

Bernhard-Strigel-Gymnasium  
Memmingen

Kollegstufe Jahrgang: 2007/2009  
Leistungskurs: Biologie  
Kollegiatin: Julia Schmalholz

## Facharbeit

### **Charakterisierung von Bakterien in verschiedenen Joghurtprodukten**

Abgegeben am: 30.01.2009

Bewertung:

Facharbeit:                      Note: \_\_\_\_\_                      Punkte: \_\_\_\_\_

Mündliche Prüfung:                      Note: \_\_\_\_\_                      Punkte: \_\_\_\_\_

Datum und Unterschrift des Kursleiters: \_\_\_\_\_

Eingetragen in das Kursblatt: \_\_\_\_\_

## **Inhaltsverzeichnis**

|                                                                                    |           |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b><u>1. Einleitung</u></b>                                                        | <b>3</b>  |
| <b><u>2. Ausplattieren von Joghurt</u></b>                                         | <b>3</b>  |
| 2.1. Anfertigung von Agarplatten                                                   | 3         |
| 2.2. Herstellung der Verdünnungsreihen                                             | 4         |
| 2.3. Ausplattieren der Verdünnungsreihen                                           | 5         |
| <b><u>3. Identifizierung</u></b>                                                   | <b>6</b>  |
| 3.1. Zählung der Kolonien und Rückrechnung auf die Anzahl der Bakterien im Joghurt | 6         |
| 3.2. Mikroskopische Analyse                                                        | 7         |
| 3.2.1. Vorbereitung                                                                | 8         |
| 3.2.2. Ergebnisse                                                                  | 8         |
| 3.3. Gram-Differenzierung mit KOH                                                  | 9         |
| 3.3.1. Vorbereitung                                                                | 9         |
| 3.3.2. Durchführung                                                                | 9         |
| 3.3.3. Ergebnisse                                                                  | 10        |
| 3.4. Katalasetest                                                                  | 10        |
| 3.4.1. Durchführung                                                                | 10        |
| 3.4.2. Ergebnisse                                                                  | 11        |
| <b><u>4. Auswertung und Charakterisierung</u></b>                                  | <b>11</b> |
| <b><u>5. Weitere Identifizierungsmöglichkeiten</u></b>                             | <b>14</b> |
| – Tests der Bunten Reihe                                                           | 14        |
| <b><u>6. Quellenverzeichnis</u></b>                                                | <b>16</b> |
| 6.1. Literaturverzeichnis                                                          | 16        |
| 6.2. Internetquellen                                                               | 16        |
| 6.3. Abbildungsnachweise                                                           | 17        |
| <b><u>7. Anhang</u></b>                                                            | <b>18</b> |

## **1. Einleitung**

„Mit probiotischen Kulturen“, diese Aussage hört man heute ständig in der Werbung und liest sie auf vielen Milchprodukten. Die Kühlregale in den Supermärkten sind voll von solchen Produkten, die unsere Abwehrkräfte stärken und uns wetterfest machen sollen.

Kritiker stempeln diese Lebensmittel jedoch als überteuert ab und betonen, dass die Hersteller den Verbrauchern damit das Geld aus der Tasche ziehen und sich so eine goldene Nase verdienen.

Bei den Einkäufen der Joghurts für meine Versuche habe ich selbst erfahren, dass probiotischer Joghurt drei- bis viermal so teuer ist wie herkömmlicher. Außerdem ist mir aufgefallen, dass in den Kühlregalen, selbst in Discountern, überwiegend probiotischer Joghurt angeboten wird.

In den folgenden Experimenten im Labor habe ich versucht die Kulturen der probiotischen Joghurts zu charakterisieren und sie zu identifizieren, um herauszufinden, welche Kulturen wir mit den Joghurts aufnehmen und was ihre ursprüngliche Aufgabe in der Natur ist.

## **2. Ausplattieren des Joghurts**

### **2.1. Anfertigung von Agarplatten**

Die Kulturen aus dem probiotischen Joghurt können nur auf bestimmten Nährböden wachsen. Für diesen Versuch genügen circa 500 ml von jedem Nährmedium, um die geeignete Anzahl an Agarplatten herzustellen.

Material:

- LB-Zubereitung der Firma Merck
- Chinablau-Laktose-Agar (CBL-Agar) der Firma Merck
- destilliertes Wasser
- 2 x 500 ml Glasflaschen
- Agar-Agar
- leere, nach Möglichkeit sterile Kunststoffpetrischalen
- Kühlschrank
- Autoklav

Durchführung:

Für 500 ml LB-Fertigmedium werden gemäß der Anleitung des Herstellers 10 g LB-Zubereitung und 7,5 g Agar-Agar (1,5%) abgewogen und mit 500 ml destilliertem Wasser in der Glasflasche vermengt.

Beim CBL-Agar werden 17,75 g abgewogen und ebenfalls in einer Glasflasche mit destilliertem Wasser vermengt. Man verschliesst die beiden Flaschen mit einem Deckel, der aber nicht fest verschraubt werden darf und autoklaviert sie anschliessend bei 120°C.

