

Einzelprotokoll

Schreiber: Dennis [REDACTED]
Versuchsanfang: 23.04.2002
Partner: Stephanie [REDACTED]
Versuchsende: 30.04.2002

Das Membranfilterverfahren

Aufgabe & Prinzip

Untersuchung einer beliebigen Wasserprobe auf E. coli und choliforme Bakterien mit Hilfe des Membranfilterverfahrens und spätere Identifizierung dieser durch den Einsatz verschiedenster Nährmedien.

Das Membranfilterverfahren eignet sich auf Grund der Filtertechnik für eine schnellere und genauere Keimzahlbestimmung bei einer geringen Keimzahldichte als das MPN- oder das Plattengußverfahren.

In unserem Fall dient es zunächst nur dazu, eventuelle Kolonien von E. Coli bzw. choliformen Bakterien für die weitere Verarbeitung zu erhalten.



Versuchsaufbau

Die folgenden Berechnungen für die Zusammensetzung der einzelnen Selektivnährmedien wurden auf 100ml bezogen, da das Medium jeweils auf vier Kulturröhrchen (à 25ml) für vier Gruppen aufgeteilt werden soll:

Rezepte für die Selektivnährmedien

Glucos- Bouillon:

Stoff	Original	für 100ml
NaCl	5g	0,5g
Glucose	10g	1g
Pepton aus Fleisch	10g	1g
Fleischextrakt	3g	0,30g
Bromkresol-purpur	0,02g	0,002
Destilliertes Wasser	1000ml	100ml

Lactose-Bouillon:

Stoff	Original	für 100ml
-------	----------	-----------

NaCl	5g	0,5g
Lactose	10g	1g
Pepton aus Fleisch	10g	1g
Fleischextrakt	3g	0,30g
Bromkresol-purpur	0,02g	0,002
Destilliertes Wasser	1000ml	100ml

Tryptophan-Bouillon:

Stoff	Original	Für 100ml
NaCl	5g	0,5g
Tryptophan	10g	1g
DC-Tryptophan	1g	0,1g
Destilliertes Wasser	1000ml	100ml

Citrat-Agar:

Fertig-Agar von Merck. Es werden 2,35g für 100ml Agar (~25ml á 4 Platten) benötigt (Original: 23,5g - 1000ml).

Endo-Agar:

Fertig-Agar von Merck. Es werden 11,6g für 200ml Agar (~30ml á 7 Platten) benötigt (Original: 58g - 1000ml).

Da wir Bakterien züchten wollen sollte der pH-Wert bei allen Nährmedien und dem Agar bei 7,2 liegen.

Versuchsdurchführung

Die Membranfiltration

Die zu untersuchende Wasserprobe ist in unserem Fall Aquariumwasser aus der Zoologie:

1. Alle benötigten Petrischalen werden bei 128°C für 20min autoklaviert.
2. Die benötigte Menge Endo-Agar wird mittels der Analysenwaage in einen 300ml Erlenmeyerkolben eingewogen und mit der entsprechenden Menge dH₂O auf dem Magnetrührer mit einem Rührfisch gelöst. Der pH-Wert der Lösung wird mit dem pH-Meter auf 7,2 eingestellt.
3. Der Kolben mit dem Endo-Agar wird mit Kappe bei 128°C für 20min autoklaviert.
4. 5ml Aquariumwasser werden mit der Pipette in einen Messbecher überführt und anschließend mit 95ml Leitungswasser verdünnt (Verdünnung = 1:20).
5. Der Endo-Agar wird unter der Sicherheitswerkbank in die Petrischalen gegossen und dort vorerst belassen.

