

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	8
	Verlauf der Dampfsterilisation	9
	Durchführung der Sterilisation im Laborautoklav	11
	Kontrolle der Dampfsterilisation	13
3.1.1.2	Tyndallisieren	14
3.1.1.3	Kochen, strömender Dampf	14
3.1.2	Trockene Hitze	15
3.1.2.1	Heißluftsterilisation	15
	Der Heißluftsterilisator	15
	Vorbereitung und Durchführung der Heißluftsterilisation	16
	Kontrolle der Heißluftsterilisation	17
3.1.2.2	Ausglühen und Abflammen	17
	Ausglühen	18
	Abflammen	18
3.2	Chemische Sterilisation und Desinfektion	19
3.2.1	Sterilisation durch Gase	19
3.2.2	Desinfektion und Keimreduzierung durch chemische Mittel	19
3.2.2.1	Händedesinfektion	20
3.2.2.2	Flächen- und Raumdesinfektion	21
3.2.2.3	Gerätedesinfektion	22
3.3	Bestrahlung	23
3.3.1	UV-Strahlung	24
3.4	Sterilfiltration	25
3.4.1	Sterilfiltration von Flüssigkeiten	26
3.4.1.1	Filtermaterialien	26
3.4.1.2	Filtrationsgeräte	29
3.4.1.3	Sterilisation von Filter und Filtrationsgerät	30
3.4.1.4	Durchführung der Sterilfiltration	31
3.4.1.5	Integritätsprüfung	33

X Inhaltsverzeichnis

3.4.2	Sterilfiltration von Gasen	33
3.4.2.1	Tiefenfilter	33
3.4.2.2	Membranfilter	34
4	Steriles Arbeiten – Sicherheit im Labor	37
4.1	Gefährlichkeit von Mikroorganismen – die Biostoffverordnung	37
4.2	Räumliche Voraussetzungen	41
4.3	Grundregeln des sterilen Arbeitens	42
4.4	Die Reine Werkbank	45
4.4.1	Prinzip, Gerätetypen	45
4.4.2	Ausstattung	47
4.4.3	Überprüfung	48
4.4.4	Regeln für das Arbeiten an der Reinen Werkbank	49
5	Kultivierung von Mikroorganismen	51
5.1	Nährböden	51
5.1.1	Einteilung der Nährböden	51
5.1.2	Die Nährbodenbestandteile	55
5.1.2.1	Wasser	55
	Wasseraufbereitung durch Destillation	56
	Wasseraufbereitung durch Entsalzung	56
	Auffangen und Lagerung des reinen Wassers	58
5.1.2.2	Kohlenstoff- und Energiequellen	58
5.1.2.3	Stickstoff- und Schwefelquellen	60
5.1.2.4	Mineralstoffe	61
5.1.2.5	Wachstumsfaktoren	64
5.1.2.6	Verfestigungsmittel	69
	Agar	69
	Gellan	71
	Gelatine	72
	Kieselgel	72
5.1.3	pH-Wert	74
5.1.3.1	Messung und Einstellung des pH-Werts	74
	Das pH-Meter	74
	Indikatorfarbstoffe	80
5.1.3.2	Puffer	81
5.1.4	Kommerzielle Komplexnährböden	85
5.1.5	Herstellung von Nährböden	87
5.1.6	Lagerung gebrauchsfertiger Nährböden	88