Danach lässt man das Medium auf ungefähr 60°C abkühlen, denn Agar ist nur bei Temperaturen über 50°C flüssig, und gießt es vorsichtig zu einer Höhe von circa 2-3 mm in die sterilen Petrischalen, was ungefähr 25 Platten jeder Sorte ergibt.

Die Schalen sollten danach sofort wieder verschlossen werden, damit sie steril bleiben, und 3 Tage bei Zimmertemperatur abkühlen, bevor sie mit Parafilm verschlossen werden und so im Kühlschrank bis zu ihrem Gebrauch aufbewahrt werden können.

(SCHMITT; 2006, Seite 13)

## **2.2. Herstellung der Verdünnungsreihen**

Material:

- Produkte der Sorten (*BIAC, Danone Aktivia Natur, Danone Actimel, Nestlé LC 1 Pur, Yakult*), wobei *Yakult* kein Joghurt ist, sondern nur aus Glukose und Wasser besteht
- Röhrcchen mit Deckel mit jeweils 9 ml steriler, 0,9%-iger NaCl-Lösung (5 Stück pro Joghurtsorte)
- 1000 µl-Pipette und Spitzen
- Parafilm
- Vortexer

Durchführung:

Die 5 Röhrcchen, die jeweils mit 9 ml steriler, 0,9%-iger NaCl-Lösung gefüllt sind, werden mit den Verdünnungsstufen und der Joghurtsorte beschriftet und der Reihe nach aufgestellt.

Mit der Pipette mit steriler Spitze werden genau 1 ml Joghurt aus dem Becher in das erste Röhrcchen überführt. Es wird verschlossen und 30 Sekunden auf dem Vortexer gemixt.

Mit einer neuen, sterilen Spitze werden dann 1 ml Suspension aus dem ersten Röhrcchen entnommen und in das zweite überfüllt, welches wieder mit Deckel auf dem Vortexer gemixt wird.

Diese Schritte werden dann mit der selben Abfolge bis zum fünften Röhrchen wiederholt.  
(SCHMITT; 2006, Seite 14)

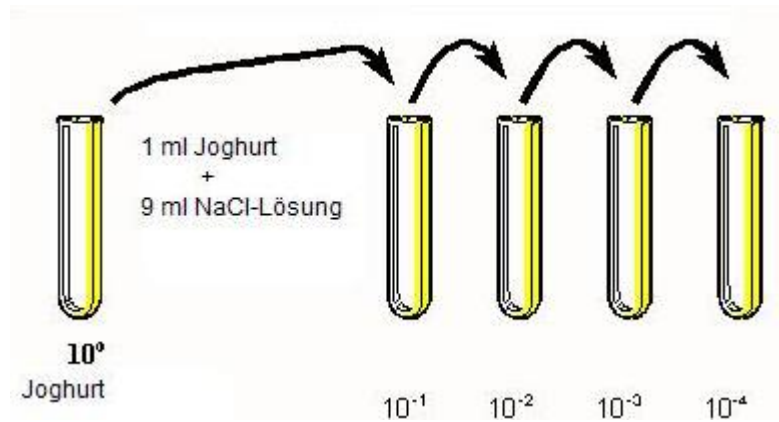


Abbildung 1: Verdünnungsreihe

### 2.3. Ausplattieren der Verdünnungsreihe

Material:

- 5 Agarplatten jeder Sorte
- Röhrchen mit den Verdünnungsreihen
- Drigalski-Spatel im Ständer
- 70% Ethanol und Bunsenbrenner
- Automatik-Pipette und passende Spitzen
- Parafilm
- Brutschrank
- Vortexer

Durchführung:

Bevor man beginnt, die Verdünnungsreihen auszuplattieren, muss der Arbeitsplatz mit 70%-igem Ethanol desinfiziert werden und die Platten am Rand auf der Unterseite mit dem Namen des Schülers, der jeweiligen Verdünnungsstufe, dem Datum und dem Joghurtnamen beschriftet werden. Man nimmt aus einem Röhrchen, dessen Inhalt man kurz zuvor erneut mit dem Vortexer gemixt hat, 50  $\mu$ l Bakteriensuspension und pipettiert sie auf die Mitte der dazugehörige Platte, die mit derselben Verdünnungsstufe markiert ist. Nachdem der Drigalski-Spatel steril gemacht wurde, indem man ihn zuerst in 70% Ethanol eintaucht und in der Bunsenbrennerflamme

entzündet hat und er abgekühlt ist, kann mit ihm die Bakteriensuspension unter ständigem Drehen der Platte auf der Agaroberfläche verstrichen werden, bis ein Widerstand zu spüren ist. Die Platte wird danach sofort verschlossen und mit Parafilm zugeklebt. Dies wird mit beiden Nährmedienplatten durchgeführt. Die bestrichenen Platten werden dann über Nacht im Brutschrank bei 37°C bebrütet.

Nach der Bebrütung können die Platten bis zur Auswertung im Kühlschrank aufbewahrt werden.

