

Inhaltsübersicht

1	Einleitung	1
2	Erste Hilfe bei Laborinfektionen	3
3	Sterilisation und Keimreduzierung	5
4	Steriles Arbeiten – Sicherheit im Labor	35
5	Kultivierung von Mikroorganismen	47
6	Anreicherung und Isolierung von Mikroorganismen	137
7	Aufbewahrung und Beschaffung von Reinkulturen	173
8	Lichtmikroskopische Untersuchung von Mikroorganismen	203
9	Bestimmung der Zellzahl und Zellmasse in Populationen einzelliger Mikroorganismen	265
10	Weiterführende Literatur	363
11	Bezugsquellen	373

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Erste Hilfe bei Laborinfektionen	3
3	Sterilisation und Keimreduzierung	5
3.1	Abtötung durch Hitze	6
3.1.1	Feuchte Hitze	7
3.1.1.1	Autoklavieren (Dampfsterilisation)	7
	Der Autoklav	7
	Verlauf der Dampfsterilisation	9
	Durchführung der Sterilisation im Laborautoklav	10
	Kontrolle der Dampfsterilisation	13
3.1.1.2	Tyndallisieren	14
3.1.1.3	Kochen, strömender Dampf	14
3.1.2	Trockene Hitze	14
3.1.2.1	Heißluftsterilisation	14
	Der Heißluftsterilisator	14
	Vorbereitung und Durchführung der Heißluftsterilisation	15
	Kontrolle der Heißluftsterilisation	16
3.1.2.2	Ausglühen und Abflammen	17
	Ausglühen	17
	Abflammen	17
3.2	Chemische Sterilisation und Desinfektion	18
3.2.1	Sterilisation durch Gase	18
3.2.2	Desinfektion und Keimreduzierung durch chemische Mittel	18
3.2.2.1	Händedesinfektion	19
3.2.2.2	Flächen- und Raumbdesinfektion	20
3.2.2.3	Gerätedesinfektion	21
3.3	Bestrahlung	22
3.3.1	UV-Strahlung	23
3.4	Sterilfiltration	24
3.4.1	Sterilfiltration von Flüssigkeiten	25
3.4.1.1	Filtermaterialien	25
3.4.1.2	Filtrationsgeräte	28
3.4.1.3	Sterilisation von Filter und Filtrationsgerät	29
3.4.1.4	Durchführung der Sterilfiltration	30
3.4.1.5	Integritätsprüfung	31
3.4.2	Sterilfiltration von Gasen	32
3.4.2.1	Tiefenfilter	32
3.4.2.2	Membranfilter	33

4 Steriles Arbeiten – Sicherheit im Labor	35
4.1 Räumliche Voraussetzungen	38
4.2 Grundregeln des sterilen Arbeitens	38
4.3 Die Reine Werkbank	41
4.3.1 Prinzip, Gerätetypen	41
4.3.2 Ausstattung	43
4.3.3 Überprüfung	44
4.3.4 Regeln für das Arbeiten an der Reinen Werkbank	45
5 Kultivierung von Mikroorganismen	47
5.1 Nährböden	47
5.1.1 Einteilung der Nährböden	47
5.1.2 Die Nährbodenbestandteile	51
5.1.2.1 Wasser	51
Wasseraufbereitung durch Destillation	52
Wasseraufbereitung durch Entsalzung	52
Auffangen und Lagerung des reinen Wassers	54
5.1.2.2 Kohlenstoff- und Energiequellen	54
5.1.2.3 Stickstoff- und Schwefelquellen	55
5.1.2.4 Mineralstoffe	56
5.1.2.5 Wachstumsfaktoren	59
5.1.2.6 Verfestigungsmittel	64
Agar	64
Gellan	65
Gelatine	66
Kieselgel	67
5.1.3 pH-Wert	68
5.1.3.1 Messung und Einstellung des pH-Werts	68
Das pH-Meter	69
Indikatorfarbstoffe	73
5.1.3.2 Puffer	74
5.1.4 Kommerzielle Komplexnährböden	78
5.1.5 Herstellung von Nährböden	80
5.1.6 Lagerung gebrauchsfertiger Nährböden	81
5.2 Kulturgefäße	82
5.2.1 Die Werkstoffe	83
5.2.1.1 Glas	83
5.2.1.2 Kunststoffe	84
5.2.2 Petrischalen, Vielfachschalen	85
5.2.2.1 Herstellung von Agarplatten	85
5.2.3 Kulturröhrchen	89
5.2.3.1 Schrägagarröhrchen	90
5.2.4 Kolben und Flaschen	91
5.2.5 Verschlüsse	91
5.2.5.1 Watteverschlüsse	92
5.2.5.2 Siliconschwammverschlüsse	93
5.2.5.3 Überwurfkappen	93