5.2	Kulturgefäße	89
5.2.1	Die Werkstoffe	90
5.2.1.1	Glas	90
5.2.1.2	Kunststoffe	91
5.2.2	Petrischalen, Vielfachschalen	94
5.2.2.1	Herstellung von Agarplatten	94
5.2.3	Kulturröhrchen	96
5.2.3.1	Schrägagarröhrchen	97
5.2.4	Kolben und Flaschen	98
5.2.5	Verschlüsse	98
5.2.5.1	Watteverschlüsse	99
5.2.5.2	Siliconschwammverschlüsse	100
5.2.5.3	Überwurfkappen	100
5.2.5.4	Schraubkappen	101
5.2.6	Reinigung der Kulturgefäße und anderer Laborgeräte	101
5.2.6.1	Reinigung neuer Glasgeräte	101
5.2.6.2	Reinigung gebrauchter Glas- und Kunststoffgeräte	102
	Manuelle Reinigung	102
	Maschinelle Reinigung	104
5.3	Entnahme von Zellmaterial, Impftechniken	104
5.3.1	Das Impfmateriäl	104
5.3.2	Grundregeln des Überimpfens	106
5.3.3	Impfösen und -nadeln	106
5.3.4	Pipetten	111
5.3.4.1	Mess- und Vollpipetten	111
5.3.4.2	Pasteurpipetten	117
5.3.4.3	Spritzen	118
5.3.5	Drigalskispatel	118
5.3.6	Lederbergstempel	118
5.4	Bebrütung	120
5.4.1	Temperatur	121
5.4.2	Licht	123
5.4.3	Aerobe Bebrütung	124
5.4.3.1	Oberflächenkultur	126
	Feste Nährböden	126
	Zweiphasenkultur	126
	Deckenkultur	127
5.4.3.2	Submerskultur	127
	Kultur in flacher Schicht	128
	Schütteln	128
	Rühren, Einleiten von Luft	129
5.4.4	Mikroaerobe Bebrütung	132
5.4.5	Anaerobe Bebrütung	132
5.4.5.1	Redoxpotential	133

5.4.5.2	Das Arbeiten mit Anaerobiern	134
5.4.5.3	Redoxindikatoren	135
5.4.5.4	Zusatz reduzierender Stoffe	136
5.4.5.5	Kultur in hoher Schicht, Flaschenkultur	137
5.4.5.6	Wright-Burri-Röhrchen	139
5.4.5.7	Der Anaerobentopf	140
6	Anreicherung und Isolierung von Mikroorganismen	145
6.1	Anreicherungskultur	145
6.1.1	Aerobe freilebende N ₂ -Fixierer: <i>Azotobacter chroococcum</i>	147
6.1.2	Saccharolytische Clostridien	149
6.1.2.1	Kartoffelkultur	149
6.1.2.2	N ₂ -fixierende Clostridien: <i>Clostridium pasteurianum</i>	150
6.1.3	Sulfatreduzierende Bakterien: <i>Desulfovibrio</i>	152
6.1.4	Ammoniakoxidierende Bakterien	153
6.1.5	Farblose schwefeloxidierende Bakterien: <i>Thiobacillus thioparus</i>	156
6.2	Direktisolierung	157
6.2.1	Fluoreszierende Pseudomonaden	158
6.2.2	Aerobe und fakultativ anaerobe endosporenbildende Bakterien: <i>Bacillus</i> , <i>Paenibacillus</i>	160
6.2.3	Milchsäurebakterien aus Milch und Sauermilchprodukten	164
6.2.3.1	Streptokokken	164
6.2.3.2	<i>Lactobacillus</i> -Arten (Auswahl)	166
6.2.4	Schwefelfreie Purpurbakterien	168
6.3	Gewinnung von Reinkulturen	170
6.3.1	Ausstrichverfahren	172
6.3.1.1	Durchführung des Ausstrichverfahrens	173
6.3.1.2	Reinheitskontrolle	176
6.3.2	Schüttelagarkultur	178
6.3.3	Verdünnung in flüssigem Nährmedium	180
7	Aufbewahrung und Beschaffung von Reinkulturen	183
7.1	Kurz- und mittelfristige Aufbewahrung	185
7.1.1	Periodisches Überimpfen	185
7.1.1.1	Aufbewahrungsgefäße	185
7.1.1.2	Nährböden	186
7.1.1.3	Überimpfung und Bebrütung	187
7.1.1.4	Lagerung	187
7.1.1.5	Aufbewahrung unter Paraffinöl	188
7.1.2	Trocknen	189
7.1.2.1	Trocknen in Gelatine	189

