

Nachweis von Mikroorganismen¹

Die Durchführung von mikrobiologischen Versuchen zum Nachweis von Mikroorganismen ist für Schülerinnen und Schüler und Schüler besonders motivierend. Für die vorgeschlagenen Experimente ist kein steriles Arbeiten notwendig. Allerdings muss die Handhabung (Abnahme des Deckels der Petrischale beim Beimpfen) geklärt werden. Die Versuche werden in Partner- oder Gruppenarbeit durchgeführt und ausgewertet. Zur Kontrolle werden 1– 2 Agarplatten ohne Beimpfung bebrütet. Die Bebrütung erfolgt entweder für zwei Tage im Brutschrank bei 30 °C oder für mehrere Tage bei Raumtemperatur. Bis zur Auswertung können sie anschließend im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Sicherheitshinweise für die Schülerinnen und Schüler:

- Die Agarplatten dürfen nur für den jeweiligen Versuch und möglichst nur kurze Zeit geöffnet werden.
- Die Ansätze sind nach dem Beimpfen sicher – z. B. mit Klebeband – zu verschließen und dürfen nicht mehr geöffnet werden.

Sicherheitshinweise für die Lehrkraft:

- Bei Abklatschversuchen handelt es sich um nicht gezielte Tätigkeiten nach §2 der BioStoffV. Es sind die Vorgaben der „**Dokumentation der Tätigkeitsbezogenen Gefährdungsbeurteilung nach BioStoffV für ausgewählte Experimente mit biologischen Arbeitsstoffen analog der allgemeinen Schutzmaßnahmen (Schutzstufe 1)**“ zu beachten. (siehe Anlage 1).
- Unterweisung der Schülerinnen und Schüler anhand der Betriebsanweisung **Arbeiten mit biologischen Arbeitsstoffen analog Schutzstufe 1** (siehe Anlage 3)
- Keine Probenentnahme an Orten, wo eine hohe Keimbelastung mit pathogenen Keimen, z. B. Fäkalkeimen zu erwarten ist (Toilette, Kläranlage, Abfalltonne, ...).

Entsorgung der bebrüteten Platten:

- Alle biologischen Arbeitsstoffe bei Experimenten analog Schutzstufe 1 sind verschlossen in einem dafür bestimmten Abfallbehälter zu sammeln und über den Hausmüll zeitnah zu entsorgen. Ggf. können die Ansätze auch vorher in geschlossenen, hitzebeständigen Kunststoffbeuteln autoklaviert bzw. im Dampfkochtopf oder bei 130°C im Wärmeschrank mindestens 30 Minuten erhitzt werden.

¹ Verändert nach: © Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung, Köln: Infektionskrankheiten vorbeugen
Schutz durch Hygiene und Impfung, Materialien für den Unterricht ab Jahrgangsstufe 7, Seite 24

Nachweis von Mikroorganismen²

Mikroorganismen wie Bakterien sind so klein, dass wir sie selbst unter dem Mikroskop kaum erkennen können. Unter günstigen Bedingungen vermehren sie sich schnell und wachsen zu einem sichtbaren Haufen, einer Bakterienkolonie. Wir verwenden für die folgenden Versuche Plastikschalen mit Deckel (Petrischalen). Auf dem speziellen Nährboden entwickeln sich Mikroorganismen besonders schnell. Aus jedem unsichtbaren Bakterium entwickelt sich in wenigen Tagen ein kleiner runder Fleck, eine Kolonie.

Nachweis von Mikroorganismen in der Luft

Es soll untersucht werden, ob die Anzahl der Mikroorganismen vom Standort (Schulbank, Klassenzimmer, Flur, Schulhof) abhängt.

Material: Pro Gruppe 2 Petrischalen mit Nährboden, Folienstift, Klebeband (Para- oder Tesafilm).

