

# Inhaltsübersicht

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Erste Hilfe bei Laborinfektionen.....</b>	<b>3</b>
<b>3 Sterilisation und Keimreduzierung .....</b>	<b>5</b>
<b>4 Steriles Arbeiten – Sicherheit im Labor.....</b>	<b>37</b>
<b>5 Kultivierung von Mikroorganismen .....</b>	<b>51</b>
<b>6 Anreicherung und Isolierung von Mikroorganismen.....</b>	<b>145</b>
<b>7 Aufbewahrung und Beschaffung von Reinkulturen.....</b>	<b>183</b>
<b>8 Lichtmikroskopische Untersuchung von Mikroorganismen .....</b>	<b>215</b>
<b>9 Bestimmung der Zellzahl und Zellmasse in Populationen einzelliger Mikroorganismen .....</b>	<b>319</b>
<b>10 Weiterführende Literatur.....</b>	<b>423</b>
<b>11 Bezugsquellen .....</b>	<b>435</b>

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	1
<b>2 Erste Hilfe bei Laborinfektionen</b> .....	3
<b>3 Sterilisation und Keimreduzierung</b> .....	5
<b>3.1 Abtötung durch Hitze</b> .....	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

3.4.2	Sterilfiltration von Gasen .....	33
3.4.2.1	Tiefenfilter .....	33
3.4.2.2	Membranfilter .....	34
<b>4</b>	<b>Steriles Arbeiten – Sicherheit im Labor .....</b>	<b>37</b>
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
<b>5</b>	<b>Kultivierung von Mikroorganismen .....</b>	<b>51</b>
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 Impfmaterial .....	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 Drigalskipatel .....	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
<b>6</b>	<b>Anreicherung und Isolierung von Mikroorganismen.....</b>	<b>145</b>
6.1	Anreicherungskultur .....	145
6.1.1	Aerobe freilebende N <sub>2</sub> -Fixierer: <i>Azotobacter chroococcum</i> .....	147
6.1.2	Saccharolytische Clostridien .....	149
6.1.2.1	Kartoffelkultur .....	149
6.1.2.2	N <sub>2</sub> -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
<b>7</b>	<b>Aufbewahrung und Beschaffung von Reinkulturen.....</b>	<b>183</b>
7.1	Kurz- und mittelfristige Aufbewahrung .....	185
7.1.1	Periodisches Überimpfen .....	185
7.1.1.1	Aufbewahrungsgefäß .....	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 Aufbewahrungsgefäße .....	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 Kultursammlungen .....	211
<b>8 Lichtmikroskopische Untersuchung von Mikroorganismen .....</b>	<b>215</b>
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-)Kondensor .....	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 Objekträger und Deckgläser .....	232
8.3.4.1 Objekträger .....	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 Kondensor .....	243
8.4.2.2 Objektive .....	243
8.4.2.3 Lichtquelle .....	244
8.4.2.4 Präparate .....	244
8.4.2.5 Einschlusmittel .....	244
8.4.3 Einstellen des Phasenkontrastmikroskops .....	245
8.4.4 Besonderheiten des Phasenkontrastbildes .....	246
8.4.4.1 Haloeffekt .....	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-Aminopeptidase-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

<b>9 Bestimmung der Zellzahl und Zellmasse in Populationen einzelliger Mikroorganismen . . . . .</b>	<b>319</b>
<b>9.1 Bestimmungsfehler . . . . .</b>	<b>319</b>
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
<b>9.2 Bestimmung der Zellzahl . . . . .</b>	<b>326</b>
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
Dispergierverfahren . . . . .	329
Anlegen von Verdünnungsreihen . . . . .	331
9.2.2 Bestimmung der Gesamzellzahl . . . . .	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
<b>10 Weiterführende Literatur .....</b>	<b>423</b>
10.1 Allgemeine und zusammenfassende Literatur .....	423
10.1.1 Lehrbücher .....	423
10.1.2 Lexika, Wörterbücher .....	425
10.2 Spezielle Literatur .....	426
<b>11 Bezugsquellen .....</b>	<b>435</b>
<b>Konzentrations- und Gehaltsangaben .....</b>	<b>437</b>
<b>Verwendete Zeichen und Abkürzungen .....</b>	<b>439</b>
<b>Abbildungsnachweis .....</b>	<b>445</b>
<b>Sachverzeichnis .....</b>	<b>447</b>