

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einführung in mikrobiologisches Arbeiten: Richtlinien und allgemeine Arbeitstechniken</b> .....	<b>1</b>
1.1	Vorsichtsmaßnahmen bei Arbeiten mit Mikroorganismen .....	1
1.1.1	Vermeiden von Laborinfektionen .....	1
1.1.2	Notfallmaßnahmen bei Laborinfektionen .....	3
1.2	Bedeutung sterilen und sauberen Arbeitens .....	4
1.2.1	Arbeitsplatz- und Gerätepflege .....	4
1.2.2	Desinfektion und Sterilisation .....	5
1.3	Kultivierung von Mikroorganismen .....	13
1.3.1	Kulturmedien .....	13
1.3.2	Laboratoriums-Grundausrüstung und Kulturgefäße .....	16
1.3.3	Isolierung, Bezug und Kurzeithaltung von Mikroorganismen ...	18
1.4	Bestimmung der Keimzahl .....	21
	Literatur .....	31
<b>2</b>	<b>Stammhaltung und Konservierung von Mikroorganismen</b> ....	<b>32</b>
2.1	Stammhaltung aerober und anaerober Mikroorganismen (Kurzeithaltung) .....	34
2.2	Konservierte Kulturen (Langzeithaltung) .....	36
2.2.1	Trockenkonservierung .....	36
2.2.2	Gefrierkonservierung .....	44
2.2.3	Konservierung unter Paraffinöl .....	49
2.2.4	Konservierung in steriler Erde .....	50
2.3	Versand von Mikroorganismen .....	50
	Literatur .....	51
<b>3</b>	<b>Identifizierung von Bakterien</b> .....	<b>52</b>
3.1	Allgemeine Bakterienidentifizierung .....	54
3.1.1	Morphologie .....	55
3.1.2	Färbungen .....	56
3.1.3	Wachstumsbedingungen .....	65
3.1.4	Verhalten gegen Sauerstoff .....	67
3.1.5	Stoffwechseleigenschaften .....	69
3.2	Identifizierung von gleitenden Bakterien .....	80
3.2.1	Nachweis der Gleitbewegung .....	80
3.2.2	Nachweis von Carotinoiden und Flexirubinen .....	81
3.2.3	Nachweis von bakteriolytischen Eigenschaften .....	81

3.3	Identifizierung von Mikroorganismen mit standardisierten Testsystemen .....	82
3.3.1	Identifizierung von Enterobacteriaceae .....	83
3.4	Identifizierung von Bakterien mit chemotaxonomischen und molekularbiologischen Methoden .....	88
3.4.1	Fettsäuren aus Bakterien (FAME) .....	89
3.4.2	Bestimmung des GC-Gehaltes der DNA .....	92
3.4.3	DNA-DNA-Hybridisierung .....	95
3.4.4	Sequenzierung des 16S-rRNA-Gens .....	98
	Literatur .....	107
<b>4</b>	<b>Wachstum der Mikroorganismen .....</b>	<b>109</b>
4.1	Wachstum in einer Batch-Kultur .....	109
4.1.1	Aufnahme einer Wachstumskurve .....	113
4.1.2	Wachstum in Abhängigkeit von verschiedenen Kohlenstoffquellen .....	115
4.1.3	Wachstum in Abhängigkeit von der Substratkonzentration .....	117
4.1.4	Wachstum aerober Mikroorganismen in Abhängigkeit von der Sauerstoffversorgung .....	120
4.2	Wachstum der Mikroorganismen in einer kontinuierlichen Kultur .....	121
4.3	Synchronisation der Zellteilung in Kulturen von Mikroorganismen .....	128
4.4	Zellzyklusanalysen an Hefen .....	132
	Literatur .....	136
<b>5</b>	<b>Bakteriophagen .....</b>	<b>137</b>
5.1	Anreicherungsverfahren von Bakteriophagen .....	141
5.2	Stufenwachstum der Phagen und Phagenzüchtung in Flüssigkultur .....	143
5.2.1	Züchtung von T1-Phagen .....	144
5.2.2	Züchtung von Lambda-Phagen .....	146
5.3	Versuche mit temperenten Phagen .....	147
5.3.1	Nachweis der Lysogenie .....	148
5.3.2	Isolierung von temperenten Phagen und sensitiven Bakterienstämmen .....	150
	Literatur .....	153
<b>6</b>	<b>Untersuchungen mit anaerob wachsenden Bakterien .....</b>	<b>155</b>
	Literatur .....	165
<b>7</b>	<b>Antibakterielle Wirkstoffe (Synthetische Wirkstoffe, Antibiotika) .....</b>	<b>166</b>
7.1	Produktion durch Mikroorganismen .....	167
7.2	Identifizierung eines antibakteriellen Wirkstoffes .....	171