5.2.5.4	Schraubkappen.	94
5.2.6	Reinigung der Kulturgefäße und anderer Laborgeräte	94
5.2.6.1	Reinigung neuer Glasgeräte	94
5.2.6.2	Reinigung gebrauchter Glas- und Kunststoffgeräte	95
	Manuelle Reinigung	95
	Maschinelle Reinigung	97
5.3	Entnahme von Zellmaterial, Impftechniken	97
5.3.1	Das Impfmateri al	97
5.3.2	Grundregeln des Überimpfens	99
5.3.3	Impfösen und -nadeln.	99
5.3.4	Pipetten	104
5.3.4.1	Meß- und Vollpipetten.	104
5.3.4.2	Pasteurpipetten.	109
5.3.4.3	Spritzen	110
5.3.5	Drigalskispatel	110
5.3.6	Lederbergstempel.	111
5.4	Bebrütung	113
5.4.1	Temperatur.	113
5.4.2	Licht.	115
5.4.3	Aerobe Bebrütung	116
5.4.3.1	Oberflächenkultur	117
	Feste Nährböden	118
	Zweiphasenkultur	118
	Deckenkultur.	119
5.4.3.2	Submerskultur	119
	Kultur in flacher Schicht	120
	Schütteln	120
	Rühren, Einleiten von Luft	121
5.4.4	Mikroaerobe Bebrütung.	123
5.4.5	Anaerobe Bebrütung	124
5.4.5.1	Redoxpotential.	125
5.4.5.2	Das Arbeiten mit Anaerobiern	126
5.4.5.3	Redoxindikatoren.	127
5.4.5.4	Zusatz reduzierender Stoffe	128
5.4.5.5	Kultur in hoher Schicht, Flaschenkultur.	129
5.4.5.6	Wright-Burri-Röhrchen	130
5.4.5.7	Der Anaerobentopf	132
6	Anreicherung und Isolierung von Mikroorganismen	137
6.1	Anreicherungskultur	137
6.1.1	Aerobe freilebende N ₂ -Fixierer: <i>Azotobacter chroococcum</i>	139
6.1.2	Saccharolytische Clostridien	141
6.1.2.1	Kartoffelkultur	141
6.1.2.2	N ₂ -fixierende Clostridien: <i>Clostridium pasteurianum</i>	142
6.1.3	Sulfatreduzierende Bakterien: <i>Desulfovibrio</i>	144
6.1.4	Ammoniakoxidierende Bakterien	145
6.1.5	Farblose schwefeloxidierende Bakterien: <i>Thiobacillus thio-parus</i>	148

6.2	Direktisolierung	149
6.2.1	Fluoreszierende Pseudomonaden	150
6.2.2	Aerobe und fakultativ anaerobe endosporenbildende Bakterien: <i>Bacillus</i> (einschließlich <i>Paenibacillus</i>)	152
6.2.3	Milchsäurebakterien aus Milch und Sauermilchprodukten	155
6.2.3.1	Streptokokken	155
6.2.3.2	<i>Lactobacillus</i> -Arten (Auswahl)	158
6.2.4	Schwefelfreie Purpurbakterien	159
6.3	Gewinnung von Reinkulturen	162
6.3.1	Ausstrichverfahren	163
6.3.1.1	Durchführung des Ausstrichverfahrens	164
6.3.1.2	Reinheitskontrolle	168
6.3.2	Schüttelagarkultur	169
6.3.3	Verdünnung in flüssigem Nährmedium	172
7	Aufbewahrung und Beschaffung von Reinkulturen	173
7.1	Kurz- und mittelfristige Aufbewahrung	175
7.1.1	Periodisches Überimpfen	175
7.1.1.1	Aufbewahrungsgefäße	175
7.1.1.2	Nährböden	176
7.1.1.3	Überimpfung und Bebrütung	177
7.1.1.4	Lagerung	177
7.1.1.5	Aufbewahrung unter Paraffinöl	178
7.1.2	Trocknen	179
7.1.2.1	Trocknen in Gelatine	179
7.2	Langfristige Aufbewahrung	181
7.2.1	Trocknen unter Vakuum	182
7.2.1.1	Schutzstoffe	183
7.2.1.2	Vakuumtrocknung ohne vorheriges Einfrieren	184
7.2.1.3	Gefriertrocknung	187
7.2.1.4	Reaktivierung der Trockenkulturen	190
7.2.2	Tiefgefrieren	192
7.2.2.1	Aufbewahrungsgefäße	194
7.2.2.2	Schutzstoffe	194
7.2.2.3	Einfrieren und Lagern im Tiefkühlschrank	195
7.2.2.4	Aufbewahrung über Flüssigstickstoff	198
7.2.2.5	Reaktivierung der tiefgefrorenen Kulturen	198
7.3	Beschaffung der Kulturen von Kulturensammlungen	200
8	Lichtmikroskopische Untersuchung von Mikroorganismen	203
8.1	Grundlagen der Lichtmikroskopie	203
8.1.1	Vergrößerung	203
8.1.2	Auflösungsvermögen	204
8.1.3	Kontrast	206
8.2	Aufbau des Mikroskops	206
8.2.1	Mechanische Bauteile	206