(SCHMITT; 2006, Seite 14-15)

### 3. Identifizierung

#### 3.1. Zählung der Kolonien und Rückrechnung auf die Anzahl der Bakterien im Joghurt

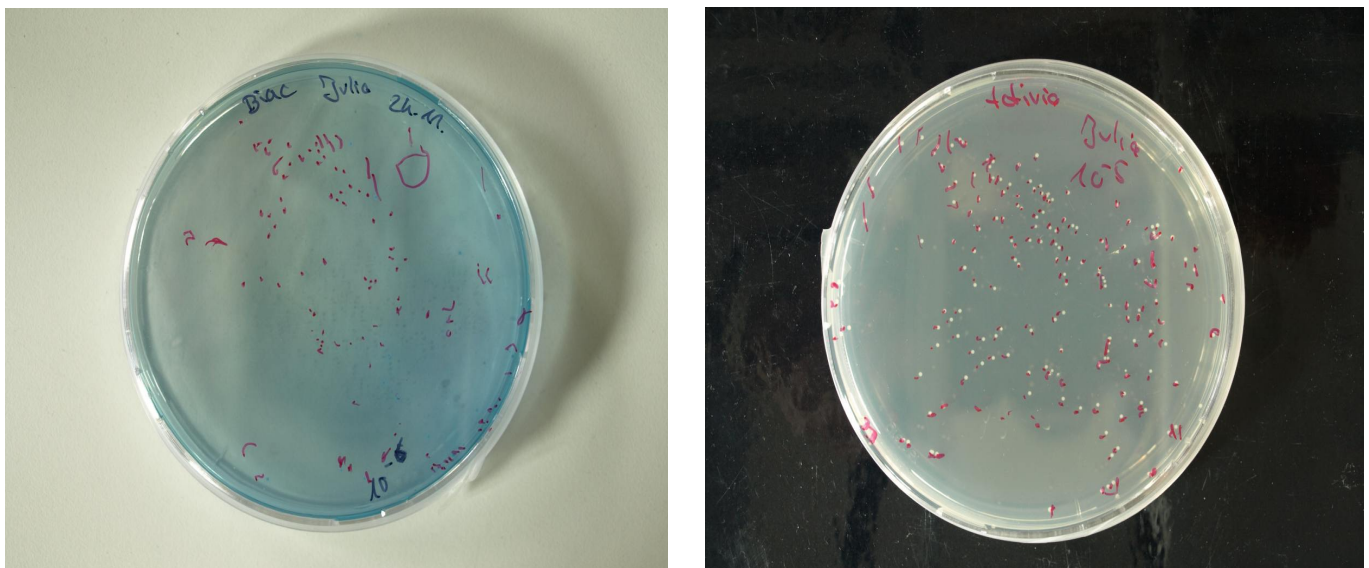


Abbildung 2: Agarplatten mit Kolonien (German WEBER, 2009)

Anhand der Anzahl der Kolonien, die auf den Platten zu finden sind, kann mit der jeweiligen Verdünnungsstufe auf die Anzahl der Bakterien pro Milliliter hochgerechnet werden. Multipliziert man die Kolonienanzahl mit der Verdünnungsstufe, so erhält man die Anzahl der Bakterien pro Milliliter.

In der ersten Spalte sind die Kolonien genau definiert, die gezählt werden. Es wird die Joghurtsorte, der Nährboden, auf dem die Kolonie gewachsen ist und das Bild der Kolonie auf der Platte beschrieben. In der zweiten Spalte ist die jeweilige Verdünnungsstufe angegeben, in der die Anzahl an Kolonien, die in Spalte drei aufgeführt ist, vorkommt. Da jede Kolonie aus einem einzelnen Bakterium entstanden ist, kann so auf die Bakterienanzahl pro Milliliter hochgerechnet werden.

| Kolonie                 | Verdünnungsstufe | Anzahl der Kolonien | Bakterien pro ml |
|-------------------------|------------------|---------------------|------------------|
| BIAC/LB/groß            | $10^{-5}$        | 26                  | 2600000          |
| BIAC/CBL                | $10^{-7}$        | 8                   | 8000000          |
| LC1/CBL/weiß, groß      | $10^{-2}$        | 6                   | 600              |
| Actimel/CBL/weiß        | $10^{-5}$        | 468                 | 46800000         |
| Actimel/CBL/blau        | $10^{-5}$        | 1                   | 100000           |
| Aktivita/LB/groß        | $10^{-6}$        | 23                  | 23000000         |
| Aktivita/CBL/blau, groß | $10^{-6}$        | 16                  | 16000000         |
| Yakult/CBL/weiß         | $10^{-7}$        | 8                   | 8000000          |
| Yakult/CBL/blau         | $10^{-7}$        | 4                   | 4000000          |

#### Fehleranalyse:

Nach ca. 20 Stunden Bebrütung bei 37°C sind bei *BIAC* auf der LB-Platte nur sehr viele, kleine, weiße Kolonien zu finden, das sind jedoch viel zu viele um sie zählen zu können. Auf den Platten mit den Verdünnungsstufen  $10^{-4}$  und  $10^{-5}$  sind erst nach anschließender, zweitägiger Lagerung bei Zimmertemperatur bedeutend größere Kolonien gewachsen.