Durchführung:

1. Beschriftet den Boden der Petrischalen mit eurem Namen, Versuchsnummer, Standort und Dauer der Öffnung der Petrischale.
2. Stellt die beiden Schalen am ausgewählten Ort nebeneinander auf.
3. Öffnet beide Schalen gleichzeitig und verschließt eine Schale nach 15, die andere nach 30 Minuten.
4. Verschließt die Petrischalen fest mit dem Klebefilm. Anschließend werden sie z Tage lang bei ca. 30 °C bebrütet.

Auswertung:

1. Fertigt eine Skizze von einer der bebrüteten Schalen an.
2. Prüft, ob verschiedene Mikroorganismen (unterschiedliche Farben oder Formen) in die Schale gelangt sind und zählt die jeweils gleich aussehenden Kolonien.

² Verändert nach: © Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung, Köln: Infektionskrankheiten vorbeugen
Schutz durch Hygiene und Impfung, Materialien für den Unterricht ab Jahrgangsstufe 7, Seite 24

Nachweis von Mikroorganismen³

Mikroorganismen wie Bakterien sind so klein, dass wir sie selbst unter dem Mikroskop kaum erkennen können. Unter günstigen Bedingungen vermehren sie sich schnell und wachsen zu einem sichtbaren Haufen, einer Bakterienkolonie. Wir verwenden für die folgenden Versuche Plastikschaalen mit Deckel (Petrischalen). Auf dem speziellen Nährboden entwickeln sich Mikroorganismen besonders schnell. Aus jedem unsichtbaren Bakterium entwickelt sich in wenigen Tagen ein kleiner runder Fleck, eine Kolonie.

Nachweis von Mikroorganismen auf Gegenständen

Es soll untersucht werden, ob sich auf Alltagsgegenständen Mikroorganismen befinden.

Material: Pro Gruppe eine Petrischale mit Nährboden, Folienstift, Klebeband (Para- oder Tesafilm).

Durchführung:

1. Beschriftet den Boden eurer Petrischale mit eurem Namen und Versuchsnummer.
2. Zeichnet mit deinem Folienstift auf den Boden der Platte ein großes Ypsilon, das die Platte in drei gleich große Abschnitte einteilt.
3. Beschriftet die Abschnitte mit den Namen der drei Gegenstände, die ihr prüfen wollt.
4. Öffnet nun die Platte kurz und drückt nacheinander die Gegenstände ganz leicht auf jeweils einen Abschnitt der Platte. Berührt dabei den Nährboden nicht mit euren Fingern!
5. Verschließt die Petrischale fest mit dem Klebeband. Anschließend werden sie zwei Tage lang bei ca. 30 °C bebrütet.

Auswertung:

1. Fertigt eine Skizze von der bebrüteten Schale an.
2. Prüft, ob verschiedene Mikroorganismen (unterschiedliche Farben oder Formen) in die Schale gelangt sind und zählt die jeweils gleich aussehenden Kolonien.
3. An welchen Gegenständen befanden sich die meisten Mikroorganismen?

³ Verändert nach: © Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung, Köln: Infektionskrankheiten vorbeugen
Schutz durch Hygiene und Impfung, Materialien für den Unterricht ab Jahrgangsstufe 7, Seite 24

Nachweis von Mikroorganismen⁴

Mikroorganismen wie Bakterien sind so klein, dass wir sie selbst unter dem Mikroskop kaum erkennen können. Unter günstigen Bedingungen vermehren sie sich schnell und wachsen zu einem sichtbaren Haufen, einer Bakterienkolonie. Wir verwenden für die folgenden Versuche Plastikschaalen mit Deckel (Petrischaalen). Auf dem speziellen Nährboden entwickeln sich Mikroorganismen besonders schnell. Aus jedem unsichtbaren Bakterium entwickelt sich in wenigen Tagen ein kleiner runder Fleck, eine Kolonie.

Nachweis von Mikroorganismen auf der Hand – und wie man sie loswird

Es soll gezeigt werden, dass sich auf einer ungewaschenen Hand sehr viele Bakterien befinden. Zudem soll die Wirksamkeit von Seife bzw. Desinfektionsmittel untersucht werden.

