

Brock

Mikrobiologie kompakt

Michael T. Madigan
John M. Martinko
David A. Stahl
David P. Clark

EXTRAS
ONLINE

Editiert und herausgegeben von Martina und Dieter Jahn

ALWAYS LEARNING

PEARSON

bis ein einziger Organismus übrig bleibt. Auf diese Weise haben Mikrobiologen, die Wachstumsraten verschiedener im Boden lebender Bakterien untersuchten, ein Bakterium isoliert, dessen Verdopplungszeit sechs Minuten beträgt – das am schnellsten wachsende uns bekannte Bakterium!

Messung des mikrobiellen Wachstums

4.3

Man misst das Wachstum einer Population, indem man Veränderungen in der Anzahl der Zellen oder in dem Vorliegen einiger zellulärer Bestandteile registriert. Letztere können ein Protein, Nucleinsäuren oder das Trockengewicht der Zellen selber sein. Im Folgenden werden wir uns mit zwei häufig verwendeten Methoden zur Messung des Zellwachstums beschäftigen: dem Zählen von Zellen und der Trübungsmessung, der Messung der Zellmasse.

4.3.1 Mikroskopische Messungen

Man kann die Anzahl von Zellen in einer Population ermitteln, indem man eine Probe unter dem Mikroskop beobachtet und die Zellen in der Kultur oder der natürlichen Probe zählt. Diese Methode ist zwar einfach, aber man kann sich auf die Ergebnisse verlassen.

Die am häufigsten angewandte Methode ist die der mikroskopischen Zählung. Bei einer mikroskopischen Zählung kann entweder mit Proben gearbeitet werden, die auf Objektträgern getrocknet wurden oder mit flüssigen Proben. Getrocknete Proben kann man färben,

um den Kontrast zwischen den Zellen und dem Hintergrund zu verstärken (siehe Abschnitt 1.3.1). Bei flüssigen Proben müssen besondere Zählkammern herangezogen werden. In solch einer Zählkammer ist ein Gitter auf der Oberfläche des Glasobjektträgers eingezeichnet, von dessen Quadraten man die Größe kennt (► Abbildung 4.12). Wenn ein Deckglas auf diese Zählkammer gelegt wird, dann hat jedes Quadrat auf dem Gitter ein genau bemessenes Volumen. Die Zahl der Zellen pro Einheit des Gitters kann unter dem Mikroskop gezählt werden, so dass man eine bestimmte Anzahl von Zellen pro kleinem Kammervolumen erhält. Man kann diesen Wert in die Anzahl von Zellen pro Milliliter Lösung umrechnen, indem man mit einem Umrechnungsfaktor multipliziert, der dem Volumen der Zählkammerprobe entspricht.

Eine zweite Methode zur Zählung von Zellen in flüssigen Proben ist die Durchflusszytometrie. Das hierzu verwendete Gerät ist zur Zählung einzelner Zellen mit einem Laserstrahl und komplexer Elektronik ausgestattet. Man bedient sich der Durchflusszytometrie nur selten, wenn Routinezählungen mikrobieller Zellen durchgeführt werden. Sie findet aber in der Medizin Einsatz, wenn man Blutzellen oder andere Zelltypen in klinischem Probenmaterial zählen und unterscheiden will. Auch in der mikrobiellen Ökologie wurde sie eingesetzt, um verschiedene Zelltypen für die Isolierung zu trennen.

Die Methode der mikroskopischen Zählung ist ein schnelles und einfaches Verfahren zur Schätzung der Zahl mikrobieller Zellen. Sie hat allerdings ihre Grenzen: (1) Ohne den Einsatz besonderer Färbetechniken kann man abgestorbene Zellen nicht von lebenden Zellen unterscheiden. (2) Es ist schwierig, kleine Zellen unter dem Mikroskop zu erkennen und einige Zellen werden wahrscheinlich nicht erfasst. (3) Es ist schwie-

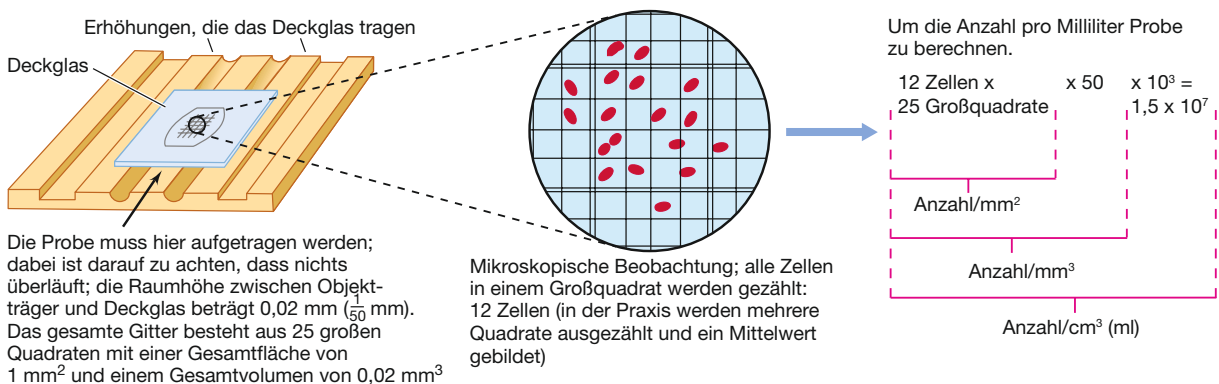


Abbildung 4.12: Direktes mikroskopisches Zählverfahren unter Verwendung der Petroff-Hausser-Zählkammer. Normalerweise verwendet man zur Zählung der Zellen ein Phasenkontrastmikroskop, um das Anfärben zu vermeiden.

rig, mit großer Genauigkeit zu arbeiten. (4) Man braucht ein Phasenkontrastmikroskop, wenn die Probe nicht gefärbt wurde. (5) Bei Zellsuspensionen geringer Dichte (weniger als ungefähr 10^6 Zellen/Milliliter) kann man nur wenige Bakterien, wenn überhaupt welche, unter dem Mikroskop erkennen, es sei denn, die Probe wird zuvor konzentriert und dann wieder in einem kleinen Volumen suspendiert. (6) Bewegliche Zellen müssen vor der Zählung immobilisiert werden. (7) Verunreinigungen und Zellrückstände können fälschlicherweise für mikrobielle Zellen gehalten werden.

In der mikrobiellen Ökologie werden Zählungen der Gesamtzellenzahl oft mit natürlichen Proben durchgeführt, wobei man Farbstoffe verwendet, um die Zellen sichtbar zu machen. Der Farbstoff DAPI (siehe Abschnitt 1.3.2 und Abbildung 1.23c) färbt alle Zellen in einer Probe, weil er mit der DNA reagiert. Im Gegensatz dazu können fluoreszierende Farbstoffe hoch spezifisch für bestimmte Organismen oder Gruppen verwandter Organismen hergestellt werden, indem man die fluoreszierenden Farbstoffe an spezifische Nucleinsäuresonden anheftet. So kann man zum Beispiel, um die Zellzahlen jeder Domäne in der Probe zu ermitteln, phylogenetische Farbstoffe, die nur Spezies von *Bacteria* oder nur Spezies von *Archaea* färben, in Kombination mit nichtspezifischen Farbstoffen einsetzen. Wenn Zellen in geringer Dichte vorkommen, zum Beispiel in einer Wasserprobe aus dem offenen Ozean, dann kann man dieses Problem überwinden, indem

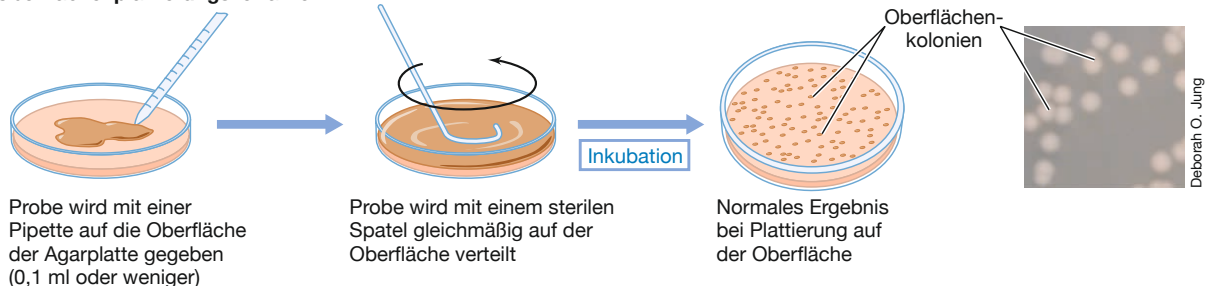
man sie zuerst durch Filtration konzentriert, um sie anschließend nach dem Färben zu zählen. Da sie einfach durchzuführen sind und oft nützliche Informationen ergeben, werden mikroskopische Zellzählungen häufig bei mikrobiellen Untersuchungen natürlicher Lebensräume eingesetzt.