7.3	Resistenz gegen antibakterielle Stoffe .....	175
7.4	Bestimmungsmethoden für antibakterielle Aktivitäten .....	179
7.4.1	Verdünnungstest .....	179
7.4.2	Agardiffusionstest .....	182
7.4.3	Kinetische Meßmethoden für antibakterielle Wirkungen .....	188
7.4.4	Konzentrationsbestimmungen von antibakteriellen Stoffen .....	190
7.5	Interaktionen zwischen verschiedenen Antibiotika .....	196
	Literatur .....	204
<b>8</b>	<b>Erzeugung von Mutanten und Photoreparatur .....</b>	<b>206</b>
8.1	Mutationsauslösung mit N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) .....	208
8.1.1	Behandlung einer Bakterienkultur mit Mutagen und Bestimmung der Inaktivierung .....	210
8.1.2	Isolierung und Bestimmung von Mutanten nach Mutagen- behandlung .....	213
8.1.3	Mutantenanreicherungsverfahren .....	213
8.1.4	Stempeltest .....	215
8.1.5	Strichtest .....	220
8.1.6	Blättchentest .....	220
8.1.7	Deutung von auxotrophen Mutantentypen .....	222
8.1.8	Isolierung verschiedener Mutantentypen .....	226
8.2	Mutationsauslösung durch Transposition .....	227
8.2.1	Transposonmutation mit dem Phagen Mu .....	230
8.3	Photoreparatur bei Bakterien .....	235
	Literatur .....	240
<b>9</b>	<b>Mutagenitäts- und Toxizitätsprüfung mit bakteriellen Systemen .....</b>	<b>242</b>
9.1	Mutagenitätsprüfung mit bakteriellen Systemen .....	243
9.1.1	Mutagenitätstest mit metabolischer Aktivierung von Testverbindungen (Ames-Test) .....	247
9.1.2	Ames-Test mit Hefemikrosomen .....	254
9.1.3	Repair-Test .....	256
9.2	Toxizitätstest mit Bakterien .....	258
9.2.1	Der Leuchthemmtest mit Leuchtbakterien .....	258
9.2.2	Der Schwärmhemmtest mit <i>Proteus mirabilis</i> .....	261
	Literatur .....	263
<b>10</b>	<b>Untersuchungen von Biosynthesen mit Hilfe von Mutanten ..</b>	<b>265</b>
10.1	Untersuchungen von Biosynthesen mit Mangelmutanten .....	266
10.1.1	Kreuzfütterungstest mit Mangelmutanten .....	270
10.1.2	Lokalisierung eines Biosyntheseblocks von Mangelmutanten durch einen Wachstumstest .....	271

10.2	Akkumulation von Biosynthesezwischenprodukten der Tryptophan-Biosynthese, Isolierung und erste Charakterisierung . . . . .	273
	Literatur . . . . .	278
<b>11</b>	<b>Regulation von Stoffwechselfvorgängen . . . . .</b>	<b>279</b>
11.1	Einfacher Nachweis einer Regulation bei intakten Zellen . . . . .	284
11.2	Versuche mit der biosynthetischen Threonindesaminase (Repression, allosterische Hemmung und Aktivierung) . . . . .	287
11.2.1	Herstellung der Enzymrohextrakte mit verschiedenen Aufschlußverfahren . . . . .	293
11.2.2	Bestimmung der spezifischen Aktivität der biosynthetischen Threonindesaminase im Rohextrakt . . . . .	293
11.2.3	Abhängigkeit des Threoninumsatzes von verschiedenen Parametern . . . . .	295
11.3	Induktion und Katabolitrepression der $\beta$ -Galactosidase von <i>E. coli</i> . . . . .	298
	Literatur . . . . .	302
<b>12</b>	<b>Proteinbiosynthese in vitro und in vivo bei <i>Escherichia coli</i> . . . . .</b>	<b>303</b>
12.1	Zellfreie Proteinsynthese . . . . .	306
12.2	Proteinsynthese in vivo . . . . .	314
12.3	Untersuchungen an Ribosomen . . . . .	316
	Literatur . . . . .	321
<b>13</b>	<b>Isolierung und Charakterisierung von Desoxyribonukleinsäuren . . . . .</b>	<b>322</b>
13.1	Sedimentationsverfahren zur Stofftrennung . . . . .	326
13.2	Isolierung von Plasmid-DNA . . . . .	329
13.3	Isolierung von Phagen-DNA . . . . .	334
13.4	Isolierung von genomischer DNA . . . . .	337
13.5	Charakterisierung von Plasmid-, Phagen- und genomischer DNA durch Spaltung mit Restriktionsenzymen . . . . .	339
	Literatur . . . . .	347
<b>14</b>	<b>Genklonierung in <i>Escherichia coli</i> . . . . .</b>	<b>349</b>
14.1	Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch in vitro neukombinierte Nukleinsäuren . . . . .	353
14.1.1	Laborsicherheitsmaßnahmen . . . . .	353
14.1.2	Biologische Sicherheitsmaßnahmen . . . . .	355
14.2	Arbeitsschritte der Genklonierung . . . . .	356
14.2.1	Präparative Spaltung von pBR 322-Plasmid-DNA und Lambda-Phagen-DNA . . . . .	356
14.2.2	Ligierung von Plasmid- und Phagen-DNA . . . . .	359
14.2.3	Isolierung von kompetenten <i>E.-coli</i> -Zellen und Plasmidtransformation . . . . .	360

