

Stephanie [REDACTED]
BTA-OH
Gruppe A, Arbeitsplatz 7
Partner: Martin [REDACTED]

Protokoll
über den Versuch vom
05.11.2002, 04./05.02.
und
11./12.02.2003

„Rhodospirillaceae“

Mikrobiologisches Praktikum
Berufskolleg Kartäuserwall
Kartäuserwall 30, Köln

Versuchsleiter: Hr. Cichos

Isolierung und Charakterisierung phototropher Bakterien

Prinzip / Theorie

In diesem Versuch wollen wir aus Teichschlamm Bakterien der Gattung Rhodospirillum isolieren und diese Bakterien dann charakterisieren.

Rhodospirillen betreiben anoxygene Photosynthese. Sie sind gekennzeichnet durch den Besitz photosynthetischer Pigmente, sie benötigen also Licht als Energiequelle. Bei dieser Art der Photosynthese wird allerdings nicht – wie bei den Pflanzen – Sauerstoff frei. Man sagt daher, dass diese Bakterien Relikte aus der früher Entwicklung der Photosynthese sind. Ihr Photosyntheseapparat befindet sich auf der Thylakoidmembran. So sind sie in der Lage, organische Verbindungen als C- und H-Quelle zu nutzen.

Rhodospirillen sind typische Wasserbakterien; sie kommen sowohl in Süß- als auch in Meerwasser vor. Die Rhodospirillales werden in vier Familien aufgeteilt: Schwefelpurpurbakterien, schwefelfreie Purpurbakterien, grüne Schwefelbakterien und die Chloroflexusgruppe. Die Purpurbakterien besitzen Carotinoide als Photosynthesepigmente, die anderen Familien Bacteriochlorophyll a.

Die Rhodospirillen zählen zu den schwefelfreie Purpurbakterien. Sie sind spirillenförmig und polar begeißelt. Nach ihrer Größe und Farbe unterscheidet man *R. fluvum*, *R. molischianum* und *R. photometricum*. Das Bakterium kommt in schwefelwasserstoffarmen Habitaten vor, z.B. in Waldseen und Gartenteichen. Zu hohe Schwefelwasserstoff-Konzentrationen hemmen die Photosynthese. Zu hohe Sauerstoffkonzentrationen wirken sich ebenfalls hemmend aus. Daher sind Purpurbakterien auch anaerobe Bakterien.

Durch die Geißelfärbung nach Leifson werden Geißeln sichtbar gemacht. Hierzu werden sie zunächst durch Quellung vergrößert. Durch eine Beizfärbung werden sie dann angefärbt und sollten bei 1000facher Vergrößerung sichtbar sein.

Material

Untersuchungsmaterial: Rhodospirillum spec.
Rhodospirillaceae
Rhodospirillales

Chemikalien:

- Ammoniumchlorid NH_4Cl , M:53,49 g/mol, R22-36, S22 von Riedel-DeHäen
- Dikaliumhydrogenphosphat K_2HPO_4 , M:174,18 g/mol von Merck
- Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4 , M:136,09 g/mol von Merck
- Hefe-Extrakt von Difco Laboratories
- Magnesiumsulfat Heptahydrat $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, M:246,48 g/mol von Merck
- Calciumchlorid Dihydrat CaCl_2 , M:147,02 g/mol, R36, S22-24 von Merck
- Titriplex
- Eisensulfat Heptahydrat FeSO_4 , M:278,02 g/mol, R22, S24/25 von Merck
- Spurenelementlösung 4, 10-fach konzentriert
- Propionsäure 99% (Milchsäure), R38-41, S26-39 von Merck
- D-Mannit $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$, M:182,17 g/mol von Merck
- D-Sorbit $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$, M:182,17 g/mol von Merck
- Glucose Monohydrat $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$, M:198,17 g/mol von Merck