4.3.2 Bestimmung der Lebendkeimzahl

Eine **lebende** Zelle ist in der Lage, sich zu teilen und Nachkommen hervorzubringen und in den meisten Fällen, in denen Zellen gezählt werden, sind es diese Zellen, die uns interessieren. Zu diesem Zweck nutzen wir die Lebendkeimzahl. Für die Ermittlung der Lebendkeimzahl bestimmen wir normalerweise die Anzahl der Zellen in einer Probe, die in der Lage sind, auf einem geeigneten Agarmedium Kolonien zu bilden. Aus diesem Grund bezeichnet man die Lebendkeimzahlzählung auch als **Koloniezählung**. Man geht bei der Lebendkeimzahlzählung davon aus, dass jede lebende Zelle wachsen, sich teilen und eine Kolonie hervorbringen kann. Daher gibt die Anzahl der Kolonien die Zahl lebender Zellen wieder.

Es gibt mindestens zwei Methoden, um die Koloniezählung durchzuführen: das **Oberflächenplattierungsverfahren** und das **Gussplattenverfahren** (► Abbildung 4.13). Bei dem Oberflächenplattierungsverfahren wird ein Volumen (im Allgemeinen 0,1 ml oder weniger)

Oberflächenplattierungsverfahren



Gussplattenverfahren

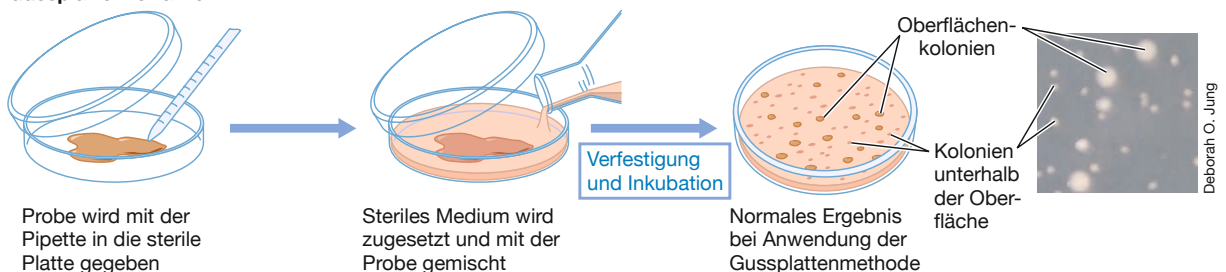


Abbildung 4.13: Zwei Methoden der Lebendkeimzahlzählung. Bei dem Gussplattenverfahren bilden sich sowohl innerhalb als auch auf der Oberfläche des Agars Kolonien. Ganz rechts sehen Sie Fotos von Kolonien von *Escherichia coli*, die aus Zellen hervorgingen, die sowohl nach dem Oberflächenplattierungsverfahren (oben) als auch nach dem Gussplattenverfahren aufgetragen wurden.

einer entsprechend verdünnten Kultur auf die Oberfläche einer Agarplatte aufgetragen, wobei man einen sterilen Glasspatel verwendet. Die Platte wird dann so lange bebrütet, bis Kolonien auftreten, und dann wird die Anzahl der Kolonien gezählt. Die Oberfläche der Platte darf nicht zu feucht sein, weil die hinzugegebene Flüssigkeit von den Platten aufgenommen werden muss, damit die Zellen stationär bleiben. Man vermeidet Volumina, die größer als 0,1 ml sind, weil überschüssige Flüssigkeit dann nicht einsickern kann und unter Umständen bewirkt die Flüssigkeit, dass sich die Kolonien während der Bildung verbinden, wodurch es schwierig wird, sie zu zählen.

Bei dem Gussplattenverfahren (Abbildung 4.13) wird ein bekanntes Volumen (im Allgemeinen 0,1–1,0 ml) einer Kultur in eine sterile Petrischale pipettiert. Dann gibt man geschmolzenes Medium mit Agar, dessen Temperatur knapp über der des Gelierens liegt, zu und vermischt dies, indem man die Petrischale vorsichtig auf der Arbeitsplatte schüttelt. Da das Präparat mit dem geschmolzenen Agar vermischt wird, kann man mit einem größeren Volumen arbeiten als bei dem Oberflächenplattierungsverfahren. Allerdings muss bei dieser Methode der Organismus, den man zählen möchte, in der Lage sein, kurzzeitig die Temperatur geschmolzenen Agars auszuhalten ($\sim 45\text{--}50^\circ\text{C}$). Bei dieser Methode entstehen verteilt über die Platte Kolonien und nicht nur auf der Oberfläche des Agar wie

bei dem Oberflächenplattierungsverfahren. Daher muss die Platte sehr sorgfältig untersucht werden, damit sichergestellt ist, dass alle Kolonien gezählt werden. Wenn man das Gussplattenverfahren einsetzt, um Zellen einer natürlichen Probe zu zählen, dann kann noch ein weiteres Problem auftreten. Jede Form von Verunreinigung in der Probe muss von den tatsächlich vorhandenen Bakterienkolonien zu unterscheiden sein, denn sonst wird die Zählung fehlerhaft.

Verdünnung von Zellsuspensionen vor der Plattierung

Sowohl beim Oberflächenplattierungsverfahren als auch beim Gussplattenverfahren ist es wichtig, dass die Zahl der sich auf oder in dem Medium entwickelnden Kolonien nicht zu groß und nicht zu klein ist. Einige Zellen können in überfüllten Platten keine Kolonien bilden und einige Kolonien können verschmelzen, was zu falschen Messergebnissen führt. Wenn die Zahl der Kolonien zu klein ist, dann wird die Zählung von geringem statistischem Wert sein. Das übliche Verfahren, das zugleich die zuverlässigsten Ergebnisse bringt, besteht darin, die Kolonien nur auf den Platten zu zählen, die zwischen 30 und 300 Kolonien haben.