7.2	Langfristige Aufbewahrung	192
7.2.1	Trocknen unter Vakuum	193
7.2.1.1	Schutzstoffe	193
7.2.1.2	Vakuumtrocknung ohne vorheriges Einfrieren	194
7.2.1.3	Gefriertrocknung	198
7.2.1.4	Reaktivierung der Trockenkulturen	201
7.2.2	Tiefgefrieren	203
7.2.2.1	AufbewahrungsgefäÙe	204
7.2.2.2	Schutzstoffe	205
7.2.2.3	Einfrieren und Lagern im Tiefkühlschrank	206
7.2.2.4	Aufbewahrung über Flüssigstickstoff	208
7.2.2.5	Reaktivierung der tiefgefrorenen Kulturen	209
7.3	Beschaffung der Kulturen von Kulturensammlungen	211
8	Lichtmikroskopische Untersuchung von Mikroorganismen	215
8.1	Grundlagen der Lichtmikroskopie	215
8.1.1	Vergrößerung	215
8.1.2	Auflösungsvermögen	216
8.1.3	Kontrast	218
8.2	Aufbau des Mikroskops	218
8.2.1	Mechanische Bauteile	219
8.2.2	Abbildende Optik	220
8.2.2.1	Objektive	220
8.2.2.2	Okulare	223
8.2.3	Beleuchtung	224
8.2.3.1	Lichtquellen	224
8.2.3.2	Lichtfilter	224
8.2.3.3	(Hellfeld-)Kondensator	225
8.2.3.4	Köhler'sche Beleuchtung	226
8.3	Das Arbeiten mit dem Mikroskop	227
8.3.1	Inbetriebnahme des Mikroskops	227
8.3.2	Mikroskopieren im Hellfeld	229
8.3.3	Das Arbeiten mit der Ölimmersion	229
8.3.4	Objektträger und Deckgläser	232
8.3.4.1	Objektträger	232
8.3.4.2	Deckgläser	232
8.3.4.3	Reinigung	233
8.3.5	Längenmessungen unter dem Mikroskop	234
8.3.6	Pflege und Reinigung des Mikroskops	236
8.3.7	Die häufigsten Störungen beim Mikroskopieren und ihre Ursachen	239

8.4	Das Phasenkontrastverfahren	240
8.4.1	Theoretische Grundlagen	240
8.4.2	Voraussetzungen der Phasenkontrastmikroskopie	243
8.4.2.1	Kondensator	243
8.4.2.2	Objektive	243
8.4.2.3	Lichtquelle	244
8.4.2.4	Präparate	244
8.4.2.5	Einschlussmittel	244
8.4.3	Einstellen des Phasenkontrastmikroskops	245
8.4.4	Besonderheiten des Phasenkontrastbildes	246
8.4.4.1	Haloefekt	246
8.4.4.2	Farbstiche	247
8.5	Untersuchung lebender Bakterien und Hefen	247
8.5.1	Einfaches Lebendpräparat	248
8.5.1.1	Prüfung auf Beweglichkeit	250
8.5.2	Immobilisierung der Zellen im Lebendpräparat	251
8.5.3	Färbungen am Lebendpräparat	253
8.5.3.1	Nachweis organischer Speicherstoffe	253
	Polysaccharide	253
	Lipide	254
8.5.3.2	Darstellung von Kapseln durch Negativfärbung	254
8.5.4	Objektträgerkultur	256
8.6	Untersuchung fixierter und gefärbter Bakterien (klassische Färbungen) ...	258
8.6.1	Allgemeine Methoden	258
8.6.1.1	Herstellung und Fixierung von Ausstrichpräparaten	258
8.6.1.2	Die Farbstoffe	260
8.6.1.3	Durchführung der Färbung, Untersuchung des gefärbten Präparats	262
8.6.2	Einfache Färbungen	264
8.6.2.1	Färbung mit Methylenblau	264
8.6.2.2	Färbung mit Kristallviolett	265
8.6.2.3	Färbung mit Karbolfuchsin	265
8.6.3	Differentialfärbungen	266
8.6.3.1	Gramfärbung	266
	KOH-Test	269
	L-Alanin-Amino-peptidase-Test	270
8.6.3.2	Färbung säurefester Stäbchen (Ziehl-Neelsen-Färbung)	271
8.6.4	Cytologische Färbungen	273
8.6.4.1	Endosporenfärbung	273
8.6.4.2	Nachweis von Polyphosphatgranula	275
8.6.4.3	Geißelfärbung	277