Material: Pro Gruppe eine Petrischale mit Nährboden, Folienstift, Klebeband (Para- oder Tesafilm).

Durchführung:

1. Beschriftet den Boden der Petrischale mit eurem Namen und der Versuchsnummer.
2. Zeichnet mit dem Folienstift ein großes Ypsilon auf den Boden der Platte, das die Platte in drei gleich große Abschnitte unterteilt. Beschriftet die Abschnitte mit A, B und C.
3. Öffnet für die Schritte 4 – 6 die Petrischaalen jeweils nur kurz.
4. Drückt mit ungewaschenen Händen ganz leicht mit dem Daumen auf den Abschnitt A der Platte.
5. Wascht eure Hände gründlich mit Seife, trocknet sie mit einem Papiertuch ab und drückt denselben Daumen auf Abschnitt B.
6. Behandelt eure Hände nach dem Waschen für 30 Sekunden mit einer Desinfektionslösung. Drückt dann den Daumen auf Abschnitt C.
7. Verschließt die Petrischaalen fest mit dem Schutzfilm. Anschließend werden sie zwei Tage lang bei ca. 30 °C bebrütet.

Auswertung:

1. Fertigt eine Skizze von einer der bebrüteten Petrischaalen an.
2. Notiert die Anzahl der Kolonien in den drei Abschnitten und beschreibt euer Ergebnis.

⁴ Verändert nach: © Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung, Köln: Infektionskrankheiten vorbeugen
Schutz durch Hygiene und Impfung, Materialien für den Unterricht ab Jahrgangsstufe 7, Seite 24

Anlage 1: Dokumentation der Tätigkeitsbezogenen Gefährdungsbeurteilung nach BioStoffV für ausgewählte Experimente mit biologischen Arbeitsstoffen analog der allgemeinen Schutzmaßnahmen (Schutzstufe 1)

Schule/Dienststelle:

Unterrichtsfach/Fachbereich:

Anwendungsbereich

- Diese Gefährdungsbeurteilung findet Anwendung bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen im Unterricht an allgemeinbildenden Schulen sowie für vergleichbare Fächer an beruflichen Schulen.
- Sie gilt ausschließlich für im *Anlage 2* aufgeführten Experimente mit den dort aufgelisteten biologischen Arbeitsstoffen. **Vor jedem Experiment mit biologischen Arbeitsstoffen ist von der fachkundigen Lehrkraft zu prüfen, ob diese Dokumentation gültig ist.**
- Für Experimente mit biologischen Arbeitsstoffen, die nicht in Anlage 2 aufgeführt sind, ist eine gesonderte Gefährdungsbeurteilung durchzuführen und zu dokumentieren.
- Kommen bei Experimenten mit biologischen Arbeitsstoffen chemische Gefahrstoffe zum Einsatz, so ist eine tätigkeitsbezogene Gefährdungsbeurteilung und Dokumentation, z. B. mittels des vorhandenen Musterformulars zur Gefährdungsbeurteilung von Gefahrstoffen nach § 6 GefStoffV, zu erstellen.

Ergebnis der Gefährdungsbeurteilung für Experimente nach Anlage 1

1. Die biologischen Arbeitsstoffe bei **gezielten Tätigkeiten** lassen sich maximal der Risikogruppe 1 zuordnen.

2. Bei **nicht gezielten** Tätigkeiten können in seltenen Fällen biologische Arbeitsstoffe höherer Risikogruppen auftreten (z. B. Teichwasserproben, Bodenproben, Abklatschversuche). Diese führen jedoch aufgrund geringer Auftretenswahrscheinlichkeit oder geeigneter Schutzmaßnahmen nicht zu einer erhöhten Gefährdung.

Somit können alle aufgeführten Experimente im Grundsatz nach den Vorgaben für Schutzstufe 1-Experimente (BioStoffV) durchgeführt werden.