Um die geeignete Anzahl von Kolonien zu erzielen, muss das Präparat, das man zählen möchte, fast immer in verdünnter Form vorliegen. Da man selten die ungefähre Lebendkeimzahl im Voraus kennt, ist es im Allgemeinen notwendig, mehr als eine Verdünnung herzustellen. Üblicherweise werden mehrere Zehnfachverdünnungen eines Präparats angefertigt (► Abbildung 4.14). Zur Herstellung einer Zehnfachverdünnung (10^{-1}) kann man 0,5 ml einer Probe mit 4,5 ml eines Verdünnungsmittels mischen oder 1,0 ml einer Probe mit 9,0 ml eines Verdünnungsmittels. Braucht man eine Hundertfachverdünnung (10^{-2}), kann man 0,05 ml mit 4,95 ml eines Verdünnungsmittels mischen oder 0,1 ml mit 9,9 ml des Verdünnungsmittels. Alternativ kann man 10^{-2} Verdünnungen herstellen, indem man zwei Zehnfachverdünnungen in Serie herstellt. Bei dichten Kulturen braucht man solche seriellen Verdünnungen, um die zur Plattierung zählbarer Kolonien

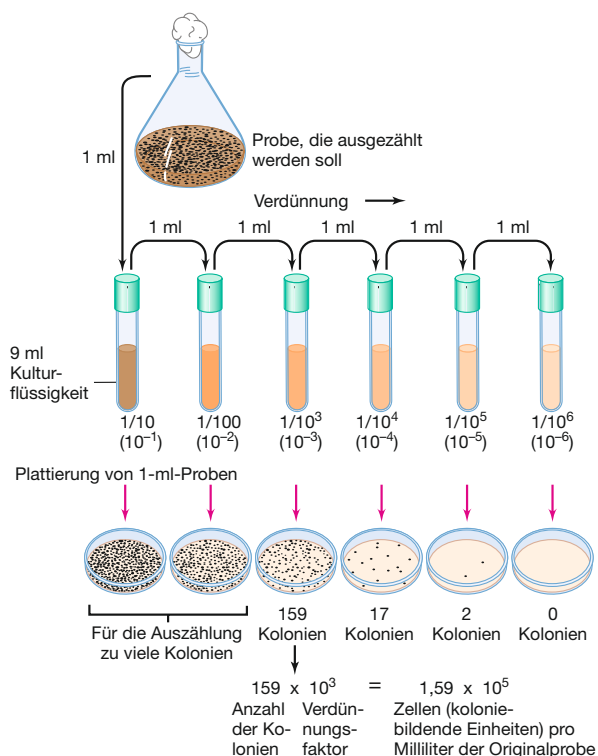


Abbildung 4.14: Verfahren der Lebendkeimzahlzählung unter Verwendung serieller Verdünnungen des Präparats und des Gussplattenverfahrens. Man kann einfach Wasser nehmen, um eine sterile Flüssigkeit für eine Verdünnungslösung zu erhalten, aber eine Lösung aus Mineralsalzen oder dem Wachstumsmedium kann ein höheres Ergebnis erzielen. Der Verdünnungsfaktor verhält sich reziprok zur Verdünnung.

geeignete Verdünnung zu erzielen. Wenn man also eine Verdünnung von 10^{-6} ($1/10^6$) benötigt, kann man sie durch drei aufeinander folgende 10^{-2} ($1/10^2$) Verdünnungen oder sechs aufeinander folgende 10^{-1} Verdünnungen erzielen.

Fehlerquellen beim Plattierungsverfahren

Die Anzahl der Kolonien, die man bei der Lebendkeimzahlzählung erhält, hängt nicht allein von der Größe des Inokulums und der Lebensfähigkeit der Kultur ab, sondern auch vom Kulturmedium und den Inkubationsbedingungen. Die Anzahl der Kolonien kann sich auch durch die Länge der Inkubation verändern. Wenn man zum Beispiel eine Mischkultur verwendet, dann werden die Zellen auf der Platte sich nicht alle mit der gleichen Geschwindigkeit zu Kolonien entwickeln. Setzt man eine kurze Inkubationszeit an, dann wird man eine Koloniezahl beobachten, die unter der Höchstzahl liegt. Außerdem schwankt die Größe der Kolonien oft. Wenn sich einige winzig kleine Kolonien entwickeln, dann kann man sie beim Zählen übersehen. Bei Reinkulturen verläuft die Entwicklung der Kolonien eher ähnlich einem gleichförmigen Prozess und eine einheitliche Morphologie der Kolonien ist die Norm.

Lebendkeimzahlzählungen können aus mehreren Gründen sehr fehlerhaft sein. Dazu gehören Ungenauigkeiten beim Pipettieren einer flüssigen Probe, Inhomogenität der Probe (zum Beispiel eine Probe, die Zellklumpen enthält), unzulängliches Mischen sowie viele weitere Faktoren. Wenn man also genaue Zählungen erzielen will, muss bei der Vorbereitung und dem Pipettieren des Präparats mit großer Sorgfalt und Genauigkeit gearbeitet werden. Zudem müssen mehrere Parallelplatten mit den wichtigsten Verdünnungsstufen angelegt werden. Beachten Sie auch, dass zwei oder mehr Zellen, die in einem Klumpen vorliegen, nur eine einzige Kolonie bilden. Wenn also in dem Präparat viele Zellklumpen vorliegen, kann eine Lebendkeimzahlzählung dieses Präparats eine fehlerhafte, niedrige Zahl ergeben. Die Ergebnisse werden oft als die Anzahl *kolonienbildender Einheiten* formuliert und nicht als die Anzahl tatsächlich lebender Zellen, da eine koloniebildende Einheit eine oder mehrere Zellen enthalten kann.

Trotz der Schwierigkeiten, die mit der Lebendkeimzahlzählung verbunden sind, liefert die Methode die beste Schätzung über die Anzahl lebender Zellen eines Präparats und wird daher in vielen Gebieten der Mikrobiologie häufig angewandt. Diese Methode wird in der Nahrungsmittel- und Milchmikrobiologie, in der medizinischen und der aquatischen Mikrobiologie standardmäßig angewandt. Die Methode hat den großen

Vorteil hoher Empfindlichkeit, denn man kann auch eine einzige lebende Zelle pro Präparat nachweisen. Diese Eigenschaft ermöglicht den Nachweis mikrobieller Kontamination in Nahrungsmittelprodukten oder anderen Substanzen.

Selektive Plattierung

Die Verwendung stark selektiver Kulturmedien und Wachstumsbedingungen bei der Bestimmung der Lebendkeimzahl eröffnet die Möglichkeit, nur bestimmte Spezies oder in einigen Fällen sogar nur ein einzige Spezies in einer gemischten Population von Mikroorganismen, die in einem Präparat vorliegen, zu untersuchen. So helfen 10 % NaCl in einem komplexen Medium zum Beispiel sehr, wenn es um die Isolierung von Spezies von *Staphylococcus* von der Haut geht, da Salz das Wachstum der meisten Bakterien hemmt. In der praktischen Anwendung, zum Beispiel in der Lebensmittelindustrie, ermöglicht die Bestimmung der Lebendkeimzahl sowohl quantitative als auch qualitative Aussagen über die Mikroorganismen, die in einem Lebensmittelprodukt vorkommen. Das heißt, mit einer einzigen Probe kann ein Medium genutzt werden, um die Gesamtzahl zu zählen und mit einem zweiten Medium kann man einen bestimmten Organismus ins Visier nehmen, zum Beispiel ein spezifisches Pathogen. Die selektive Plattierung wird viel bei Abwasseranalysen oder anderen Wasseranalysen eingesetzt. Mit Hilfe selektiver Medien kann man Darmbakterien, die aus Fäkalien stammen, leicht selektieren. Wenn man in einer Wasserprobe eines Badegewässers Darmbakterien entdeckt, dann weist deren Gegenwart darauf hin, dass das Wasser für den Menschen eine Gefahr darstellt.

Die große Anomalie beim Plattierungsverfahren

Die direkte mikroskopische Zählung natürlicher Proben ergibt normalerweise weitaus mehr Organismen als man auf der Platte eines einzigen Kulturmediums entdecken könnte. Obwohl es sich beim Plattierungsverfahren um eine sehr empfindliche Methode handelt, kann es zu wenig zuverlässigen Zählergebnissen kommen, wenn man die Gesamtzellzahl in natürlichen Proben aus dem Boden oder dem Wasser bestimmen möchte. Einige Mikrobiologen haben diesen Sachverhalt als „die große Anomalie des Plattierungsverfahrens“ bezeichnet.