- Glycerin 87%, δ :1,23 g/cm³ von Merck
- D-Zitronensäure C₆H₈O₇* H₂O, M:210,14 g/mol, R36, S26 von Merck
- DL-Weinsäure 99%, M:150,99 g/mol von Riedel-DeHäen
- DL-Malat D₄H₆O₅, M:134,09 g/mol, R36 von Merck
- Natriumchlorid NaCl von Merck
- Fuchsin C₂₀H₂₀ClN₃, M:337,85 g/mol von Merck
- Ethanol C₂H₅OH, 96%, M:46,07 g/mol, δ :0,88 g/cm³, R11, S7-16 von Merck
- Tannin (Gerbsäure), gepulvert, rein von Merck
- Phenol C₆H₅OH, M:94,11 g/mol, δ :1,06 g/cm³, **sehr giftig!**, R24/25-34, S28,6-45 von Merck

Geräte:

- Lampe (100 W)
- Spiegel (aus Damentoilette)
- Pipetten
- sterile Petrischalen
- Anaerobentopf „Diagnostica“ von Merck
- Anaerotest von Merck
- Anaerocult A von Merck
- Schraubdeckelröhrchen (SDR's)
- Küvetten
- Photometer Ultrospec IV von Pharmacia LKB

Durchführung

1. I. Versuchstag

- zur Gewinnung der Rhodospirillen wird Teichschlamm gesammelt
- für die gesamte Gruppe werden 500 ml FB-Medium I (Standard) nach folgenden Rezept hergestellt:

| | für 1000 ml Medium | für 500 ml Medium |
|------------------------------|-----------------------|----------------------|
| Na-Malat | 4 g | 2 g |
| Ammoniumchlorid | 1 g | 0,5 g |
| Kaliumhydrogenphosphat | 0,8 g | 0,4 g |
| Kaliumdihydrogenphosphat | 0,6 g | 0,3 g |
| Hefeextrakt | 0,2 g | 0,1 g |
| Magnesiumsulfat | 0,2 g | 0,1 g |
| Calciumchlorid | 0,05 g | 0,025 g |
| Titriplex | 0,02 g | 0,01 g |
| Eisensulfat | 0,002 g | 0,001 g |
| SL-Lösung | 1 ml | 0,5 ml |
| pH Wert einstellen | 7,0 | 7,0 |
| auffüllen mit Aqua dest. auf | 1000 ml | 500 ml |

- das Medium autoklavieren
- 2 Schraubdeckelröhrchen (SDR) ebenfalls autoklavieren
- in beide Röhrchen unter sterilen Bedingungen jeweils 2-3 ml Teichschlamm füllen
- die SDR's mit FB-Medium I so auffüllen, dass sie mit dem Schraubdeckel luftblasenfrei verschlossen werden können
- die SDR's im Dauerlicht (tagsüber Sonnenlicht/ abends 100 W in 1 m

Entfernung) bei Raumtemperatur einige Wochen inkubieren

- hinter den Kulturen einen Spiegel aufstellen, damit die Strahlung reflektiert wird
- die Kulturen wöchentlich drehen

2. *II. Versuchstag*

- nach etwa 12 Wochen sollte das Medium rötlich verfärbt sein, wenn Rhodospirillen gewachsen sind
- das FB-Medium I wird mit 1,5% Agar versetzt; daraus werden 2 Platten gegossen: bei 30 ml Medium benötigt man 0,45 mg Agar
- unter sterilen Bedingungen wird von den Kulturen im SDR Material im 13-Strich-Verfahren auf die beiden Platten ausgestrichen
- die Platten werden in den Anaerobentopf gegeben und unter Sauerstoffausschluss 1-2 Wochen bei Raumtemperatur im Dauerlicht inkubiert
- den Anaerobentopf täglich im Licht drehen

3. *III. Versuchstag*

- für den V. Versuchstag werden 17 verschiedene Medium benötigt, von denen jeweils 2 SDR hergestellt werden
- die Medien werden jeweils für 2 Gruppen hergestellt; da in ein Röhrchen etwa 10 ml passen, benötigt man also 40 ml pro Medium