Die Anzahl der Kolonien der verschiedenen Verdünnungsstufen lassen bei den LB-Platten des Joghurts *LC 1 Pur* von *Nestlé* und *Actimel* von *Danone* keine vernünftige Hochrechnung zu, denn die Zahl der Kolonien weist keine Parallelität mit den Verdünnungsstufen auf. Die Kolonienanzahl bleibt in allen 5 Verdünnungsreihen unter 10; dies war auch beim Wiederholen des Experiments der Fall.

Zudem sind die kleinen Kolonien jeweils zu klein und zu häufig um sie nachzählen zu können.

Ist das Ergebnis nicht brauchbar, werden Platten mit höheren Verdünnungsstufen angesetzt.

### 3.2. Mikroskopische Analyse

#### Material:

- Objektträger
- Impföse
- Deckplättchen
- Pipette
- Wasser
- Mikroskop

Vorbereitung:

Man bereitet jeweils einen sauberen Objektträger vor und setzt in dessen Mitte einen kleinen Tropfen Wasser. Mit Hilfe einer Impföse trägt man dann eine Kolonie von der Agarplatte ab und mischt sie in den Wassertropfen auf dem Objektträger. Danach legt man vorsichtig ein Deckplättchen über das Gemisch, möglichst so, dass keine Luftbläschen darunter sind.

So können die Organismen unter dem Mikroskop betrachtet werden.

Die folgenden Ergebnisse entstanden mit dem Schulmikroskop bei 400-facher Vergrößerung.

Ergebnisse:

*BIAC:*

Bei der grossen, weißen Kolonie von der LB-Platte werden einzelne, stäbchenförmige, bewegliche Bakterien, mit gerundeten Enden beobachtet, die zum Teil leicht gebogen und zum Teil gerade sind.

Auf der selben Platte befinden sich auch bedeutend kleinere, weiße Kolonien; hier erkennt man unter dem Mikroskop einzelne, kugelförmige Organismen, die als Kokken bezeichnet werden und in Zweiergruppen auftreten. Die hier vorliegenden Kokken sind unbeweglich.

Grosse, weiße Kolonien sind auch auf den Chinablau-Laktose-Agarplatten gewachsen. Betrachtet man diese unter dem Mikroskop, lassen sich runde Organismen, also Kokken, erkennen, die perlschnurartig aneinandergereiht und unbeweglich sind; diese werden Streptokokken genannt.

*Nestlé LC 1 Pur:*

Unter den selben Bedingungen betrachtet kann man bei der weißen Kolonie, die auf einer Chinablau-Laktose-Agarplatte gewachsen ist, zum einen sehr kleine stäbchenförmige Bakterien erkennen, die beweglich sind, zum anderen sieht man auch Kokken, die in Dreier- oder Vierergruppen beieinander liegen und nicht beweglich sind. Die selben Kokkengruppen findet man auch auf den LB-Platten, wo sie ebenfalls kleine, weiße Kolonien bilden.

Die grossen, blauen Kolonien auf den Chinablau-Laktose-Agarplatten ergeben mikroskopiert Kokkenketten, bestehend aus vier bis zehn Kokken, die leicht beweglich zu sein scheinen.

*Danone Actimel:*

Einzelnen und in Ketten kommen die unbeweglichen Kokken der grossen, weißen Kolonie von der LB-Platte vor.

Als unbewegliche, kleine Stäbchen entpuppen sich die kleinen, weißen Kolonien auf der selben Platte.

Auf der Chinablau-Laktoseagarplatte wachsen blaue Kolonien, die unter dem Mikroskop betrachtet aus unbeweglichen Kokken bestehen, meist einzeln, ab und zu jedoch in

Zweiergruppen und kurzen Ketten vorkommen.

*Danone Aktivia:*

Die auf dem LB Medium gewachsenen, grossen, weißen Kolonien sind unter dem Mikroskop als bedeutend kleiner und als unbewegliche, kettenbildende Kokken, Streptokokken, zu erkennen. Das selbe mikroskopische Bild ergeben die Bakterien der grossen, blauen Kolonie auf der Chinablau-Laktose-Agarplatte.

*Yakult:*

Die Bakterien der weißen Kolonien auf den Chinablau-Laktose-Agarplatten sind unter dem Mikroskop betrachtet unbeweglich und kokkenförmig und treten in Zweier- und Vierergruppen auf.

Als kleine, einzelne, unbewegliche Kokken treten dagegen die Bakterien der weißen Kolonie auf, die ebenfalls auf Chinablau-Laktose-Agar gewachsen sind.

(SCHLEGEL, Hans G., (1985): Allgemeine Mikrobiologie. 6. überarbeitete Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag: Seite 87 ff, 271 f, 277 f)

### **3.3. Gram-Differenzierung mit KOH (Kaliumhydroxid)**

#### 3.3.1. Vorbereitung der 0,5 Molaren KOH-Lösung

Für diesen Versuch ist die Vorbereitung von 100 ml 0,5 Molarer KOH-Lösung nötig.