Warum ergibt die Zählung mit dem Plattierungsverfahren geringere Zellzahlen als die Zählung direkt unter dem Mikroskop? Ein auf der Hand liegender Grund dafür ist, dass man bei mikroskopischen Verfahren abgestorbene Zellen zählt, während dies bei Metho-

den, die lebende Zellen brauchen, per Definition nicht möglich ist. Noch viel wichtiger ist aber der Umstand, dass die verschiedenen Organismen, sogar Organismen, die in sehr geringer Menge in einer natürlichen Probe enthalten sind, ganz erheblich unterschiedliche Ansprüche an die Nährstoff- und Wachstumsbedingungen einer Laborkultur stellen (siehe Abschnitte 3.1.1 und 3.1.2). Somit erlauben ein Medium und eine Konstellation von Wachstumsbedingungen höchstens das Wachstum eines Teils der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft. Wenn dieser Teil der Population zum Beispiel 10^6 Zellen/g einer gesamten lebenden Population von 10^9 Zellen/g ausmacht, dann wird das Plattierungsverfahren nur 0,1 % der Gesamtpopulation erfassen, eine gewaltige Unterschätzung der Zahl tatsächlich vorhandener lebender Zellen.

Man muss dem Plattierungsverfahren daher mit etwas Vorbehalt gegenüberstehen. Das selektive Plattierungsverfahren, bei dem hoch selektive Medien eingesetzt werden, wie zum Beispiel bei der mikrobiellen Untersuchung von Abwasser oder Lebensmitteln, kann oft recht zuverlässige Ergebnisse liefern, denn die Physiologie der selektierten Organismen ist bekannt. Im Gegensatz dazu können „Zählungen der Gesamtzellzahl“ der gleichen Proben unter Verwendung eines einzigen Mediums und verschiedener Wachstumsbedingungen dazu führen, und dies ist meist der Fall, dass es zu Unterschätzungen von einer bis zu mehreren Größenordnungen kommt.

4.3.3 Trübungsmessungsmethoden

Während des exponentiellen Wachstums folgt aus der Vergrößerung aller Bestandteile der Zelle eine Zunahme der Zellzahl. Anstatt nun die Zunahme der Zellzahl innerhalb einer bestimmten Zeit zu messen, könnte man die Zunahme an Protein, DNA oder das Trockengewicht einer Kultur als Barometer des Wachstums heranziehen. Da Zellen aber eher Objekte als aufgelöste Substanzen sind, streuen sie das Licht und eine schnelle und recht nützliche Methode die Zellzahl zu schätzen basiert auf eben dieser Eigenschaft, die *Trübungsmessung*.

Eine Zellsuspension sieht für das Auge nebulös (trüb) aus, weil die Zellen das Licht streuen, das durch die Suspension scheint. Je mehr Zellen vorhanden sind, desto mehr Licht wird gestreut und daher wird die Suspension immer trüber. Das, was man tatsächlich in einer Trübungsmessung misst, ist die Gesamtzellmasse. Da sich jedoch die Zellmasse proportional zur Zellzahl verhält, kann man die Trübungsmessung sowohl als Maßeinheit der Zellzahl als auch als Mittel nutzen, um die Zunahme der Zellzahl einer wachsenden Kultur zu messen.

Optische Dichte

Man kann die Trübung mit einem Spektralphotometer messen, einem Gerät, das das Licht durch eine Zellsuspension leitet und die Menge nichtgestreuten Lichts, das durchtritt, misst. Je mehr Zellen die Zellsuspension enthält, desto trüber wird sie sein (► Abbildung 4.15). Ein Spektralphotometer ist mit einem Prisma oder einer Diffraktionsvorrichtung ausgestattet, um einfallendes Licht mit einer spezifischen Wellenlänge zu erzeugen (Abbildung 4.15a). Bei der Messung der bakteriellen Trübung werden häufig die Wellenlängen 480 nm (blau), 540 nm (grün), 600 nm (orange) und 660 nm (rot) verwendet. Die Empfindlichkeit des Geräts ist am höchsten bei kürzeren Wellenlängen, aber genauere Messungen der Dichte der Zellsuspension erzielt man bei längeren Wellenlängen. Die Maßeinheit der Trübung ist die *optische Dichte (OD)* bei der spezifischen Wellenlänge, zum Beispiel OD_{540} für Spektralphotometermessungen bei 540 nm. Der Begriff *Absorption (A)*, zum Beispiel A_{540} , wird auch häufig verwendet, aber man sollte daran denken, dass es sich um gestreutes Licht handelt, das bei Trübungsmessungen des mikrobiellen Wachstums gemessen wird und nicht um Absorption an sich.

Die Beziehung der optischen Dichte zur Zellzahl

Bei einzelligen Organismen verhält sich die optische Dichte im Rahmen bestimmter Grenzen proportional zur Zellzahl. Daher kann man Trübungsmessungen als Ersatz für Direktzählverfahren oder Lebendkeimzahlzählungen heranziehen. Bevor man sich jedoch an die Arbeit macht, muss eine Standardkurve aufgestellt werden, durch die die Zellzahl (mikroskopische Zählung oder Lebendkeimzahlzählung), das Trockengewicht oder der Proteingehalt mit der Trübung in Beziehung gesetzt werden. Wie man aus solch einer Graphik erkennen kann, besteht die Proportionalität nur innerhalb bestimmter Grenzen (Abbildung 4.15c). Bei hohen Zellkonzentrationen kann das Licht, das von einer Zelle in der Photozelle weggestreut wird, durch eine andere Zelle wieder zurückgestreut werden. Das sieht dann für die Photozelle so aus, als wäre niemals Licht durch die erste Zelle gestreut worden. Bei solch hohen Zelldichten weicht daher die Entsprechung zwischen der Zellzahl und der Trübung von der Linearität ab und die Messungen der optischen Dichte werden weniger genau. Bis zu dieser Grenze können Trübungsmessungen aber genau Meßergebnisse der Zellzahl oder des Trockengewichts ergeben. Da verschiedene Organismen sich in Größe und Form unterscheiden, ergeben gleiche Zellzahlen zweier verschiedener bakteriel-