▪ FB-Medium II

- C- und H- Quelle wurde hier durch andere Substanzen ersetzt
- die Konzentration beträgt jeweils 0,2 % = 0,8 g
- die Kontrolle enthält keine C- und H- Quelle
- der pH-Wert ist in allen Medien auf 7,0 einzustellen, außer im Malat-Medium mit pH 5,2
- es werden folgende Medien mit der oben angegebenen Konzentration angesetzt:

- Kontrolle
- Propionsäure
- Mannit
- Sorbit
- Glucose
- Glycerin
- Citrat
- Weinsäure
- Malat (pH 5,2)

- FB-Medium III
 - hier wurde die Malatkonzentration variiert = Malat-Orgel
 - 0,01 % = 4 mg
 - 0,05 % = 20 mg
 - 0,1 % = 40 mg
 - 0,2 % = 80 mg etc...
 - der pH-Wert beträgt in unserer Gruppe in allen Medien 7,0
 - es werden Medien mit den folgenden Malatkonzentrationen angesetzt:

- 0,01 %
- 0,05 %
- 0,1 %
- 0,2 %
- 0,5 %
- 1,0 %
- 1,5 %
- 2,0 %

- jeweils 10 ml pro Medium werden in ein SDR gegeben und autoklaviert
- (das zweite Röhrchen benötigen wir später zum Auffüllen der beimpften Röhrchen)
- es wird eine Reinkultur der phototrophen Bakterien hergestellt
- hierzu werden zunächst 5 SDR's mit je 10 ml FB-Medium I gefüllt und autoklaviert
- der Anaerobentopf wird geöffnet
- aus den beiden Platten sucht man sich drei gut isoliert liegende Einzelkolonien heraus
- damit werden drei der fünf SDR's beimpft
- mit den verbleibenden zwei Röhrchen werden die beimpften Röhrchen so aufgefüllt, dass man sie mit dem Deckel luftdicht verschließen kann
- die Reinkulturen werden eine Woche im Dauerlicht bei Raumtemperatur inkubiert

4. *IV. Versuchstag*

- die Reinkultur, die am besten gewachsen ist (intensivste Rotfärbung) wählt man aus den drei Reinkulturen aus
- jeweils ein SDR der verschiedenen Medien FB II und FB III wird mit 0,5 ml dieser Reinkultur beimpft
- mit dem zweiten Röhrchen wird das Röhrchen wie gehabt aufgefüllt und mit dem Deckel luftdicht verschlossen
- die SDR's werden eine Woche lang wie gehabt inkubiert
- mit den beiden anderen Kulturen nimmt man ein Absorptionsspektrum von ? = 360 – 860 nm in 10er-Schritten auf
- ein Tropfen der Rhodospirillenlösung wird mikroskopiert
- außerdem wird eine Geißelfärbung nach Leifson durchgeführt:

- hierzu werden zunächst drei Lösungen angesetzt:
 Lösung A: 3% Tannin in 0,2 %iger Phenollösung
 Lösung B: 1,5% ige wässrige NaCl-Lösung
 Lösung C: 1,2% Fuchsin in 96%igem Ethanol
- kurz vor der Geißelfärbung die drei Lösungen im Verhältnis 1:1:1 mischen
- alle Arbeiten mit Schutzhandschuhen und unter dem Abzug durchführen
- einen Objektträger über dem Bunsenbrenner entfetten, indem man ihn in die Flamme hält (vorsichtig, damit des Glas nicht platzt)
- auf dem Objektträger vier Rechtecke (1,3 x 2,0 cm) markieren
- in jedes Feld mit der Impföse einen Tropfen Zellsuspension aus der Reinkultur geben und vom Objektträger abtropfen lassen
- an der Luft trocknen lassen
- dann 5 Tropfen Färbelösung in jedes Feld, immer im Abstand von 5 Sekunden pro Feld
- wenn in den ersten beiden ein Niederschlag sichtbar wird, den gesamten Objektträger mit Aqua dest. spülen
- Präparat an der Luft trocknen lassen und mikroskopieren

5. *V. Versuchstag*

- die Kulturen werden nun photometrisch ausgewertet
- bei 660 nm wird die Extinktion der einzelnen Kulturen ermittelt
- die Ergebnisse werden tabellarisch und graphisch dargestellt