6. Unter der Sicherheitswerkbank wird mittels Bunsenbrenner der Vakuumfilter abgeflämmt. Zu dieser Apparatur gehören: Deckel, Aufsatz, Verschlusskammer, Unterteil, Edelstahlfritte, PTFE-Ring und der Filtertisch. Gleichzeitig wird der sterile Membranfilter mit einer zuvor ebenfalls abgeflämmt Pinzette auf die Fritte gegeben. Die Apparatur wird noch unter der Werkbank zusammengesetzt und gut verschlossen.
7. Die Filterapparatur wird mittels Gummistopfen mit einer Saugflasche verbunden. Diese ist wiederum über Gummischläuche mit einer Vakuumpumpe verbunden.
8. Kontrollieren, ob der Absperrhahn verschlossen ist.
9. Die zu untersuchende Wasserprobe (100ml) wird in den Aufsatz gegossen und der Deckel geschlossen.
10. Die Vakuumpumpe wird eingeschaltet und der Absperrhahn geöffnet.
11. Nach Durchlauf der gesamten Probenmenge wird bei geschlossenem Absperrhahn mit 0,9% NaCl-Lsg. nachgespült und die Prozedur wiederholt.
12. Unter der Sicherheitswerkbank wird der Membranfilter mit einer zuvor abgeflämmt Pinzette auf den mittlerweile erhärteten Endo-Agar so abgerollt, dass keine Luftblasen entstehen.
13. Die Petrischale wird verschlossen und bei 37°C im Brutschrank für ~24h belassen.

Identifizierung der Kolonien vom Membranfilter

14. Herstellung von Glucose-, Lactose-, Tryptophanbouillon und Citrat-Agar nach Rezept.
15. 3 Kulturröhrchen werden je zu 2/3 mit den drei Bouillons gefüllt. In die Röhrchen mit Glucose- und Lactosebouillon wird zwecks späterem Gastest zusätzlich je ein Darumröhrchen gegeben.
16. Die Kulturröhrchen werden mit Kappen bei 128°C für 20min autoklaviert.
17. Eine Kolonie von der Endo-Agar-Platte (rot-metallisch glänzend) wird in 2ml 0,9% NaCl suspendiert.
18. Die Kulturröhrchen werden unter der Sterilwerkbank mit der abgeflämmt Impföse mit der Bakteriensuspension beimpft, ebenso der Citrat-Agar in der Petrischale (in Schlangenlinien).
19. Alle Ansätze werden bei 37°C im Brutschrank für ~ 2 Tage belassen.
20. Beim Glucose- und Lactosebouillon wird mit dem zuvor geeichten pH-Meter der pH-Wert bestimmt und das Darumröhrchen auf Gaseinschlüsse untersucht.
21. Der Tryptophan-Bouillon wird mit wenigen Tropfen Kovac'scher Lsg. behandelt, welche bei rötlicher Verfärbung des Bouillons anzeigt, dass Indol produziert worden ist.
22. Der Citrat-Agar wird auf eine eventl. Verfärbung, bzw. Kolonienwachstum hin geprüft (Indikator für Citratverwertung)

Auswertung

Ergebnis der Selektivnährmedien und Identifizierung der Bakterien

Medium	Ergebnis	Keimform
Endo-Agar	rot-metallische Kolonien	Lactosespaltende Organismen
Glucose-Agar	Gas- und Säurebildung	E. coli + choliforme B.
Lactose-Agar	Gas- und Säurebildung	E. coli + choliforme B.
Tryptophan-Agar	positiv	E. coli
Citrat-Agar	keine Citratverwertung ¹	E. coli

¹: Schlangenlinien waren zu erkennen.

Auf Grund der Ergebnisse der Selektivnährmedien kann ich sagen, dass in der Wasserprobe Escherichia coli Bakterien vorhanden waren. Dies ist bei einer Probe Aquariumwasser nicht sonderlich überraschend, da die Organismen im Aquarium durch ihren Stoffwechsel E. coli ins Wasser abgeben, bzw. das Wachstum der Bakterien begünstigen.

Fehlerquellen

➤ Da nicht die Möglichkeit gegeben war, die Medien immer im exakten Zeitfenster zu bebrüten, kann es dadurch zu Schwankungen im Kolonienwachstum gekommen sein. Diese Fehlerquelle halte ich allerdings für vernachlässigbar.