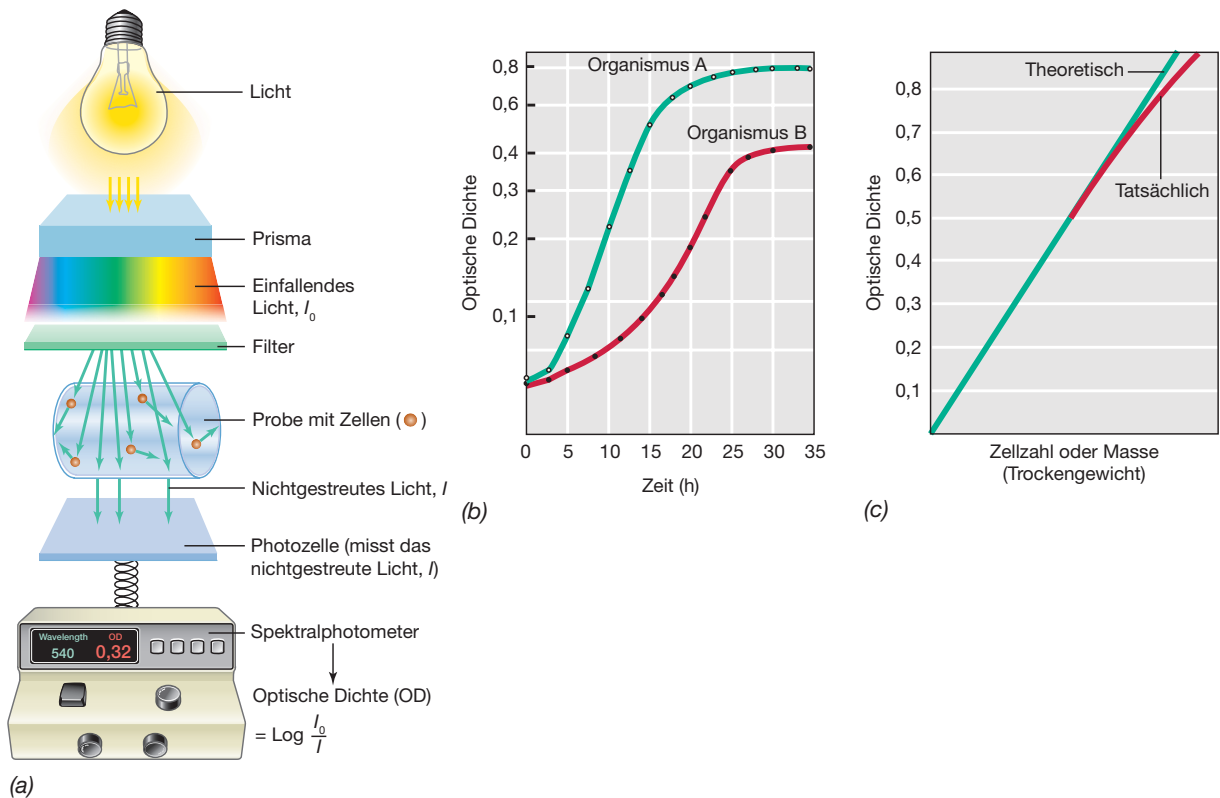


Abbildung 4.15: Trübungsmessung des mikrobiellen Wachstums. (a) Trübungsmessungen werden mit einem Spektralphotometer durchgeführt. Die Photozelle misst das nichtgestreute einfallende Licht der suspendierten Zellen und zeigt Werte in Einheiten der optischen Dichte. (b) Typische Werte einer Wachstumskurve für zwei Organismen mit unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten. (c) Verhältnis zwischen der Zellzahl oder dem Trockengewicht und Trübungsmesswerten. Beachten Sie, dass die Eins-zu-eins-Entsprechung zwischen diesen Verhältnissen bei hohen Trübungen nicht mehr gilt.

ler Spezies nicht unbedingt die gleiche optische Dichte. Um also die optische Dichte mit der tatsächlichen Zellzahl in Beziehung zu setzen, muss man für jeden einzelnen Organismus, den man im Labor kultiviert, eine Standardkurve aufstellen, die diese beiden Parameter in Beziehung setzt.

Trübungsmessungen bieten den Vorteil, dass sie schnell und einfach durchzuführen sind. Man kann sie normalerweise durchführen, ohne die Probe zu zerstören oder erheblich zu schädigen. Aus diesen Gründen werden Trübungsmessungen häufig durchgeführt, um das Wachstum mikrobieller Kulturen zu überwachen. Die gleiche Probe kann wiederholt geprüft und die Meßergebnisse können in einem halblogarithmischen Graphen gegen die Zeit aufgetragen werden. Aus dieser Abbildung kann man dann leicht die Generationszeit und andere Parameter der wachsenden Kultur berechnen (Abbildung 4.15b).

Manchmal sind Trübungsmessungen problematisch. Obwohl im flüssigen Medium viele Mikroorganismen gleichmäßig suspendiert sind, ist dies bei vielen anderen nicht der Fall. Einige Bakterien bilden zu große Klumpen und in solchen Fällen sind OD-Messungen ungenau und eignen sich nicht zur Bestimmung der mikrobiellen Biomasse. Außerdem wachsen viele Bakterien an den Wänden der Röhrchen oder anderer Wachstumsgefäße als Biofilme und ahmen so in der Laborkultur ihr tatsächliches Wachstum in der Natur nach. Damit also OD-Messungen die genaue Zellmenge in einem flüssigen Medium wiedergeben (und damit die Zellzahlen), müssen Verklumpung und die Bildung von Biofilmen weitestgehend ausgeschaltet werden. Dies kann man oftmals durch Rühren oder Schütteln erreichen oder die Zellen während der Wachstumsphase gut vermischt halten, um so der Bildung von Zellanhäufungen und Biofilmen entgegenzuwirken.

Temperatur und mikrobielles Wachstum

4.4

Die Aktivitäten der Mikroorganismen, so auch das Wachstum, werden erheblich von den chemischen und physikalischen Bedingungen ihrer Umgebung beeinflusst. Viele Umweltfaktoren können in Betracht gezogen werden. Es gibt jedoch für das Wachstum aller Mikroorganismen vier Schlüsselfaktoren: Temperatur, pH-Wert, Verfügbarkeit von Wasser und Sauerstoff; hier werden wir uns mit jedem Faktor auseinandersetzen. Einige andere Faktoren können möglicherweise das Wachstum von Mikroorganismen beeinflussen, wie Druck oder Strahlung. Diese spezielleren Umweltfaktoren werden wir später in diesem Buch besprechen, wenn wir uns mit den Habitaten befassen, in denen sie eine wichtige Rolle spielen. Jetzt müssen Sie sich in Erinnerung rufen, dass sowohl das Medium als auch die Wachstumsbedingungen stimmen müssen, wenn man erfolgreich eine Kultur eines Mikroorganismus anlegen möchte.

4.4.1 Die Wirkung der Temperatur auf das Wachstum

Die Temperatur ist wahrscheinlich *der* wichtigste Umweltfaktor für das Wachstum und das Überleben von Mikroorganismen. Bei zu kalter oder zu hoher Temperatur können Mikroorganismen nicht wachsen oder sie sterben sogar. Die Mindest- und die Maximaltemperaturen für das Wachstum schwanken bei den verschiedenen Mikroorganismen erheblich und spiegeln im Allgemeinen die Spannbreite der Temperatur und die Durchschnittstemperatur ihrer Habitate wider.

Die Kardinaltemperaturen

Die Temperatur betrifft die Mikroorganismen in zweierlei einander entgegengesetzter Hinsicht. Mit steigender Temperatur laufen chemische und enzymatische Reaktionen in der Zelle schneller ab und das Wachstum vollzieht sich schneller; oberhalb einer bestimmten Temperatur können die Zellbestandteile jedoch irreversibel beschädigt werden. In dem Maß also, in dem die Temperatur innerhalb einer bestimmten Bandbreite erhöht wird, nehmen Wachstum und metabolische Funktion zu, bis zu dem Punkt, an dem Denaturierungsreaktionen eintreten. Oberhalb dieses Punktes hört die Zellfunktion auf. Es gibt für jeden Mikroorganismus eine *minimale* Temperatur, unterhalb der kein Wachstum möglich ist, eine *optimale* Temperatur, bei der das Wachstum am schnellsten ist und eine *maximale* Temperatur, oberhalb der kein Wachstum möglich

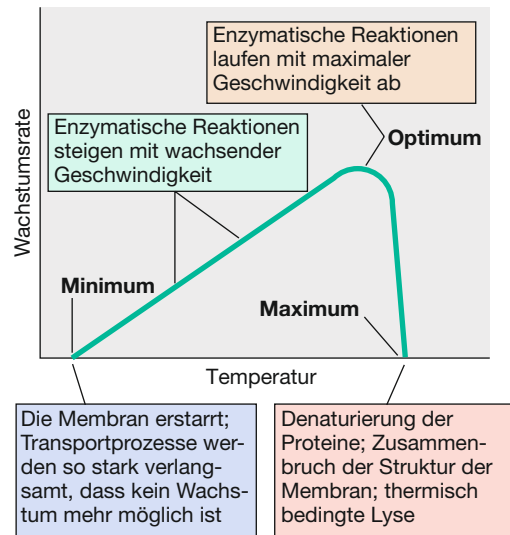


Abbildung 4.16: Die Kardinaltemperaturen: minimal, optimal und maximal. Die tatsächlichen Werte schwanken bei den verschiedenen Mikroorganismen erheblich (siehe Abbildung 4.17).

ist (► Abbildung 4.16). Diese drei Temperaturen, die für jeden Mikroorganismus bezeichnend sind, nennt man **Kardinaltemperaturen**.

