



Hochschule Neubrandenburg  
University of Applied Sciences

**Hochschule Neubrandenburg**

**Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften**

Studiengang Lebensmittel- und Bioprodukttechnologie

Wintersemester 2022/2023

## **Masterarbeit**

# Etablierung mikrobiologischer Untersuchungen in einem Labor

Zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science (M. Sc)

Verfasserin: Tanja Hindinger

URN: 2023-0581-2

Betreuer: Prof. Dr. Marco Ebert

Prof. Dr. Michael Sandmann

Neubrandenburg, 23.02.2023

## Abstract

This master's thesis focuses on two major microbiological analyses within these courses. Firstly, the bacteriological analysis of drinking water is described. In 2001, the 'Trinkwasser-verordnung' decree was passed in Germany to regulate the quality of drinking water. This decree also determines the standard procedure for analysing drinking water, with membrane filtration being one of them. In this thesis, the practicality of using membrane filtration for the course is demonstrated, as it is currently being taught in practical training using liquid enhancement with lactose broth. Secondly, the toxicity test using swarming bacteria and zinc sulfate is discussed. Due to the substitution rule, the university is required to replace harmful substances such as the bacteria *P. mirabilis* with a less harmful one such as *A. Brasiliense*. The substitution is tested in various experiments with different growth media, but the incorrect results of experiments with *A. Brasiliense* led to the conclusion that a substitution of *P. mirabilis* is not possible for the course. Additionally, the concentration of zinc sulfate for the toxicity test with *P. mirabilis* needs to be changed in the future.

# Inhaltsverzeichnis

ABSTRACT.....	2
INHALTSVERZEICHNIS .....	3
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	5
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	6
TABELLENVERZEICHNIS .....	7
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>8</b>
1.1.    MIKROBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN DER HOCHSCHULE NEUBRANDENBURG .....	8
1.2.    AUFBAU DER ARBEIT.....	8
<b>2. TRINKWASSERUNTERSUCHUNG .....</b>	<b>10</b>
2.1.    THEORETISCHE GRUNDLAGEN TRINKWASSERUNTERSUCHUNG .....	10
2.1.1. <i>Bakteriologische Wasseruntersuchung</i> .....	10
2.1.2. <i>Definition und Bedeutung coliformer Keime und Escherichia Coli</i> .....	11
2.1.3. <i>Plattenverfahren</i> .....	12
2.2.    MATERIAL UND METHODEN TRINKWASSERANALYSE .....	13
2.2.1. <i>Flüssiganreicherung in Lactosebouillon</i> .....	13
2.2.2. <i>Membranfiltration</i> .....	15
2.2.3. <i>Nährböden zur Bestimmung von coliformen Keimen</i> .....	16
2.2.4. <i>Materialien bakteriologische Wasseranalyse</i> .....	18
2.3.    VERSUCHE TRINKWASSERANALYSE.....	19
2.3.1. <i>Vorbereitung und Vorversuche Trinkwasseranalyse</i> .....	19
2.3.2. <i>Hauptversuch 1 Trinkwasser</i> .....	22
2.3.3. <i>Hauptversuch 2 Trinkwasser</i> .....	23
2.4.    ERGEBNISSE TRINKWASSERANALYSE .....	23
2.4.1. <i>Ergebnisse Hauptversuch 1 Trinkwasseranalyse</i> .....	23
2.4.2. <i>Ergebnisse Hauptversuch 2 Trinkwasseranalyse</i> .....	26
2.4.3. <i>Fehlerbetrachtung</i> .....	28
2.5.    BEURTEILUNG TRINKWASSERANALYSE PRAKTIKUM.....	29
<b>3. SCHWÄRMHEMMTEST .....</b>	<b>31</b>
3.1.    THEORETISCHE GRUNDLAGEN SCHWÄRMHEMMTEST .....	31
3.1.1. <i>Toxizitätstest</i> .....	31
3.1.2. <i>Bakterielles Schwärmverhalten</i> .....	31
3.1.3. <i>Schwärmverhalten P. mirabilis und A. brasilense</i> .....	32
3.1.4. <i>Taxonomie und Merkmale von P. mirabilis und A. brasilense</i> .....	34

3.2.	MATERIAL UND METHODEN SCHWÄRMHEMMTEST .....	35
3.2.1.	<i>Zinksulfat</i> .....	35
3.2.2.	<i>Schwärmagar</i> .....	36
3.2.3.	<i>Optische Dichte von Zellsuspensionen</i> .....	37
3.2.4.	<i>Materialien und Geräte zur Durchführung</i> .....	37
3.2.5.	<i>Durchführung Toxizitätstest</i> .....	38
3.3.	VERSUCHE TOXIZITÄTSTEST .....	39
3.3.1.	<i>Vorversuche P. mirabilis und A. brasilense</i> .....	39
3.3.2.	<i>Hauptversuch 1 mit Tween 80 und A. brasilense</i> .....	40
3.3.3.	<i>Hauptversuch 2 mit P. mirabilis und A. brasilense</i> .....	41
3.4.	ERGEBNISSE .....	42
3.4.1.	<i>Ergebnisse Vorversuche mit P. mirabilis und A. brasilense</i> .....	42
3.4.2.	<i>Ergebnisse Hauptversuch 1 Schwärmhemmtest</i> .....	43
3.4.3.	<i>Ergebnisse Hauptversuch 2 Schwärmhemmtest</i> .....	47
3.4.4.	<i>Auswertung Schwärmhemmtest</i> .....	49
3.4.5.	<i>Fehlerbetrachtung Schwärmhemmtest</i> .....	49
3.5.	BEURTEILUNG SUBSTITUTION <i>P. MIRABILIS</i> DURCH <i>A. BRASILENSE</i> IM TOXIZITÄTSTEST .....	51
<b>4.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>53</b>
<b>5.</b>	<b>LITERATUR</b> .....	<b>55</b>
<b>ANHANG</b>	.....	<b>57</b>
	ANHANG 1: PRAKTIKUMSANLEITUNG „BAKTERIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG VON WASSER“ .....	57
	ANHANG 2: PRAKTIKUMSANLEITUNG „TOXIZITÄTSTEST MIT BAKTERIEN“ .....	61
	<b>ERKLÄRUNG ZUR SELBSTSTÄNDIGEN ANFERTIGUNG DER ARBEIT</b> .....	<b>62</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ISO	= Internationale Organisation für Normung
DIN	= Deutsches Institut für Normung
EN	= Europäische Norm
TrinkwV	= Trinkwasserverordnung
BGBl	= Bundesgesetzblatt
CCA	= Coliforme chromogen Agar
KBE	= Koloniebildende Einheit
GKZ	= Gesamtkeimzahl

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Filtrationsanlage Labor .....	16
Abbildung 2: Schema Aufbau Membranfiltration (Stoffels-Schmid, 2015).....	16
Abbildung 3: Verdünnungsreihe von E. coli im Hauptversuch 1 .....	22
Abbildung 4: Auswertung Lactosebouillon Hauptversuch 1 .....	25
Abbildung 5: Wachstum E. coli auf CCA Agar.....	25
Abbildung 6: E. coli in DEV Agar.....	25
Abbildung 7: Lactosebouillon Hauptversuch 2.....	27
Abbildung 8: E. coli auf Endo Agar .....	27
Abbildung 9: Auswertung Indolreaktion und Lactoseverwertung .....	27
Abbildung 10: Reduzierte Farbintensität in Abhängigkeit der Lagerzeit von CCA Agar.....	28
Abbildung 11: Wachstum Fremdkeime auf CCA Agar Hauptversuch 2.....	29
Abbildung 12: Fortbewegungsarten von Bakterien.....	31
Abbildung 13: Wachstum P. mirabilis auf Schwärmagar.....	33
Abbildung 14: Schema Schwämmuster P. mirabilis (Jose und Singh 2020) .....	33
Abbildung 15: Optische Dichte in Abhängigkeit der Zeit Vorversuche.....	42
Abbildung 16: Schwärmagarplatten Vorversuche .....	43
Abbildung 17: Optische Dichte in Abhängigkeit der Zeit Hauptversuchen .....	44
Abbildung 18: Schwärmagar mit 0,8% Agar mit und ohne Tween, Zinksulfat c=0.....	45
Abbildung 19: Auswertung Durchmesser A. brasilense in Abhängigkeit von Agarkonzentration und Zinksulfatkonzentration .....	46
Abbildung 20: Unterschiede Schwärmagar 1% Agar mit Tween 80 .....	47
Abbildung 21: Überwucherte Platten Hauptversuch 1, 0,8% Agar, Tween 80 .....	48
Abbildung 22: Hauptversuch 2 P. mirabilis mit Zinksulfatkonzentration c=0 bis c=1000 .....	48
Abbildung 23: Auswertung Durchmesser P. mirabilis höhere Zinksulfatkonzentration .....	49

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Allgemeine Anforderungen an Trinkwasser TrinkwV Anlage 1 Teil 1 (BGBl, 2001)	10
Tabelle 2: Auswertung Bunte Reihe zum Nachweis von E.Coli (Hochschule Neubrandenburg, 2022a)	15
Tabelle 3: Materialübersicht Durchführung Wasseranalyse	18
Tabelle 4: Planung Vorversuch Trinkwasseranalyse	20
Tabelle 5: Übersicht Proben und Nährböden Hauptversuch 2	23
Tabelle 6: Nachweis E.Coli Hauptversuch 1	24
Tabelle 7: Auswertung Gesamtkeimzahl Hauptversuch 1	24
Tabelle 8: Auswertung Nachweis E. Coli Hauptversuch 2	26
Tabelle 9: Auswertung Gesamtkeimzahl Hauptversuch 2 mit arithmetischen Mittel	26
Tabelle 10: Eigenschaften A. brasilense und P. mirabilis	35
Tabelle 11: Materialien zur Durchführung Toxizitätstest	37
Tabelle 12: Geräte zur Durchführung Toxizitätstest	38
Tabelle 13: Vorversuche Schwämmtest Übersicht	40
Tabelle 14: Variationen des Hauptversuchs 1	40
Tabelle 15: Darstellung Versuchsvarianten Hauptversuch 2	41

# 1. Einleitung

## 1.1. Mikrobiologische Untersuchungen an der Hochschule Neubrandenburg

In den Modulen „Grundlagen der Mikrobiologie und Biochemie“ und „Qualitätsmanagement und Lebensmittelmikrobiologie“ sind verschiedene mikrobiologische Untersuchungen ein wichtiger Bestandteil des Praktikums. In dieser Masterarbeit sollen zwei mikrobiologische Untersuchungen der Praktika genauer betrachtet und optimiert werden. Hierbei handelt es sich um die bakteriologische Wasseranalyse und den Toxizitätstest.

Die bakteriologische Wasseranalyse wird derzeit an der Hochschule Neubrandenburg im Modul „Qualitätsmanagement und Lebensmittelmikrobiologie“ anhand der Flüssiganreicherung mit Lactosebouillon durchgeführt. (Hochschule Neubrandenburg, 2022a) Die Flüssiganreicherung wird seit der Einführung der Membranfiltration und des Colilert-18-Verfahrens nicht mehr als Referenzmethode für die bakteriologische Trinkwasseruntersuchung genutzt (BGBl, 2001). In dieser Arbeit soll die derzeitige Praktikumsmethode der Flüssiganreicherung mit dem aktuellen Membranfiltrationsverfahren verglichen und anschließend im Praktikum etabliert werden.

Neben der bakteriologischen Wasseranalyse werden noch weitere Versuche zum Toxizitätstest aus dem Modul „Grundlagen der Mikrobiologie und Biochemie“ durchgeführt. Aufgrund der BioStoffverordnung ist die Hochschule dazu verpflichtet die Studierenden während des Praktikums bestmöglich vor gefährlichen Biostoffen zu schützen (BGBl, 2013). Im Toxizitätstest wird derzeit *Proteus Mirabilis* verwendet, welches ein Bakterium der Risikogruppe 2 ist (Europäisches Parlament, 2000; Hochschule Neubrandenburg, 2022b). Zur Minimierung des Risikos soll in dieser Arbeit eine mögliche Substitution von *Proteus Mirabilis* mit dem Bakterium *Azospirillum Brasilense* untersucht werden. *Azospirillum Brasilense* ist ein Bakterium der Risikogruppe 1 und gehört ebenfalls zu den schwärmenden Bakterien. Es soll getestet werden, ob die Praktikumsmethode auf *Azospirillum Brasilense* angepasst werden kann. Hierfür wird eine Studie von Niu et al (2005), sowie die Studienarbeit von Krangemann (2022) genutzt. Es wird Tween 80 als Schwärmhilfsstoff eingesetzt, um das Schwärmverhalten von *Azospirillum Brasilense* zu verbessern. Neben der Substitution werden weitere Versuche zur Zinksulfatkonzentration des Toxizitätstests durchgeführt. Die Umsetzbarkeit innerhalb der Praktikumszeit, sowie die Anschaulichkeit des Versuches stehen hierbei im Fokus.

## 1.2. Aufbau der Arbeit

Für die durchgeführten Versuche werden in dieser Arbeit zunächst die beiden Teilgebiete der bakteriologischen Wasseruntersuchung und der Toxizitätstests thematisch aufgebaut.



Zu Beginn der Arbeit werden die theoretischen Grundlagen und die Bedeutung der Trinkwasserordnung für die bakteriologische Trinkwasseruntersuchung beschrieben. Diese Grundlagen werden in der Methodik und Versuchsdurchführung praktisch angewandt. Für den Vergleich der Flüssiganreicherung mit der Membranfiltration werden Trinkwasserproben aus dem Labor, sowie mit *Escherichia Coli* beimpftem, destilliertem Wasser verglichen. Es werden Vorversuche zur Bestimmung der Methodik durchgeführt und die gewonnenen Ergebnisse in Hauptversuchen zur Bestimmung der Nachweisgrenze umgesetzt. Anschließend wird der Versuch noch auf seine Praktikabilität für das Praktikum des Moduls „Qualitätsmanagement und Lebensmittelmikrobiologie“ an der Hochschule Neubrandenburg beurteilt.

Der thematische Aufbau des Toxizitätstests gestaltet sich ähnlich. In dieser Arbeit soll die Substitution von *Proteus Mirabilis* mit dem ungefährlicheren Bakterium *Azospirillum Brasilense* geprüft werden. Für die Substitution ist das Verständnis der theoretischen Grundlagen zum Schwärmverhalten von *Proteus Mirabilis* und *Azospirillum Brasilense* wichtig. Diese Grundlagen zum Schwärmverhalten, sowie der Toxizitätstest werden auch hier in der Methodik festgelegt. Die Vorversuche dienen vorerst der weiteren Bestimmung der Methodik zur Durchführung des Schwärmhemmtests mit *Azospirillum Brasilense*. In den Hauptversuchen werden verschiedene Möglichkeiten für den Schwärmhemmtest untersucht und verglichen. Die erhaltenen Ergebnisse werden ausgewertet und fließen in die Beurteilung der Substitution von *Proteus Mirabilis* mit *Azospirillum Brasilense* für den Schwärmhemmtest mit ein. Zum Schluss wird die Versuchsmethodik auf die Umsetzbarkeit für das Praktikum des Moduls „Grundlagen der Mikrobiologie und Biochemie“ an der Hochschule Neubrandenburg beurteilt.

## 2. Trinkwasseruntersuchung

### 2.1. Theoretische Grundlagen Trinkwasseruntersuchung

#### 2.1.1. Bakteriologische Wasseruntersuchung

Die bakteriologische Wasseruntersuchung dient der Bestimmung der Bakterienanzahl in einer Wasserprobe. Zur Erhaltung bestimmter Wasserqualitäten wurden nationale Gesetze und Verordnungen, sowie internationale Richtlinien erlassen. Die Gesundheitsämter überwachen gesetzliche Pflichten, sowie Wassergewinnungs- und Wasserversorgungsanlagen. Bundesländer und ihre Behörden sind verantwortlich für die Trinkwasserqualität. (BMG, 2022)

Nach Zustimmung des Bundesrates erließ das Bundesministerium für Gesundheit im Jahr 2001 die Trinkwasserverordnung (TrinkwV). Diese Verordnung setzt die EG-Richtlinien zur Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch in nationales Recht um. Aufgrund der nationalen Gesundheitsschutzregelungen sind die Vorgaben in der Trinkwasserverordnung teilweise strenger als in den EG-Richtlinien verankert. (Jankowski, 2013)

In der Trinkwasserverordnung wird der Begriff „Trinkwasser“ und die Anforderungen daran festgelegt. Sie regelt die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (TrinkwV 2001) §2 Abschnitt 1. Die Trinkwasserverordnung bezeichnet Trinkwasser als „Wasser, das im ursprünglichen Zustand oder nach Aufbereitung um Trinken, zum Kochen, zur Zubereitung von Speisen und Getränken oder insbesondere zu häuslichen Zwecken[...] bestimmt ist“ (TrinkwV 2001 §3 Abschnitt 1a). Es muss gewährleistet sein, dass der Genuss oder Gebrauch von Trinkwasser keinen Schaden auf die menschliche Gesundheit nimmt. Des Weiteren dürfen im Trinkwasser keine Krankheitserreger in einer solchen Konzentration enthalten sein, in der sie die Gesundheit des Menschen gefährden könnten. (TrinkwV 2001, § 5, Abschnitt 1). Die jeweiligen Grenzwerte für mikrobiologische Parameter werden in der Anlage 1 der Trinkwasserverordnung festgelegt (siehe Tabelle 1). (BGBl, 2001)

Tabelle 1: Allgemeine Anforderungen an Trinkwasser TrinkwV Anlage 1 Teil 1 (BGBl, 2001)

Parameter	Grenzwert KBE/100ml
<i>Escherichia coli</i>	0/100 ml
Enterokokken	0/100 ml

Besonders coliforme Keime gelten in der Trinkwasseranalytik als Indikatorkeime für fäkale, aber auch für nichtfäkale Verunreinigungen. Der Nachweis von coliformen Keimen im

Trinkwasser weist somit stets auf einen nicht akzeptablen Zustand hin und erfordert Maßnahmen zur Ursachenklärung und Kontrolle. Zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von coliformen Keimen und *Escherichia Coli* wurden über die Jahre mehrere bewährte und neue Verfahren eingesetzt. Neben der Flüssiganreicherung wurde mit der DIN EN ISO 9308-1 auch die Membranfiltration mit chromogener coliforme Agar (CCA Agar) als Referenzmethode eingeführt. Ein weiteres beliebtes Verfahren ist das Colilert-18-Verfahren. Bei jedem der Verfahren ist der Nachweis von coliformen Keimen in 100ml bereits eine Überschreitung des Grenzwertes. Bei Wiederholungsuntersuchungen sollte stets dasselbe Verfahren genutzt werden. (BMG, 2009)

### **2.1.2. Definition und Bedeutung coliformer Keime und *Escherichia Coli***

Der Begriff „Coliforme Bakterien“ wird für verschiedene Bakterien der *Enterobacteriaceae* verwendet. Hierzu zählen die Gattungen *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* und *Citrobacter*. Es handelt sich hierbei um gramnegative, stäbchenförmige, fakultativ anaerobe Bakterien. Sie sind Indikatorkeime für die Qualität von Lebensmitteln und Trinkwasser. Coliforme Bakterien befinden sich im Darm von Menschen und warmblütigen Tieren. Durch Fäkalien, Abwasser oder mangelnde Hygiene können diese in Gewässer und Lebensmittel gelangen. Besonders *Escherichia Coli* wird als Fäkalindikator in Untersuchungen herangezogen. Coliforme Keime können natürlich auch im Boden und im Oberflächenwasser vorkommen und sind daher nicht zwangsläufig fäkalen Ursprungs. *Escherichia Coli* hingegen hat sein Vorkommen im Darm und ist daher ein guter Indikator für die fäkalen Verunreinigungen. (Gunkel, 1994)

Verunreinigte Gewässer durch Fäkalien und weiteren Krankheitserregern führen zu einer Einschränkung der Wassernutzung. Eine Infektion mit coliformen Keimen kann zu wässrigen Durchfällen, Übelkeit, Erbrechen und Bauchschmerzen führen. Infektionen mit dem enterohämorrhagischen *Escherichia Coli* (EHEC), beispielsweise, kommen sehr selten vor, können aber bei Kindern zu einem hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) führen. Hierbei werden rote Blutkörperchen zerstört und es kommt zu einer Blutgerinnungsstörung. Die Nierenfunktion wird eingeschränkt und es können neurologischen Veränderungen auftreten. (BFR, 2018)

Die stete Kontrolle der Wasserqualität ist wichtig, um Fehler im Aufbereitungssystem oder auch im Verteilungsnetz aufzudecken und diese schnell bereinigen zu können. In der Trinkwasserverordnung sind hierfür auch die Probennahme sowie die regelmäßigen Kontrollen festgelegt. (BGBI, 2001)

### 2.1.3. Plattenverfahren

Die Plattenverfahren bezeichnen die Kultivierung von Bakterien in einem festen Nährmedium. Das feste Nährmedium besteht aus Gelatine, Agar-Agar oder Natriumsilikat, welches Nährstoffe und weitere selektive Substanzen enthält. Abhängig vom Untersuchungsziel werden Bakterien auf verschiedenen Nährbodenarten unterschiedlich kultiviert. Hierbei unterscheidet man zwischen Selektiv- und Differenzierungsmedien. Selektivmedien fördern das Wachstum einer bestimmten Gattung von Bakterien und hemmen dabei andere Arten. Anreicherungsmedien sind ähnlich. Hier wird das Wachstum einer Bakterienart in einer Mischprobe gegenüber anderen Keimen beschleunigt. Differenzierungsmedien dienen der Bestimmung mehrerer Bakterienarten nebeneinander durch die Bildung unterschiedlicher, charakteristischer Kolonien. (Bast, 2014)

In der bakteriologischen Wasseruntersuchung werden hauptsächlich selektive Nährböden verwendet, deren Inhaltsstoffe und Zusammensetzung das Wachstum des nachzuweisenden Organismus fördern und gleichzeitig unerwünschte Begleitorganismen hemmen können.