Ergebnisse

Das Absorptionsspektrum der ausgewählten Reinkultur ergab folgendes Ergebnis:

| Wellenlänge | Absorption |
|-------------|------------|
| 360 | 1,213 |
| 370 | 1,284 |
| 380 | 1,301 |
| 390 | 1,203 |
| 400 | 1,081 |
| 410 | 0,953 |
| 420 | 0,670 |
| 430 | 0,058 |
| 440 | -0,176 |
| 450 | -0,124 |
| 460 | -0,221 |
| 470 | -0,301 |
| 480 | -0,301 |
| 490 | -0,301 |
| 500 | -0,301 |
| 510 | -0,301 |
| 520 | -0,301 |
| 530 | 0,196 |
| 540 | 0,263 |
| 550 | 0,221 |
| 560 | 0,272 |
| 570 | 0,256 |
| 580 | 0,252 |
| 590 | 0,252 |
| 600 | 0,272 |
| 610 | 0,206 |
| 620 | 0,154 |
| 630 | 0,353 |
| 640 | 0,424 |
| 650 | 0,581 |
| 660 | 0,663 |
| 670 | 0,716 |
| 680 | 0,471 |
| 690 | 0,360 |
| 700 | 0,362 |
| 710 | 0,353 |
| 720 | 0,345 |
| 730 | 0,352 |
| 740 | 0,360 |
| 750 | 0,370 |
| 760 | 0,370 |
| 770 | 0,386 |
| 780 | 0,400 |
| 790 | 0,410 |
| 800 | 0,435 |
| 810 | 0,418 |
| 820 | 0,344 |
| 830 | 0,319 |
| 840 | 0,340 |
| 850 | 0,418 |
| 860 | 0,531 |

Tab.1: Absorptionsspektrum

Im mikroskopischen Bild sah man die spirillenförmigen, farblosen Bakterien bei 1000facher Vergrößerung mit Ölimmersionsmikroskopie. Die Zellen waren mobil und unterschiedlich groß. Aufgrund der Mobilität ließen sie sich nicht ausmessen. Auch eine genauere Charakterisierung war bei der Vergrößerung nicht möglich. Nach der Geißelfärbung waren die Zellen nicht mehr farblos, sondern rötlich gefärbt. Die Geißeln waren trotz Quellung und Färbung bei 1000facher Vergrößerung nicht sichtbar.

Die Messung der unterschiedlichen Medien bei 660 nm führte zu diesem Ergebnis:

| Probe | Extinktion |
|------------------|------------|
| 1 Kontrolle | 0,264 |
| 2 Propions. | 0,229 |
| 3 Mannit | 0,234 |
| 4 Sorbit | 0,261 |
| 5 Glucose | 0,576 |
| 6 Glycerin | 0,345 |
| 7 Citrat | 0,396 |
| 8 Weins. | 0,202 |
| 9 Malat (pH 5,2) | 0,679 |