Die Kardinaltemperaturen der verschiedenen Mikroorganismen unterscheiden sich erheblich; bei einigen Organismen liegt das Temperaturoptimum bei nur 4 °C und bei anderen bei über 100 °C. Der Temperaturbereich, in dem Wachstum bei Mikroorganismen stattfindet, ist noch größer, er reicht von unterhalb der Gefriergrenze bis deutlich über den Siedepunkt des Wassers. Allerdings vermag kein Organismus über den gesamten Temperaturbereich zu wachsen, da die Spannbreite für jeden Organismus normalerweise zwischen 25–40 Grad liegt.

Die maximale Wachstumstemperatur eines Organismus gibt die Temperatur an, oberhalb derer die Denaturierung eines oder mehrerer lebenswichtiger Zellbestandteile stattfindet, zum Beispiel eines wichtigen Enzyms. Die Faktoren, die die minimale Wachstumstemperatur eines Organismus steuern sind noch nicht klar. Wie aber zuvor gesagt, muss sich die Cytoplasmamembran in einem halbflüssigen Zustand befinden, damit der Transport und andere wichtige Funktionen ablaufen können (siehe Abschnitt 2.2.3). Die minimale Temperatur eines Organismus kann sehr wohl vom Funktionieren der Membran gesteuert werden; das heißt, wenn sich die Cytoplasmamembran eines Organismus so verfestigt, dass sie den Transport nicht mehr leisten kann oder nicht mehr in der Lage ist, die protonenmotorische Kraft zu erzeugen oder zu verbrauchen, dann vermag der Organismus nicht mehr

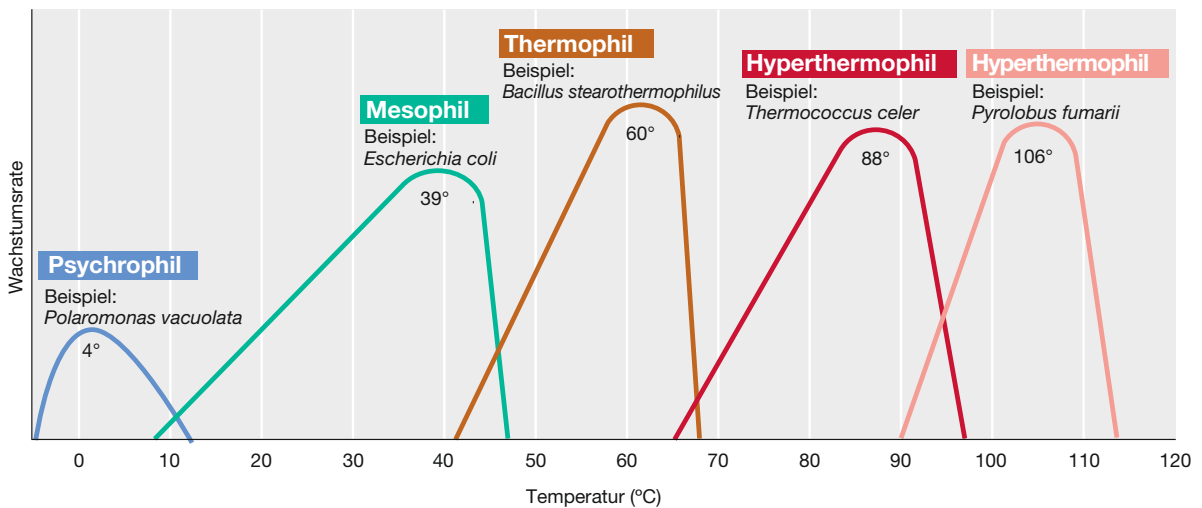


Abbildung 4.17: Das Wachstum bei den verschiedenen Temperaturbereichen der Mikroorganismen als Reaktion auf die Temperatur. Das Temperaturoptimum eines jeden Modellorganismus wird in dem Diagramm dargestellt.

zu wachsen. Die *optimale* Wachstumstemperatur spiegelt den Zustand wider, in dem alle oder die meisten Zellbestandteile mit höchster Geschwindigkeit funktionieren und liegt normalerweise näher bei der maximalen als bei der minimalen Wachstumstemperatur (siehe Abbildung 4.17).

Die Temperaturklassen der Organismen

Obwohl es ein Kontinuum von Organismen gibt, von Organismen, mit einem sehr niedrigen Temperaturoptimum bis zu Organismen mit hohem Temperaturoptimum, kann man entsprechend ihrer optimalen Wachstumstemperatur vier Klassen von Mikroorganismen unterscheiden: **Psychrophile**, mit niedrigem Temperaturoptimum, **Mesophile**, mit mittlerem Temperaturoptimum, **Thermophile**, mit hohem Temperaturoptimum und **Hyperthermophile**, mit sehr hohem Temperaturoptimum (► Abbildung 4.17).

Mesophile kommen in der Natur sehr häufig vor. Sie leben in warmblütigen Tieren, in der Erde und im Wasser in gemäßigten und tropischen Breiten. Psychrophile und Thermophile kommen entweder in ungewöhnlich kalten oder ungewöhnlich warmen Lebensräumen vor. Hyperthermophile sind in extrem heißen Habitaten anzutreffen, wie heißen Quellen, Geysiren und heißen Quellen in der Tiefsee.

Escherichia coli ist ein typischer Mesophiler, dessen Kardinaltemperaturen genau bestimmt wurden. Die Optimaltemperatur der meisten Stämme von *E. coli* liegt nahe bei 39 °C, die Maximaltemperatur beträgt 48 °C und die Minimaltemperatur liegt bei 8 °C. Damit

liegt die Temperaturspannbreite von *E. coli* bei ungefähr 40 Grad, nahe der oberen Grenze für Prokaryoten (Abbildung 4.17).

Wir wenden uns jetzt den interessanten Fällen von Mikroorganismen zu, die bei sehr niedrigen oder sehr hohen Temperaturen leben, beschäftigen uns mit einigen der physiologischen Probleme, die ihr Leben betreffen, sowie einigen biochemischen Lösungen, die sie entwickelt haben, um unter extremen Bedingungen zu überleben.

4.4.2 Mikrobielles Leben in der Kälte

Da wir Menschen auf der Erdoberfläche dort leben und arbeiten, wo im Allgemeinen gemäßigte Temperaturen herrschen, ist es naheliegend, sehr heiße und sehr kalte Lebensräume als „extrem“ zu bezeichnen. Allerdings sind viele mikrobielle Habitate entweder sehr kalt oder sehr warm. Daher bezeichnet man die Organismen, die in diesen Lebensräumen vorkommen als **Extremophile**. Interessanterweise haben sich die meisten Organismen so entwickelt, dass sie bei der Temperatur ihrer Umgebung *optimal* wachsen. In diesem und im nächsten Abschnitt werden wir uns mit der Biologie dieser faszinierenden Organismen beschäftigen.