Die Nährmedien werden in sterile Petrischalen gegossen. Diese werden mit einer geringen Menge an Probematerial beimpft und anschließend im Brutschrank bei einer konstanten Temperatur bebrütet. Die Bakterien vermehren sich und Kolonien werden sichtbar. Nach der spezifischen Inkubationszeit werden die Platten ausgezählt. Die Temperatur für das optimale Wachstum ist bei jeder Bakterienart unterschiedlich. Hierdurch lassen sich bereits einige Bakterien qualitativ differenzieren. (Bast, 2014)

Die Identifizierung von Bakterien erfolgt durch Form, Größe und Farbe der Kolonien. Der Zusatz von chromogenen Substanzen, wie beim coliforme chromogen Agar, kann ein weiteres Erkennungsmerkmal schaffen, da hierbei spezifische Stoffwechselprodukte der Bakterien in Farbkomplexe umgesetzt werden und die Kolonien anfärben.

Zur Beimpfung der Nährböden können verschiedene Verfahren genutzt werden.

- Oberflächenausstrich

Mit einer Impföse wird auf den ausgehärteten Nährbodenplatten die Probe ausgestrichen. Die Bakterien wachsen nur auf der Oberfläche des Nährbodens. Diese Methode wird immer dann eingesetzt, wenn es sich um einen Indikator-Agar handelt, bei dem eine eindeutige Farbreaktion mit den Kolonien stattfinden muss. Abweichende Färbungen entstehen vor allem bei eingemischten Kolonien, da beispielsweise unter der Oberfläche andere Sauerstoffverhältnisse herrschen können. (Bast, 2014)

- Verdünnungsausstrich

Werden einzelne, gut isolierte Kolonien benötigt, wird die Probe schrittweise durch den Ausstrich verdünnt. Der bekannteste Ausstrich ist der 3-Ösen-Ausstrich, bei dem die Öse je nach einem Drittel während des Ausstreichens abgeflammt wird. Somit erzielt man einzelne Kolonien, die in ihrer Morphologie gut beschrieben werden können. Die Bakterien wachsen nur an der Oberfläche des Nährbodens. (Bast, 2014)

- Plattengussverfahren

Hierbei wird ein Teil der flüssigen Probe in die Petrischale gegeben und mit dem flüssigen Nährboden übergossen. Die Probe wird durch Achter-Bewegungen mit dem Nährboden vermischt. Die Anwendung dieser Methode ist vor allem bei beweglichen Bakterien optimal, da diese nicht auf der Oberfläche schwärmen können. Es bilden sich kleinere und kompaktere Kolonien als bei den Oberflächenverfahren. (Hütter, 1994)

Zur quantitativen Bestimmung der Keimzahl werden die Kolonien unter einem Keimzählgerät mit 6-8-facher Vergrößerung ausgezählt. Das Ergebnis der Koloniezählung wird in „Koloniebildenden Einheiten pro Milliliter“ (KBE/ml) angegeben. Die Zahl der Kolonien pro Platte sollte zwischen 30 und 300 liegen. Bei hoher Keimdichte zählt man nur einige zufällig ausgewählte Quadrate im Sichtfeld und bestimmt mit dem Mittelwert dieser Einzelzählungen die Gesamtzahl pro Platte. Ist die Keimdichte auf der Platte zu hoch ( $\gg 300$ /Platte) muss der Ansatz mit höheren Verdünnungen wiederholt werden. Die Verdünnung erfolgt in der Regel in Zehnerpotenzen. (Bast, 2014)

## **2.2. Material und Methoden Trinkwasseranalyse**

### **2.2.1. Flüssiganreicherung in Lactosebouillon**

In der alten Trinkwasserverordnung von 1990 wurde die Flüssiganreicherung in der Lactosebouillon bei 36°C vorgeschrieben. Hierbei wird zunächst die Probe mit gleicher Menge, meist 100ml, doppelt konzentrierter Lactosebouillon vermischt und mit einem Dürhamröhrchen versehen. Die Lactosebouillon wird für einen Tag bei 36°C bebrütet.

Wenn eine Farbveränderung und Gasbildung vorliegt wird aus der Bouillon eine Subkultur auf Endo-Agar angelegt. Dieser wird erneut einen Tag bei 36°C bebrütet. Zur Bestimmung der coliformen Keime und *Escherichia Coli* werden die gewachsenen Kolonien des Endo Agars weiter analysiert.

Ein Röhrchen mit Tryptophanbouillon wird mit verdächtigen Kolonien des Endo Agars beimpft und für drei Stunden im Brutschrank bei 36°C bebrütet. Nach den drei Stunden werden

Röhrchen mit Glucose- und Lactosebouillon beimpft und je eine Platte mit Citrat-Agar und eine mit DEV Agar ausgestrichen. Alle Reagenzgläser wurden bereits mit Dürramröhrchen autoklaviert, um eine spätere Gasbildung erkennen zu können. Die Röhrchen und Nährböden werden einen Tag bei 36°C bebrütet. Es werden folgende Stoffwechselreaktionen in Form einer „Bunten Reihe“ durchgeführt: (Süßmuth et al., 1999)

- Prüfung auf Indolbildung

Gewisse Bakterien haben die Fähigkeit, aus dem Tryptophan abgebauter Eiweiße, Indol zu bilden. Diese Substanz lässt sich im Medium mit einer Testlösung nachweisen. Das hierfür verwendete Reagens ist das Kovacs' Reagens. Nachdem das beimpfte Tryptophanbouillon-Röhrchen für 24h bei 36°C bebrütet hat, werden einige Tropfen der Kovacs' Reagens hinzugegeben. Verfärbt sich die Oberfläche rot ist das Ergebnis positiv.

- Oxidase-reaktion

Oxidasen sind Enzyme, die Oxidationsvorgänge im Bakterienstoffwechsel katalysieren. Sie finden sich vor allem bei obligaten Aeroben wie *Pseudomonas*. Zum Nachweis der Oxidasen bedient man sich gewisser Redox-Farbstoffe, wie z.B. N,N-Dimethyl-p-phenylendiaminhydrochlorid. Durch Einwirkung der Bakterien-Oxidase nehmen diese, im reduzierten Zustand farblosen Reagenzien, eine schwarzbraune bzw. blauviolette Farbe an. Der Test wird mit Hilfe von Teststreifen durchgeführt. Die Kolonien des DEV Agar werden mit der Impföse auf die Teststreifen eingerieben. Verfärbt sich der Teststreifen blauviolett, ist das Ergebnis positiv. Bei einer Gelbfärbung handelt es sich um *E.coli*.

- Glucose- und Lactosespaltung

Der Nachweis der Lactosespaltung wird mit Hilfe eines Röhrchens mit Lactosebouillon, sowie eines mit Glucosebouillon durchgeführt. Das Durhamröhrchen im Reagenzglas hilft dabei spätere Gasbildung nachweisen zu können. Das überimpfte Röhrchen wird 24h bei 36°C bebrütet. Ein Farbumschlag weist auf die Bildung von Säure hin und Luft im Durhamröhrchen auf Gasbildung. Bei Farbumschlag und Gasbildung ist der Test positiv zu bewerten.

- Citratverwertung

Für die Prüfung auf Citratverwertung wird der Simmons-Citrat-Agar verwendet. Hierbei können gramnegative Enterobakterien auf Basis von Natriumcitrat als Kohlenstoff und anorganisches Salz als Stickstoffquelle identifiziert werden. *Escherichia Coli* wächst

nicht auf diesem Nährmedium. Somit ist der Test bei keinem Wachstum negativ zu bewerten. (Carl Roth Deutschland, 2022a)

Alle Stoffwechselreaktionen werden nach 24h ausgewertet. Ob es sich bei den vorliegenden Bakterien um *Escherichia Coli* oder coliforme Keime handelt, kann mit Hilfe der Tabelle 2 genauer bestimmt werden.

Tabelle 2: Auswertung Bunte Reihe zum Nachweis von *E.Coli* (Hochschule Neubrandenburg, 2022a)

	<i>E. coli</i>	coliforme Keime
Oxidasereaktion	-	-
Indolbildung	+	-(+)*
Citratverwertung	-	+(-)**
Lactosespaltung	+	-(+)**
Glucosespaltung	+	-(+)**

\* positive Reaktion möglich

\*\* negative Reaktion möglich

\*\*\* Positive Reaktion möglich, jedoch nur, wenn die Indolreaktion negativ ausfällt.

Bei dieser Methode lässt sich lediglich die Anwesenheit coliformer Keime und *Escherichia Coli* feststellen. Es handelt sich um keine quantitative Methode. Für eine quantitative Auswertung der KBE/100ml wird das Membranfiltrationsverfahren genutzt. (Süßmuth et al., 1999)

### 2.2.2. Membranfiltration

In der neuen Trinkwasserverordnung wird das Untersuchungsverfahren unter §15 der DIN EN ISO 9308 als Standardmethode zur Untersuchung nach coliformen Bakterien und *Escherichia Coli* festgelegt (BGBl, 2001). Bei der Membranfiltration wird die Wasserprobe durch einen Membranfilter mit einer nominellen Porengröße von 0,2 oder 0,45 µm unter Vakuum filtriert. Dieses Verfahren beinhaltet mehrere Arbeitsschritte, um den Nachweis von coliformen und fäkalcoliformen Bakterien zu bestätigen. Es werden 100ml filtriert, da die Grenzwerte sich auch auf KBE/100ml beziehen. Der Membranfilter wird nach der Filtration auf den spezifischen Nährboden gegeben und bebrütet. Der Aufbau der Filtrationsanlage ist in der Abbildung 1 und Abbildung 2 zu sehen. (Stoffels-Schmid, 2015)



Abbildung 1: Filtrationsanlage Labor

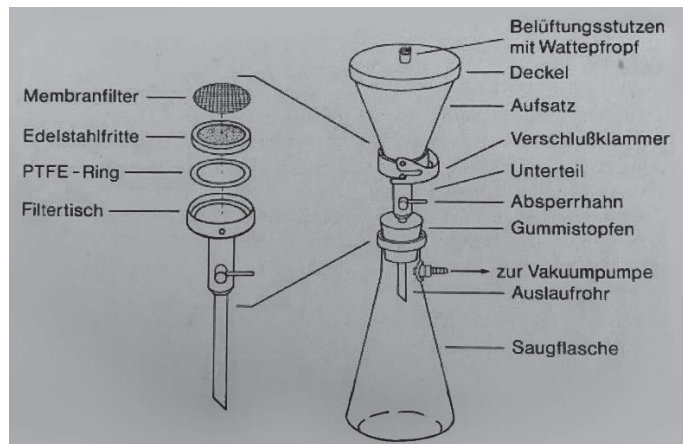


Abbildung 2: Schema Aufbau Membranfiltration (Stoffels-Schmid, 2015)

In der DIN EN ISO 9308 wird der Nachweis nach *Escherichia Coli* und coliformen Keimen mit Hilfe des Laktose-TTC-Agars mit Tergitol-7 durchgeführt. Laktoseverwertende Bakterien, zu denen die coliformen Bakterien zählen, wachsen auf diesem Medium als gelbe bis gelb-orange Kolonien. Sie erzeugen eine entsprechende Verfärbung des Mediums und sind coliform verdächtig. Weisen diese im Oxidase-Test eine negative Reaktion auf, gelten sie als coliforme Bakterien. Sind die verdächtigen Kolonien in der Lage zusätzlich auf Tryptophan bei 44 °C Indol zu bilden, gilt der Nachweis für *E. coli* als erbracht.

Das Verfahren mit Laktose-TTC-Agar kann nur mit sehr sauberen Gewässern angewandt werden, da sich die Begleitflora auf das Ergebnis auswirkt. Dadurch können falsch negative und falsch positive Ergebnisse entstehen. (Botzenhart et al., 2008)

In den moderneren Verfahren wird der Coliforme Chromocult Agar (CCA) verwendet, um eine schnellere Identifizierung der coliformen Keime und *Escherichia Coli* Keime zu erhalten. Die Begleitflora sollte allerdings auch hier nicht zu groß sein, da sich die Ergebnisse verändern können.

Als alternative Methode zur Membranfiltration wird in der Trinkwasserverordnung auch das Colilert-18/Quanti-Tray Verfahren angegeben. (Botzenhart et al., 2008)

### 2.2.3. Nährböden zur Bestimmung von coliformen Keimen

#### Endo Agar

Der Endo Agar dient dem Nachweis von coliformen und fäkalcoliformen Bakterien (*Escherichia coli*). Die Inkubationstemperatur liegt bei 35-37°C. Der Endo Agar von Roth hat folgende Zusammensetzungen in Gramm je Liter:



- Pepton 10,0
- Di-Kaliumphosphat 3,5
- Lactose 10,0
- Natriumsulfit 2,5
- Agar-Agar 10,0

Natriumsulfit und Fuchsin hemmen grampositive Bakterien. *E. coli* und Coliforme verwerten Laktose unter Bildung von Aldehyd und Säure. Aldehyd setzt Fuchsin aus der Fuchsin-Sulfid Verbindung frei, welches dann die Kolonien rot anfärbt. Bei *E. coli* ist diese Reaktion so intensiv, dass das Fuchsin auskristallisiert und dadurch den Kolonien einen grünschimmernden, beständigen Metallglanz (Fuchsinglanz) verleiht. Die Coliforme zeigen keinen Fuchsinglanz. (Carl Roth Deutschland, 2022b)

In der Flüssiganreicherung wird der Endo Agar für die weitere Analyse nach *Escherichia Coli* verwendet.

### **Coliforme Chromogener Agar**

Der coliforme chromogen Agar (CCA) ermöglicht eine schnelle Identifizierung von Bakterien durch den Nachweis charakteristischer Enzyme. Hierbei handelt es sich um einen Selektivagar zum gleichzeitigen Nachweis von coliformen und fäkalcoliformen Bakterien bei der bakteriologischen Untersuchung von Wasser und Lebensmitteln. Der CCA Agar setzt sich wie folgt zusammen in g je Liter:

- Natriumchlorid 5,0
- Di-Natriumhydrogenphosphat 2,7
- Natriumdihydrogenphosphat 2,2
- Hefeextrakt 2,0
- Casein, enzymatisch verdaut 1,0
- Natriumpyruvat 1,0
- Tryptophan 1,0
- Sorbitol 1,0
- Chromogene 0,4
- Natriumheptadecylsulfat 0,15
- Agar-Agar 10

Durch die Kombination von geeigneten Peptonen, Pyruvat, Sorbit und Phosphatpuffer wird ein schnelles Anwachsen auch von subletal geschädigten coliformen Bakterien gewährleistet. Der Gehalt an Tergitol-7 hemmt weitgehend das Wachstum grampositiver und einiger

gramnegativer Bakterien, ohne Einflüsse auf das Wachstum der coliformen Keime zu haben. Der simultane Nachweis von coliformen Keimen und *E.coli* wird durch die neue Kombination von zwei chromogenen Substanzen möglich. Das Substrat Salmon-GAL wird durch die Coliforme charakteristische  $\beta$ -D-Galactosidase gespalten und bewirkt eine rosarote Färbung der Coliformen-Kolonien. Der Nachweis, der für *E. coli* charakteristischen  $\beta$ -D-Glucuronidase erfolgt über das Substrat X-Glucuronid, das eine Blaufärbung der positiven Kolonien bewirkt. Da *E. coli* sowohl Salmon-GAL als auch X-Glucuronid spaltet, färben sie sich dunkelblauviolett. Somit sind sie leicht von den übrigen, rosaroten coliformen Bakterien zu differenzieren. (Carl Roth Deutschland, 2022c)

In der Membranfiltration wird der coliforme chromogen Agar zur Bestimmung von coliformen Keimen verwendet.

#### 2.2.4. Materialien bakteriologische Wasseranalyse

In folgender Tabelle werden die verwendeten Materialien und Geräte aufgelistet.

Tabelle 3: Materialübersicht Durchführung Wasseranalyse

Art	Chargennummer	Hersteller, Anschrift
Caso Bouillon	192186721	Carl Roth GmbH+Co. KG Schoemperlenstr. 3-5, 76185 Karlsruhe
Lactosebouillon	081306744	Carl Roth GmbH+Co. KG Schoemperlenstr. 3-5, 76185 Karlsruhe
Coliforme chromogener Agar	242325523	Carl Roth GmbH+Co. KG Schoemperlenstr. 3-5, 76185 Karlsruhe
DEV-Nährboden	395232927	Carl Roth GmbH+Co. KG Schoemperlenstr. 3-5, 76185 Karlsruhe
Tryptophanbouillon	V994694	Merck KGaA 64293 Darmstadt
Citrat Agar	570498	Carl Roth GmbH+Co. KG Schoemperlenstr. 3-5, 76185 Karlsruhe
Endo Agar	V902284	Carl Roth GmbH+Co. KG Schoemperlenstr. 3-5, 76185 Karlsruhe
Petrischalen		Greiner Bio-One GmbH Maybachstraße 2 72636 Frickenhausen
Vorkultur <i>E.Coli</i>		DSMZ- German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH Inhoffenstraße 7B 38124 Braunschweig
Absaugflasche		Sartorius AG Otto-Brenner-Str. 20 37079 Goettingen, Germany

Filteranlage		Sartorius AG Otto-Brenner-Str. 20 37079 Goettingen, Germany
Inkubationsschüttler	Omnilab SM-30 und TM-30	Edmund Bühler GmbH Schin- dackerstr. 8 72411 Bodelshausen
Inkubationsschrank	Heraeus Instruments Function Line Typ B 6200 und Typ T20	Heraeus Holding GmbH Heraeusstr. 12-14, 63450 Hanau
Pipetten		Thermo Fisher Scientific Inc Neuendorfstraße 25, 16761 Hennigsdorf
Laborflaschen		SCHOTT AG Hattenbergstraße 10 55122 Mainz

## 2.3. Versuche Trinkwasseranalyse

### 2.3.1. Vorbereitung und Vorversuche Trinkwasseranalyse

Die Vorversuche der bakteriologischen Wasseranalyse dienen zur Einarbeitung und Festlegung der Methode.

Zu Beginn der Versuche wurden alle notwendigen Nährböden und Lösungen, die für die Membranfiltration und die Flüssiganreicherung benutzt werden, wie folgt hergestellt.

- 0,85%ige NaCl Lösung in 9 ml Reagenzgläser
- Lactosebouillon in 10 ml Reagenzgläser
- Tryptophanbouillon in 10 ml Reagenzgläser
- Doppelt konzentrierte Lactosebouillon in 100 ml Gläser
- DEV-Agar in Flaschen für Plattengussverfahren
- Endo-Agar Platten
- Citrat-Agar Platten
- CCA-Agar Platten

Der Nährboden der Glucosebouillon war abgelaufen. Daher wurde in allen nachfolgenden Versuchen kein Test auf Glucose Spaltung durchgeführt.

Alle Nährböden und Reagenzgläser wurden autoklaviert und kühl gelagert. Der Endo-Agar wurde zusätzlich mit Alufolie vor Licht geschützt. Der CCA Agar darf laut Hersteller nicht autoklaviert, sondern nur aufgekocht und dann in die Petrischalen abgefüllt werden.

Die Vorgehensweise für die Probennahme bei einer bakteriologischen Trinkwasseranalyse ist in der Trinkwasserverordnung festgelegt. Für eine sterile Probennahme und den Versuchsablauf müssen leere Flaschen, Messzylinder und Pipettenspitzen autoklaviert werden. Um die Gefahr von Verschmutzungen im Hahn zu minimieren, wird dieser zunächst abgeflammt. Zudem soll das Wasser vor der Probennahme etwas bei komplett geöffnetem Hahn ablaufen. Die Probe wird dann aus dem laufenden Wasser genommen. Bei der Probennahme wird normalerweise zusätzlich die Temperatur bestimmt. Dies wurde bei diesen Versuchen nicht dokumentiert. Die Flaschen werden nach der Probennahme verschlossen und beschriftet. Nach der Probennahme muss das Trinkwasser innerhalb von 12 Stunden analysiert werden. (Botzenhart et al., 2008)

Es werden folgende Wasserproben verwendet:

- Trinkwasser Labor
- Destilliertes Wasser mit *Escherichia Coli* beimpft

Der Vorversuch wird wie in der nachfolgenden Tabelle dargestellt, durchgeführt. Die Methodik der Flüssiganreicherung aus 2.2.1 und der Membranfiltration aus 2.2.2 wird noch um die Bestimmung der Gesamtkeimzahl ergänzt. Hierzu wird 1 ml Probe mit flüssigen DEV-Agar im Plattengussverfahren übergossen. In der Praktikumsmethodik wird hierbei die Wasserprobe noch auf  $10^{-1}$  und  $10^{-2}$  mit NaCl verdünnt. Die Gesamtkeimzahl wird einmal bei 22°C und einmal bei 37°C bebrütet. Daraus ergeben sich folgende Platten:

Tabelle 4: Planung Vorversuch Trinkwasseranalyse

Nährmedium	Trinkwasser	<i>E. Coli</i> Dest. Wasser
DEV Agar	6	6
Lactosebouillon doppelt. Konz.	1	1
CCA Agar	1	1

Bei der Membranfiltration ist das sterile Arbeiten mit dem Filtrationsgerät sehr wichtig. Die Anlage muss zwischen den Proben ordnungsgemäß abgeflammt und leicht abgekühlt werden. Daraus ergeben sich folgende Schritte:

1. Abflammen und Zusammenbau der Filtrationseinheit

Filtrationsgerät mit Hilfe eines durchbohrten, auf das Auslaufrohr gezogenen Gummistopfens fest auf eine Saugflasche setzen und die Saugflasche mit der Vakuumpumpe verbinden. Dichtungsring und Edelstahlfritte in den Filtertisch einlegen. Aufsatz auf das Unterteil setzen und mit Hilfe der Verschlussklammer fest mit ihm verbinden.

