

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Erste Hilfe bei Laborinfektionen</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Sterilisation und Keimreduzierung</b>	<b>5</b>
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 Raumdesinfektion	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

<b>4 Steriles Arbeiten – Sicherheit im Labor</b> .....	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
<b>5 Kultivierung von Mikroorganismen</b> .....	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, Vielschalen .....	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 KulturgefäÙe und anderer LaborgeräÙe . . . . .	94
5.2.6.1	Reinigung neuer GlasgeräÙe . . . . .	94
5.2.6.2	Reinigung gebrauchter Glas- und KunststoffgeräÙe . . . . .	95
	Manuelle Reinigung . . . . .	95
	Maschinelle Reinigung . . . . .	97
5.3	Entnahme von Zellmaterial, Impftechniken . . . . .	97
5.3.1	Das Impfmateriel . . . . .	97
5.3.2	Grundregeln des Überimpfens . . . . .	99
5.3.3	ImpföÙen und -nadeln. . . . .	99
5.3.4	Pipetten . . . . .	104
5.3.4.1	MeÙ- 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-RöÙrchen . . . . .	130
5.4.5.7	Der Anaerobentopf . . . . .	132
<b>6</b>	<b>Anreicherung und Isolierung von Mikroorganismen . . . . .</b>	<b>137</b>
6.1	Anreicherungskultur . . . . .	137
6.1.1	Aerobe freilebende N <sub>2</sub> -Fixierer: <i>Azotobacter chroococcum</i> . . . . .	139
6.1.2	Saccharolytische Clostridien . . . . .	141
6.1.2.1	Kartoffelkultur . . . . .	141
6.1.2.2	N <sub>2</sub> -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 thioparus</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	<b>Aufbewahrung und Beschaffung von Reinkulturen</b>	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	<b>Lichtmikroskopische Untersuchung von Mikroorganismen</b>	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
	Haloeffekt . . . . .	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
<b>9</b>	<b>Bestimmung der Zellzahl und Zellmasse in Populationen einzelliger Mikroorganismen</b>	<b>265</b>
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 Membranfiltrertechnik . . . . .	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
<b>10 Weiterführende Literatur . . . . .</b>	<b>363</b>
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
<b>11 Bezugsquellen . . . . .</b>	<b>371</b>
11.1 Produktgruppen und ihre Bezugsquellen . . . . .	373
11.2 Firmenanschriften . . . . .	378
<b>Konzentrations- und Gehaltsangaben . . . . .</b>	<b>395</b>
<b>Verwendete Zeichen und Abkürzungen . . . . .</b>	<b>397</b>
<b>Abbildungsnachweis . . . . .</b>	<b>403</b>
<b>Sachverzeichnis . . . . .</b>	<b>405</b>