Durch die Addition der Atommassen von Kalium, Sauerstoff und Wasserstoff, welche man aus dem Periodensystem ablesen kann, erhält man 46,1049 g/mol. Dies ist die Molare Masse für 1 Mol auf 1 Liter Wasser. Um auf 0,5 Mol KOH pro 100 ml zu kommen muss die Molare Masse, 46,1049 g/mol, halbiert und durch 10 geteilt werden. Das Ergebnis ist dann 2,3052459 g/mol, was abgewogen wird und dann mit 100 ml destilliertem Wasser vermischt wird.

#### 3.3.2. Durchführung

Material:

- Impföse
- Glasobjektträger
- Pipette

Mit Hilfe der Pipette werden 30  $\mu$ l KOH auf den Objektträger gegeben. Das Material einer Bakterienkolonie wird mit einer Impföse auf dem Objektträger in die Kaliumhydroxidlösung eingerieben. Bei „Gram-negativen“ Bakterien kann nach wenigen Sekunden mit einem Zahnstocher, der durch das Gemisch gezogen wird, ein Faden gezogen werden; hier wird die

Zellwand durch die Kalilauge lysiert, die Zellen brechen auf und die DNA wird freigesetzt. Wenn kein Faden gezogen werden kann, sind die Organismen „Gram-positiv“, hier ist die Lauge zu schwach um die Zellwand zu lysieren. Mit KOH (Kaliumhydroxid) lässt sich also herausfinden, ob die vorliegenden Bakterien eine Gram-Schicht besitzen, oder nicht.

( <http://de.wikipedia.org/wiki/KOH-Schnelltest#KOH-Test>)

### 3.3.3. Ergebnisse:

Alle Bakterien, die sowohl auf den LB-Platten als auch auf den CBL-Agarplatten gewachsen sind, sind „Gram-positiv“. Dies ist typisch für Milchsäurebakterien. Zum Vergleich sollte man diesen Versuch mit E.coli durchführen, denn E.coli ist „Gram-negativ“, somit kann man die negative Reaktion besser unterscheiden.

## 3.4. Katalasetest

Der Katalasetest ist ein einfaches Verfahren zum Nachweis des Enzyms Katalase, welches Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser umsetzt.

### 3.4.1. Durchführung

Für den Katalasetest wird eine konzentrierte Wasserstoffperoxidlösung (Perhydrol, ca.30%-ig, CAS 7722-84-1) mit destilliertem Wasser auf 3% verdünnt.

Das bedeutet, man mischt 1 ml Perhydrol mit 9 ml destilliertes Wasser.

10 µl der Gebrauchslösung können dann entweder direkt auf eine Kolonie auf der Agarplatte gegeben werden oder auf eine Kolonie, die mit einer sterilen Impföse von der Platte auf einen Objektträger gebracht wurde.

Beobachtet man eine Gasentwicklung, so ist die Reaktion positiv. Kann keine Gasentwicklung beobachtet werden, ist die Reaktion negativ.



( [http://www.nugi-zentrum.de/Experimente/Allgemeines/Rezepte\\_Testes.html#Katalase](http://www.nugi-zentrum.de/Experimente/Allgemeines/Rezepte_Testes.html#Katalase))

Abbildung 3: links Katalase positiv; rechts: Katalase negativ

### 3.4.2. Ergebnisse

| <b>Joghurtsorte</b> | <b>Kolonie</b> | <b>Reaktionsergebnis</b> |
|---------------------|----------------|--------------------------|
| BIAC                | LB/groß        | negativ                  |
| BIAC                | LB/klein       | negativ                  |
| BIAC                | CBL            | negativ                  |
| Nestlé LC 1         | LB/klein       | positiv                  |
| Nestlé LC 1         | CBL/groß/weiß  | positiv                  |
| Nestlé LC 1         | CBL/klein/weiß | positiv                  |
| Danone Actimel      | LB/groß        | negativ                  |
| Danone Actimel      | LB/klein       | negativ                  |
| Danone Actimel      | CBL            | positiv                  |
| Danone Aktivia      | LB/klein       | negativ                  |
| Danone Aktivia      | LB/groß        | negativ                  |
| Danone Aktivia      | CBL/klein/weiß | positiv                  |
| Danone Aktivia      | CBL/groß/blau  | positiv                  |
| Yakult              | CBL/blau       | negativ                  |
| Yakult              | CBL/weiß       | positiv                  |
| Yakult              | CBL/gelb       | positiv                  |

## **4. Auswertung und Charakterisierung:**

Aus den oben genannten Versuchen und der Betrachtung der Bakterien unter dem Mikroskop, kann man folgende Aussagen zu den jeweiligen Kulturen treffen:

*BIAC:*

Die Organismen der großen weißen Kolonie auf der LB-Platte erweisen sich als „Gram-positiv“, jedoch „Katalase-negativ“. Mikroskopisch betrachtet erkennt man unbewegliche Bakterien, die stäbchenförmig, zum Teil gebogen, zum Teil ziemlich gerade, in kleinen