Abspeerhahn des Unterteils öffnen, Vakuumpumpe einschalten und einen schwachen Luftstrom mit der Fritte saugen. Innenwand mit Ethanol abspülen.

Aufsatz abnehmen und die Filtriereinheit bei geöffnetem Ventil abflammen. Aufsatz auf der Unterseite abflammen und wieder auf das Unterteil setzen und verschließen.

Nach dem Abflammen zum Abkühlen etwas steriles, destilliertes Wasser eingießen, Hahn öffnen und Wasser absaugen, Hahn wieder schließen.

## 2. Membranfilter einlegen

Aufsatz öffnen und vom Filtrationsgerät nehmen. Sterile Membranfilter (Citratfilter) mitsamt dem darüberliegenden farbigen Schutzblättchen mit steriler Pinzette am äußeren Rand anfassen, aus der Packung entnehmen und auf das Filtrationsgerät legen. Schutzfolie abziehen und Aufsatz wieder verschließen.

## 3. Filtration und Inkubation der Probe

100 ml der Probe in den Aufsatz gießen. Der Hahn muss dabei geschlossen sein. Vakuumpumpe einschalten und Hahn öffnen. Probe unter leichtem Vakuum absaugen und Hahn wieder schließen. Anschließend den Aufsatz mit ca. 30ml steriler NaCl Lösung spülen und erneut absaugen. Aufsatz abnehmen und mit einer abgeflammt Pinzette den Membranfilter am Rand vom Filtrationsgerät lösen. Hierbei den Membranfilter nur am Rand mit der Pinzette berühren. Der Membranfilter wird in die Mitte der CCA Agar Platte gegeben. Die Platten werden bei  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  für  $21 \pm 3\text{h}$  inkubiert.

Das Ziel der Vorversuche ist es, dieses Arbeiten exakt mit der Laborfiltrationsanlage zu üben und für die zukünftigen Praktikumszwecke zu beurteilen. Für die Hauptversuche ist der Vorversuch wichtig, um auch die richtige Methodik zu finden mit der das destillierte Wasser mit *Escherichia Coli* beimpft werden sollte. Es wird ein Versuch durchgeführt, bei dem das destillierte Wasser direkt mit einer Kolonie vom Nährboden aus der Stammsammlung beimpft und vermischt wird.

Alle Platten und Lösungen aus dem Vorversuch werden bei  $37^\circ\text{C}$  bzw. die DEV-Platten noch bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Tag werden die CCA Agar Platten ausgewertet und die Lactosebouillon bei Farbumschlag und Gasbildung auf Endo-Agar überimpft. Die restliche Auswertung der kleinen bunten Reihe beinhaltet die Stoffwechselreaktionen aus 2.2.1. Das erwartete Ergebnis ist der positive Nachweis von *E.Coli* in dem beimpften destillierten Wasser und ein negatives Ergebnis im Trinkwasser aus dem Labor.

### 2.3.2. Hauptversuch 1 Trinkwasser

Im ersten Hauptversuch der bakteriologischen Wasseranalyse wird eine Verdünnungsreihe für das mit *Escherichia Coli* infizierte Wasser angelegt, um die Nachweisgrenze der beiden Untersuchungsmethoden auszuwerten.

Für die Verdünnungsreihe wurde zunächst eine Flüssigkultur von *Escherichia Coli* mit Caso Bouillon angelegt und einen Tag im Schüttler bei 37°C inkubiert. Der Erfahrungswert zeigt, dass die Flüssigkolonie eine Keimdichte von ca.  $1 \times 10^9$  KBE/ml aufweist. Durch diesen Wert lassen sich die benötigten Verdünnungsstufen festlegen. Wichtig für die Bestimmung des Grenzwertes ist es, einen Membranfilter mit 0 KBE/100ml zu erreichen. Hierfür wird die Probe bis  $10^{-10}$  verdünnt. Zur Darstellung der quantitativen Analysemöglichkeit, die die Membranfiltration bietet, sollen auch mehrere Verdünnungen analysiert werden. Es werden die Verdünnungen  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  bewertet. Somit soll ein guter Bereich abgedeckt werden, um die Nachweisgrenze von *Escherichia Coli* darzustellen. Die Verdünnungsreihe wird, wie in Abbildung 3 dargestellt, durchgeführt.

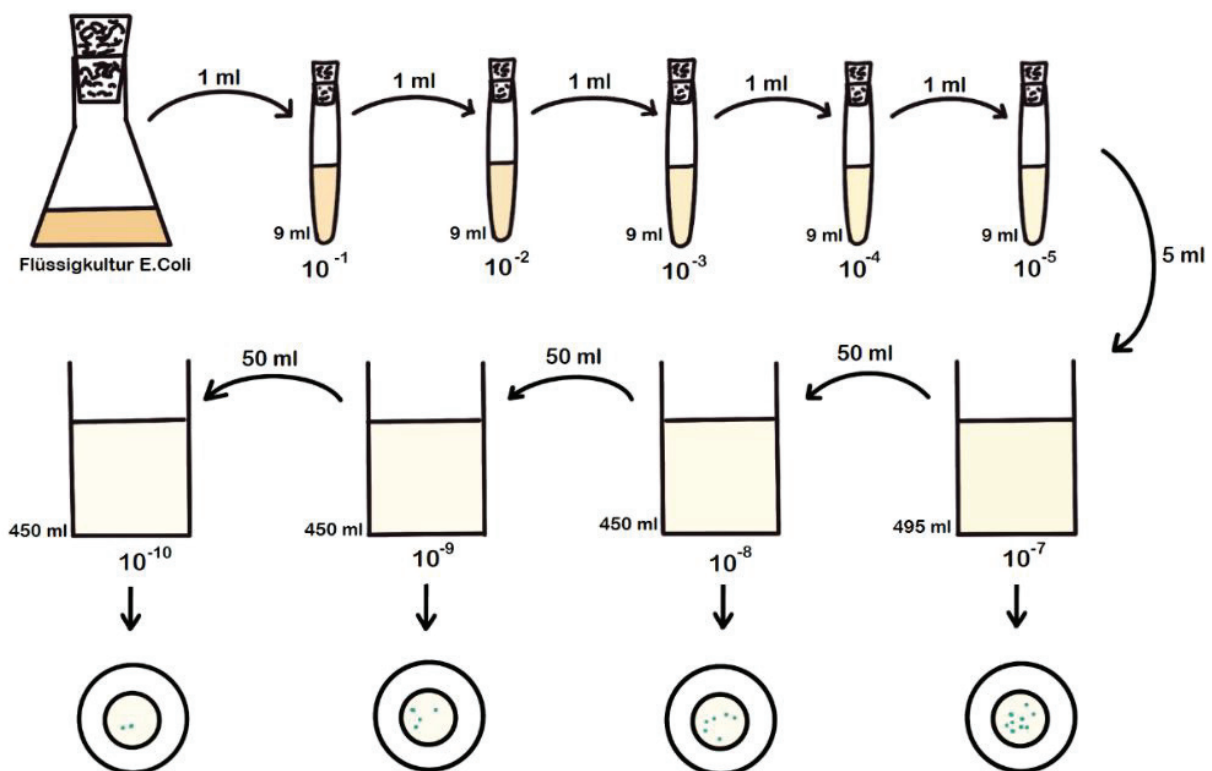


Abbildung 3: Verdünnungsreihe von *E. coli* im Hauptversuch 1

Wie bereits in den Vorversuchen beschrieben wird auch hier jede Verdünnung, sowie normales Trinkwasser mit der Flüssiganreicherung und der Membranfiltration analysiert. Dieser

Versuch soll zeigen welche Verdünnungsstufen in einem Dreifachtest weiter untersucht werden sollen.

### 2.3.3. Hauptversuch 2 Trinkwasser

Die passenden Verdünnungen aus dem ersten Hauptversuch werden im zweiten Versuch erneut mit einem Dreifachtest kontrolliert. Aus dem Hauptversuch 1 ergaben sich die Verdünnungsstufen  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  welche weiter analysiert werden sollten. Der Ablauf des Hauptversuchs 2 gestaltet sich wie im Vorversuch und im Hauptversuch 1. Jede der Proben wird dreimal als Probe angesetzt. Daher wird bei der Verdünnungsreihe auch der Probenumfang erhöht.

Für jeden Probenansatz werden 100 ml für die Membranfiltration und 100 ml für die Lactosebouillon benötigt. Daraus ergibt sich eine benötigte Probenmenge von 600 ml pro Probe für einen Dreifachtest. Zudem werden je Probe 6 ml für die DEV-Platten benötigt. In diesem Versuch wird die in Abbildung 3: Verdünnungsreihe von *E. coli* im Hauptversuch 1

dargestellte Verdünnungsreihe von der Menge verdoppelt. Somit wird jede Probe auf 1000 ml verdünnt. In der unten dargestellten Tabelle 5 werden alle Probenkürzel und angesetzten Platten bzw. Lösungen dargestellt.

Tabelle 5: Übersicht Proben und Nährböden Hauptversuch 2

Probe			Nährböden und Lösungen		
Probenkürzel	Verdünnung	Escherichia Coli	DEV Agar 22°C und 37°C	CCA Agar	Lactose Bouillon
N1 – N3	Trinkwasser unverdünnt	-	18	3	3
E71 – E73	$10^{-7}$	+	18	3	3
E81 – E83	$10^{-8}$	+	18	3	3
E91 – E93	$10^{-9}$	+	18	3	3

## 2.4. Ergebnisse Trinkwasseranalyse

### 2.4.1. Ergebnisse Hauptversuch 1 Trinkwasseranalyse

Durch den ersten Hauptversuch wurde der Verdünnungsbereich von  $10^{-7}$  bis  $10^{-9}$  festgelegt. In folgender Tabelle 6 ist die Auswertung zur Feststellung von *Escherichia Coli* in den angesetzten Proben ersichtlich.

Tabelle 6: Nachweis *E. Coli* Hauptversuch 1

Probe	CCA Agar in KBE/100ml	Flüssiganreicherung
Trinkwasser	0	Negativ
<i>E. Coli</i> 10 <sup>-7</sup>	34	Positiv
<i>E. Coli</i> 10 <sup>-8</sup>	3	Positiv
<i>E. Coli</i> 10 <sup>-9</sup>	1	Positiv
<i>E. Coli</i> 10 <sup>-10</sup>	0	Positiv

In der Auswertung wird deutlich, dass die Flüssiganreicherung auch in der 10<sup>-10</sup> noch *E. coli* nachweisen konnte. Auf der dazugehörigen CCA Agar Platte konnte allerdings kein Wachstum festgestellt werden. Daher wurde diese Verdünnung für den darauffolgenden Versuch ausgelassen.

Neben dem Nachweis von *Eschericia Coli* wurde auch die Gesamtkeimzahl bei allen Verdünnungen ausgewertet und in Tabelle 7 dargestellt. Der geltende Grenzwert für die Gesamtkeimzahl liegt bei 100 KBE/100ml (BGBl, 2001).

Tabelle 7: Auswertung Gesamtkeimzahl Hauptversuch 1

Probe	Gesamtkeimzahl 22°C in KBE/100ml			Gesamtkeimzahl 37°C in KBE/100ml		
	10 <sup>-0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>
Trinkwasser	2	2	2	42	24	1
<i>E. Coli</i> 10 <sup>-7</sup>	2	0	1	89	20	8
<i>E. Coli</i> 10 <sup>-8</sup>	13	6	5	76	16	2
<i>E. Coli</i> 10 <sup>-9</sup>	13	6	5	72	23	11
<i>E. Coli</i> 10 <sup>-10</sup>	6	4	2	61	28	9



## Optische Beurteilung von Hauptversuch 1

Die positive Auswertung der Lactosebouillon wird durch den Farbumschlag und die Gasbildung festgestellt. In Abbildung 4: Auswertung Lactosebouillon Hauptversuch 1 ist der Farbumschlag der Lactosebouillon sehr gut zu sehen. Die vier Proben links sind die *Escherichia Coli*-Verdünnungen und rechts ist die negative Lactosebouillon der normalen Trinkwasserprobe zu sehen.

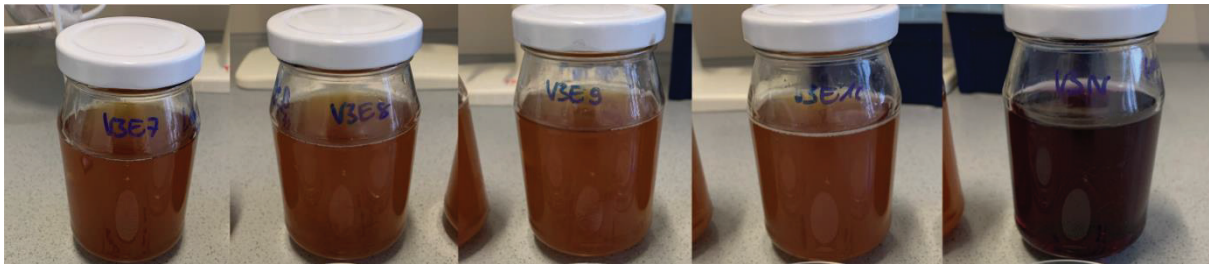


Abbildung 4: Auswertung Lactosebouillon Hauptversuch 1

Die weitere Untersuchung der kontaminierten Trinkwasserproben wird wie in 2.2.1 beschrieben durchgeführt. Die jeweilige Auswertung erfolgt im weiteren Verlauf auch über die optische Beurteilung. Die Untersuchungsergebnisse der bunten Reihe können mit Hilfe der Tabelle 2 zur Unterscheidung von *E. Coli* und coliformen Keimen ausgewertet werden.

In Abbildung 5 ist das typische Wachstum von *Escherichia Coli* auf dem CCA Agar zu sehen. Die Kolonien sind durch die bläuliche Verfärbung sehr gut im Kontrast zum weißen Agar erkennbar. Hierbei ist das Zentrum der Kolonien meist intensiver gefärbt als die Ränder. Bei allen *E. Coli* Platten lassen sich im DEV Agar eine hohe Anzahl an sehr kleinen, gelblichen, konvex wachsenden Kolonien feststellen. Diese durchziehen den Nährboden. An der Oberfläche bildet sich in manchen Fällen ein Hof, welcher vom Zentrum aus welcher heller ist und einen irregulären Rand aufweist.

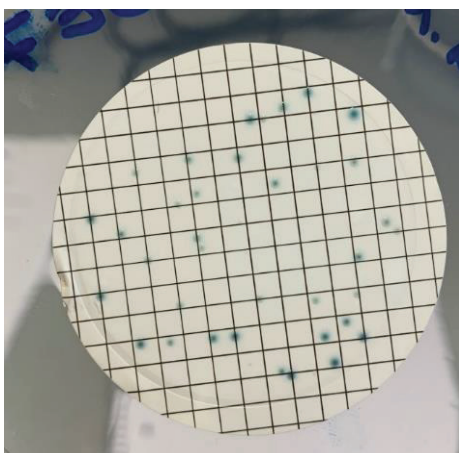


Abbildung 5: Wachstum E. coli auf CCA Agar



Abbildung 6: E. coli in DEV Agar

Diese Kolonien sind nach optischer Beurteilung als *E. coli* zu bewerten. Die Morphologie der Kolonien ist in Abbildung 6 sehr gut zu erkennen.

#### 2.4.2. Ergebnisse Hauptversuch 2 Trinkwasseranalyse

Der Hauptversuch 2 wurde als Dreifachtest durchgeführt. Die Ergebnisse werden mit Hilfe des arithmetischen Mittels berechnet und ausgewertet. Hierbei wird die Anzahl der Kolonien auf den Platten durch die Anzahl der Versuche (n=3) geteilt. In Tabelle 8 ist die Auswertung dargestellt.

Tabelle 8: Auswertung Nachweis E. Coli Hauptversuch 2

Probe	CCA Agar in KBE/100ml	Flüssiganreicherung
Trinkwasser	0	Negativ
<i>E. coli</i> 10 <sup>-7</sup>	12	Positiv
<i>E. coli</i> 10 <sup>-8</sup>	1,33	Positiv
<i>E. coli</i> 10 <sup>-9</sup>	0,67	Positiv

Durch die Membranfiltration ist die quantitative Bestimmung von *Escherichia Coli* möglich. In beiden Hauptversuchen ist die absinkende Anzahl an *E.coli* Kolonien in den Tabellen klar ersichtlich. Zu beachten ist, dass bei diesem Hauptversuch 2 die Anzahl der gesamten Kolonien niedriger ist als beim Hauptversuch 1.

Auch hier wurde die Bestimmung der Gesamtkeimzahl im Dreifachtest und mit zwei Verdünnungen durchgeführt. Die Auswertungen wurden mit dem arithmetischen Mittel berechnet. Die Ergebnisse zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl sind in folgender Tabelle 9 ersichtlich.

Tabelle 9: Auswertung Gesamtkeimzahl Hauptversuch 2 mit arithmetischen Mittel

Probe	Gesamtkeimzahl 22°C in KBE/100ml			Gesamtkeimzahl 37°C in KBE/100ml		
	10 <sup>-0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>
Trinkwasser	2	1,3	0	38	18	1
<i>E. Coli</i> 10 <sup>-7</sup>	12	9,3	1,3	76,3	24	9
<i>E. Coli</i> 10 <sup>-8</sup>	8,3	6	3	47,3	16	2
<i>E. Coli</i> 10 <sup>-9</sup>	9	5,3	2	24	12	6

## Optische Beurteilung Hauptversuch 2

Die Auswertung für die Lactosebouillon wird wie im Hauptversuch 1 durchgeführt. In der Abbildung 7 sind alle Proben der Dreifachbestimmung zu sehen. Im Gegensatz zum ersten Hauptversuch ist hier die Intensität des Farbumschlags in Abhängigkeit zur Verdünnung von *Escherichia Coli* zu beobachten.



Abbildung 7: Lactosebouillon Hauptversuch 2

Bei der Überimpfung der Lactosebouillon auf den Endo-Agar sollen durch den 3-Ösen-Ausstrich einzelne Kolonien erzeugt werden. In Abbildung 8 ist die Morphologie der *Escherichia Coli* Kolonien sehr gut zu sehen. Die Farbe des Nährbodens intensiviert sich bei hohem Wachstum. Die einzelnen Kolonien sind rötlich, metallisch schimmernd, konvex mit leicht irregulärem Rand. Beim Wachstum wie in der Abbildung 8 wurde die Bunte Reihe zur genaueren Bestimmung angesetzt. Die Auswertung ist in Abbildung 9 dargestellt.



Abbildung 8: *E. coli* auf Endo Agar

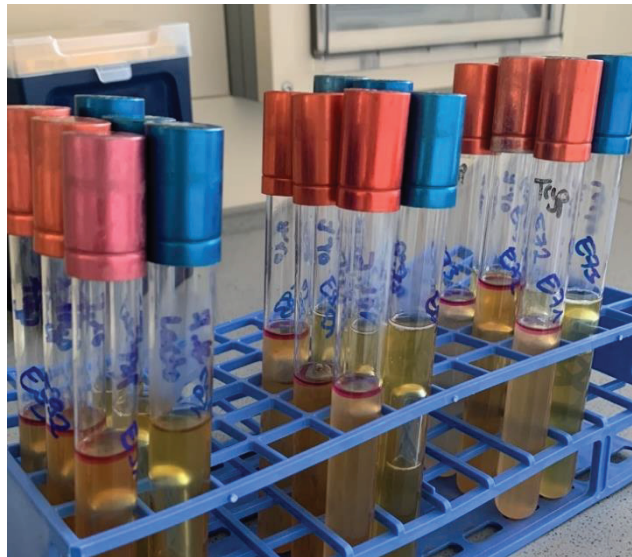


Abbildung 9: Auswertung Indolreaktion und Lactoseverwertung

Die Reagenzgläser mit rotem Deckel enthalten die Tryptophanbouillon, in welche Konvac's Reagenz hinzugegeben wurde. Die positive Indolreaktion zeigt sich durch die Rotfärbung der Konvac's Reagenz, welche hier gut zu beobachten ist. Die Reagenzgläser mit blauem Deckel zeigen die Auswertung der Spaltung von Lactose. Bei einem Farbumschlag der Lactosebouillon von dunklen violettblau zu einem helleren gelbgrünen Ton, sowie der Gasbildung, ist das Ergebnis als positiv zu bewerten.

### 2.4.3. Fehlerbetrachtung

Im ersten Hauptversuch ist die Verdünnungsstufe von  $10^{-10}$  auf dem CCA Agar als negativ zu bewerten, allerdings wurde in der Flüssiganreicherung *Escherichia Coli* festgestellt. Es wurde keine dreifache Untersuchung durchgeführt. Somit kann es sein, dass ein Messwert aus dem abweichenden Bereich festgestellt wurde. Eine Einzelbestimmung ist daher immer anfälliger für Fehler als eine Dreifachbestimmung.

Der zweite Hauptversuch zeigt eine geringere Koloniezahl auf dem CCA Agar auf als im Hauptversuch 1. Die Nährböden wurden nicht neu für die Versuche produziert. Die Haltbarkeit der Nährböden kann das Wachstum von Mikroorganismen negativ beeinflussen. Die Nährmedien sind zwar autoklaviert, allerdings können Komponenten der Nährböden über die Zeit verfallen und somit können beispielsweise einige Vitamine nicht mehr für das Wachstum der Mikroorganismen verfügbar sein. Carl Roth (2023) rät hier für den Nährboden eine Haltbarkeit von 2 Wochen. Durch die etwas verlängerte Lagerung der CCA Agar Platten könnte hierbei das Wachstum reduziert worden sein, was die blassere Farbe der Kolonien und das geringere Wachstum im Vergleich zu der vorherigen Woche zeigt.