8.7	Das Epifluoreszenzmikroskop	282
8.7.1	Theoretische Grundlagen	282
8.7.2	Optische Teile des Epifluoreszenzmikroskops	283
8.7.2.1	Strahlengang	283
8.7.2.2	Objektive	285
8.7.2.3	Okulare	286
8.7.2.4	Lichtquellen	286
8.7.2.5	Lichtfilter	290
	Absorptionsfilter	290
	Interferenzfilter	290
	Erregungsfilter	291
	Sperrfilter	292
	Strahlenteiler	293
	Kennzeichnung der Filter	293
	Filterblocks	294
	Rotabsorptionsfilter	294
	Neutralfilter	295
	Wärmeschutzfilter	295
8.7.3	Bedingungen für das Arbeiten mit dem Epifluoreszenzmikroskop	295
8.7.4	Kombination der Epifluoreszenzmikroskopie mit anderen lichtmikroskopischen Verfahren	296
8.7.5	Konfokale Laserscanning-Mikroskopie	297
8.8	Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen	297
8.8.1	Die Fluoreszenzfarbstoffe	297
8.8.1.1	Übersicht	297
8.8.1.2	Einfluss der Umgebung auf die Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe	299
8.8.1.3	Wirkung der Fluoreszenzfarbstoffe auf die Zellen	300
8.8.1.4	Metachromasie	301
8.8.1.5	Nucleinsäurefarbstoffe	301
8.8.1.6	Membranpotentialindikatoren	304
8.8.1.7	Esterasesubstrate	306
8.8.1.8	Ausbleichen („Photobleaching“)	306
	Antifade-Reagenzien	307
8.8.2	Fluoreszenzfärbungen	311
8.8.2.1	Einfache Fluoreszenzfärbungen	311
	Färbung mit <i>BacLight Green</i> bzw. <i>BacLight Red</i>	312
8.8.2.2	Fluoreszenzgramfärbung	313
8.8.2.3	Fluoreszenzfärbung säurefester Stäbchen	315

9	Bestimmung der Zellzahl und Zellmasse in Populationen einzelliger Mikroorganismen	319
9.1	Bestimmungsfehler	319
9.1.1	Zufällige Fehler	319
9.1.1.1	Mittelwert, Streuungsmaße	320
9.1.1.2	Konfidenzintervall des Mittelwerts	322
9.1.1.3	Poissonverteilung	324
9.1.2	Systematische Fehler	325
9.2	Bestimmung der Zellzahl	326
9.2.1	Gewinnung und Aufbereitung der Proben	326
9.2.1.1	Probenahme	326
	Auswahl der Proben	326
	Entnahme und Aufbewahrung der Proben	327
9.2.1.2	Dispergieren und Verdünnen der Proben	328
	Dispergiervverfahren	329
	Anlegen von Verdünnungsreihen	331
9.2.2	Bestimmung der Gesamtzellzahl	335
9.2.2.1	Mikroskopische Zellzählung in einer Zählkammer	335
	Die Zählkammer	335
	Vorbereitung der Probe	336
	Durchführung der Zellzählung	338
	Berechnung des Zählergebnisses	340
9.2.2.2	Mikroskopische Zellzählung auf einem Membranfilter	340
	Probenmenge, Filter	341
	Farbstoffe, Färbung und Auszählung	343
	Durchführung der Zellzahlbestimmung	344
	Berechnung des Zählergebnisses	348
	„Vitalfärbungen“	349
	Vitalfärbung mit SYTO 9 und Propidiumiodid	351
9.2.2.3	Elektronische Zellzählung: der Coulter-Counter	354
	Messprinzip	354
	Vorteile und Grenzen der Methode	355
	Zähllösungen, Verdünnen der Zellsuspension	356
9.2.3	Bestimmung der Lebendzellzahl (Keimzahl)	356
9.2.3.1	Dispersions- und Verdünnungsmittel	357
9.2.3.2	Plattenverfahren	358
	Gussplattenverfahren	359
	Spatelplattenverfahren	361
	Auszählung der Kolonien	363
	Berechnung des Zählergebnisses	364
9.2.3.3	Schüttelagarkultur im Hochschichtröhrchen	366

