinweis

Besonders bei flüssigen Desinfektionsmitteln und -Sprays sind die Gebrauchshinweise zur Dosierung und Anwendung genau zu beachten, damit alle Krankheitserreger sicher abgetötet werden. Auch ist ein 14-tägiger Wechsel der Desinfektionsmittel mit unterschiedlichen Wirkstoffen angebracht. Der Wechsel verhindert, dass Keime mit der Zeit gegen ein Desinfektionsmittel widerstandsfähig (resistent) werden und dann das Desinfektionsziel nicht zu erreichen ist.

5.9 Desinfektion - Sterilisation

 Aufgabe: 1. Definieren Sie die Begriffe Sterilisation und Desinfektion mit Hilfe des vorliegenden Lückentextes. Verwenden Sie dabei die unten angegebenen Begriffe.

Sterilisation

Unter diesem Begriff werden die Maßnahmen zusammengefasst, die der (Abtötung oder Abtrennung) dienen. Durch verschiedene **Sterilisationsverfahren** werden also Gegenstände, Einrichtungen und Arbeitsstoffe von vermehrungsfähigen Mikroorganismen befreit (.....). Sterile Kulturgefäße, Nährmedien und Arbeitsgeräte im mikrobiologischen Labor, sterile Bioreaktoranlagen und die Einhaltung der entsprechenden Sterilmaßnahmen im Biobetrieb sind die Grundvoraussetzungen der erfolgreichen und biotechnischen Produktion.


Desinfektion

Unter diesem Begriff werden alle Maßnahmen zusammengefasst, die einen Gegenstand in einen Zustand versetzen, in dem er nicht mehr infizieren kann. Die verschiedenen Desinfektionsverfahren bezwecken also die (Abtötung oder Inaktivierung). Der Erfolg von Sterilisations- und Desinfektionsverfahren muss regelmäßig durch geeignete Methoden überprüft werden. Eine Möglichkeit dazu bietet beispielsweise das Verfahren des Mikroorganismen – Nachweises mit der


Sterilisation inaktiviert

Desinfektion inaktiviert nur die

Begriffe: mikrobiologischen Arbeit, Entfernung von krankheitserregenden Mikroorganismen, Agarplatte, Entfernung aller Mikroorganismen, alle Mikroorganismen, krankheitserregenden Mikroorganismen, Entkeimung.


 Aufgabe: 2. Geben Sie die Standardsterilisationsbedingungen für folgende Verfahren an:

Sterilisationsverfahren	Sterilisationsbedingungen
Sterilisation im Autoklaven	
Heißluftsterilisation	


 Aufgabe: 3. Nennen Sie die geeignete Methode für das Sterilisieren von Impfösen oder Impfnadeln aus Metall.

 Aufgabe: 4. Ermitteln Sie mit Hilfe der vorliegenden Informationen geeignete Verfahren für die Sterilisation folgender Geräte und Flüssigkeiten.

Sterilisationsverfahren	Sterilisationsbedingungen
Agar	-----
Aminosäuren	-----
Antibiotikallösung	-----
Enzyme	-----
Glaspipetten	-----
Glaswaren	-----
Glucoselösung	-----
Membranfiltergeräte	-----
Pinzetten	-----
Proteinhaltige Lösungen	-----
Scheren	-----
Schläuche (Gummi, Silikon)	-----
Schraubverschlüsse (Kunststoff)	-----
Stopfen (Gummi, Watte, Silikon)	-----
Vitaminlösung	-----
Wasser	-----


 Aufgabe: 5. Zählen Sie Wirkstoffe flüssiger Desinfektionsmittel an.

