Wachstumsvoraussetzungen für strikt anaerobe Bakterien

VerfasserInnen: Pascale Sandmann pascale@sandmann.ch, Thomas Huber its4tom@gmx.ch, Philippe Saner P.Saner@access.unizh.ch, Isabelle Zumsteg izumsteg@hotmail.com
Betreuerin: Christine Lehmann chleh@botinst.unizh.ch

Einleitung

Aus Pansensaft und aus einer Schlammprobe (aus dem Irchel-Park) wurden anaerobe Bakterien gezüchtet, indem sie unter anaeroben Bedingungen in einem „Agarshake“ in Kultur gebracht wurden. Resazurin zeigte als Redoxindikator die anaeroben Bedingungen der Bakterienkulturen an (ungefärbtes Medium bedeutet anaerobe Bedingungen - gefärbtes (rosa) Medium deutet auf mikroaerobe Bedingungen hin). Zugabe von Pyrogallol in den über dem Agar führt schnell zu anoxischen Bedingungen, sodass auch strikt anaerobe Bakterien wachsen können.

Vorgehen

Vorbereitung des Inoculums: Anreicherung von sporenbildenden Bakterien: Pasteurisieren einer Bodensuspension resp. von Pansensaft bei 70° C.

- Den Schlamm in wenig autoklaviertem Wasser aufrühren, den Pansensaft nicht verdünnen, 2 ml von dieser Suspension in ein Reagenzglas geben. Zugabe von 8 ml steriler physiologischer NaCl-Lösung (0.85%).
- Inkubation der Suspension in einem Wasserbad (70° C) während 10 Minuten; danach das Reagenzglas sofort ins Eis stellen.

Herstellung einer Verdünnungsreihe und Ansetzen der Agarshakes

Schritt 1: 10er Verdünnungsreihe

- In 7 Reagenzgläser (eines davon für die Kontrolle) 5.4 ml Nährlösung pipettieren; danach 10 µl Resazurin in alle Reagenzgläser pipettieren.
- 0.6 ml abgekühltes (pasteurisiertes) Inoculum in das erste Reagenzglas geben, gut mischen, 0.6 ml von dieser Lösung in das Reagenzglas 2 überführen, gut mischen, 0.6 ml von dieser Lösung in das Reagenzglas 3 überführen, etc. Diesen Vorgang so lange wiederholen, bis 6 Reagenzgläser (verdünntes) Inoculum enthalten. Das siebte Reagenzglas dient als Kontrolle und wird deshalb nicht beimpft.
- Je 3 ml von den Reagenzgläsern 5 und 6 in zwei weitere Reagenzgläser (RG 5' und 6') geben (→ mit Reagenzgläsern 5' und 6' wird die Pyrogallol-Methode, welche schnell anaerobe Bedingungen schafft, getestet).

Schritt 2: Zugabe von flüssigem Agar

- Je 3 ml (flüssigen, 3-fach konzentrierten) Agar in Reagenzgläser 1-4 und 7, und je 1.5 ml Agar in die Reagenzgläser 5, 5', 6 und 6' geben; alle Reagenzgläser auf dem Vortex sofort gut mischen, bevor der Agar erstarrt.
- Pyrogallol-Methode: bis in die Mitte der Reagenzgläser 5' und 6' ein kleines Stück Watte einführen, darauf ca. 100 µl 4% NaOH und einige Pyrogallolkristalle auftragen; danach wieder ein Stück Watte einführen und die Reagenzgläser auf den Kopf stellen (sodass keine Lauge den Agar kontaminieren kann).
- Alle RGs mit Butylgummistopfen verschliessen.
- Die Reagenzgläser mit dem inzwischen verfestigten Medium werden bei Dunkelheit und bei 30°C in einem Wärmeschrank während einer Woche inkubiert

Ergebnisse:

Schlammprobe aus dem Irchel-Park

Verdünnungsstufe	Gasbildung	Kolonien	Typen von Bakterienkolonien	Resazurin-Entfärbung + = farblos, - = violett
1	negativ	positiv	gross (4mm)	+
2	negativ	positiv	gross (3mm)	+
3	negativ	positiv	kleiner (2mm)	+
4	negativ	positiv	2 grosse Kolonien (5mm)	- (hellrosa)
5	negativ	negativ	-	-
5'	negativ	negativ	-	+
6	negativ	negativ	-	-
6'	negativ	negativ	-	+
7 (= Kontrolle)	negativ	negativ	-	-

Pansensaft

Verdünnungsstufe	Gasbildung	Kolonien	Typen von Bakterienkolonien	Resazurin-Entfärbung + = farblos, - = violett
1	negativ	positiv	sehr klein (1/10mm)	+
2	negativ	positiv	sehr klein	+
3	negativ	positiv	sehr klein	+
4	negativ	positiv	sehr klein	+
5	negativ	positiv	sehr klein	+
6	negativ	positiv	grosse und kleine	oben -, unten +
7 (= Kontrolle)	negativ	positiv	sehr klein	+

Diskussion

- 1) Es waren **unterschiedlichen Formen und Grössen von Kolonien** unterscheidbar, was auf unterschiedliche Bakterienstämme hinweisen könnte.
- 2) Der oberste, microaerobe Bereich im Agar war manchmal rosa gefärbt mit rel. grossen Kolonien auf der Oberfläche.
- 3) Die **Kontrolle** (kein Inokulum) war bei der Schlammprobe aus dem Irchelpark negativ, d.h. kontaminationsfrei. Wir arbeiteten also aseptisch. Es zeigten sich auch keine abiotisch verursachten Änderungen im Agar. Die Kontrolle für den Pansensaft war jedoch positiv. Unsere Arbeitsweise war also hier nicht optimal. Da für die Zugabe des Agars für alle Proben dieselbe Glaspipette verwendet wurde, könnte bei diesem Arbeitsschritt die Kontrolle durch unsterile Arbeitsweise querkontaminiert worden sein. Möglich wäre auch eine Kontamination durch Fremdbakterien aus der Umgebungsluft, wenn die Reagenzgläser am Hals nicht abgeflammt wurden.
- 4) Unterschied zwischen den Reagenzgläsern 5 und 5' respektive 6 und 6' für die Schlammprobe. Bei allen 4 Reagenzgläsern wurden keine Kolonien gefunden (zu niedrige Bakterien-Konzentration in der ursprünglichen Probe); die unterschiedliche Resazurin Färbung, 5 und 6 gefärbt, 5' und 6' entfärbt, lässt darauf schliessen, dass **Pyrogallol effizient Sauerstoff aus dem Kulturmedium** entfernt.
- 5) Die **Bodenproben** (nicht die Schlammproben) anderer Arbeitsgruppen zeigten meist fein verteilte **Gasblasen** (CO₂, H₂...) analog zur Verteilung von Bakterienkolonien.