Maßnahmen:

1. Lehrkräfte sowie Schülerinnen und Schüler werden gemäß Musterbetriebsanweisung „Arbeiten mit biologischen Arbeitsstoffen analog Schutzstufe1“ (*Anlage 3*) unterwiesen.
2. Die Schutzmaßnahmen der Musterbetriebsanweisung (*Anlage 3*) sind zu beachten.
3. Beim Arbeiten mit Teichwasser, Bodenproben und einem Heuaufguss dürfen keine offensichtlich kontaminierten Proben (z. B. Abwasser, Klärschlamm) verwendet werden.
4. Bei Abklatschversuchen und Spontankulturen dürfen keine Proben von Orten mit zu erwartenden hohen Verunreinigungen mit Fäkalienkeimen (z. B. Toilette, Kompost, Abfalltonne) entnommen werden. Eine Kultivierung von Proben aus Körpersekreten (z. B. Speichel) ist nicht zulässig; ein Fingerabdruck ist möglich. Proben sind vor der Inkubation sicher zu verschließen (z. B. Klebeband) – keine offene Handhabung!
5. Alle biologischen Arbeitsstoffe bei Experimenten analog Schutzstufe 1 sind verschlossen in einem dafür bestimmten Abfallbehälter zu sammeln und über den Hausmüll zeitnah zu entsorgen. Die Entsorgung von Teichwasser, Bodenproben und Heuaufguss erfolgt über z. B. Kompost oder Gartenteich.

Name, Datum, Unterschrift

Anlage 2: Experimente — gezielte Tätigkeiten

Versuch/Experiment	Biologische Arbeitsstoffe	zusätzliche Hinweise
Herstellung von Lebensmitteln <i>Alkoholische Gärung</i> Bier, Wein	Hefen (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	
Herstellung von Lebensmitteln <i>Milchsäuregärung</i> Sauerkraut, Brot, Joghurt, Quark, Käse	Bäckerhefe (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) <i>Leuconostoc</i> sp. <i>Lactobacillales</i> (Milchsäurebakterien)	
Qualitätsbestimmung verschiedener Wasserproben (IMViC Indolbildung, Methylrot, Voges-Proskauer-Test, Citratverwertung)	<i>Escherichia coli</i> K 12 <i>Enterobacter</i> sp. (nur teils RG 1)	Keine Verwendung von Abwasserproben zur Vermeidung von RG 2 - Arbeitsstoffen
Vereinzlungstechnik	<i>Micrococcus luteus</i>	
Vermehrung von Bakterien, Verdünnungsausstriche	z. B. <i>Escherichia coli</i> K 12	Bei Verwendung anderer Bakterien auf Risikogruppe 1 achten
Kolonienzucht	<i>Saccharomyces</i> sp.	
Kulturbesichtigung makroskopisch und mikroskopisch	Bakterien der RG 1	
Wachstum und Sporulation	<i>Bacillus subtilis</i>	
Züchtung von <i>Bacillus megaterium</i> auf Möhren und Erstellung einer Reinkultur auf Standardagar	<i>Bacillus megaterium</i>	
Anzucht und Untersuchung von <i>E. coli</i> - Mangelmutanten	<i>Escherichia coli</i> K12 Mangelmutanten	
Färbetechniken (z. B. Gramfärbung, Sporenfärbung, Färbung mit Methyleneblau zur Darstellung der Zellform)	<i>Escherichia coli</i> K12 <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Micrococcus luteus</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Lactococcus lactis</i>	Zusätzliche Schutzmaßnahmen auf Grund der verwendeten Gefahrstoffe (Farbstoffe)
Methoden zur Zellmassenbestimmung, Wachstumskurve	<i>Escherichia coli</i> K12	
Nachweis von Hemmstoffen und Antibiotika (Agardiffusionstest)	<i>Escherichia coli</i> K12 <i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus subtilis</i>	
Nachweis von Lysozymwirkung	<i>Escherichia coli</i> K12 <i>Bacillus megaterium</i>	
Nachweis des Pasteureffektes	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Immobilisierung von Zellen	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Diauxie (Verwertung zwei verschiedener Kohlenstoffquellen)	<i>Escherichia coli</i> K12	
Biologische Vitamin B6-Bestimmung	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	
Regulierung des Lactoseabbaus	<i>Escherichia coli</i> K12	
Nachweis von Bakteriophagen	<i>Escherichia coli</i> K12 Lambda-Phage	
Nachweis chromosomaler DNA, Isolierung von Plasmid-DNA	<i>Escherichia coli</i> K12 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Isolierung streptomycinresistenter Mutanten	<i>Escherichia coli</i> K12	
Transformation, Konjugation von <i>E coli</i> K12	<i>Escherichia coli</i> K12	
Übertragung des <i>lacZ</i> -Gens (Plasmidisolierung, Herstellung kompetenter Zellen, Transformation dieser Zellen)	<i>Escherichia coli</i> K12 JM 109 pBR 322/ <i>lacZ</i> (Genbaukasten Blue Genes)	