Kalte Lebensumgebungen

Ein großer Teil der Erdoberfläche hat kalte Temperaturen. Die Durchschnittstemperatur der Ozeane, die mehr als die Hälfte der Erdoberfläche ausmachen, liegt bei

5 °C und in den Tiefen der offenen Ozeane herrscht eine konstante Temperatur von 1–3 °C. Riesige Gebiete der Arktis und der Antarktis liegen unter Dauerfrost und tauen nur wenige Wochen im Sommer auf (► Abbildung 4.18). Diese kalten Lebensräume sind nicht steril und einige Mikroorganismen können dort bei jeder niedrigen Temperatur wachsen, solange noch flüssiges Wasser vorkommt. Salz und andere lösliche Substanzen erniedrigen den Gefrierpunkt des Wassers und ermöglichen mikrobielles Wachstum unterhalb des Gefrierpunkts von reinem Wasser, der bei 0 °C liegt. Aber sogar in gefrorenen Substanzen gibt es oft kleine

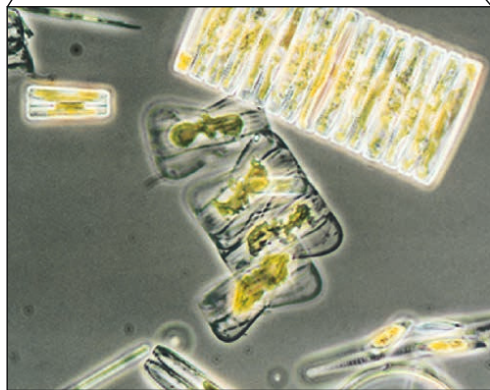
Taschen mit flüssigem Wasser, in denen lösliche Substanzen konzentriert vorliegen und wo Mikroorganismen Metabolismus durchführen und wachsen können. In Gletschern, zum Beispiel, gibt es ein Netz kleiner Kanäle mit flüssigem Wasser, in denen Prokaryoten überleben und sich vermehren.

Wenn man sich mit kalten Lebensräumen beschäftigt, ist es wichtig, zwischen *konstant* kalten und nur *saisonal* kalten Lebensumgebungen zu unterscheiden. In Letzteren, die für gemäßigte Temperaturen typisch sind, liegen die Sommertemperaturen bei bis zu 40 °C. Ein gemäßigter See kann zum Beispiel im Winter eine



John Gosink und James T. Staley

(a)



John Gosink und James T. Staley

(b)



James T. Staley

(c)



Deborah Jung und Michael T. Madigan

(d)

Abbildung 4.18: Mikrobielle Habitate und Mikroorganismen in der Antarktis. (a) Ein Kern gefrorenen Meerwassers aus McMurdo Sound, Antarktis. Der Kern hat einen Durchmesser von 8 cm. Beachten Sie die dichte Färbung in Folge pigmentierter Mikroorganismen. (b) Phasenkontrastmikroskopaufnahme phototropher Mikroorganismen aus dem in (a) abgebildeten Kern. Die meisten Mikroorganismen sind entweder Diatomeen oder Grünalgen (beides eukaryotische Phototrophe). (c) Transmissionselektronenmikroskopaufnahme von *Polaromonas*, einem Bakterium mit Gasvesikeln, das im Meereseis lebt und dessen optimale Wachstumstemperatur bei 4 °C liegt. (d) Foto der Oberfläche des Lake Bonney, McMurdo Dry Valleys, Antarktis. Wie viele andere antarktische Seen bleibt der ungefähr 40 m tiefe Lake Bonney permanent gefroren mit einer Eisdecke von ungefähr 5 m. Die Wassersäule des Lake Bonney bleibt nahe 0 °C und enthält sowohl sauerstoffhaltige als auch anoxische Zonen, daher können in dem See sowohl aerobe als auch anaerobe Mikroorganismen leben. Allerdings leben in den Seen der Dry Valleys keine höher entwickelten eukaryotischen Organismen, was dieses Gebiet zu einem einzigartigen mikrobiellen Ökosystem macht.

Zeit lang mit Eis bedeckt sein, aber die Zeit, die das Wasser eine Temperatur von 0°C hat, ist recht kurz. Derartig stark schwankende Lebensumgebungen sind für die bei Kälte aktiven Mikroorganismen weniger günstige Habitats als die konstant kalten Lebensräume der Polarregionen, Regionen in großer Höhe und in den Tiefen der Ozeane. So enthalten die Seen in den Antarktischen McMurdo Dry Valleys eine mehrere Meter dicke Permaeisschicht (Abbildung 4.18d). Die Wassersäule unter dem Eis dieser Seen bleibt das gesamte Jahr über bei 0°C oder darunter und stellt damit das ideale Habitat für an die Kälte angepasste Mikroorganismen dar.

Psychrophile Mikroorganismen

Wie bereits erwähnt, nennt man Organismen mit niedrigem Temperaturoptimum **Psychrophile**. Ein Psychrophiler kann als ein Organismus definiert werden, dessen optimale Wachstumstemperatur bei 15°C oder darunter liegt, einer maximalen Wachstumstemperatur von unter 20°C und einer minimalen Wachstumstemperatur von 0°C oder darunter. Organismen, die bei 0°C wachsen, deren Optimum aber zwischen 20–40°C liegt, bezeichnet man als **psychrotolerant**.

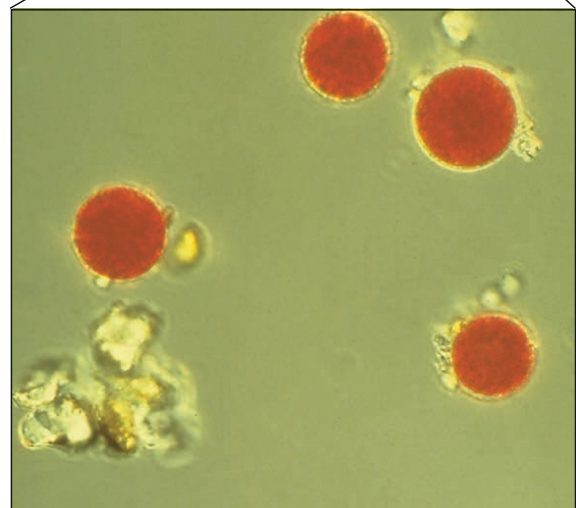
Psychrophile kommen in konstant kalten Umgebungen vor und können durch Erwärmen auf nur 20°C schnell absterben. Aus diesem Grund muss man bei Laboruntersuchungen mit großer Sorgfalt vorgehen, um sicherzustellen, dass sie während der Probenentnahme, des Transports zum Labor, der Isolierung oder anderen Arbeiten nicht erwärmt werden. Im offenen Ozean, wo die Temperaturen konstant bei ungefähr 3°C liegen, kommen verschiedene kälteaktive *Bacteria* und *Archaea* vor, obwohl bisher nur wenige von ihnen im Labor kultiviert wurden. Gemäßigte Lebensräume, die sich im Sommer erwärmen, bieten hitzeempfindlichen Psychrophilen keinen Lebensraum, weil sie beim Erwärmen nicht überleben können.

Psychrophile mikrobielle Gemeinschaften, die Algen und Bakterien enthalten, wachsen in großer Dichte im und unter dem Meereseis der Polarregionen (gefrorenes Meerwasser, das sich saisonal bildet) (Abbildung 4.18a,b) und treten auch oft auf den Oberflächen von Schneefeldern und Gletschern in solcher Dichte auf, dass sie der Oberfläche eine gut sichtbare Färbung verleihen (► Abbildung 4.19a). Die weitverbreitete Schneeealge *Chlamydomonas nivalis*, deren Sporen für die leuchtend rote Farbe auf der Schneeoberfläche verantwortlich sind, ist dafür ein Beispiel (Abbildung 4.19b). Diese Grünalge wächst im Schnee als grünpigmentierte vegetative Zelle heran, um dann Sporen zu bilden. Wenn der Schnee durch Schmelzen, Erosion, Verdampfung und Sublimierung verschwindet, konzentrieren



Katherine M. Brock

(a)



T. D. Brock

(b)

Abbildung 4.19: Schneeealgen. (a) Schneebank in der Sierra Nevada, Kalifornien, mit roter Färbung in Folge der Anwesenheit von Schneeealgen. Rosafarbener Schnee, wie er im Sommer häufig auf den Schneebänken in Hochlagen überall auf der Welt vorkommt. (b) Foto von rot pigmentierten Sporen der Schneeealge *Chlamydomonas nivalis*. Die Sporen keimen und bilden bewegliche Grünalgenzellen. Einige Stämme der Schneeealgen sind echte Psychrophile, aber viele sind psychrotolerant und wachsen am besten bei Temperaturen über 20°C. Vom phylogenetischen Standpunkt aus gesehen handelt es sich bei *C. nivalis* um eine Grünalge. Diese Organismen werden in Abschnitt 13.4.2 besprochen.

sich die Sporen auf der Oberfläche. Verwandte Spezies der Schneeealgen enthalten verschiedene Pigmente aus Carotinoiden, weshalb die Felder aus Schneeealgen grün, orange, braun oder violett sein können.