14.2.4	Charakterisierung von rekombinanten Bakterienklonen .....	363
14.3	Klonierung und Expression des Luziferasegens von <i>Vibrio fischeri</i> in <i>Escherichia coli</i> .....	366
	Literatur .....	372
<b>15</b>	<b>Erregerdetektion durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) .</b>	<b>374</b>
15.1	Nachweis der Methicillinresistenz von Staphylokokken durch DNA-Diagnostik mit der Polymerasekettenreaktion .....	374
	Literatur .....	379
<b>16</b>	<b>Transformation von chromosomaler DNA in <i>Bacillus subtilis</i> .</b>	<b>380</b>
	Literatur .....	388
<b>17</b>	<b>Stoffbestimmungen mit Mikroorganismen .....</b>	<b>389</b>
17.1	Aminosäurebestimmung durch Trübungsmessung .....	390
17.2	Vitaminbestimmung durch Trübungsmessung oder Messung gebildeter Milchsäure .....	392
	Literatur .....	395
<b>18</b>	<b>Isolierung von Farbstoffen aus Bakterien .....</b>	<b>396</b>
18.1	Cytochrom c-556 .....	398
18.2	Prodigiosin .....	400
	Literatur .....	402
<b>19</b>	<b>Mikrobieller Abbau .....</b>	<b>403</b>
19.1	Isolierung toluolabbauender Mikroorganismen aus Wasser- proben .....	404
19.2	Abwasseranalytik .....	409
19.2.1	Bestimmung des biochemischen Sauerstoffbedarfs (Verdünnungs-BSB nach DIN 38 409 Teil 51) .....	410
19.3	Respirometrische Untersuchungen von Abbauvorgängen .....	416
19.3.1	Atmungsaktivität von Belebtschlamm beim Abbau verschiedener Substanzen .....	416
19.3.2	Respirometrische BSB-Bestimmung .....	419
19.3.3	Respirometrischer Abbaunachweis .....	422
19.4	Anaerober Abbau .....	423
	Literatur .....	427
<b>20</b>	<b>Stoffumwandlungen durch Mikroorganismen (Biotransformationen) .....</b>	<b>429</b>
20.1	Hydroxylierung von Progesteron mit <i>Calonectria decora</i> .....	429
20.2	Gewinnung von L-Asparaginsäure mit immobilisierten <i>Escherichia coli</i> -Zellen .....	432
	Literatur .....	435

<b>21</b>	<b>Gewinnung von Metallen durch bakterielle Laugung (Leaching-Verfahren)</b> .....	<b>436</b>
21.1	Perkolator-Leaching .....	438
21.2	Submersleaching .....	441
21.2.1	Submersleaching mit chemolithotrophen Bakterien .....	441
21.2.2	Submerslaugung mit heterotrophen Mikroorganismen .....	443
	Literatur .....	443
<b>22</b>	<b>Mikrobiologische Trinkwasseruntersuchung nach der Trinkwasserverordnung</b> .....	<b>444</b>
22.1	Bestimmung der Koloniezahl .....	446
22.2	Nachweis von <i>Escherichia coli</i> und coliformen Bakterien .....	448
22.2.1	Flüssiganreicherung in Laktosebouillon .....	448
22.2.2	Isolierung von <i>Escherichia coli</i> und coliformen Keimen .....	449
22.2.3	Identifizierung von <i>Escherichia coli</i> und coliformen Keimen .....	450
22.3	Nachweis von sulfitreduzierenden sporenbildenden Anaerobiern .....	452
22.4	Nachweis von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	455
22.5	Nachweis von Fäkalstreptokokken (Enterokokken) .....	456
22.6	Nachweis von <i>Legionella pneumophila</i> .....	457
22.7	Nachweis von atypischen Mykobakterien .....	459
22.8	Viren im Trinkwasser .....	460
	Literatur .....	461
<b>23</b>	<b>Pflanzenpathogene Pilze</b> .....	<b>463</b>
23.1	Infektion von Äpfeln mit pilzlichen Erregern und Kochsche Postulate .....	463
23.1.1	Isolierung und Bestimmung von Erregern der Apfelfruchtfäule ..	464
23.1.2	Infektion von Äpfeln .....	465
23.2	Biologische Bekämpfung von Gurkenmehltau mit einem Hyperparasiten .....	466
	Literatur .....	470
	Medienanhang .....	471
	Anhang: Empfehlungen zur Entsorgung von Abfällen .....	475
	Sachverzeichnis .....	477