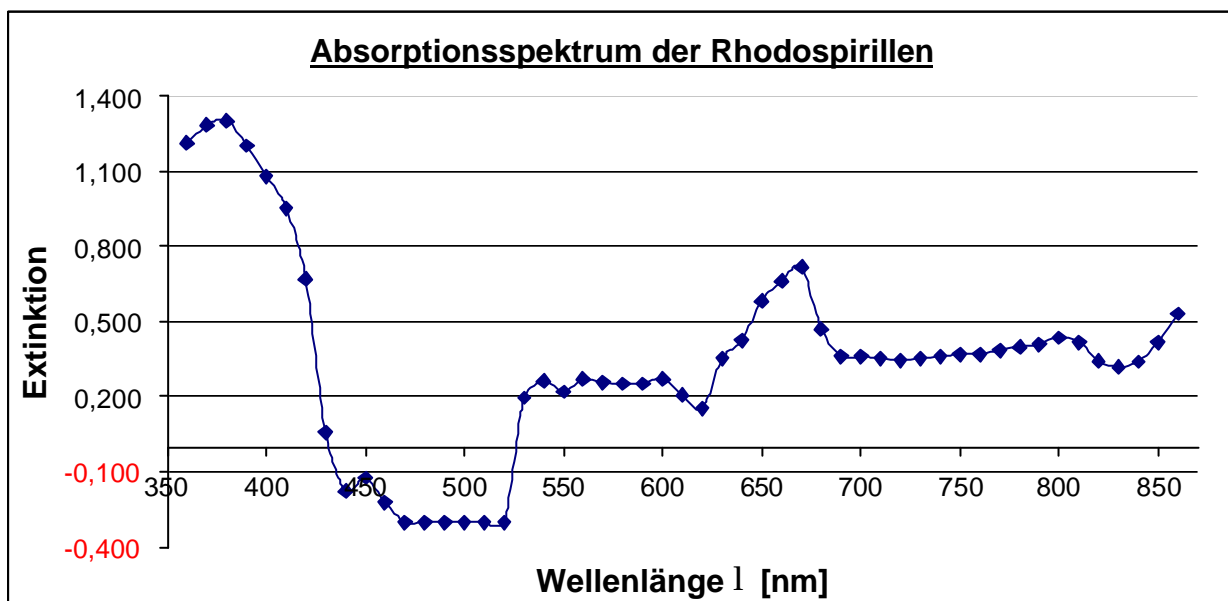
Tab. 2: versch. C- und H-Quellen

| Konzentration [%] | Extinktion |
|-------------------|------------|
| 0,01 | 0,273 |
| 0,05 | 0,499 |
| 0,1 | 0,578 |
| 0,2 | 0,952 |
| 0,5 | 0,822 |
| 1,0 | 1,163 |
| 1,5 | 0,051 |
| 2,0 | 0,667 |

Tab. 3: Malat-Organ

Auswertung

Trägt man in einem Graphen die Wellenlänge gegen die Extinktion ab, so kann man das Absorptionsmaximum der Bakteriensuspension bestimmen:

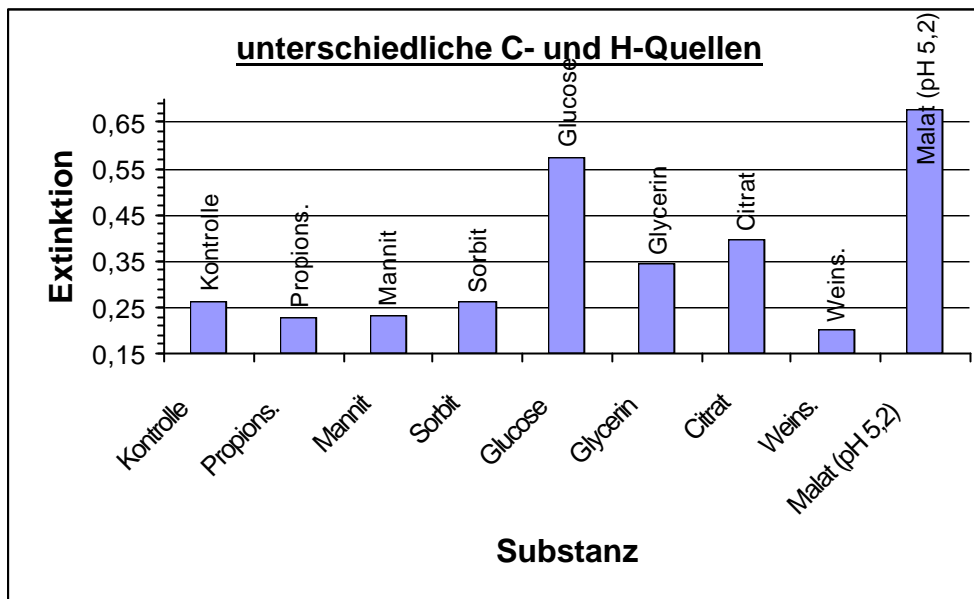


Graph 1: Absorptionsspektrum der Rhodospirillensuspension

Das Maximum befindet sich bei etwa 660 - 670 nm. Hier ist ein deutlicher Peak sichtbar. Der Literaturwert liegt bei 660 nm. Die weitere Auswertung sollte also bei dieser Wellenlänge erfolgen. Wodurch es zu dem anfänglichen Riesenpeak kommt, kann ich mir nicht erklären. Ähnliche Phänomene hatten wir auch schon in der Biochemie, wobei wir den Anfangspeak dann immer vernachlässigt haben. Wahrscheinlich handelt es sich um einen Fehler der Messapparatur. Eine negative Absorption ist eigentlich ebenfalls kaum möglich. Eigentlich ist sie gleich 0 zu setzen.

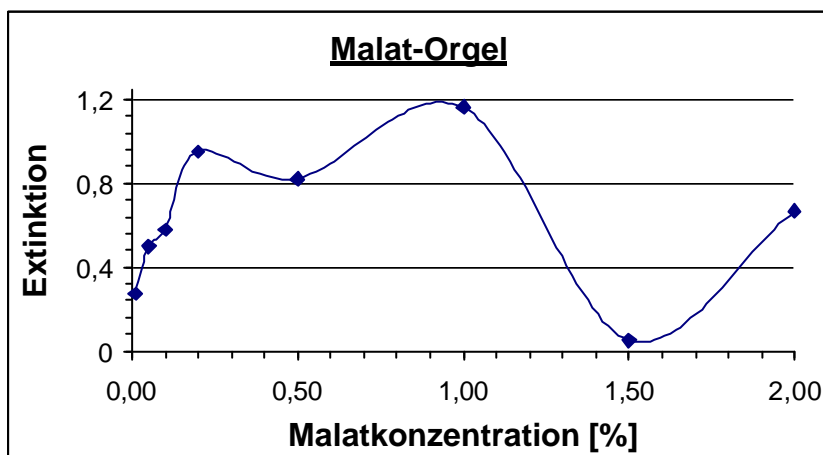
Ersetzt man das Malat durch andere Kohlen- und Wasserstoffquellen, so kann man anhand des unterschiedlichen Wachstums erkennen, dass die Rhodospirillen nicht jeden

Stoff verwerten können. Besonders gut können sie Malat verwerten, auch bei anderen pH-Werten. Glucose ginge im Notfall auch noch. Wie man im folgenden Graphen ablesen kann, eignen sich die anderen Stoffe jedoch nicht so gut:



Graph 2: Verwendung unterschiedlicher C- und H-Quellen

Im letzten Versuchsteil haben wir die Malatkonzentrationen zwischen 0,01 und 2,0% variiert. Die Auswertung der „Malat-Orgel“ ergibt einen Doppelpeak. Demnach können Konzentrationen von 0,2% und 1% besonders gut verwertet werden:



Graph 3: Malat-Orgel

Fehlerdiskussion

Woher der große Peak zu Beginn des Absorptionsspektrums kommt, weiß ich nicht. Überlegungen habe ich ja bereits oben angestellt. Glucose ist ein sehr weit verbreiteter Stoff in unserer Umwelt. Ich finde es einleuchtend, dass die Rhodospirillen diesen Stoff ersatzweise nutzen können. Der Peak bei 1% Malatkonzentration in Graph 3 scheint mir falsch zu sein. Es erschiene mir einleuchtender, wenn der Graph hier weiter abfallen würde. Vielleicht wurde beim Ansetzen des Mediums ein Fehler gemacht und die Konzentration war eher niedriger.

Literaturangaben

- Allgemeine Mikrobiologie, Hans G. Schlegel, Thieme-Verlag
- Mikrobiologisch-Biochemisches Praktikum, Süßmuth / Eberspächer / Haag / Springer, Thieme-Verlag
- Mikrobiologie, Wolfgang Fritsche, Spektrum Gustav Fischer
- Medizinische Mikrobiologie für MTA, Volker Mersch-Sundermann, Thieme-Verlag
- Praktikumsript Vers. 6
- Internetrecherche