Außer der Schneeealge hat man mehrere psychrophile Bakterien isoliert, vor allem aus Meeressedimenten, dem Meereis oder der Antarktis. Einige von diesen, vor allem Isolate aus dem Meereis wie *Polaromonas* (Abbildung 4.18c) zeichnen sich durch eine sehr niedrige optimale und maximale Wachstumstemperatur aus (jeweils 4 °C und 12 °C). Eine Spezies des Meereisbakteriums *Psychromonas* wächst bei –12 °C, der niedrigsten Wachstumstemperatur eines uns bekannten Bakteriums. Aber sogar diese Temperatur stellt wahrscheinlich nicht die untere Temperaturgrenze bakteriellen Wachstums dar, die wahrscheinlich näher an –20 °C liegt. Taschen mit flüssigem Wasser können bei –20 °C existieren und Untersuchungen haben ergeben, dass Enzyme aus kälteaktiven Bakterien unter solchen Bedingungen noch funktionieren. Die Wachstumsgeschwindigkeit unter derartig tiefen Temperaturen ist wahrscheinlich außerordentlich niedrig, mit Verdopplungszeiten von Monaten oder sogar Jahren. Aber wenn ein Organismus wachsen kann, sei es auch nur sehr langsam, dann kann er wettbewerbsfähig bleiben und seine Population in dem Habitat erhalten.

Psychrotolerante Mikroorganismen

Psychrotolerante Mikroorganismen kommen in der Natur öfter vor als Psychrophile und können aus Böden und Wasser gemäßigter Klimazonen sowie aus Fleisch, Milch und anderen Molkereiprodukten, Apfelwein, Gemüse und Obst, die im Kühlschrank aufbewahrt werden (~4 °C) isoliert werden. Wie gesagt, wachsen psychrotolerante Mikroorganismen am besten bei Temperaturen zwischen 20–40 °C. Obwohl psychrotolerante Mikroorganismen bei 0 °C wachsen, muss man doch betonen, dass die meisten bei dieser Temperatur nicht sehr gut wachsen und oftmals muss man mehrere Wochen warten, bis das Wachstum in der Laborkultur sichtbar wird. Zu den Psychrotoleranten gehören verschiedene *Bacteria*, *Archaea* und mikrobielle Eukaryoten.

Molekulare Anpassungen an die Psychrophilie

Psychrophile bilden Enzyme, die in der Kälte am besten wirken und bei gemäßigten Temperaturen oft denaturiert oder auf andere Weise deaktiviert werden. Bisher sind die molekularen Grundlagen dieses Vorgangs noch nicht ganz verstanden, aber es gibt eindeutig einen Zusammenhang mit der Proteinstruktur. Mehrere kälteaktive Enzyme weisen α -Helices in größerer Anzahl und β -Faltblattsekundärstrukturen in geringerer Anzahl auf (siehe Abschnitt 6.5.6) als Enzyme, die bei Kälte inaktiv sind. Da die β -Faltblatt-Sekundärstruktur dazu neigt, eine stabilere Struktur als α -Helices zu bilden, verfügen kälteaktive Enzyme auf Grund des größeren Gehalts an α -Helices über eine größere Flexibilität zur Katalyse ihrer Reaktionen in der Kälte.

Kälteaktive Enzyme neigen außerdem dazu, mehr polare und weniger hydrophobe Aminosäuren zu enthalten als ihre mesophilen und thermophilen Gegenstücke (siehe Abbildung 5.22 zur Struktur der Aminosäuren). Desweiteren gibt es bei kälteaktiven Proteinen tendenziell weniger schwache Bindungen wie Wasserstoff- und Ionenbindungen und weniger spezifische Wechselwirkungen zwischen Proteindomänen, wenn man sie mit den Proteinen von Organismen, die am besten bei höheren Temperaturen wachsen, vergleicht. All diese molekularen Eigenschaften tragen wahrscheinlich dazu bei, dass diese Enzyme unter kalten Bedingungen flexibel und funktionsfähig bleiben.

Eine weitere charakteristische Eigenschaft der Psychrophilen besteht darin, dass bei ihnen im Gegensatz zu den Mesophilen die Transportprozesse (siehe Abschnitt 2.2.3) bei niedriger Temperatur optimal ablaufen. Diese Tatsache weist darauf hin, dass die Cytoplasmamembranen der Psychrophilen in der Art strukturell verändert sind, dass die niedrigen Temperaturen die Membranfunktion nicht beeinträchtigen. Die Cytoplasmamembranen der Psychrophilen haben einen hohen Gehalt an ungesättigten Fettsäuren mit kürzeren Ketten. Dadurch wird der flüssige Zustand der Membran bei niedrigen Temperaturen besser aufrechterhalten (Membranen, die vor allem aus gesättigten Fettsäuren bestehen, werden bei niedrigen Temperaturen wachsartig und sind dann nicht funktionsfähig). Außerdem enthalten die Lipide einiger psychrophiler Bakterien vielfach ungesättigte Fettsäuren, was bei den Prokaryoten sehr selten vorkommt. So enthält zum Beispiel das psychrophile Bakterium *Psychroflexus* Fettsäuren mit bis zu fünf Doppelbindungen. Diese Fettsäuren bleiben bei niedrigen Temperaturen flexibler als gesättigte oder einfach ungesättigte Fettsäuren.

Weitere molekulare Anpassungen an die Kälte sind „Kälteschock“-Proteine und Cryoprotektantien. Kälteschockproteine sind eine Reihe von Proteinen, die mehrere Funktionen erfüllen, so unterstützen sie die Zelle, andere Proteine unter kalten Bedingungen in aktiver Form zu erhalten oder an spezifische mRNAs zu binden und deren Translation zu ermöglichen. Zu diesen mRNAs gehören vor allem solche, die kälteaktive Proteine kodieren, von denen die meisten nicht gebildet werden, wenn die Zelle nahe an ihrem Temperaturoptimum wächst. Zu den Cryoprotektantien gehören

Copyright

Daten, Texte, Design und Grafiken dieses eBooks, sowie die eventuell angebotenen eBook-Zusatzdaten sind urheberrechtlich geschützt. Dieses eBook stellen wir lediglich als **persönliche Einzelplatz-Lizenz** zur Verfügung!

Jede andere Verwendung dieses eBooks oder zugehöriger Materialien und Informationen, einschließlich

- der Reproduktion,
- der Weitergabe,
- des Weitervertriebs,
- der Platzierung im Internet, in Intranets, in Extranets,
- der Veränderung,
- des Weiterverkaufs und
- der Veröffentlichung

bedarf der **schriftlichen Genehmigung** des Verlags. Insbesondere ist die Entfernung oder Änderung des vom Verlag vergebenen Passwortschutzes ausdrücklich untersagt!

Bei Fragen zu diesem Thema wenden Sie sich bitte an: info@pearson.de

Zusatzdaten

Möglicherweise liegt dem gedruckten Buch eine CD-ROM mit Zusatzdaten bei. Die Zurverfügungstellung dieser Daten auf unseren Websites ist eine freiwillige Leistung des Verlags. **Der Rechtsweg ist ausgeschlossen.**

Hinweis

Dieses und viele weitere eBooks können Sie rund um die Uhr und legal auf unserer Website herunterladen:

<http://ebooks.pearson.de>