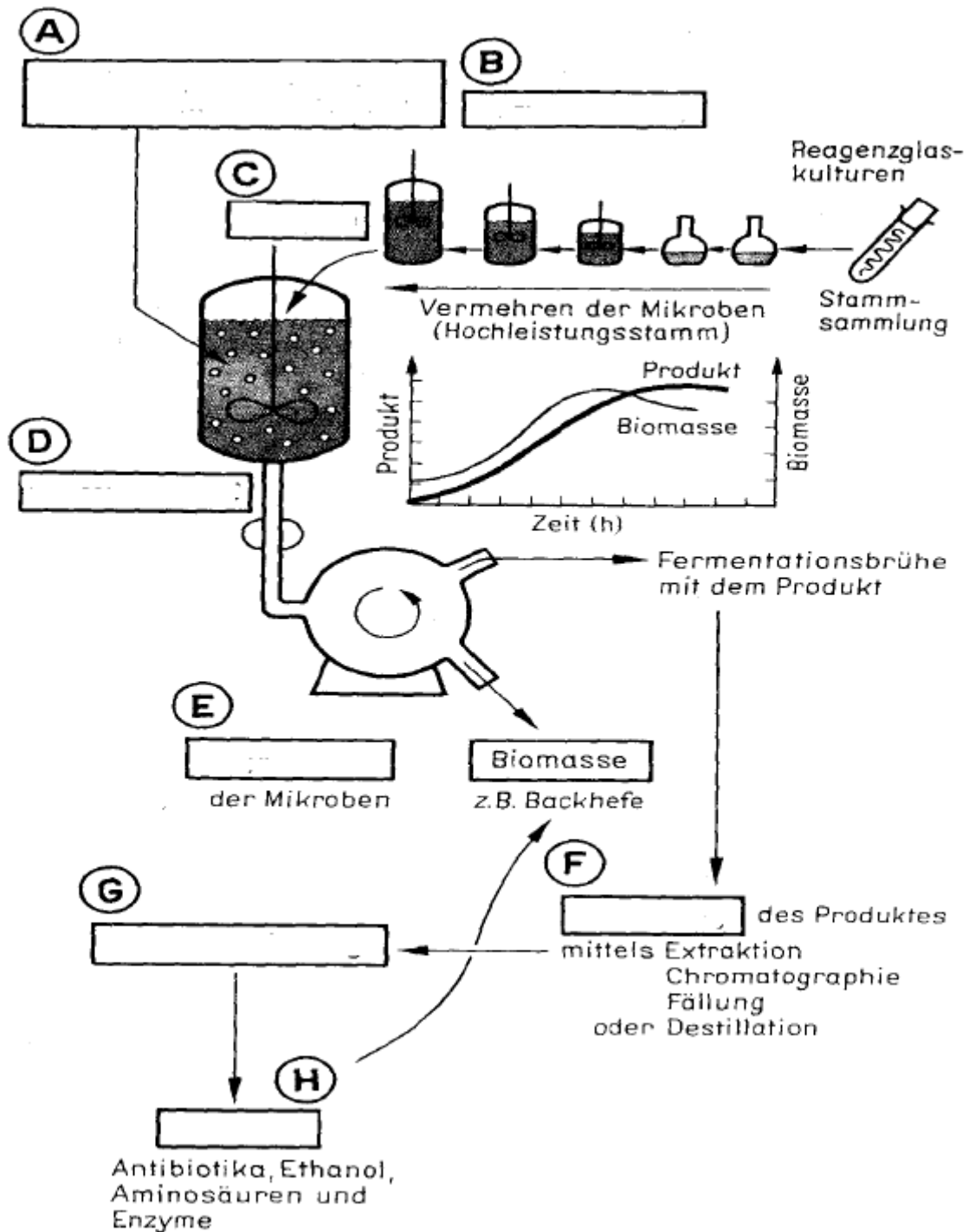
 Aufgabe: 6. Wie wirken Desinfektionsmittel?

 Aufgabe: 7. Beschreiben Sie, wie verhindert werden kann, dass Mikroorganismen gegen ein Desinfektionsmittel resistent werden.


6. Biotechnologie

6.1 Der biotechnologische Produktionsprozess

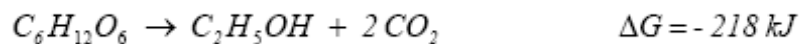
-  Aufgabe: 1. Beschriften Sie die einzelnen Phasen A-H eines biotechnologischen Produktionsprozesses.
2. In welche Abschnitte lässt sich der biotechnologische Produktionsprozess einteilen?




6.2 Herstellung von Bioalkohol durch alkoholische Gärung


 Grundlagen: Bringt man Hefepilze in eine verdünnte Zuckerlösung und schließt diese von Sauerstoff ab (anaerob) gedeihen sie trotzdem darin, ja sie vermehren sich sogar. Der Reaktionsgleichung). Übersteigt das bei der Gärung entstehende Ethanol den Anteil von 15 %, sterben die Hefepilze im eigenen Stoffwechselprodukt ab.

Reaktionsgleichung:



 Material:

- 500 mL Erlenmeyerkolben
- Reagenzglas
- Watte
- Gasableitungsrohr
- 500 mL Destillationsapparat mit Kolonne und Rücklaufteiler
- Pilzheizhaube

 Substanzen:

- Zucker
- Hefe
- VE-Wasser
- Barytwasser
- Cerammoniumnitrat
- Reagenzlösung

Versuchsdurchführung:

1. In einem 500 mL Erlenmeyerkolben werden 60 g Zucker in 300 mL VE-Wasser gelöst.
2. In einem kleinen Becherglas suspendiert man 4 g Backhefe in ca. 10 mL VE-Wasser und fügt die homogene Suspension der vorbereiteten Zuckerlösung zu.
3. Das Gasableitungsrohr der Versuchsanordnung taucht ca. 1 cm tief in ein Reagenzglas mit kalt gesättigtem, frisch filtriertem Barytwasser ein (Reagenzglas locker mit Watte verschließen).
4. Die Apparatur bleibt so mehrere Tage stehen. Der Ablauf der Gärung ist von Zeit zu Zeit zu beobachten und zu protokollieren.
5. Nach Beendigung der Gärung nach ca. 5 Tagen (keine Gasentwicklung mehr zu beobachten) wird die entstandene Suspension in einen 500 mL Destillationskolben filtriert. In einer Destillationsapparat mit 30 cm Kolonne und Rücklaufteiler (Rektifikation) wird der entstandene Alkohol bei Normaldruck abdestilliert (Siedesteine nicht vergessen!).
6. Das hergestellte Ethanol wird in einer Hauptfraktion mit einer Kopftemperatur von 78°C – 82°C abdestilliert (Destillationsprotokoll anfertigen).
7. Nach Beendigung der Destillation erfolgt der qualitative Nachweis des Ethanols mittels Cerammoniumnitrat – Reagenzlösung, erkennbar an der Rotfärbung der Lösung bei Zugabe des Ethanols.
8. Das abdestillierte Ethanol wird ausgewogen und zur Reinheitskontrolle die Brechzahl und eine gaschromatographische Untersuchung durchgeführt.

Auswertung:

Anzugeben ist die Ausbeute an Ethanol in Gramm und Prozent der Theorie, bezogen auf den Einsatz Zucker, die Siedetemperatur des Reinstoffes und die Brechzahl.