Die Abnahme der Farbintensität über die Zeit lässt sich in Abbildung 10: Reduzierte Farbintensität in Abhängigkeit der Lagerzeit von CCA Agar sehr gut erkennen.

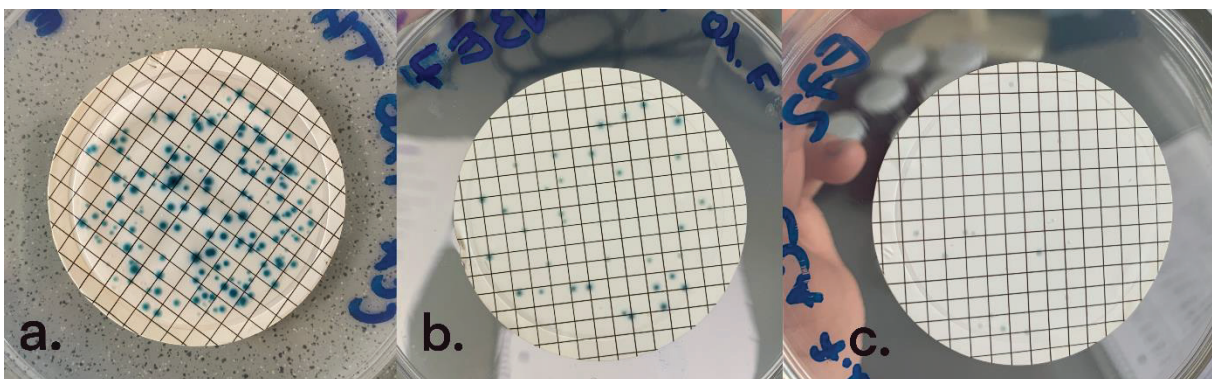


Abbildung 10: Reduzierte Farbintensität in Abhängigkeit der Lagerzeit von CCA Agar

Die CCA Agar Platte in a. stellt den ersten Versuch mit CCA Agar dar, der Nährboden wurde frisch produziert. Die *E. coli* Kolonien weisen eine sehr intensive Blaufärbung auf. In b. wurde

der Nährboden bereits 2 Wochen gelagert. Es ist dennoch eine gute Blaufärbung der Kolonien zu erkennen. Kleinere Kolonien sind nur sehr leicht in der Mitte eingefärbt. Auf der Platte c. wurde der Nährboden 3 Wochen gelagert. Kolonien sind erkennbar und auch eine leichte Blaufärbung, welche auf dem Bild schlechter zu erkennen ist als mit dem Auge. Beim Vergleich aller Platten ist aber eine deutliche Abnahme der Farbintensität in Abhängigkeit der Lagerung des CCA Agars erkennbar. Diese Fehler sollten zukünftig durch die frische Herstellung des Nährbodens für das Praktikum vermieden werden, um hier die maximale Farbintensität zu gewährleisten und den Versuch, als auch die Auswertung anschaulicher zu gestalten.

Unter den CCA Agar Platten befand sich auch eine CCA-Platte mit Fremdkeimen am Rand der Platte (Abbildung 2). Diese Platte wurde beim Berechnen des arithmetischen Mittels ausgeschlossen. Hierbei kann es sich um Keime handeln, die durch die längere Lagerung und anschließende Bebrütung bei 37°C gewachsen sind.

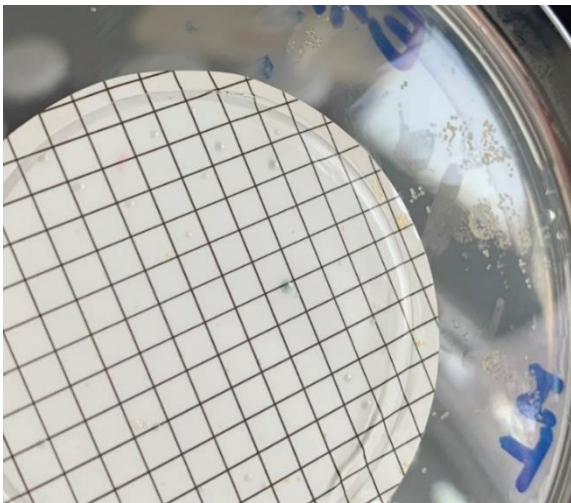


Abbildung 11: Wachstum Fremdkeime auf CCA Agar Hauptversuch 2

Der coliforme chromogen Agar wird im Gegensatz zu den regulären Nährmedien nur aufgekocht und nicht autoklaviert. Daher ist der Nährboden nicht so steril wie ein autoklavierter Nährboden. Für das Praktikum ist die frische Herstellung für die maximale Farbintensität als auch für die besten Ergebnisse wichtig. Durch zu lange Lagerung des nicht autoklavierten Nährbodens könnten die Ergebnisse der Versuche beeinflusst werden.

## 2.5. Beurteilung Trinkwasseranalyse Praktikum

In den Versuchen zur bakteriologischen Trinkwasseranalyse für das Praktikum sollte die geltende Regeluntersuchung gelehrt werden. Die Membranfiltration ist in der Trinkwasserverordnung festgelegt und bildet das Referenzverfahren zur bakteriologischen Trinkwasseruntersuchung (BGBl, 2001). Im Praktikum für das Modul „Qualitätsmanagement und Lebensmittelmikrobiologie“ sollen die Studierenden mikrobiologische Untersuchungen, welche für die Analyse von Lebensmitteln in der Praxis wichtig sind, kennenlernen und verstehen. Hierbei handelt es

sich um verschiedene Untersuchungen, welche auch so in der Praxis in einem Arbeitsalltag in Analysenlaboren durchgeführt werden. Die Studierenden lernen also bereits die Grundlagen für das Arbeiten in einem Labor für Lebensmittelanalytik. Hierbei ist es wichtig aktuelle Methoden zu lehren, um die Studierenden bestmöglich vorzubereiten. Da die Flüssiganreicherung in der Regel nicht weiter für die bakteriologische Trinkwasseranalyse genutzt wird, sollte diese auch nicht mehr für die Analyse im Praktikum genutzt werden. Die Änderung des Praktikums ist daher sehr wichtig. Die Membranfiltration ist im Rahmen des Praktikums möglich und kann auch wie derzeit mit der Flüssiganreicherung mit Tollenseesewasser durchgeführt werden oder mit selbst beimpfter Wasserprobe. Der zeitliche Aufwand für den Versuch der bakteriologischen Wasseruntersuchung ist mit der Membranfiltration auch geringer. Die Ergebnisse können bereits nach einem Tag ausgewertet werden. Das farbige Wachstum der E. Coli Kolonien auf dem CCA Agar bietet eine einfache Auswertung für die Studierenden. Für das Praktikum wichtige Punkte sind das richtige Abflammen der Filtrationsanlage und die Handhabung des CCA Agars, damit die Ergebnisse nicht beeinflusst werden.

Die neue Praktikumsanleitung zur bakteriologischen Trinkwasseranalyse mit Hilfe der Membranfiltration auf CCA Agar für das Modul „Qualitätsmanagement und Lebensmittelmikrobiologie“ ist im Anhang 1 zu finden.

## 3. Schwärmhemmtest

### 3.1. Theoretische Grundlagen Schwärmhemmtest

#### 3.1.1. Toxizitätstest

Durch die Auswirkung von Substanzen auf einen Organismus können unbekannte Toxine in dieser festgestellt werden. Der Schwärmhemmtest ist hierbei als Toxizitätstest eine Methode. Diese Biotests helfen auch dabei Interaktionen in Gemischen wie synergistische und antagonistische Effekte nachzuweisen. Biotests, wie der Schwärmhemmtest, sind daher eine gute Ergänzung zu der physikalisch-chemischen Analyse. Die Kombination beider Untersuchungen ist wichtig, um das gesamte Schädigungspotential von Chemikalien für die Umwelt oder die Organismen herauszufiltern. Eine Alternative zu den Biotests sind Tierversuche. Diese sind allerdings sehr aufwendig, zeitintensiv und kostspielig. Neben dem Schwärmhemmtest, als mikrobiellen Toxizitätstest wird auch der Leuchthemmtest verwendet. In dieser Arbeit wird der Schwärmhemmtest als Toxizitätstest, verwendet und genauer beschrieben. Die Schwärmhemmung kann direkt proportional abhängig mit der Konzentration des Toxins gesetzt werden. Hierbei können verschiedene Konzentrationen und auch eine Nullprobe mit Wasser verwendet werden, um die Stärke der Beeinträchtigung durch das Toxin besser einschätzen zu können. (Süßmuth et al., 1999)

#### 3.1.2. Bakteriell Schwärmverhalten

Verschiedene Bakterienarten können sich über eine Geißel fortbewegen. Durch die Geißel kann sich das Bakterium schwärmend oder schwimmend bewegen. Das Schwärmen ist eine besondere Art dieser Fortbewegung, da diese bei einer bestimmten Population in einem Flüssigkeitsfilm auf einer Oberfläche stattfindet. (Süßmuth et al., 1999)

Das Phänomen des Schwärmverhaltens von Bakterien ist gut durch die Fortbewegung anderer Bakterien zu verstehen. In Abbildung 12: Fortbewegungsarten von Bakterien werden die verschiedenen Arten der Fortbewegung von Bakterien gezeigt.

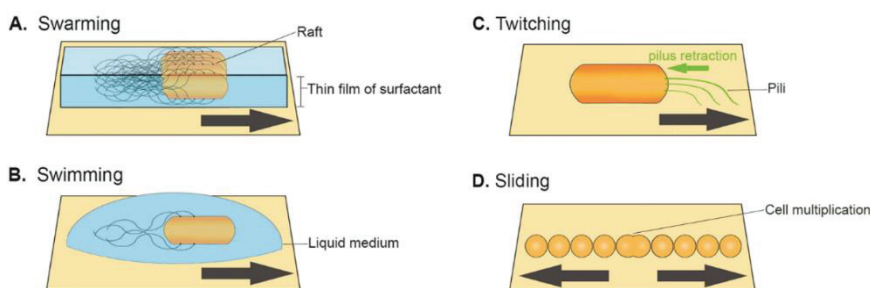


Abbildung 12: Fortbewegungsarten von Bakterien

Durch die Rotation der Geißel schwimmt das Bakterium durch eine Flüssigkeit (B). In festen Medien können sich Mikroorganismen auch ohne Geißel bewegen. Hierzu gehört die passive Art der Fortbewegung, das Gleiten. Diese Bewegung entsteht bei der Zellteilung (D). Des Weiteren gibt es noch eine Art, in der sich das Bakterium durch Fimbrien in einer zuckenden Bewegung nach vorne zieht (C). Bis auf die gleitende Fortbewegung ist jede dieser Bewegungsarten für einzelne Zellen basierend auf Flagellen. Beim Schwärmen bewegen sich allerdings mehrere Bakterien synchron mit Hilfe der Geißel fort (A). (Jose and Singh, 2020)

Die Begeißelung der Zellen ist in den meisten Fällen der Schwärmbakterien wie in Abbildung 12: Fortbewegungsarten von Bakterien dargestellt peritrich. Die Zellen besitzen mehrere Flagellen auf der gesamten Zelloberfläche. Wenn die Zellen beginnen zu schwärmen nimmt die Anzahl an Flagellen der Zellen zu. (vgl. Kearns, 2010)

### 3.1.3. Schwärmverhalten *P. mirabilis* und *A. brasilense*

Das Schwärmverhalten ist abhängig vom Schwärmmedium. In einem Nährboden mit einem Agargehalt von unter 0,3% können die Bakterien nicht schwärmen. Der prozentuale Anteil von Agar sollte daher über 0,3% liegen. Das Optimum der meisten Bakterien liegt bei einer Agarkonzentration von 0,3% bis 1% (Be'er and Ariel, 2019). Bei einer Agarkonzentration von über 1,5% wird das Schwärmverhalten unterdrückt. Abhängig von diesem Schwärmverhalten lassen sich schwärmfähige Bakterien in zwei Kategorien unterteilen (Jose and Singh, 2020):

- Moderate Schwärmer: Schwärmen auf weicheren Agaroberflächen von einem Agargehalt von 0,5-08% (z.B. *Escherichia Coli*)
- Robuste Schwärmer: Schwärmen auf härteren Agaroberflächen von einem Agargehalt von bis zu 3% (z.B. *Proteus Mirabilis*)

Das Schwärmverhalten ist je nach Bakterium unterschiedlich. Die Bakterien bilden in vielen Fällen auch sehr einzigartige Schwärmuster aus. Wie bereits erwähnt, schwärmt der *P. mirabilis* in einem „Bulls eye“ Muster. Dies entsteht durch einen sich wiederholenden Schwärmprozess und die Dedifferenzierung der Zellen (Jose and Singh, 2020). Zudem ändert *Proteus mirabilis* seine Form, während der Dedifferenzierung von Kurzstäbchen in Langstäbchen. Die Langstäbchen besitzen längere Geißeln und eine höhere Geißeldichte, welche das Schwärmen erleichtert. Nach dem Schwärmen einer kleinen kreisrunden Fläche auf dem Schwärmagar bilden sich die Langstäbchen wieder in Kurzstäbchen zurück. Nach einer halben Stunde werden wieder Schwärmzellen und somit Langstäbchen gebildet. (Süßmuth et al., 1999).



Das Wachstum von *P. mirabilis* in Form der konzentrischen Kreise verleiht dem Schwärmmuster die nach außen hin heller werdenden „Ringe“ (Pearson, 2019). Dieses Schwärmmuster ist in den Abbildung 13 Abbildung 14 zu sehen.

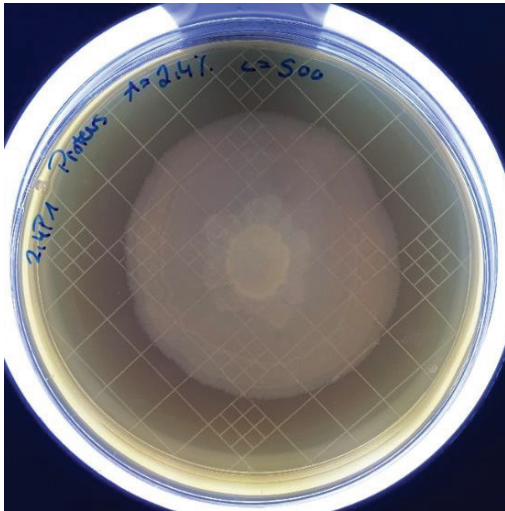


Abbildung 13: Wachstum *P. mirabilis* auf Schwärmagar

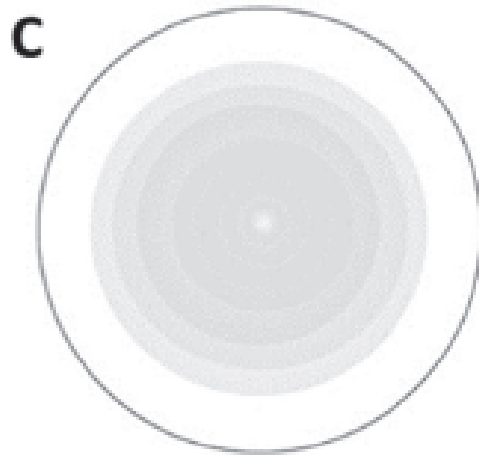


Abbildung 14: Schema Schwärmmuster *P. mirabilis* (Jose und Singh 2020)

Das Schwärmverhalten von *Azospirillum brasilense* ist in der Studie von Niu et al gut dargestellt. *Azospirillum brasilense* zählt in die Kategorie der moderaten Schwärmer. In der Studie gelang es Niu et al *A. brasilense* auf einem Schwärmagar mit einer Agarkonzentration von 0,7-0,8% schwärmen zu lassen. (Niu et al., 2005)

Schwärmfähige Bakterien brauchen zur Aktivierung des Schwärmens eine bestimmte Zelldichte und das geeignete Medium. Der Schwärmagar wird vor dem Auftragen der Bakterien getrocknet, um den Wasserfilm des Nährbodens verdunsten zu lassen. Somit wird das Bakterium zum Schwärmen gebracht, da es auf der Oberfläche nicht schwimmen kann (Be'er and Ariel, 2019). Beim Auftragen der Bakterien kommt es zunächst zu dem so genannten „Schwärm Lag“. Hierbei wachsen die Zellen, ohne zu schwärmen. Es bilden sich runde Kolonien ohne Schwärmmuster. In dieser Phase werden wohlmöglich oberflächenaktive Substanzen, zum Beispiel Tenside oder Netzmittel produziert, welche das spätere Schwärmen erleichtern (Jose and Singh, 2020). Die Zelldichte ist wichtig für das Schwarm Lag. Eine sehr hohe Dichte verkürzt hierbei die Zeit des Schwarm Lags. Durch eine Zugabe der oberflächenaktiven Stoffe kann das Schwarm Lag zusätzlich verkürzt werden, da es den Bakterien erleichtert früher in eine schwärmende Bewegung überzugehen. *Proteus Mirabilis* produziert eine oberflächenaktive Substanz welche als kapselförmige Polysaccharide bereits erforscht wurde. *Azospirillum Brasilense* wurde dahingehend noch nicht weiter erforscht und es ist bisher nicht bekannt, ob dieses Bakterium eine ähnliche Substanz zum Schwärmen produziert. (Jose and Singh, 2020)

Die Studie von Niu et al über die Zugabe von Tween 80 für die Beeinflussung des Schwärmverhaltens von verschiedenen Bakterien ist daher eine sehr interessante Forschung. Hier wird das Tween 80 zum Schwärmagar hinzugegeben. Durch dieses Hilfsmittel wird die Schwärmfläche der Bakterien, unter anderen von *A. brasilense*, vergrößert. (Niu et al., 2005)

Anhand dieser Informationen wird das unterschiedliche Schwärmverhalten von *P. mirabilis* und *A. brasilense* genau dargestellt. Diese Aspekte müssen bei den Substitutionsversuchen genauer betrachtet werden, um eine erfolgreiche Substitution von *P. mirabilis* in den Praktika zu gewährleisten.

#### **3.1.4. Taxonomie und Merkmale von *P. mirabilis* und *A. brasilense***

*Proteus mirabilis* ist ein gramnegativer, polymorpher Keim, der verschiedene Infektionen beim Menschen verursacht. *P. mirabilis* ist der dritthäufigste Erreger für Harnwegsinfektionen und ist in manchen Fällen auch für Wundinfektionen verantwortlich. Natürlich kommt er in der Darmflora von Menschen und Tieren vor. (Pearson, 2019)

Der *Azospirillum Brasilense* ist ein gramnegatives, stickstofffixierendes Bakterium, welches sich durch die Bildung von Rhizosphären positiv auf das Pflanzenwachstum auswirkt. Daher ist das Bakterium sehr beliebt und genutzt in der Agrarwirtschaft. Dies liegt daran, dass *A. brasilense* nützlich für die Wurzelbildung von Pflanzen ist. *A. brasilense* wandelt sich von einer vibrioide Form in eine peritrich begeißelte Form um schwärmen zu können. (Aizawa, 2014)

Die Bakterienarten *A. brasilense* und *P. mirabilis* lassen sich in der Taxonomie in die Kategorie der Proteobakterien einordnen. Weitere bekannte Vertreter dieser Art sind ebenfalls pathogene Mikroorganismen wie *Escherichia*, *Salmonella* und *Vibrio*. Alle Bakterien der Kategorie Proteobakterien sind gramnegativ und besitzen Lipopolysaccharide an der äußeren Membran. Spezielle Arten wie *A. brasilense* und *P. mirabilis* besitzen zudem Flagellen und sind hierdurch beweglich. (vgl. Okafor, 2011) Es gibt nur wenige Bakterienstämme, welche schwärmfähige Bakterien aufweisen. Bekannte Stämme sind die Firmicutes, Gammaproteobacteriaceae und die Alphaproteobacteriaceae. (Kearns, 2010)

In der folgenden Tabelle 10 ist eine Zusammenfassung der Eigenschaften und Taxonomie von *A. brasilense* und *P. mirabilis* dargestellt.

Tabelle 10: Eigenschaften *A. brasilense* und *P. mirabilis*

	<i>A. brasilense</i>	<i>P. mirabilis</i>
Taxonomie	Alphaproteobakterie	Gammaproteobakterie
Gramfärbung	Gram-negativ	Gram-negativ
Morphologie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vibrioid</li> <li>• Peritrich begeißelt (Schwärmen)</li> <li>• Einzelne polare Flagelle (schwimmen)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Polymorph</li> <li>• Petrich begeißelt (Schwärmen)</li> <li>• Peritrich begeißelt (Schwimmen)</li> </ul>

### 3.2. Material und Methoden Schwärmhemmtest

#### 3.2.1. Zinksulfat

An der Hochschule Neubrandenburg wird für das Toxin im Versuch des Schwärmhemmtests Zinksulfat in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Das Zinksulfat wird hierbei, wie in der Praktikumsanleitung, mit der Konzentration 10, 30, 40 und 100 µg/ml verwendet, um eine Schwärmhemmung bei zunehmender Konzentration des Toxins darstellen zu können. (Süßmuth et al., 1999)

Zinksulfat enthält Metallionen, welche auch zu den Spurenelementen zählen. Diese Spurenelemente werden von Organismen zum Überleben benötigt. In den Arbeiten von Bast (2014) und Jose und Singh (2020) wird die Theorie aufgestellt, dass Spurenelemente in hoher Konzentration eine toxische Wirkung auf Mikroorganismen haben und durch den Einsatz im Nährboden auch die Schwärmfähigkeit von Mikroorganismen hemmen. Spurenelemente sind auch ohne direkte Zugabe im Nährboden enthalten. Sie werden durch die Zugabe von Wasser beigefügt. (Bast, 2014; Jose and Singh, 2020)

In der Nature Review haben Lemire und Harrison (2013) verschiedene Theorien dargestellt, weshalb Metallionen toxisch auf Mikroorganismen wirken. Eine Theorie ist die „ionische Mimikry“. Hierbei werden Metallionen an Proteine gebunden deren korrekter Co-Faktor ein weniger kompetitives Metallion wäre. Manche Mikroorganismen können diese Co-Faktoren nicht unterscheiden, weshalb es zu zellulären Störungen kommt. Des Weiteren basiert eine Theorie auf dem HASAB-Konzept von Pearson. In dieser Theorie wird davon ausgegangen, dass Zinksäuren als schwache Säuren einzuordnen sind, welche starke Verbindungen mit Schwefelgruppen eingehen. Eine Schwefelgruppe ist beispielsweise die Sulfhydrylgruppe (R-SH), welche häufig in Proteinen vorkommt. Die antibakteriell-toxische Wirkung der Metallionen ist somit proportional zu ihrer starken Bindung an Schwefel und Proteine. Zinksulfat wirkt sich bei

unterschiedlichen Bakterienarten verschieden aus. Bisher gibt es nur Theorien zu ihrer Wirkung. (Lemire et al., 2013)

### 3.2.2. Schwärmagar

Das richtige Schwärmmedium ist für den Schwärmhemmtest ausschlaggebend. Im Folgenden wird die Zusammensetzungen des in dieser Arbeit primär verwendeten Schwärmagars dargestellt.