9.2.3.4	Membranfiltertechnik	366
	Filter	367
	Filtrationsgeräte.	369
	Probenmenge.	371
	Nährböden	371
	Filtration	372
	Auswertung	374
	Dokumentation	376
9.2.3.5	Bestimmung der „wahrscheinlichsten Keimzahl“ („most probable number“)	376
	Prinzip, Durchführung.	376
	Verteilungstyp, Genauigkeit	378
	Verwendung und Nachteile der Methode	379
9.3	Bestimmung der Zellmasse	380
9.3.1	Bestimmung der Feuchtmasse	381
9.3.2	Bestimmung der Trockenmasse	381
9.3.2.1	Trockenmassebestimmung mit Abtrennung der Zellen durch Zentrifugation	382
	Grundlagen der Zentrifugation	382
	Die Zentrifuge	383
	Rotoren	384
	Zentrifugengefäße	385
	Durchführung der Bestimmung	388
9.3.2.2	Trockenmassebestimmung mit Abtrennung der Organismen durch Membranfiltration	391
	Filter	391
	Durchführung der Bestimmung	392
9.3.2.3	Systematische Fehler.	394
9.3.3	Proteinbestimmung	395
9.3.3.1	Ernte der Zellen	396
9.3.3.2	Biuretmethode	396
	Prinzip	396
	Durchführung	397
	Störende Substanzen	399
	Bewertung der Methode	400
9.3.3.3	Methode nach Lowry et al.	400
	Prinzip	400
	Durchführung	401
	Berechnung des Proteingehalts	403
	Störende Substanzen	405
	Bewertung der Methode	405
9.3.4	Trübungsmessung	405
9.3.4.1	Grundlagen der Trübungsmessung.	406

9.3.4.2	Das Photometer	408
	Lichtquellen	409
	Monochromator	410
	Lichtfilter	410
	Probenraum	411
	Strahlungsdetektor	411
	Einstrahl-/Doppelstrahlphotometer	411
	Anforderungen an das Photometer bei Trübungsmessungen ..	412
9.3.4.3	Küvetten	414
	Küvettenmaterialien	414
	Form und Größe von Küvetten	415
	Handhabung und Reinigung von Küvetten	416
9.3.4.4	Durchführung der Trübungsmessung	417
	Vorbereitung der Proben	417
	Wahl der Wellenlänge	418
	Messbereich	419
	Messung	419
	Aufstellung einer Eichkurve	420
	Einfluss des Brechungsindex auf die Trübungsmessung	422
10	Weiterführende Literatur	423
10.1	Allgemeine und zusammenfassende Literatur	423
10.1.1	Lehrbücher	423
10.1.2	Lexika, Wörterbücher	425
10.2	Spezielle Literatur	426
11	Bezugsquellen	435
	Konzentrations- und Gehaltsangaben	437
	Verwendete Zeichen und Abkürzungen	439
	Abbildungsnachweis	445
	Sachverzeichnis	447