8.2.2	Abbildende Optik	208
8.2.2.1	Objektive	208
8.2.2.2	Okulare	211
8.2.3	Beleuchtung	212
8.2.3.1	Lichtquellen	212
8.2.3.2	Lichtfilter	212
8.2.3.3	(Hellfeld-)Kondensor	213
8.2.3.4	Köhlersche Beleuchtung	214
8.3	Das Arbeiten mit dem Mikroskop	215
8.3.1	Inbetriebnahme des Mikroskops	215
8.3.2	Mikroskopieren im Hellfeld	216
8.3.3	Das Arbeiten mit der Ölimmersion	217
8.3.4	Objektträger und Deckgläser	219
8.3.4.1	Objektträger	219
8.3.4.2	Deckgläser	220
8.3.4.3	Reinigung	220
8.3.5	Das Phasenkontrastverfahren	221
8.3.5.1	Theoretische Grundlagen	221
8.3.5.2	Voraussetzungen der Phasenkontrastmikroskopie	224
	Kondensor	224
	Objektive	225
	Lichtquelle	225
	Präparate	225
	Einschlußmittel	225
8.3.5.3	Einstellen des Phasenkontrastmikroskops	226
8.3.5.4	Besonderheiten des Phasenkontrastbildes	227
	Haloefekt	228
	Farbstiche	228
8.3.6	Längenmessungen unter dem Mikroskop	228
8.3.7	Pflege und Reinigung des Mikroskops	230
8.3.8	Die häufigsten Störungen beim Mikroskopieren und ihre Ursachen	232
8.4	Untersuchung lebender Bakterien und Hefen	234
8.4.1	Einfaches Lebendpräparat	234
8.4.1.1	Prüfung auf Beweglichkeit	236
8.4.2	Immobilisierung der Zellen im Lebendpräparat	237
8.4.3	Färbungen am Lebendpräparat	238
8.4.3.1	Nachweis organischer Speicherstoffe	238
	Polysaccharide	239
	Lipide	239
8.4.3.2	Darstellung von Kapseln durch Negativfärbung	240
8.4.4	Objektträgerkultur	241
8.5	Untersuchung fixierter und gefärbter Bakterien	243
8.5.1	Allgemeine Methoden	243
8.5.1.1	Herstellung und Fixierung von Ausstrichpräparaten	243
8.5.1.2	Die Farbstoffe	245
8.5.1.3	Durchführung der Färbung, Untersuchung des gefärbten Präparats	247
8.5.2	Einfache Färbungen	249
8.5.2.1	Färbung mit Methylenblau	249