#### Schwärmagar Praktikum

- 1,4 % Hefeextrakt
- 2,9 % Caso-Bouillon
- 2,4 % Agar-Agar

Mit dem 2,4 % Agar-Agar liegt die Festigkeit des Nährbodens in einem Bereich der optimal für robuste Schwärmer wie *Proteus Mibilis* ist. Diese Zusammensetzung wird im Praktikum der Hochschule Neubrandenburg verwendet und auch so in der Praktikumsanleitung von Süßmuth beschrieben. (Süßmuth et al., 1999)

Für die Substitution von *P.mirabilis* mit *A.brasilense* muss der Schwärmagar allerdings die Bedingungen eines moderaten Schwärmers erfüllen. Hier verwendete Niu et al (2005) bereits in einer Studie die Agarkonzentrationen 0,7% und 0,8% in Kombination mit 0,02% Tween 80 (Niu et al., 2005). In der vorgehenden Studienarbeit von Krangemann (2022) an der Hochschule Neubrandenburg wurde diesen Nährböden mit den Agarkonzentrationen und mit der Zugabe von Tween 80, wie in der Studie von Niu et al (2005) getestet. Aufgrund des zu weichen Schwärmagars konnten hierbei allerdings die Nährböden nicht wie im Praktikum überkopf getrocknet werden und es haben sich Fremdkulturen auf den Platten gebildet. (Krangemann, 2022)

In dieser Masterarbeit wurde daher der Agargehalt angepasst, um eine Überkopftrocknung zu ermöglichen. Es wurden verschiedene Schwärmagar hergestellt. Die Agarkonzentrationen sind hierbei 0,8%, 1% und 2%, jeweils mit und ohne 0,02% Tween 80. Wichtig hierbei ist, dass Tween 80 erst nach dem Aufkochen des Nährbodens hinzugegeben werden darf. Die Temperatur darf hierbei nicht über 50°C betragen (Niu et al., 2005).

Der Schwärmagar muss vor der Verwendung in den Platten bei 30°C getrocknet werden, um die Bakterien zum Schwärmen zu zwingen. Im Praktikum werden die Platten hierfür kopfüber für 30 Minuten getrocknet. Eine längere Trocknungszeit ist aufgrund der Praktikumsdauer nicht möglich. Der Nährboden mit einem geringeren Agargehalt wurden in der Studie von Niu et al

für eine Stunde getrocknet (Niu et al., 2005). In dieser Versuchsreihe werden die Nährböden wie im Praktikum nur 30 Minuten getrocknet, um die Versuchszeit unter Praktikumsbedingungen darzustellen.

### 3.2.3. Optische Dichte von Zellsuspensionen

Damit Bakterien zum Schwärmen gebracht werden muss auch die Zelldichte der Zellsuspension stimmen. Hierfür wird die optische Dichte mit Hilfe eines Photometers gemessen. Der Photometer ist ein Gerät zur photoelektrischen Messung monochromatischer Lichtströme und wird daher in Laboren für diverse Trübungsmessungen eingesetzt. (Bast, 2014)

Zunächst muss der Photometer für die gewünschten Nanometer auf Null gesetzt werden. Für die Messung der optischen Dichte werden ca. 750 µl der zu messenden Zellsuspension in eine Küvette pipettiert. Die Küvette kommt in den Probenraum des Photometers. Während der Messung wird das einfallende Licht von den Bakterienzellen gestreut. Die Intensität der Lichtstrahlen nimmt durch die Suspension ab. Die Abnahme ist direkt proportional zu der Zelldichte, sodass die Zelldichte schnell bestimmt werden kann. Bei der Zelldichtebestimmung einer Suspension mit einem Photometer ist allerdings zu beachten, dass es nur eine Näherung zum eigentlichen Wert ist. Sie eignet sich aber sehr gut für eine kontinuierliche Bestimmung, da keine Zellen beschädigt oder abgetötet werden. Durch diese Bestimmung lässt sich das Wachstum verschiedener Mikroorganismen gut darstellen. (Bast, 2014)

### 3.2.4. Materialien und Geräte zur Durchführung

Tabelle 11: Materialien zur Durchführung Toxizitätstest

Art	Chargennummer	Hersteller, Anschrift
Caso Bouillon	192186721	Carl Roth GmbH+Co. KG Schoemperlenstr. 3-5, 76185 Karlsruhe
Hefeextrakt	808846	Oxoid Limited Wade Road, Basingstoke, Hampshire, RG24 8PW, UK
Agar-Agar, Kobe 1	267260224	Carl Roth GmbH+Co. KG Schoemperlenstr. 3-5, 76185 Karlsruhe
Tween 80		Carl Roth GmbH+Co. KG Schoemperlenstr. 3-5, 76185 Karlsruhe
Vorkultur <i>P.mirabilis</i>	DSMZ-Nr. 788	DSMZ- German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH Inhoffenstraße 7B 38124 Braunschweig

Vorkultur <i>A. brasilense</i>	DSMZ-Nr. 1690	DSMZ- German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH Inhoffenstraße 7B 38124 Braunschweig
Petrischalen		Greiner Bio-One GmbH Maybachstraße 2 72636 Frickenhausen

Tabelle 12: Geräte zur Durchführung Toxizitätstest

Art	Typ	Hersteller, Anschrift
Inkubationsschüttler	Omnilab SM-30 und TM-30	Edmund Bühler GmbH Schindackerstr. 8 72411 Bodelshausen
Inkubationsschrank	Heraeus Instruments Function Line Typ B 6200 und Typ T20	Heraeus Holding GmbH Heraeusstr. 12-14, 63450 Hanau
Pipetten		Thermo Fisher Scientific Inc Neuendorfstraße 25, 16761 Hennigsdorf
Laborflaschen		SCHOTT AG Hattenbergstraße 10 55122 Mainz
Photometer	Genesys 20, Thermo Spectronic	Fischer Scientific GmbH Im Heiligen Feld 17, 58239 Schwerte
Einmal-Küvetten	Rotilabo® PS halbmikro, XK 20, 1,6 ml Fassungsvermögen	XK 20, 1,6 ml Fassungsvermögen Carl Roth GmbH+Co. KG Schoemperlenstr. 3-5, 76185 Karlsruhe
Erlenmeyerkolben		SCHOTT AG Hattenbergstrasse 10 55122 Mainz

### 3.2.5. Durchführung Toxizitätstest

Die Durchführung des Toxizitätstest entspricht der Beschreibung von Süßmuth in „Mikrobiologisch-chemisches Praktikum“.

Dafür wird zu Beginn eine Vorkultur des benötigten Bakterienstammes, in diesem Fall *A. brasilense* und *P. mirabilis* angesetzt. Die Vorkultur wird für 22 Stunden im Schüttler bei 30°C bebrütet. Nach dem Bebrüten werden 5 ml der ersten Vorkultur (Vorkultur 1) in 50 ml Nährmedium (Caso Bouillon) pipettiert. Die beimpfte „neue“ Vorkultur wird im Folgenden als Vorkultur 2 bezeichnet. Die Vorkultur 2 wird nach dem Beimpfen auch bei 30°C im Inkubationsschüttler inkubiert. Hier wird alle 10-20 Minuten die optische Dichte mit dem Photometer gemessen bis

die Vorkultur eine  $OD_{578nm}=0,6$  erreicht hat. Dies entspricht einer Zelldichte von  $4 \times 10^7$  Zellen pro ml.

Für jede Probe werden fünf Platten mit Schwärmagar benötigt. Der Schwärmagar wird bereits vorher in Flaschen vorbereitet und autoklaviert. Der Agar wird aufgekocht und in leere Petrischalen gegossen. Nach dem Erstarren wird der Agar überkopf für 30 Minuten bei  $30^\circ\text{C}$  getrocknet.

Die Zinksulfatlösung wird mit einer Ausgangskonzentration von  $100 \mu\text{g/ml}$  vorbereitet. Von dieser Ausgangskonzentration werden fünf Verdünnungen hergestellt: 0, 10, 30, 40 und  $100 \mu\text{g/ml}$ . Nach dem Erreichen von  $OD_{578nm}=0,6$  werden von der Vorkultur 2 jeweils  $100 \mu\text{l}$  zu  $100 \mu\text{l}$  der Zinksulfatlösungen gegeben. Die Vorkultur 2 und die Zinksulfatlösungen werden in Eppendorfgläsern gemischt. Bei der Konzentration 0 handelt es sich um eine Nullprobe, welche mit sterilem, destilliertem Wasser pipettiert wird.

Von den fünf Proben werden  $5 \mu\text{l}$  mittig auf jeweils eine beschriftete Schwärmagarplatte pipettiert. Hierbei ist darauf zu achten mit der Pipettenspitze nicht in den Agar einzustecken. Die Platten werden anschließend bei der jeweiligen Inkubationstemperatur ( $30^\circ\text{C}$ ) für 24 Stunden inkubiert. Bei den Proben mit *A. brasilense* werden die Platten für 48 Stunden inkubiert.

Nach der Inkubationszeit werden die Platten optisch beurteilt. Zur Auswertung wird die Morphologie des Wachstums beschrieben und der Durchmesser der Schwärmzone gemessen. Durch die gemessenen Durchmesser für die jeweilige Zinksulfatkonzentration sollte die Hemmung der Toxine deutlich sein. (Süßmuth et al., 1999)

### **3.3. Versuche Toxizitätstest**

#### **3.3.1. Vorversuche *P. mirabilis* und *A. brasilense***

Der Vorversuch dient der Bekanntmachung mit der Methode des Toxizitätstests aus dem Praktikum mit *P. mirabilis*. Im zweiten Vorversuch wird *P. mirabilis* mit *A. brasilense* substituiert. Die Durchführung wurde in 3.2.5 beschrieben.

Mit Hilfe der Vorversuche lassen sich Probleme feststellen, welche später bei der direkten Substitution von *P. mirabilis* mit *A. brasilense* auftreten können. Zudem wurde ein Vorversuch mit der optischen Dichte durchgeführt. *A. brasilense* hat in den Versuchen von Krangenmann im Vergleich zu *P. mirabilis* länger gebraucht um die erwünschte  $OD_{578nm}=0,6$  zu erreichen. In einem Vorversuch soll getestet werden, ob die Inkubationszeit der Vorkultur 1 hier einen

Unterschied macht. Eine Vorkultur wird 24 Stunden und eine weitere wird 48 Stunden inkubiert. In Tabelle 13 werden die Versuche mit der Plattenanzahl dargestellt.

Tabelle 13: Vorversuche Schwärmtest Übersicht

Versuch	Bakterium	Plattenanzahl
1	<i>P. mirabilis</i>	5
2	<i>A. Brasilense</i> (24h)	5
2.1	<i>A. Brasilense</i> (48h)	5

### 3.3.2. Hauptversuch 1 mit Tween 80 und *A. brasilense*

In der Studie von Niu et al. wurde bereits der schwärmfördernde Effekt von Tween 80 nachgewiesen. Daher soll dieser Effekt auch hier getestet werden (Niu et al., 2005). Hierfür wird 0,02% Tween 80 in den aufgekochten Schwärmagar hinzugegeben und die Platten werden ausgegossen und getrocknet. Die jeweiligen Agarkonzentrationen wurden auf 0,8%, 1%, 2% und 2% festgelegt. Diese Agarkonzentrationen waren fest genug um die Platten überkopf und ohne Deckel trocknen zu können. Der Versuch wird dreifach durchgeführt. Um die Plattenanzahl zu verringern, werden die Zinksulfatkonzentrationen 0, 30 und 100 µg/ml verwendet.

In der folgenden Tabelle 14 werden alle Proben mit den passenden Probennummern und Variationen aufgeführt.

Tabelle 14: Variationen des Hauptversuchs 1

Proben	Agarkonzentration in %	Twen 80	Zink	Platten
A81, A82, A83	0,8	Nein	0, 30, 100	9
T81, T82, T83	0,8	Ja	0, 30, 100	9
A11, A12, A13	1	Nein	0, 30, 100	9
T11, T12, T13	1	Ja	0, 30, 100	9
A21, A22, A23	2	Nein	0, 30, 100	9
T21, T22, T23	2	Ja	0, 30, 100	9

Für die Hauptversuche wurden auch die Ergebnisse der Vorversuche in Betracht gezogen. Hier gab es beispielsweise keinen Unterschied in der Inkubationszeit der Vorkultur 1. Aufgrund



dessen wurde beim Hauptversuch 1 aus zeitlichen Gründen erneut die Vorkultur 1 für 48h inkubiert. Die Versuchsdurchführung entspricht der Beschreibung zur Durchführung des Toxizitätstest in 3.1.1.

### 3.3.3. Hauptversuch 2 mit *P. mirabilis* und *A. brasilense*

Im Hauptversuch 2 sollen die Ergebnisse zur Substitution mit *A. brasilense* erneut kontrolliert werden und weitere höhere Zinksulfatkonzentrationen getestet werden. Im Hauptversuch 1 wurde deutlich, dass die Zinksulfatkonzentrationen erhöht werden können, um die Hemmung deutlicher darzustellen. Hier wird die beste Schwärmagarvariante aus Hauptversuch 1 genutzt, um diese Versuchsreihe mit *A. brasilense* und *P. mirabilis* zu vergleichen.

Neben dem Versuch mit der abgeänderten Schwärmagar Variante soll ein erneuter Versuchsablauf mit dem Schwärmagar aus der Praktikumsmethode und *P. mirabilis* durchgeführt werden, um hier die bisher bekannte Methode zu optimieren. Die verwendeten Zinksulfatkonzentrationen sind 0, 50, 100, 500 und 1000 µg/ml. In der nachfolgenden Tabelle 15 werden die beiden Versuchsvariationen mit den Probennummern und der Plattenanzahl dargestellt.

Tabelle 15: Darstellung Versuchsvarianten Hauptversuch 2

Proben	Agarkonzentration in %	Twen 80	Zink	Platten
A1.1, A2.1, A3.1	0,8	Ja	0, 50, 100, 500, 1000	15
P1.1, P2.1, P3.1	0,8	Ja	0, 50, 100, 500, 1000	15
P1.2, P2.2, P3.2	2,4	Nein	0, 50, 100, 500, 1000	15

Bis auf die Herstellung der Zinksulfatlösung und des Schwärmagars entspricht die Durchführung der Beschreibung des Toxizitätstest in 3.2.5.

### 3.4. Ergebnisse

#### 3.4.1. Ergebnisse Vorversuche mit *P. mirabilis* und *A. brasilense*

Der Wachstumsverlauf der Vorkultur 2 aus den Vorversuchen mit *P. mirabilis* und *A. brasilense* ist in der nachfolgenden Abbildung 15: Optische Dichte in Abhängigkeit der Zeit Vorversuch dargestellt.

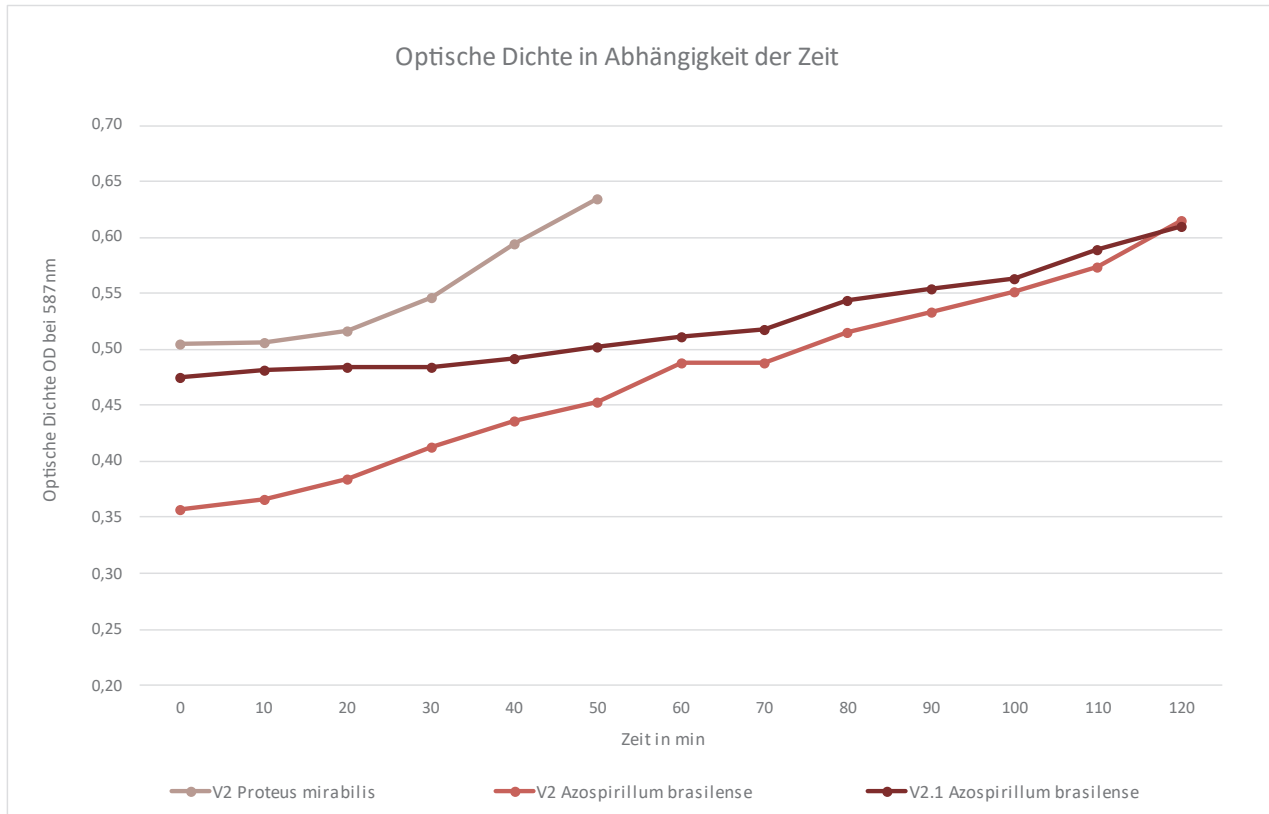


Abbildung 15: Optische Dichte in Abhängigkeit der Zeit Vorversuche

Während der Durchführung der Vorversuche wird bereits ersichtlich, dass *P. mirabilis* die nötige  $OD_{578nm}=0,6$  nach 50 Minuten erreicht. In der Studienarbeit von Krangemann (2022) hat *P. mirabilis* die optische Dichte bereits nach unter 30 Minuten erreicht. Somit lässt sich gut darstellen, dass *P. mirabilis* ein schnelleres Wachstum als *A. brasilense* hat. *A. brasilense* hat in den Vorversuchen 120 Minuten benötigt, um über 0,6 zu gelangen. In den Vorversuchen wurden zwei Vorkulturen 2 für *Azospirillum brasilense* angesetzt. Die Linie „V2.1 *Azospirillum brasilense*“ zeigt die Vorkultur 2.1, welche aus einer Vorkultur 1 mit einer Inkubationszeit von 48 Stunden hergestellt wurde. Beide Vorkulturen brauchen 120 Minuten, um auf die optische Dichte von 0,6 zu kommen. Unterschiedlich hierbei ist die optische Dichte am Anfang der Messung. Die Vorkultur 2.1 startet mit einer viel höheren optischen Dichte als die Vorkultur 2.

## Optische Beurteilung Vorversuche

Bei der optischen Beurteilung der Agarplatten der Vorversuche wird das unterschiedliche Schwärmverhalten von *P. mirabilis* und *A. brasilense* gut sichtbar. In Abbildung 16: Schwärmagarplatten Vorversuche ist ein Teil der Platten zu sehen.