Anlage 2: Experimente — nicht gezielte Tätigkeiten

Versuch/Experiment	Biologische Arbeitsstoffe	zusätzliche Hinweise
Heuaufguss	<i>Paramecium caudatum</i> (Pantoffeltierchen) Kahmhefen <i>Hansenula</i> , <i>Pichia</i> , <i>Candida</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Kein verschimmeltes Heu verwenden.
Untersuchung von Teichwasser	Diverse Protozoen: Amöben, Trompetentierchen (<i>Spirotricha</i>), Glockentierchen (<i>Peritricha</i>); keine biologischen Arbeitsstoffe sind <i>Chlorella</i> sp. (Grünalge), <i>Volvox</i> sp. (Grünalge)	Die mögliche Konzentration von biologischen Arbeitsstoffen der Risikogruppe 2 (einige Amöbenarten) kann als sehr gering eingestuft werden.
Mikroskopieren von Mikroorganismen in Lebensmitteln (Käse, Joghurt)	Schimmelpilze (z. B. <i>Penicillium camemberti</i> , <i>Penicillium roqueforti</i>), Milchsäurebakterien	Keine verdorbenen Lebensmittel verwenden.
Isolierung von Milchsäurebakterien aus Joghurt und Sauerkraut	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Streptococcus lactis</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	
Anzucht von Schimmelpilzen (Lebensmittel)	Schimmelpilze	Eine sensibilisierende Wirkung kann nicht ausgeschlossen werden. Keine offene Handhabung.
Keimzahlbestimmung in Roh- und Vollmilch	Milchsäure-Bakterien <i>Listeria monocytogenes</i>	Keine offene Handhabung. (<i>Listeria monocytogenes</i> → RG 2)
Abklatschversuche zum Nachweis von Handkeimen / Bedeutung der Händedesinfektion (Geldstücke, Radiergummi, Hände)	In Abhängigkeit vom Probenentnahmeort: Bakterien Hefen Pilze	Keine Probenentnahme von Orten mit zu erwartender hoher Verunreinigung mit Fäkalkeimen (Toilette, Kompost, Abfalltonne ...). Keine offene Handhabung.
Spontankulturen auf Agarplatten (Fangplatten)	Bakterien Pilze	
Untersuchung von Bodenproben	Bakterien Pilze	Die mögliche Konzentration von biologischen Arbeitsstoffen der Risikogruppe 2 kann als sehr gering eingestuft werden.
Abbau verschiedener C-Verbindungen durch Bodenorganismen	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Cellulomonas</i> sp.	
Anreicherung von anaeroben Bodenorganismen	<i>Clostridium pasteurianum</i> <i>Clostridium butyricum</i>	Anzucht auf kohlenhydratreichen Substraten (z. B. Kartoffeln) um das Wachstum von peptolytischen Clostridien (<i>C. perfringens</i> , <i>C. tetani</i> , <i>C. botulinum</i> → RG 2) zu unterdrücken
Nachweis von Kapseln bei Bodenbakterien (Färbung)	<i>Azotobacter</i> sp.	
Anreicherung phototropher Bakterien	Rhodospirillaceae	
Selektive Anreicherung von speziellen Stoffwechselgruppen	<i>Thiobacillus</i> sp.	