Kolonien auftreten. Aus diesen Ergebnissen wird darauf geschlossen, dass sie c.f. *Lactobacillus delbrueckii subspecies bulgaricus*, eine Unterart des *Lactobacillus delbrueckii*, sind. *Lactobacillus delbrueckii* bilden keine Sporen und sind meist unbeweglich und mikroaerob, das bedeutet, dass sie in ihrer Umgebung nur geringe Anteile an Sauerstoff tolerieren. *Lactobacillus delbrueckii subspecies bulgaricus* erzeugt, genauso wie *Lactococcus lactis subspecies lactis*, durch Fermentation Milchsäure; ebenso sind sie in der Lage Lactose zur Energiegewinnung zu nutzen.

Denn *Lactobacillus delbrueckii subspecies bulgaricus* wird zur Herstellung von traditionellem Joghurt verwendet und *BIAC* ist kein Joghurt mild, was für Verwendung dieser Kultur spricht.

(BAYERHUBER/LUCIUS, 1992: Seite 54 ff)

Auf der selben Platte findet man auch bedeutend kleinere Kolonien, die unter dem Mikroskop meist paarweise als kugelförmige, unbewegliche Kokken auftreten. Dadurch, dass sie ebenfalls „Gram-positiv“ und „Katalase-negativ“ sind, können sie zu den c.f. Milchsäurebakterien zugeordnet werden. Das mikroskopische Erscheinungsbild lässt stark vermuten, dass sie zur Spezies c.f. *Lactococcus lactis subspecies lactis* gehören, diese werden ebenfalls zur Erzeugung von Milchprodukten verwendet.

( BAYERHUBER/LUCIUS, 1992: Seite 57 ff)

„Gram-positiv“ aber „Katalase-negativ“ sind die Testergebnisse der grossen, blauen Kolonie von der CBL-Agarplatte. Die mikroskopische Untersuchung ergibt unbewegliche *Streptokokken*. Zur Herstellung von Joghurt werden auch c.f. *Streptococcus salivarius* verwendet, zu denen diese Organismen laut der oben genannten Ergebnisse gehören könnten.

([http://de.wikipedia.org/wiki/Streptococcus\\_salivarius\\_subsp.\\_thermophilus](http://de.wikipedia.org/wiki/Streptococcus_salivarius_subsp._thermophilus))

*Nestlé LC 1 Pur:*

Hier wachsen auf dem LB-Medium nur kleine, weiße Kolonien, die „Gram-positiv“ und „Katalase-negativ“ sind; die selben Merkmale haben kleine weiße Kolonien auf den CBL-Agarplatten. Auch unter dem Mikroskop betrachtet haben sie das selbe Bild: Es sind unbewegliche Kokken die in Dreier-, Vierer,- oder Fünfergruppen beieinanderliegen.

Dies lässt darauf schliessen, dass sie zu den c.f. *Staphylokokken* gehören, deren Unterart, die c.f. *Mikrokokken* genau so beschrieben sind. Sollte diese Zuordnung stimmen, kann dies vermutlich auf ungenaues Arbeiten beim Experiment zurückzuführen sein, denn *Mikrokokken* kommen unter anderem auch auf der Haut vor und können überall überleben, wo genügend Nährstoffe und Feuchtigkeit vorhanden sind.

( BAYERHUBER/LUCIUS, 1992: Seite 63 f)

Auf der CBL-Agarplatte sind auch große, weiße Kolonien gewachsen, die unter dem Mikroskop als klassische *Streptokokken* zu identifizieren sind. Aufgrund der Testergebnisse „Gram-positiv“ und „Katalase-positiv“ können sie jedoch noch keiner genaueren Unterart zugeordnet werden. Unter dem Mikroskop ließen sich neben diesen noch bedeutend kleinere, einzelne, stäbchenförmige Organismen erkennen, die beweglich und mit diesen Methoden nicht näher definierbar sind.

*Danone Actimel:*

Die großen, weißen Kolonien auf der LB-Agarplatte sind mikroskopisch betrachtet Kokken, die einzeln und in Ketten vorkommen. Sie könnten deshalb zur Gattung der c.f. *Staphylokokken* gehören. Der Gramtest verläuft positiv während der Katalasetest negativ ist.

Ebenso verliefen auch die Tests der kleinen Kolonien der LB-Agarplatte. Unter dem Mikroskop betrachtet, erscheinen diese Organismen jedoch als kleine, unbewegliche Stäbchen. Somit könnten diese Organismen zu den c.f. *Bifidobakterien* gehören, die in der Natur im Darm vorkommen und sich unter anderem auch von Milchsäuregärung ernähren.

(„<http://de.wikipedia.org/wiki/Bifidobakterien>“)

Auf der CBL-Agarplatte sind blaue Kolonien gewachsen, die „Gram-positiv“ und „Katalase-positiv“ sind. Mikroskopisch betrachtet sind es bewegliche Kokken, die meist einzeln, manchmal paarweise und in seltenen Fällen in kurzen Ketten auftreten. Ein besonders auffälliges Merkmal ist die unsymmetrische, schrumpelige Oberfläche.