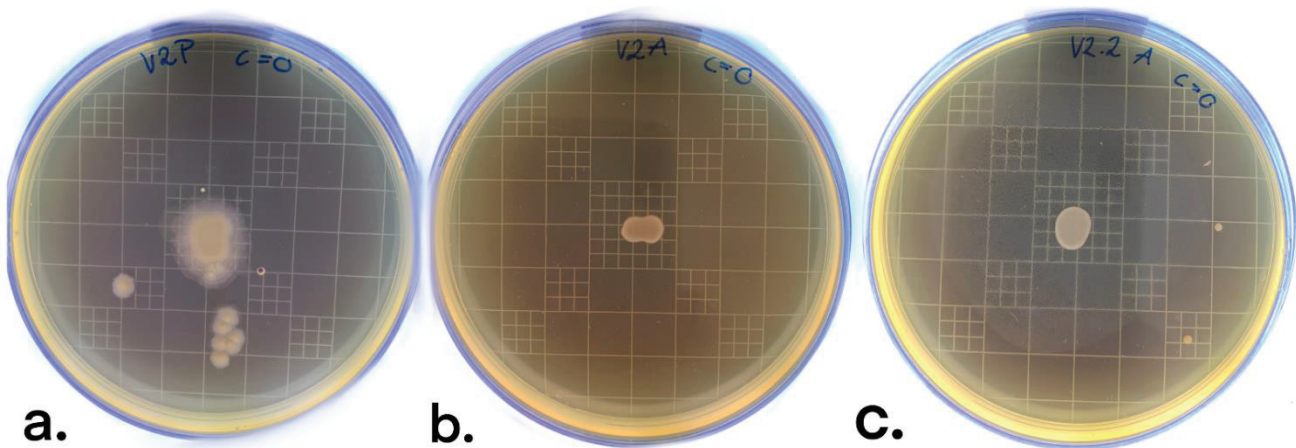


Abbildung 16: Schwärmagarplatten Vorversuche

Alle Agarplatten haben einen Agargehalt von 2,4%. Unter a. ist der Praktikumsversuch mit *P. mirabilis* bei einer Zinksulfatkonzentration von 0 µg/ml zu sehen. Die Schwärmringe von *P. mirabilis* sind gut erkennbar. Beim Auftragen der 5 µl auf die Agarplatte ist ein Pipettierfehler unterlaufen, weshalb es außerhalb der Hauptkolonie in der Mitte noch weitere Schwärmzonen gibt. Im Gegensatz zu *P. mirabilis* ist bei den Platten b und c mit *A. brasilense* kein Schwärmen zu beobachten. Zudem ist kein Unterschied im Wachstum zwischen den Kolonien zu sehen welche aus der Vorkultur 1 mit 24 und 48 Stunden beimpft wurden. Beide Kolonien sind nicht geschwärmt und haben eine ähnliche Morphologie. Sie sind kreisrund, leicht konvex und besitzen ein dunkleres Zentrum und einen helleren Rand.

### 3.4.2. Ergebnisse Hauptversuch 1 Schwärmhemmtest

In der Abbildung 17 wird der Verlauf der optischen Dichte in Abhängigkeit der Zeit von beiden Hauptversuchen dargestellt. Für einen weiteren Vergleich des Wachstums von *Proteus Mirabilis* wird die Wachstumskurve des ersten Versuchs in Abbildung 17: Optische Dichte in Abhängigkeit der Zeit Hauptversuchen dargestellt.

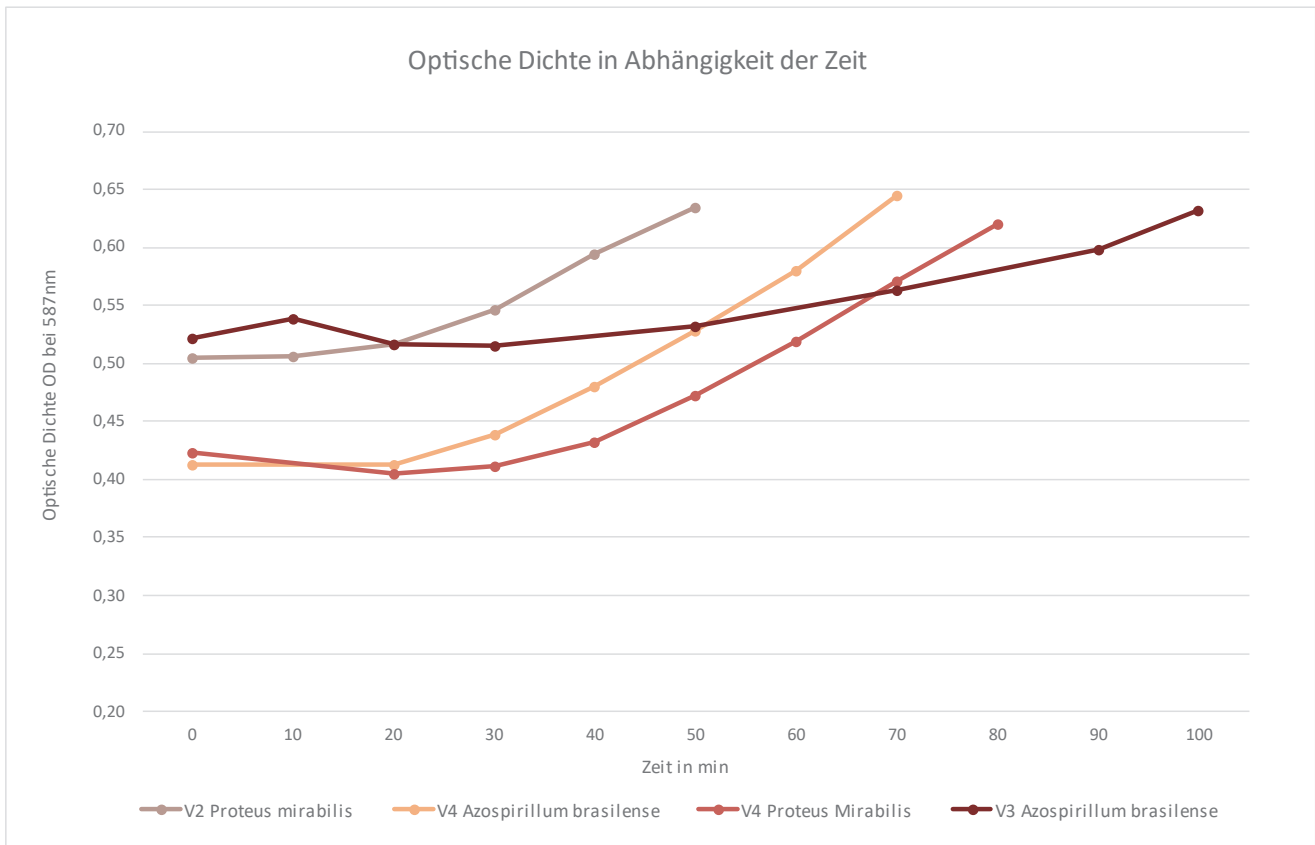


Abbildung 17: Optische Dichte in Abhängigkeit der Zeit Hauptversuchen

Durch den direkten Vergleich mit der Wachstumskurve von *Proteus Mirabilis* des ersten Versuchs und des Hauptversuches 2 wird deutlich, dass *Proteus Mirabilis* im Hauptversuch 1 30 Minuten länger gebraucht hat um  $OD_{578nm}=0,6$  zu erreichen. *A. brasilense* wurde im Hauptversuch 1 aufgrund einer Verzögerung mit einer Vorkultur 1 angesetzt, welche 48 Stunden inkubiert wurde. Aus diesem Grund ist die Ausgangsdichte der Vorkultur 2 höher als im Hauptversuch 2. Im Gegensatz zum *A. brasilense* aus dem Hauptversuch 1 erreicht die Vorkultur 2 im Hauptversuch 2 bereits nach 70 Minuten die gewünschte optische Dichte von 0,6. Die Vorkultur 1 wurde im Hauptversuch 2 mit einer flüssigen Kultur angeimpft.

Die optische Beurteilung und das Vermessen der Schwärmzonen auf den verschiedenen Agar Variationen im Hauptversuch 1 erfolgte aufgrund des langsamen Wachstums von *A. brasilense* erst nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden.

In Abbildung 18: Schwärmagar mit 0,8% Agar mit und ohne Tween, Zinksulfat c= ist ein Teil der Agarplatten mit 0,8% Agar-Agar zu sehen. Hier wird der Vergleich der Platten mit und ohne Tween 80 bei der Zinksulfatkonzentration von 0  $\mu\text{g/ml}$  zu sehen. Die Platten a, b, und c sind mit Tween 80 und d, e und f ohne. Es ist ein deutlicher Unterschied bei allen Platten mit Tween 80 zu erkennen.

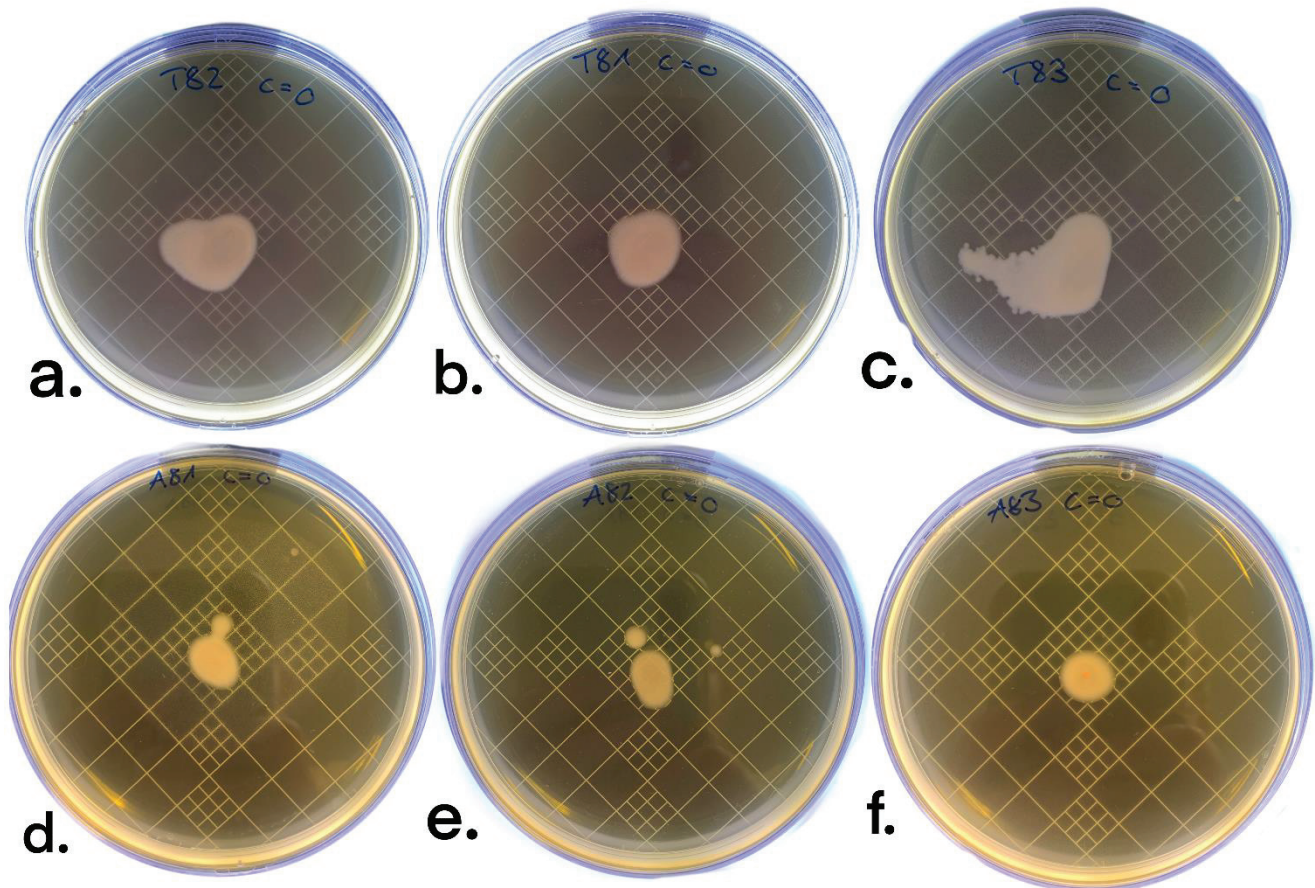


Abbildung 18: Schwärmagar mit 0,8% Agar mit und ohne Tween, Zinksulfat  $c=0$

Bereits beim Auftragen der 5  $\mu$ l auf die Platte war zu sehen, dass die Flüssigkeit etwas weiter auseinandergeflossen ist als bei den regulären Schwärmagarplatten ohne Tween 80. Die Morphologie des geschwärmten *A. brasilense* unterscheidet sich optisch sehr von der Morphologie von *P. mirabilis*. Auf einigen Platten ist ein eher „wucherndes“ Wachstum ersichtlich. Die Kolonien sind sehr kompakt oder eher „zerlaufen“. Die Platten mit 0,8% Agar-Agar ohne Tween 80 zeigen lediglich eine *A. brasilense* Kolonie. Im Vergleich zu höheren Agar-Agar Konzentrationen ist hier allerdings die Kolonie noch etwas größer.

Das spezielle Wachstum von *A. brasilense* erschwert es, die Schwärmhemmung von Zinksulfatkonzentrationen optisch auszuwerten. Durch Messung der Durchmesser und anschließende Berechnung lassen sich geringe Unterschiede feststellen. Der Durchmesser aller Platten im Hauptversuch 1 wurde bemessen und dokumentiert. In Abbildung 19: Auswertung Durchmesser *A. brasilense* in Abhängigkeit von Agarkonzentration und Zinksulfatkonzentration sind die Schwärmzonen aus Hauptversuch 1 in Abhängigkeit der Zinksulfatkonzentration für alle Schwärmagarvariationen aufgeführt.

In der Abbildung 19: Auswertung Durchmesser *A. brasilense* in Abhängigkeit von Agarkonzentration und Zinksulfatkonzentration ist eine deutliche Verringerung des Durchmessers mit zunehmender Agarkonzentration zu sehen. Des Weiteren weisen die Platten mit Tween 80 einen höheren Durchmesser auf. Bei den Versionen mit 0,8% und 1% Agar-Agar ist der Durchmesser bis zu doppelt so groß. Die Platten mit 0,8% Agar-Agar und Tween 80 zeigen auch eine deutliche Verringerung im Durchmesser in Abhängigkeit der Zinksulfatkonzentration. Bei der optischen Beurteilung fällt die Hemmung der Schwärmzone nicht direkt auf, weswegen eine Auswertung mit den durchschnittlichen Durchmessern sehr wichtig ist. Die Durchmesser der Platten mit 1% und 2% Agar-Agar haben einen höheren durchschnittlichen Durchmesser mit einer Zinksulfatkonzentration von  $c=30$ .

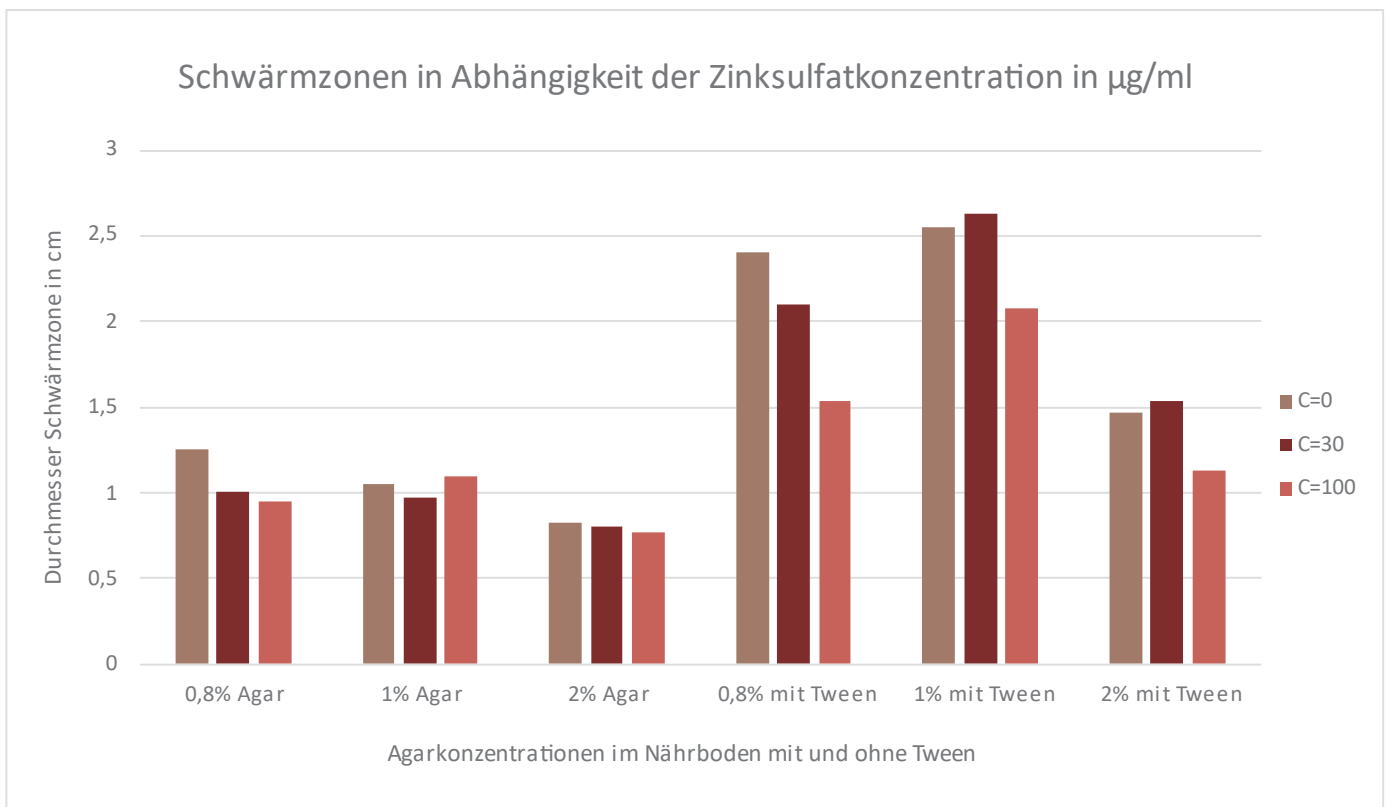


Abbildung 19: Auswertung Durchmesser *A. brasilense* in Abhängigkeit von Agarkonzentration und Zinksulfatkonzentration

Anhand des Diagramms lassen sich die Schwärmagarvarianten mit 0,8% und 1% Agar-Agar und Tween 80 als beste Varianten bestimmen. Die Variante mit 1% und Tween 80 ist von der Schwärmfähigkeit in den Durchmessern am besten und die Variante mit 0,8% und Tween zeigt eine gute Schwärmhemmung durch das Zinksulfat.

Bei weiterer optischer Beurteilung dieser beiden Schwärmagarvarianten lassen sich große Schwankungen im Schwärmverhalten erkennen. Besonders bei 1% Agar-Agar und Tween 80 sind einige Platten sehr weit, länglich geschwärmt, während die restlichen Platten kaum geschwärmt sind. Dieses Phänomen ist deutlich in der Abbildung 20: Unterschiede Schwärmagar 1% Agar mit Tween 80 zu sehen. Die obere Reihe a bis c zeigt die Platten mit dem höchsten

Durchmesser der Schwärmzone. Hier ist auch noch einmal das deutliche „wuchernde“ oder „fließende“ Schwärmuster von *A. brasilense* erkennbar. Die untere Reihe d bis f zeigt die Mehrheit der Platten mit *A. brasilense*. Die meisten Platten zeigen eine größere Kolonie in der Mitte in der leichte Schwärmuster zu sehen sind, allerdings keine Auswucherungen wie in der oberen Reihe.

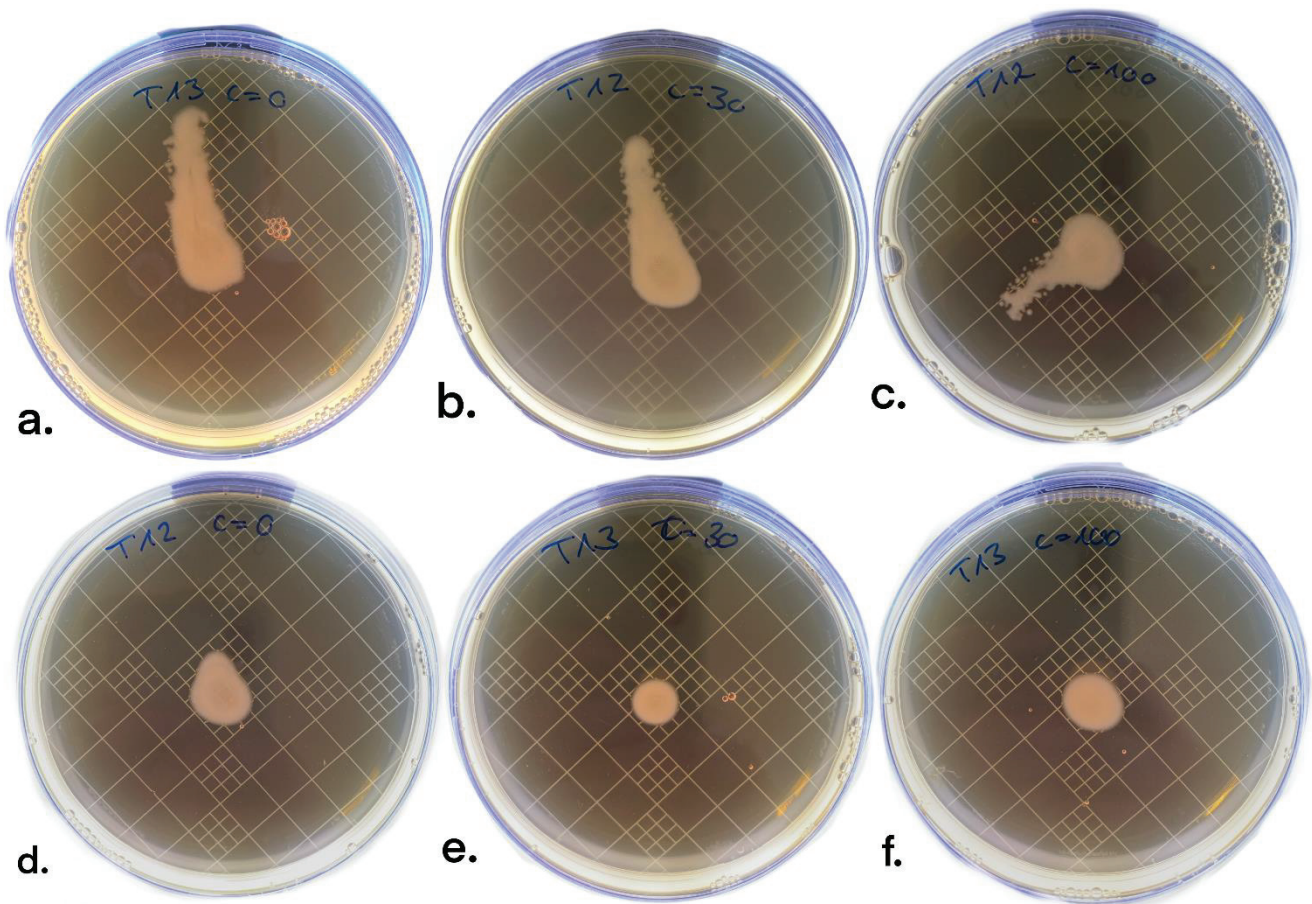


Abbildung 20: Unterschiede Schwärmagar 1% Agar mit Tween 80

Durch das inkonstante Ergebnis in der 1% Agar-Agar Variante wurde im Hauptversuch 2 der Schwärmagar mit 0,8% Agar-Agar und Tween 80 für weitere Versuche verwendet. Da die Schwärmhemmung des Toxizitätstests mit den geringeren Konzentrationen oft nicht direkt ersichtlich und in manchen Fällen inkonstant ist, sollte erneut eine Versuchsreihe durchgeführt werden, in der die Wirkung höherer Zinksulfatkonzentrationen getestet wird.