Anlage 3: Musterbetriebsanweisung für das Arbeiten mit biologischen Arbeitsstoffen

Schule:	MUSTERBETRIEBSANWEISUNG	Datum:
	Arbeitsbereich: Biologie	
	Arbeitsplatz: Biologievorbereitungsraum _____ / Fachraum _____	Unterschrift:
	Verantwortliche: Schulleitung / Fachlehrkraft Biologie	
ANWENDUNGSBEREICH		
Arbeiten mit biologischen Arbeitsstoffen analog Schutzstufe 1		
GEFAHREN FÜR MENSCH UND UMWELT		
Gefahren für Mensch und Umwelt bestehen durch biologische Arbeitsstoffe die analog Schutzstufe 1 zugeordnet werden können nach dem Stand der Wissenschaft nicht. Ein Infektionsrisiko für den Menschen ist unwahrscheinlich, ein allergenes oder toxisches Potenzial ist aber nicht grundsätzlich auszuschließen. Ein mögliches Auftreten von biologischen Arbeitsstoffen der Risikogruppe 2 führt bei geringer Auftretenswahrscheinlichkeit oder geeigneten Schutzmaßnahmen nicht zu einer erhöhten Gefährdung.		
SCHUTZMASSNAHMEN UND VERHALTENSREGELN		
 	<ul style="list-style-type: none"> • Geeignete Kleidung tragen. • Gegebenenfalls Schutzbrille tragen. • Zum Pipettieren ausschließlich Pipettierhilfen benutzen. • Aerosolbildung vermeiden, Fenster und Türen der Arbeitsbereiche sollen während der Arbeit geschlossen sein. • Spritzen, Kanülen und Skalpelle sollen nur wenn unbedingt nötig benutzt werden. Benutzte Kanülen direkt in die Kanülenabfallbehälter geben, nie in die Schutzhüllen zurückstecken. • Arbeitsplatz aufgeräumt und sauber halten. • Nach Beendigung der Arbeiten Hände mit Wasser und Seife waschen. • Im Arbeitsraum nicht essen, rauchen, trinken, Kaugummi kauen oder Kosmetika auftragen. • Unbekannte Mischkulturen sind nach der Inkubation durch Abkleben luftdicht zu verschließen und nicht mehr zu öffnen. 	
VERHALTEN IM GEFAHRFALL		Ruf Feuerwehr: 112
<ul style="list-style-type: none"> • Bei Freisetzung von biologischen Arbeitsstoffen ist die Lehrkraft zu informieren. • Kontaminierte Gegenstände oder Oberflächen sofort reinigen bzw. nass aufwischen und gegebenenfalls desinfizieren. • Zum Wischen und Aufsaugen Zellstoff verwenden. 		
ERSTE HILFE		Notruf: 112
	<ul style="list-style-type: none"> • Offene Wunden fachkundig versorgen. • Gegebenenfalls ärztliche Hilfe in Anspruch nehmen. • Verletzungen sind der Lehrkraft zu melden – Dokumentation mittels Unfallanzeige oder Verbandbuch. 	
SACHGERECHTE ENTSORGUNG		
	<ul style="list-style-type: none"> • Alle biologischen Arbeitsstoffe sind verschlossen in einem dafür bestimmten Abfallbehälter zu sammeln und über den Hausmüll zeitnah zu entsorgen. • Die Entsorgung von Teichwasser, Bodenproben und Heuaufguss erfolgt über z. B. Kompost oder Gartenteich. 	