*Danone Aktivia:*

Zu c.f. *Lactobacillus lactis subspecies lactis* gehören die kleinen Kolonien auf der LB-Agarplatte, die genauso wie die ebenfalls kleinen Kolonien der LB-Agarplatte von *BIAC*, paarweise angeordnete, unbewegliche Kokken sind. Sie sind auch „Gram-positiv“ und „Katalase-negativ“. (BAYRHUBER Horst; LUCIUS Eckhard R., (1992): Seite 57 ff)

Der Gramtest fällt bei der grossen weißen Kolonie positiv aus während der Katalasetest negativ ist. Mikroskopiert man diese Organismen, so kann man sie den c.f. *Streptokokken* zuordnen, die allerdings bedeutend kleiner sind als die c.f. *Streptokokken* der bisherig untersuchten Kulturen. Eine genauere Untergliederung ist mit diesen Tests nicht möglich.

Auf der CBL-Agarplatte wachsen grosse, blaue Kolonien, die „Gram-positiv“ und „Katalase-negativ“ sind. Mikroskopisch betrachtet erkennt man sowohl einzelne Kokken, als auch paarweise und in Ketten angeordnete. Als Folge dieser Ergebnisse kann man sie den c.f. *Streptokokken* zuordnen. Obwohl sie den Organismen der großen, weißen Kolonie von der LB-Agarplatte sehr ähnlich sehen unterschieden sie sich im Katalasetest voneinander, denn die LB-Kolonie ist „Katalase-negativ“. Diese könnte man ebenso den c.f. *Streptokokken*

zuordnen.

*Yakult*:

Bei *Yakult* wachsen nur auf den CBL-Agarplatten Bakterienkolonien.

Zum einen findet man hier blaue Kolonien, die „Gram-positiv“ und „Katalase-negativ“ sind. Sie erweisen sich, unter dem Mikroskop betrachtet, als einzelne, unbewegliche Kokken.

Zum anderen zeigen sich auch weiße Kolonien, die jedoch „Katalase-positiv“ sind. Unter dem Mikroskop betrachtet, erkennt man hier Kokken, die in kleinen Haufen beieinander liegen und unbeweglich sind, weshalb man sie für c.f. *Mikrokokken* halten kann. Eine Unterart wäre c.f. *Micrococcus luteus*, welche diesen Eigenschaften entsprechen würde. In diesem Fall, wäre dies höchstwahrscheinlich auf eine unsterile Arbeitsweise bei den Versuchen zurückzuführen, denn diese Sorte lebt unter anderem auch auf der menschlichen Haut. (BAYRHUBER Horst; LUCIUS Eckhard R., (1992): Seite 63 f)

## **5. Weitere Identifizierungsmöglichkeiten**

### **Tests aus der Bunten Reihe:**

Anhand der Bunten Reihe kann dieses Experiment weitergeführt werden; mit weiteren Tests können die Bakterien genauer bestimmt werden. Die Identifizierung erfolgt über den Nachweis bestimmter Enzymaktivitäten, über den Abbau von Substraten oder den Nachweis bestimmter Fähigkeiten.

Folgende Tests gehören zur älteren, sogenannten kleinen Bunten Reihe und sind für die weitere Bestimmung der vorliegenden Kulturen sinnvoll:

Material:

- Reagenzgläser
- Impföse
- Bunsenbrenner

Der flüssige Agar wird in die Reagenzgläser gefüllt. Ist er abgekühlt, wird mit einer Impföse eine zu untersuchende Kolonie von der Agarplatte genommen. Mit der Impföse wird zuerst senkrecht in den Agar gestochen und danach auf der Schrägfläche im Zickzackkurs ausgestrichen.

### **Kligler-Agar:**

Der Kligler Agar besteht aus 1% Laktose, 0,1% Dextrose, Phenolrot und Eisenammoniumcitrat.

Nachweis:

- Laktase
- Gärung (erkennbar durch Gasbildung; CO<sub>2</sub>)
- H<sub>2</sub>S-Bildung

Reaktionen:

Durch den Dextroseabbau entsteht Säure und Phenolrot wird beim pH < 7 gelb. Nach Oxidation der Schrägfläche durch den Luftsauerstoff wird der Agar im oberen Bereich realkalisiert und die Schrägfläche wird rot, ausser es wird auch Laktose gespalten (Säurebildung!), dann bleibt der gesamte Agar durch den Säureüberschuss gelb.

Geschieht dies ohne Verwendung von Sauerstoff (Gärung!), so bildet sich CO<sub>2</sub>, was als kleine Luftblasen und Risse im Agar sichtbar wird.

Das gebildete H<sub>2</sub>S reagiert mit dem Eisenammoniumzitat zu Eisensulfid, was als schwarzer Niederschlag ausfällt:

Ergebnisse:

Ist der gesamte Agar gelb, besitzen die Organismen das Enzym Laktase und bauen damit Laktose ab.