### 3.4.3. Ergebnisse Hauptversuch 2 Schwärmhemmtest

Im Hauptversuch 2 wurden zwei Versuchsabläufe durchgeführt. Zunächst wurde erneut der Schwärmagar mit 0,8% Agar-Agar mit Tween 80 in einem Dreifachtest mit *P. mirabilis* und *A. brasilense*, sowie mit höheren Zinksulfatkonzentrationen durchgeführt.

Die Agarplatten aus der ersten Versuchsreihe im Hauptversuch 2 sind alle überwuchert. In Abbildung 21: Überwucherte Platten Hauptversuch 1, 0,8% Agar, Tween 80 sind jeweils die Platten mit der Zinksulfatkonzentration  $c=0$  und  $c=1000$  von *P. mirabilis* und *A. brasilense* abgebildet.

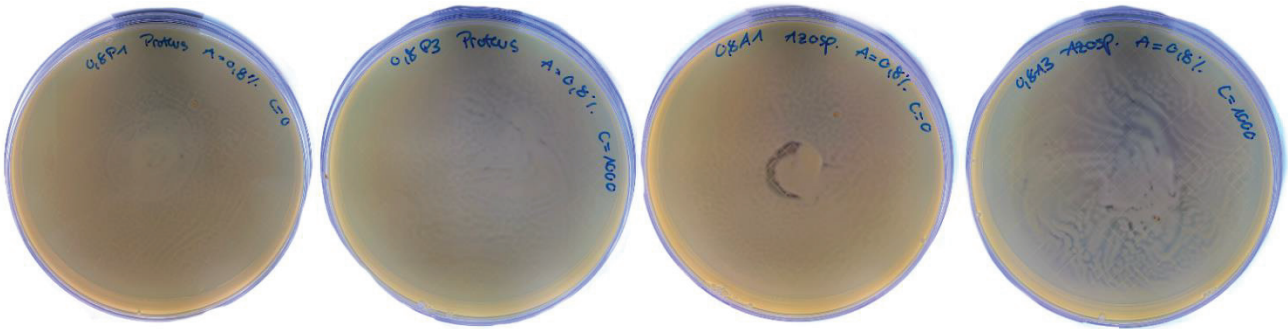


Abbildung 21: Überwucherte Platten Hauptversuch 1, 0,8% Agar, Tween 80

In der Studienarbeit von Krangemann (2020) die konnten die Versuche mit Tween 80 und 0,8% Agar-Agar auf Grund von überwucherten Platten nicht ausgewertet werden. Hier handelte es sich allerdings wohlmöglich um Fremdkeime, die durch das Trocknen der Platten ohne Deckel und nicht überkopf auf den Schwärmagar gelangt waren. (Krangemann, 2022)

In dieser Versuchsreihe weisen die Platten, im Gegensatz zu Hauptversuch 1, ein Rasenwachstum auf. Mit Hilfe des EnteroPluri-Tests wurden beide Kolonien auf den Platten erneut untersucht, um das Ergebnis zu bestätigen. *Proteus Mibilis* wurde auf den entsprechenden Platten eindeutig nachgewiesen. *Azospirillum Brasilense* ist nicht mit dem EnteroPluri-Test nachweisbar. Aufgrund des Wachstumsbildes und des eindeutigen Ergebnisses von *Proteus Mibilis* ist allerdings davon auszugehen, dass es sich hierbei auch um *A. brasilense* handelt und nicht um eine Fremdkultur. Wegen des Rasenwachstums wurden diese Platten von der weiteren Auswertung ausgenommen.

Die zweite Versuchsreihe von *Proteus Mirabilis* auf dem Schwärmagar aus dem Praktikum wies ein sehr gutes Wachstum auf. Die Zinksulfatkonzentrationen sind in diesem Versuch höher angesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 zu sehen.

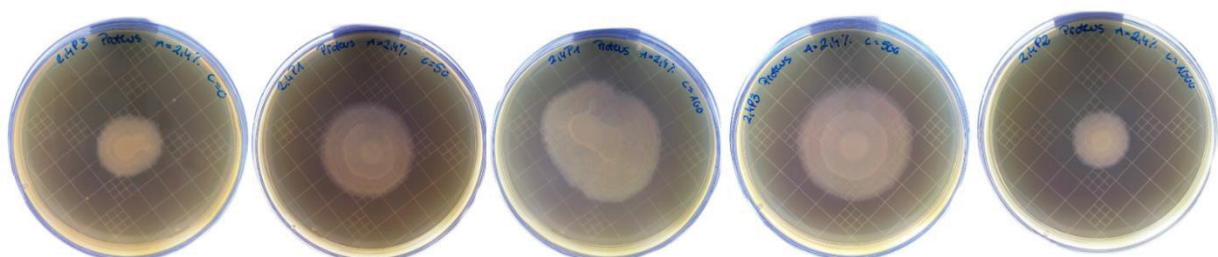


Abbildung 22: Hauptversuch 2 *P. mirabilis* mit Zinksulfatkonzentration  $c=0$  bis  $c=1000$



Die Platten mit der Zinksulfatkonzentration von  $c=100$ ,  $c=500$  und  $c=1000 \mu\text{g/ml}$  weisen eine größere Schwärmzone auf als bei den niedrigeren Zinksulfatkonzentrationen. In Abbildung 23 werden die durchschnittlichen Durchmesserwerte verglichen.

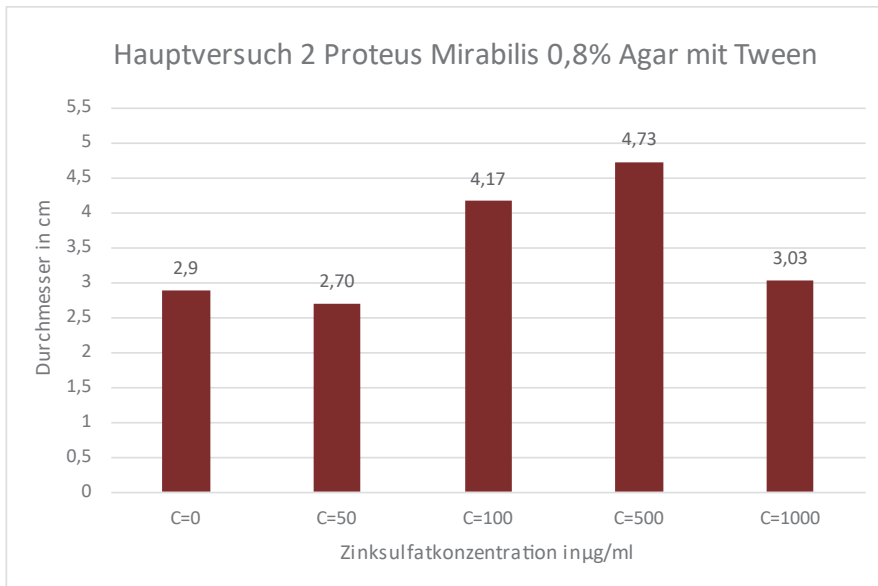


Abbildung 23: Auswertung Durchmesser *P. mirabilis* höhere Zinksulfatkonzentration

#### 3.4.4. Auswertung Schwärmhemmtest

Der Schwärmhemmtest mit *A. brasilense* ist in der Form des Toxizitätstest anhand der durchgeführten Versuche nur sehr schwer für ein Praktikum umsetzbar. Es gelang das Schwärmen von *A. brasilense* durch Tween 80 wie in der Studie von Niu et al (2005), zu ermöglichen. Allerdings war dieser Versuch nicht wiederholbar. In der Wiederholung kam es zu Rasenwachstum, weshalb die Platten nicht bewertbar waren. (Niu et al., 2005)

Die Toxizitätstests mit *P. mirabilis* weisen ein konstantes Ergebnis auf. Das Schwärmen des Bakteriums mit dem „Bull’s eye“ Muster ist sehr gut auf allen Platten mit dem passenden Schwärmmedium erkennbar. Die Hemmung durch Zinksulfat war hier in vielen Fällen nur sehr schwer erkennbar. Für weitere Versuche könnten noch höhere Zinksulfatkonzentrationen verwendet werden, um die Hemmung besser darzustellen.

#### 3.4.5. Fehlerbetrachtung Schwärmhemmtest

##### Rasenwachstum 0,8% Agar mit Tween 80

Des Rasenwachstum von *P. mirabilis* und *A. brasilense* auf dem Schwärmagar mit 0,8% Agar-Agar und Tween 80 könnte unterschiedliche Gründe haben. Da es sich hierbei um das aufgetragene Bakterium handelt und eine Fremdkontamination ausgeschlossen werden kann,

werden im Folgenden Aspekte genannt, die zu erhöhten Schwärmverhalten von *P. mirabilis* und *A. brasilense* geführt haben können.

*P. mirabilis* zählt zu den robusten Schwärmern, welche auch auf einem festeren Agar mit 2,4% gut schwärmen. Die niedrige Agarkonzentration erleichtert hier zusätzlich das Schwärmen von *P. mirabilis*. Auch die Zugabe von Tween 80 als grenzflächenaktive Substanz erleichtert hier das Gleiten der Mikroorganismen. Aus diesen Gründen, und im Vergleich zu dem bisherigen Wachstum von *P. mirabilis*, war es hier zu erwarten, dass die Platten gut bewachsen sind. Allerdings war dieses Ergebnis nicht von *A. brasilense* zu erwarten.

Ein Grund für die erhöhte Schwärmfähigkeit der Mikroorganismen ist eine fehlerhafte Zugabe von Tween 80. Die hohe Viskosität von Tween 80 erschwert es die exakte Menge von 0,02% in den Schwärmagar zu geben. Durch fehlerhaftes Pipettieren kann mehr Tween 80 in den Schwärmagar geraten sein als angedacht war. Die Oberfläche ermöglicht daher das Gleiten der Mikroorganismen und das starke Wachstum der Kolonien von der Mitte und unterstützt diese These. Beim Gleiten bewegen sich die Mikroorganismen durch die Zellteilung weiter fort. (Jose and Singh, 2020). Tween 80 als grenzflächenaktive Substanz begünstigt hier das Gleiten und nicht nur das Schwärmen der Mikroorganismen.

Des Weiteren kann eine fehlerhafte Trocknung der Platten ein Grund für das erhöhte Wachstum sein. In der Studie von Niu et al. (2005) wurden die Platten über eine Stunde kopfüber getrocknet, da sie durch den niedrigen Agar-Agar Gehalt auch sehr viel Wasser enthalten und die Oberfläche möglichst trocken sein sollte, um die Mikroorganismen zum Schwärmen zu zwingen. In diesem Versuch wurden die Platten nur 30 Minuten, wie im Praktikum zeitlich möglich wäre, getrocknet. Im Hauptversuch 1 wurden die Platten ca. 45 Minuten getrocknet. Dieser Zeitunterschied könnte ausreichend gewesen sein, weswegen im Hauptversuch 1 die Platten nicht überwuchert waren.

### **Schwärmverhalten in Abhängigkeit von Zinksulfat**

Die Versuche in dieser Arbeit zeigen alle eine geringe Hemmung im Schwärmverhalten der Mikroorganismen durch das Toxin Zinksulfat. Die Unterschiede in den Durchmessern sind sehr gering und auf den ersten Blick oft nicht direkt ersichtlich. *A. brasilense* zeigt mit der richtigen Agarvariante in Hauptversuch 1 eine Schwärmhemmung in Abhängigkeit der Zinksulfatkonzentration. Bei *P. mirabilis* zeigt sich im Hauptversuch 1 eine Vergrößerung der Schwärmfläche in den Zinksulfatkonzentrationen  $c=100$  und  $c=500$   $\mu\text{g/ml}$ . Es wirkt so, als würde das Zinksulfat das Schwärmverhalten fördern. Wie in 3.2.1 bereits beschrieben, kann Zink als Spurenelement wirken. Diese Wirkung tritt allerdings nur in geringer Konzentration auf, die

Konzentrationen aus dem Toxizitätstest sind höher. Eine weitere Möglichkeit ist eine Wachstumsförderung durch das Sulfat, welches die Schwärmeigenschaften begünstigt. Pearson (2019) verwendete Magnesiumsulfat als selektives Antibiotikum um hier die Schwärmeigenschaften zu hemmen. Dies widerspricht der Theorie, dass Sulfat die Schwärmeigenschaften begünstigt.

Des Weiteren kann eine fehlerhafte Mischung der Zinksulfatlösung mit der Bakteriensuspension ein Grund für eine fehlende Schwärmhemmung sein. Im Hauptversuch 2 wurden die Ergebnisse von Krangemann (2022) mit in Betracht gezogen und auch hier war eine schwache Hemmung ersichtlich. Falls ein Pipettier- oder Mischfehler vorliegt ist dieser unbeabsichtigt von verschiedenen Personen wiederholbar. Eine Lösung wäre es, in weiteren Versuchen die Zinksulfatlösungen vor der Vermischung mit der Bakteriensuspension erneut gut zu mischen, um die Konzentrationen homogen zu halten. Dies sollte auch mit der Zinksulfat-Bakterien Lösung geschehen, bevor diese auf den Platten aufgetragen wird. In der Arbeit von Krangemann (2022) wird ebenfalls vorgeschlagen bei weiteren Versuchen höhere Zinksulfatkonzentrationen zu testen, um hier eine bessere Schwärmhemmung zu erreichen. Dies wurde in Hauptversuch 2 getestet. Die erwünschte Wirkung hat hier leider nicht stattgefunden. Allerdings sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Mit größeren Abständen zwischen den verschiedenen Konzentrationen kann eine bessere Abstufung in der Hemmung vorerst erzielt werden.

### **3.5. Beurteilung Substitution *P. mirabilis* durch *A. brasilense* im Toxizitätstest**

Die Versuchsreihen zur Substitution von *P. mirabilis* mit *A. brasilense* zeigten einige Probleme für die Durchführung des Toxizitätstest auf. Die beiden Mikroorganismen sind in ihrem Schwärmverhalten sehr unterschiedlich. Wie in 3.1.3 bereits dargestellt handelt es sich hier um zwei verschiedene Arten von Schwärmorganismen. Auch mit angepasstem Schwärmagar und Inkubationszeiten gelang es nur in einem Fall *A. brasilense* zum Schwärmen zu bringen und dabei noch eine leichte Schwärmhemmung durch das Zinksulfat zu beobachten. Die Ergebnisse mit Tween 80 erzielten in den Versuchen nicht das gewünschte Ergebnis. Zudem sind die Versuche mit *A. brasilense* aufwendiger und zeitintensiver als bisher. Die Inkubationszeit der Vorkultur ist bei effizienter Arbeitsweise in manchen Fällen noch innerhalb der Praktikumszeit möglich. Allerdings ist dies für den Zeitplan des Praktikums, in dem auch noch die Versuche theoretisch besprochen werden und Fragen beantwortet werden müssen, nicht das Optimum. Die schnellere Inkubation von *P. mirabilis* ist hier für die zeitliche Planung des Praktikums besser umsetzbar.

Der Toxizitätstest mit *P. mirabilis* ist im Rahmen eines Praktikums ein anschaulicherer Versuch als mit *A. brasilense*. Die Ergebnisse sind hier bisher sehr konstant gewesen und durch das einzigartige Schwärmuster von *P. mirabilis* sind die Schwärmzonen, sowie auch der Durchmesser leicht zu beurteilen. Die Hemmung durch Zinksulfat ist zwar in manchen Fällen, wie auch hier im Praktikum, etwas variabel und sollte noch weiter untersucht werden, um optimale Konzentrationen zu finden. Dennoch ist in einem Diagramm und bei der Messung der Durchmesser eine geringe Hemmung des Schwärmverhaltens ersichtlich.

Für das weitere Praktikum ist es ratsam die Versuche mit *Proteus Mibilis* durchzuführen. Hier sind die Ergebnisse konstanter und das Bakterium bietet eine anschaulichere Auswertung der Schwärmhemmung für die Studierenden. Die Erhöhung der Zinksulfatkonzentrationen kann in weiteren Praktika getestet werden, um hier eine anschaulichere Hemmung des Schwärmverhaltens zu erhalten.

Die aktualisierte Praktikumsanleitung für den angepassten Toxizitätstest mit Bakterien für das Modul „Grundlagen der Mikrobiologie und Biochemie“ ist in der Anhang 2 zu finden.

## 4. Zusammenfassung

Die Abänderung der Methodik für die bakteriologische Trinkwasseranalyse in dem Praktikum zum Modul „Qualitätsmanagement und Lebensmittelmikrobiologie“ ist aufgrund der vorgegebenen Referenzmethode in der Trinkwasserverordnung sehr wichtig. Die im Praktikum durchgeführten Untersuchungen sollten dem Stand der Wissenschaft und den derzeitigen Standards entsprechen. Diese wurden vor der Durchführung der Vorversuche genauer dargestellt. Die Methode der Membranfiltration und die Nutzung des coliforme chromogen Agars für die Identifizierung von *Escherichia Coli* und coliforme Keime ist weit verbreitet und in der ISO 9309-1 (2014) als eine der Referenzmethoden genannt. Die Vorversuche dienten der Festlegung der Methode zur Analyse mit der Membranfiltration. In den Hauptversuchen wurde die Flüssiganreicherung mit der Membranfiltration weiter verglichen. Die quantitative Auswertung der CCA Agarplatten und die Zeitersparnis in der Analyse sind ein Vorteil gegenüber der Flüssiganreicherung. Hier werden über vier Tage hinweg die gewachsenen Kolonien mit Hilfe verschiedener Nährböden und Analysen differenziert um die Keime als *Escherichia Coli* oder coliforme Keime auswerten zu können. Im Hauptversuch 2 kam durch eine lange Lagerung der CCA Agar Platten zu fehlerhaften Ergebnissen. Das Wachstum der Kolonien wurde hierdurch reduziert und die Farbintensität der *Escherichia Coli* Kolonien war schwächer als mit frisch hergestelltem Nährboden. Eine Platte wies auch nach dem Bebrüten Fremdkolonien auf. Der coliforme chromogen Agar sollte daher nicht länger als 2 Wochen gelagert werden. Am besten wäre es den Agar innerhalb einer Woche zu verwenden. Während der Lagerung muss der Agar in Alufolie vor Lichteinflüssen geschützt werden (Carl Roth Deutschland, 2022c).

Die Anpassung der bakteriologischen Wasseranalyse ist mit der Membranfiltration sehr gut möglich. Die Studierenden lernen hierbei die in der Praxis angewandte Analyse und lernen den Umgang mit den Filtrationsanlagen. Wichtig hierbei ist eine zeitnahe Herstellung des Coliformen chromogen Agars, um lange Lagerzeiten zu vermeiden.

Durch das Substitutionsgebot der BiostoffV ist die Hochschule verpflichtet gefährliche Biostoffe durch weniger gefährliche zu substituieren, sofern dies technologisch möglich ist (BGBI, 2013). In diesen Versuchen wurde die mögliche Substitution von *Proteus Mibilis* mit *Azospirillum Brasilense* für den Toxizitätstest getestet. In den Vorversuchen wurde die Schwärmfähigkeit von *A. brasilense* unter den derzeitigen Praktikumsbedingungen getestet. Da *A. brasilense* hier kein Schwärmverhalten aufwies, wurde der Schwärmagar angepasst. Im Hauptversuch 1 wurden verschiedene Agarkonzentrationen getestet. Zudem wurde die Studie von Niu et al (2005) als Referenzmethode herangezogen um den Einsatz von Tween 80 als grenzflächenaktive Substanz zu prüfen. Aus dieser Untersuchung wurde deutlich, dass Tween 80 einen Einfluss auf das Schwärmverhalten von *A. brasilense* hat, sowie eine niedrige Agarkonzentration wie 0,8%

Agar-Agar das Bakterium im Schwärmen unterstützt. Die Schwärmhemmung von Zinksulfat war allerdings nur schwer ersichtlich und nicht so eindeutig wie es gewünscht wäre. Die Ringe im Schwärmmuster von *P. mirabilis* zeigen das Schwärmverhalten und die Hemmung durch Zinksulfat besser als das „wuchernde“, „zerlaufende“ Schwärmmuster von *A. brasilense*. Für die weitere Untersuchung werden höhere Zinksulfatkonzentrationen verwendet, um eine bessere Hemmung zu erreichen. Da das Wachstum von *A. brasilense* nicht wie erwünscht war, wurden die abgeänderten Zinksulfatkonzentrationen auch für die normale Praktikumsmethode mit *P. mirabilis* getestet. Die Ergebnisse des Hauptversuches 2 zeigen deutlich, dass die Methodik mit Tween 80 als grenzflächenaktive Substanz und „Schwärmhelfer“ nicht so verlässlich ist, um sie im Praktikum weiter anzuwenden. Die Agarplatten waren durch Rasenwachstum der Mikroorganismen nicht auszuwerten. Die Substitution von *P. mirabilis* mit *A. brasilense* wurde mit verschiedenen Mitteln getestet und ist technologisch für den zeitlichen Rahmen des Praktikums nicht möglich. Der Toxizitätstest soll weiterhin mit *P. mirabilis* durchgeführt werden.