8.5.2.2	Färbung mit Kristallviolett	250
8.5.2.3	Färbung mit Karbolfuchsin	250
8.5.3	Differentialfärbungen	251
8.5.3.1	Gramfärbung	251
8.5.3.2	Färbung säurefester Stäbchen (Ziehl-Neelsen-Färbung)	254
8.5.4	Cytologische Färbungen	255
8.5.4.1	Endosporenfärbung	255
8.5.4.2	Nachweis von Polyphosphatgranula	257
8.5.4.3	Geißelfärbung	259
9	Bestimmung der Zellzahl und Zellmasse in Populationen einzelliger Mikroorganismen	265
9.1	Bestimmungsfehler	265
9.1.1	Zufällige Fehler	265
9.1.1.1	Mittelwert, Streuungsmaße	266
9.1.1.2	Konfidenzintervall des Mittelwerts	268
9.1.1.3	Poissonverteilung	270
9.1.2	Systematische Fehler	271
9.2	Bestimmung der Zellzahl	272
9.2.1	Gewinnung und Aufbereitung der Proben	272
9.2.1.1	Probenahme	272
	Auswahl der Proben	272
	Entnahme und Aufbewahrung der Proben	273
9.2.1.2	Dispergieren und Verdünnen der Proben	274
	Dispergierv Verfahren	275
	Anlegen von Verdünnungsreihen	277
9.2.2	Bestimmung der Gesamtzellzahl	280
9.2.2.1	Mikroskopische Zellzählung in einer Zählkammer	280
	Die Zählkammer	281
	Vorbereitung der Probe	282
	Durchführung der Zellzählung	283
	Berechnung des Zählergebnisses	285
9.2.2.2	Mikroskopische Zellzählung auf einem Membranfilter	285
	Probenmenge, Filter	286
	Färbung, Auszählung	287
	Durchführung der Filtration und Zellzählung	288
	Berechnung des Zählergebnisses	291
	Epifluoreszenzmikroskopie	292
	„Vitalfärbungen“	293
9.2.2.3	Elektronische Zellzählung: der Coulter-Counter	295
	Meßprinzip	295
	Vorteile und Grenzen der Methode	295
	Zähllösungen, Verdünnen der Zellsuspension	297
9.2.3	Bestimmung der Lebendzellzahl (Keimzahl)	297
9.2.3.1	Dispersions- und Verdünnungsmittel	298
9.2.3.2	Plattenverfahren	299
	Gußplattenverfahren	300
	Spatelplattenverfahren	301

Auszählung der Kolonien	303
Berechnung des Zählergebnisses.	305
9.2.3.3 Schüttelagarkultur im Hochschichtröhrchen	306
9.2.3.4 Membranfiltertechnik	307
Filter	307
Filtrationsgeräte.	309
Probenmenge.	310
Nährböden.	311
Filtration	312
Auswertung.	314
Dokumentation	316
9.2.3.5 Bestimmung der „wahrscheinlichsten Keimzahl“ („most probable number“)	316
Prinzip, Durchführung.	316
Verteilungstyp, Genauigkeit	318
Verwendung und Nachteile der Methode	319
9.3 Bestimmung der Zellmasse.	320
9.3.1 Bestimmung der Feuchtmasse	321
9.3.2 Bestimmung der Trockenmasse	322
9.3.2.1 Trockenmassebestimmung mit Abtrennung der Zellen durch Zentrifugation	322
Grundlagen der Zentrifugation	322
Die Zentrifuge.	323
Rotoren	324
Zentrifugengefäße	325
Durchführung der Bestimmung	328
9.3.2.2 Trockenmassebestimmung mit Abtrennung der Organismen durch Membranfiltration	331
Filter	331
Durchführung der Bestimmung	331
9.3.2.3 Systematische Fehler	333
9.3.3 Proteinbestimmung	334
9.3.3.1 Ernte der Zellen	335
9.3.3.2 Biuretmethode	336
Prinzip	336
Durchführung	336
Störende Substanzen	339
Bewertung der Methode	339
9.3.3.3 Methode nach Lowry et al.	339
Prinzip	339
Durchführung	340
Berechnung des Proteingehalts	342
Störende Substanzen	344
Bewertung der Methode	344
9.3.4 Trübungsmessung	345
9.3.4.1 Grundlagen der Trübungsmessung.	345
9.3.4.2 Das Photometer	347
Lichtquellen	348
Monochromator.	349

Lichtfilter	349
Probenraum	350
Strahlungsdetektor	350
Einstrahl-/Doppelstrahlphotometer	350
Anforderungen an das Photometer bei Trübungsmessungen	351
9.3.4.3 Küvetten	352
Küvettenmaterialien	352
Form und Größe von Küvetten	353
Handhabung und Reinigung von Küvetten	354
9.3.4.4 Durchführung der Trübungsmessung	356
Vorbereitung der Proben	356
Wahl der Wellenlänge	356
Meßbereich	357
Messung	358
Aufstellung einer Eichkurve	359
Einfluß des Brechungsindex auf die Trübungsmessung	361
10 Weiterführende Literatur	363
10.1 Allgemeine und zusammenfassende Literatur	363
10.1.1 Lehrbücher	363
10.1.2 Lexika	364
10.1.3 Mikrobiologische Methoden	364
10.2 Spezielle Literatur	365
11 Bezugsquellen	373
11.1 Produktgruppen und ihre Bezugsquellen	375
11.2 Firmenanschriften	380
Konzentrations- und Gehaltsangaben	399
Verwendete Zeichen und Abkürzungen	401
Abbildungsnachweis	407
Sachverzeichnis	409