Ist der Agar gelb und die Schrägfläche rot, ist keine Laktase-Aktivität vorhanden.

Sind Bläschen auf dem Agar erkennbar, wird durch Gärung CO<sub>2</sub> gebildet.

Ein schwarzer Niederschlag am Boden weist auf eine positive H<sub>2</sub>S-Bildung.

### **Harnstoff Röhrrchen:**

Harnstoff-Röhrrchen bestehen aus Harnstoff und Phenolrot (Indikator).

Nachweis: Urease

Reaktionen:

Durch das Enzym Urease wird Harnstoff abgebaut, wodurch ein alkalisches Milieu entsteht und der Indikator zu rot umschlägt.

Ergebnis:

Färbt sich der Agar rot, ist die Reaktion positiv verlaufen.

([http://www.kliniken.de/lexikon/Medizin/Diagnostik/Mikrobiologie/Bunte\\_Reihe\\_\(Labor\).html](http://www.kliniken.de/lexikon/Medizin/Diagnostik/Mikrobiologie/Bunte_Reihe_(Labor).html))

Diese Experimente zeigen nun, dass die probiotischen Joghurtprodukte überwiegend Milchsäurebakterien enthalten, die zur Produktion des Joghurts ohnehin notwendig sind. „Am weitesten verbreitet sind Stämme aus den Gattungen *Bifidobakterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* und *Streptococcus*, neuerdings noch weitere Gattungen.

Probiotische Milchsäurebakterien können allerdings nur dann wirken, wenn eine ausreichende Menge von ihnen den Darm lebend erreicht. Das Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) spricht von mindestens einer Million Milchsäurebakterien pro Gramm.” (VOLLBORN, 2006: Seite 54). Dies trifft bei allen untersuchten Produkten zu.

Bleibt also nur noch die Frage, ob sie uns nun wirklich wetterfest machen und unser Immunsystem stärken und sie den hohen Preis wert sind oder ob wir uns mit herkömmlichem Joghurt genauso gesund ernähren können, was wesentlich günstiger käme.

## **6. Quellenverzeichnis**

### **6.1. Literaturverzeichnis:**

- (1) SCHMITT Patrick, 2006: Einführung in die Grundarbeitstechniken der Molekularbiologie
- (2) BAYRHUBER Horst; LUCIUS Eckhard R., (1992): Handbuch der praktischen Mikrobiologie und Biotechnik. Mikroorganismen im Unterricht. Band 3. Hannover: Metzler-Schulbuchverlag.
- (3) SCHLEGEL, Hans G., (1985): Allgemeine Mikrobiologie. 6. überarbeitete Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag
- (4) VOLLBORN Marita; GEORGESCU Vlad D., (2006): Die Joghurtlüge. Die unappetitlichen Geschäfte der Lebensmittelindustrie. Frankfurt/Main: Campus Verlag

### **6.2. Internetquellen:**

„[http://de.wikipedia.org/wiki/Streptococcus\\_salivarius\\_subsp.\\_thermophilus](http://de.wikipedia.org/wiki/Streptococcus_salivarius_subsp._thermophilus)”, aufgerufen am 09.01.2009

„<http://de.wikipedia.org/wiki/Lactobacillus>”, aufgerufen am 09.01.2009

„<http://de.wikipedia.org/wiki/Bifidobakterien>”, aufgerufen am 09.01.2009

„[http://www.nugi-zentrum.de/Experimente/Allgemeines/Rezepte\\_Testes.html#Katalase](http://www.nugi-zentrum.de/Experimente/Allgemeines/Rezepte_Testes.html#Katalase)“,  
aufgerufen am 29.11.2008

„<http://de.wikipedia.org/wiki/KOH-Schnelltest#KOH-Test>“, aufgerufen am 27.11.2008

„[http://de.wikipedia.org/wiki/Bunte\\_Reihe\\_\(Labor\)](http://de.wikipedia.org/wiki/Bunte_Reihe_(Labor))“, aufgerufen am 17.01.2009

„[http://www.kliniken.de/lexikon/Medizin/Diagnostik/Mikrobiologie/Bunte\\_Reihe\\_\(Labor\).html](http://www.kliniken.de/lexikon/Medizin/Diagnostik/Mikrobiologie/Bunte_Reihe_(Labor).html)“,  
aufgerufen am 17.01.2009

### **6.3. Abbildungsnachweis:**

Abbildung 1:

„<http://www.vu-wien.ac.at/i123/viro/ViroSkript20061-Dateien/image011.gif>“  
(verändert), aufgerufen am 20.12.2008

Abbildung 2:

German Weber, 15.01.2009

Abbildung 3:

„<http://memiserf.medmikro.ruhr-uni-bochum.de/praktikum/katalase.jpg>“, aufgerufen am  
26.01.2009

## **7. Anhang**

Erklärung des Kollegiaten:

Ich erkläre, dass ich die Facharbeit ohne fremde Hilfe angefertigt und nur die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen und Hilfsmittel benützt habe.

Reuthen, den 28. Januar 2009 .....

(Unterschrift des Kollegiaten)