Der Toxizitätstest mit *P. mirabilis* funktionierte zwar in der Vergangenheit auch nicht bei jedem Studierenden einwandfrei, allerdings ist er anschaulicher als die Versuche mit *A. brasilense*. Für eine bessere Hemmung können in Zukunft weitere Analysen mit verschiedenen Zinksulfatkonzentrationen getestet werden.

Die bakteriologische Trinkwasseranalyse mit der Membranfiltration kann durch diese Arbeit zukünftig im Praktikum für das Modul „Qualitätsmanagement und Lebensmittelmikrobiologie“ etabliert werden. Für den Toxizitätstest mit *A. brasilense* hingegen konnte keine Methode gefunden werden, welche im Praktikum für das Modul „Grundlagen der Mikrobiologie und Biochemie“ genutzt werden kann. Die bisherigen Versuche sollten weiterhin mit *P. mirabilis* durchgeführt werden.

## 5. Literatur

- Aizawa, S.-I., 2014. Chapter 3 - *Azospirillum brasilense* — A Bushy Hook of the Polar Flagellum, in: Aizawa, S.-I. (Ed.), *The Flagellar World*. Academic Press, pp. 18–21. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417234-0.00003-7>
- Bast, E., 2014. *Mikrobiologische Methoden*, 3.Auflage. ed. Springer Spektrum, Bonn.
- Be'er, A., Ariel, G., 2019. A statistical physics view of swarming bacteria. *Mov. Ecol.* 7, 9. <https://doi.org/10.1186/s40462-019-0153-9>
- BFR, 2018. EHEC [WWW Document]. URL <https://www.infektionsschutz.de/erregersteckbriefe/ehec/> (accessed 12.11.22).
- BGBl, 2013. § 8 BioStoffV.
- BGBl, 2001. Trinkwasserverordnung - TrinkwV.
- BMG, 2022. Trinkwasser | BMG [WWW Document]. URL <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/service/begriffe-von-a-z/t/trinkwasser.html> (accessed 12.10.22).
- BMG, 2009. Coliforme Bakterien im Trinkwasser: Empfehlung zur Risikoabschätzung und Maßnahmen bei systemischer Kontamination – Empfehlung des Umweltbundesamtes nach Anhörung der Trinkwasserkommission des Bundesministeriums für Gesundheit beim Umweltbundesamt. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 52, 474–482. <https://doi.org/10.1007/s00103-009-0823-7>
- Botzenhart, K., Exner, M., Feuerpfeil, I., Fleischer, J., Frohmann, A., Hamsch, B., Hauk, G., Heinemeyer, E.-A., Huber, S., Hummel, A., Luden, K., Rechenburg, A., Röbbcke, R.S., Schaefer, B., Schickling, H., Schindler, P., Schneider, O., Schoenen, D., Schulz, J.-M., Szewzyk, R., Uhlig, S., Werner, P., Wiedenmann, A., 2008. *Hygienisch-mikrobiologische Wasseruntersuchung in der Praxis*. Wiley-Vch Verlag GmbH&Co. KGaA, Weinheim.
- Carl Roth Deutschland, 2022a. Simmons-Citrat-Agar [WWW Document]. URL <https://www.carlroth.com/de/de/medien-fuer-coliforme-ecoli/simmons-citrat-agar/p/5774.1> (accessed 12.14.22).
- Carl Roth Deutschland, 2022b. Endo-Agar (Basis) [WWW Document]. URL <https://www.carlroth.com/de/de/medien-fuer-coliforme-ecoli/endo-agar-%28basis%29/p/x920.1> (accessed 12.13.22).
- Carl Roth Deutschland, 2022c. Coliforme chromogener Agar (ISO) | [WWW Document]. URL <https://www.carlroth.com/de/de/chromogene-medien/coliforme-chromogener-agar-%28iso%29/p/8849.1> (accessed 12.13.22).
- Europäisches Parlament, 2000. EGRichtlinie Nr. 2000/54, Anhang III.

- Gunkel, G., 1994. Bioindikation in aquatischen Ökosystemen. Gustav Fischer Verlag Jena, Berlin.
- Hochschule Neubrandenburg, 2022a. Versuchsanleitung für das Praktikum im Modul "Qualitätsmanagement und Lebensmitteltechnologie."
- Hochschule Neubrandenburg, 2022b. Versuchsanleitung für das Praktikum im Modul "Grundlagen der Mikrobiologie und Biochemie."
- Hütter, L., 1994. Wasser und Wasseruntersuchung, 6. Auflage. ed. Salle und Sauerländer, Frankfurt am Main.
- Jankowski, S., 2013. Rechtliche Grundlagen, Empfehlungen und Regelwerk [WWW Document]. Umweltbundesamt. URL <https://www.umweltbundesamt.de/themen/wasser/trinkwasser/rechtliche-grundlagen-empfehlungen-regelwerk> (accessed 12.9.22).
- Jose, R., Singh, V., 2020. Swarming in Bacteria: A Tale of Plasticity in Motility Behavior. *J. Indian Inst. Sci.* 100, 515–524. <https://doi.org/10.1007/s41745-020-00177-2>
- Kearns, D.B., 2010. A field guide to bacterial swarming motility. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 634–644. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2405>
- Krangemann, K.A., 2022. Substitution von *Proteus mirabilis* durch *Azospirillum brasilense* im Toxizitätstest 36.
- Lemire, J.A., Harrison, J.J., Turner, R.J., 2013. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 371–384. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3028>
- Niu, C., Graves, J.D., Mokuolu, F.O., Gilbert, S.E., Gilbert, E.S., 2005. Enhanced swarming of bacteria on agar plates containing the surfactant Tween 80. *J. Microbiol. Methods* 62, 129–132. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.01.013>
- Okafor, N., 2011. Taxonomy, Physiology, and Ecology of Aquatic Microorganisms, in: Okafor, N. (Ed.), *Environmental Microbiology of Aquatic and Waste Systems*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 47–107. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-1460-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-94-007-1460-1_4)
- Pearson, M.M., 2019. *Proteus mirabilis - Methods and Protocols*. Springer Science and Business Media.
- Stoffels-Schmid, 2015. *Praktikumskript Mikrobiologie Hochschule Weihenstephan*.
- Süßmuth, R., Eberspächer, J., Haag, R., Springer, W., 1999. *Mikrobiologisch-Biochemisches Praktikum*, 2. Auflage. ed. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.



## Anhang

### Anhang 1: Praktikumsanleitung „Bakteriologische Untersuchung von Wasser“

#### Einführung

Wasser ist ein unentbehrliches Nahrungsmittel für alle Lebewesen. Entsprechend ist in den industrialisierten Ländern die Bereitstellung von Trinkwasser in ausreichender Menge und Qualität eine Grundvoraussetzung für die öffentliche Versorgung. Einerseits steht den meisten Haushalten per Wasserleitung Trinkwasser unmittelbar zur Verfügung, andererseits wird es zur Herstellung von Lebensmitteln eingesetzt und kommt so indirekt mit dem Verbraucher in Berührung. Die Mindestanforderungen an die Qualität von Trinkwasser sind durch nationale (Trinkwasser Verordnung) und europäische Regelungen vorgeschrieben. Neben chemischen (z.B. pH-Wert, Rückstände an Pestiziden, Salzgehalt...) und physikalischen (Temperatur, Farbe) Eigenschaften sind auch mikrobiologische Parameter in der Verordnung festgelegt. Die mikrobiologischen Eigenschaften des Trinkwassers spielen für die öffentliche Gesundheit eine überragende Rolle: verkeimtes Trinkwasser kann die Ursache für das epidemische Auftreten von Infektionskrankheiten sein. Besonders die Ausbreitung von Typhus- und Cholera-Erregern kann zu einer schwerwiegenden Bedrohung für die Bevölkerung werden, wenn kein sauberes Trinkwasser zur Verfügung gestellt werden kann. Als mögliche Quelle für Trinkwasser kommen Oberflächengewässer und Grundwasser in Frage. Je nach Qualität des Rohwassers müssen in Wasserwerken Aufbereitungsverfahren durchgeführt werden, um die vorgeschriebene Trinkwasserqualität zu erreichen. Hierzu gehört u.a. die Chlorung, die Behandlung mit UV-Licht oder Ozon. In mikrobiologischer Hinsicht sind Oberflächengewässer stärker als Grundwasser gefährdet. Über eine Gesamtkeimzahlbestimmung wird die bakteriologische Qualität des Wassers kontrolliert. Dabei dürfen nicht mehr als 100 Lebendkeime pro ml festgestellt werden. Gleichzeitig wird in einer Wasserprobe von 100 ml eine Untersuchung auf Anwesenheit von coliformen Keimen durchgeführt. Dieser Test beruht auf dem Konzept der sog. "Indikatorkeime". Die Anwesenheit coliformer Keime im Trinkwasser gibt einen Hinweis, dass das Versorgungssystem mit dem Abwasser tierischer oder menschlicher Herkunft in Verbindung stehen könnte. Einem solchen Befund muss sehr sorgfältig nachgegangen werden, da immer die Gefahr besteht, dass durch eine Abwasserverunreinigung des Versorgungssystems auch gefährliche Krankheitserreger verbreitet werden. Die effektive Trennung von Abwasserkanalisationssystemen und Abwasserkläranlagen von der Trinkwassergewinnung und -aufbereitung wurde in den industrialisierten Ländern im 19. Jahrhundert im großen Umfang durchgeführt. Diese Maßnahme hat entscheidend zur Zurückdrängung gefürchteter Infektionskrankheiten beigetragen.

## Chemikalien/Medien

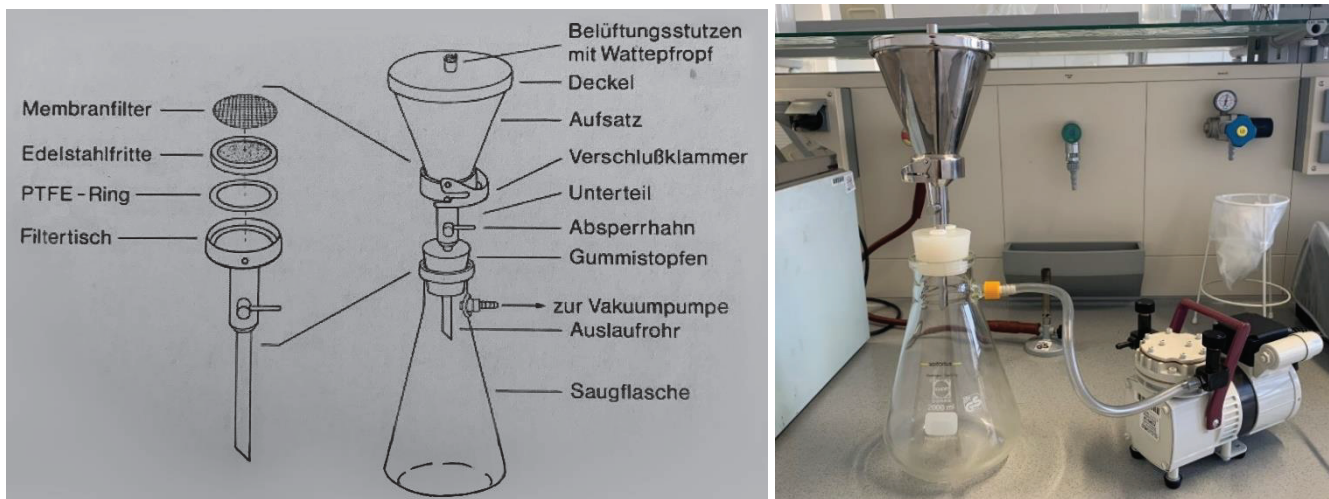
Salzlösung: 0,85%ige NaCl-Lösung zu 9ml Portionen, sterilisiert

DEV-Nähragar: DEV-Nähragar wird nach Herstellerangaben angesetzt und in Flaschen sterilisiert

CCA-Nähragar: CCA-Nähragar wird nach Herstellerangaben angesetzt und in Petrischalen ausgegossen (Nicht autoklavieren, nur erhitzen)

Membranfilter: Citratfilter 0,45

## Geräteaufbau



### A) Gesamtkeimzahlbestimmung GKZ

Von jeder Wasserprobe werden 10fach Verdünnungen (Trinkwasser:  $10^1$ ,  $10^2$ ; Tollensewasser:  $10^1 - 10^4$ ) angelegt und im Plattengussverfahren mit DEV-Nähragar vermischt. Von jeder Verdünnungsstufe werden 2 Platten angelegt. Die Platten werden jeweils 24 h bei  $20^\circ\text{C}$  bzw.  $36^\circ\text{C}$  inkubiert. Auswertung: Angabe der gefundenen Keimzahl und Gegenüberstellung zum Trinkwassergrenzwert.

### B) Coliforme Keime

Der Coliforme chromogene Agar wird von der ISO 9308-1 (CCA) als selektives Medium zur Detektion von *E. coli* und anderer Coliforme aus Wasser- und Lebensmittelproben empfohlen. Die hochwertigen Inhaltsstoffe ermöglichen ein schnelles Kolonienwachstum, wobei gram-positive Bakterien durch das enthaltene Tergitol 7 inhibiert werden. Das Medium enthält ebenfalls

Tryptophan, wodurch mit den gewachsenen Kolonien ein Indoltest zur näheren Bestimmung von E. coli durchgeführt werden kann. Durch die Bildung des Enzyms  $\beta$ -D-Galactosidase können coliforme Keime den chromogenen Bestandteil Salmon-gal umsetzen und erscheinen in roten Kolonien. Da E. coli zusätzlich  $\beta$ -D-Glucuronidase bildet und dadurch zusätzlich das X-Glucuronid umsetzt, sind diese Kolonien typischerweise dunkelblau-violett gefärbt. Es wird nach der TWVO empfohlen, die Probe zunächst durch eine Membran zu filtrieren, die Membran auf eine CCA-Platte zu überführen und diese bei  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  für  $21 \pm 3\text{h}$  zu inkubieren. Zur Auswertung wird zuerst die Zahl der roten Kolonien (Coliforme, nicht-E. coli) notiert. Kolonien, die nicht gefärbt sind, werden durch den Oxidase-Test als coliform (Oxidasen negativ) oder nicht coliform eingestuft. Anschließend werden dunkelblau-violette Kolonien als E. coli gezählt. Die Gesamtzahl an coliformen Bakterien ergibt sich aus allen Oxidase-negativen Kolonien, allen roten Kolonien und allen dunkelblau-violetten Kolonien.

#### 4. Abflammen und Zusammenbau der Filtrationseinheit

Filtrationsgerät mit Hilfe eines durchbohrten, auf das Auslaufrohr gezogenen Gummistopfens fest auf eine Saugflasche setzen, und die Saugflasche mit der Vakuumpumpe verbinden. Dichtungsring und Edelstahlritze in den Filtertisch einlegen. Aufsatz auf das Unterteil setzen und mit Hilfe der Verschlussklammer fest mit ihm verbinden.

Absperrehahn des Unterteils öffnen, Vakuumpumpe einschalten und einen schwachen Luftstrom mit der Fritte saugen. Innenwand mit Ethanol abspülen.

Aufsatz abnehmen und die Filtriereinheit bei geöffnetem Ventil abflammen. Aufsatz auf der Unterseite abflammen und wieder auf das Unterteil setzen und verschließen.

Nach dem Abflammen zum Abkühlen etwas steriles, destilliertes Wasser eingießen, Hahn öffnen und Wasser absaugen, Hahn wieder schließen.

#### 5. Membranfilter einlegen

Aufsatz öffnen und vom Filtrationsgerät nehmen. Sterile Membranfilter (Citratfilter) mitsamt dem darüber liegenden farbigen Schutzblättchen mit steriler Pinzette am äußeren Rand anfassen, aus der Packung entnehmen und auf das Filtrationsgerät legen. Schutzfolie abziehen und Aufsatz wieder verschließen

#### 6. Filtration und Inkubation der Probe

100 ml der Probe in den Aufsatz gießen. Der Hahn muss dabei geschlossen sein. Vakuumpumpe einschalten und Hahn öffnen. Probe unter leichtem Vakuum absaugen und Hahn wieder schließen. Anschließend den Aufsatz mit ca. 30 ml sterilen NaCl Lösung spülen und erneut absaugen. Aufsatz abnehmen und mit einer abgeflammt Pinzette den Membranfilter am Rand vom Filtrationsgerät lösen. Hierbei den Membranfilter nur am

nur am Rand mit der Pinzette berühren. Der Membranfilter wird in die Mitte der CCA Agar Platte gegeben. Die Platten werden bei  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  für  $21 \pm 3\text{h}$  inkubiert.

## 7. Auswertung

Auszählen der KBE's auf dem Membranfilter

Escherichia coli	Blau Violett
Enterobacter aerogenes	Rosa Rot
Pseudomonas aeruginosa	Farblos

## 8. Angabe des Ergebnisses

- a) In 100 ml Wasser wurde *E. coli* (nicht) nachgewiesen.
- b) In 100 ml Wasser wurden coliforme Keime (nicht) nachgewiesen.

## Literatur

K. Höll (1979) Wasser; Untersuchung, Beurteilung, Aufbereitung, Chemie, Bakteriologie, Virologie, Biologie. 6. Aufl. Verlag W. de Gruyter, Berlin

K. Aurand u.a. Hrsg. (1991) Die Trinkwasserverordnung. Einführung und Erläuterungen für Wasserversorgungsunternehmen und Überwachungsbehörden. 3. Aufl. Erich Schmidt Verlag

L.A. Hütter (1994) Wasser und Wasseruntersuchungen, 6. Aufl. Laborbücher Chemie, Salle und Sauerländer

Katalyse e.V. (1993) Das Wasserbuch, Trinkwasser und Gesundheit. Kiepenheuer & Witsch

Produkt-Datenblatt Coliforme Chromogener Agar (2021), Carl Roth GmbH + Co. KG

## Anhang 2: Praktikumsanleitung „Toxizitätstest mit Bakterien“

### LESEN ZUR VORBEREITUNG

Literatur:

Süßmuth, R. et al (1998) Mikrobiologisch-Biochemisches Praktikum, (Kap. 9.2 Toxizitätstest mit Bakterien)

Mikroorganismen zeigen spezifische Reaktionen in Gegenwart von Giftstoffen. Auch die Schwärmeigenschaft des Bakteriums *Proteus Mibilis* kann durch toxische Reagenzien beeinflusst werden. In dem hier vorgestellten Experiment soll untersucht werden, inwieweit die Schwärmaktivität von *Proteus Mibilis* durch die Testverbindung Zinksulfat beeinflusst wird.

### Material:

Vorkultur von *P. mirabilis*, Caso-Bouillon, Schwärmagar (1,4% Hefeextrakt, 2,9% Caso-Bouillon, 2,4% Agar-Agar) Petrischalen, Schüttler, Photometer mit Halbmikroküvetten, Inkubator, sterile Eppendorffgefäße, steriles Wasser, Zinksulfatlösung (1000µg/ml)

### Durchführung:

50ml NB-Medium werden mit 5ml einer *P. mirabilis* Vorkultur angeimpft und bei 30°C bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{578nm} = 0,6$  (Messen der optischen Dichte gegen Wasser) angezchtet.

Der Schwärmagar wird aufgekocht und auf 50°C abgekühlt. Es werden 5 Platten mit Schwärmagar gegossen. Nach dem Erstarren des Agars werden die Platten für 30 min bei 30°C offen, überkopf getrocknet.

Von der Zinksulfatlösung (1000µg/ml) werden 5 Verdünnungen mit sterilem Wasser in Eppendorffgefäßen hergestellt. Die Konzentrationen an Zinksulfat sollen 0, 50, 100, 500, 1000 µg/ml betragen.

Wenn die Zellen die vorgesehene Dichte erreicht haben, werden 100 µl der Zellsuspension mit 100 µl der Testsubstanz-Verdünnung bzw. Wasser (Kontrolle) in Eppendorffgefäßen gemischt. Von jeder Mischung werden jeweils 5 µl vorsichtig in die Mitte der Schwärmagarplatte aufgetropft. Die so beimpften Platten werden für 24 Stunden bei 20°C inkubiert.

### Auswertung

Bei richtiger Inkubation schwärmt *P. mirabilis* über die Agaroberfläche aus. Die Breite dieser Zonen wird bestimmt und mit der Konzentration der Testsubstanz korreliert.

## Erklärung zur selbstständigen Anfertigung der Arbeit

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist und ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Textstellen, die wörtlich oder annähernd wörtlich aus Veröffentlichungen entnommen wurden, sind durch Zitate als solche gekennzeichnet.

Ich erkläre weiterhin, dass die abgegebene digitale Version mit der eingereichten schriftlichen Version übereinstimmt.

Neubrandenburg, 23.02.2023

---

Ort, Datum

---

Eigenhändige Unterschrift