Gerhart Drews

Mikrobiologisches Praktikum

Dritte, neubearbeitete Auflage

Mit 47 Abbildungen

(内部交流)

Springer-Verlag

Berlin Heidelberg New York 1976

Professor Dr. GERHART DREWS, Lehrstuhl für Mikrobiologie,
Institut für Biologie II der Universität Freiburg,
Schänzlestr. 9, 7800 Freiburg i. Br.

Die Umschlagseite zeigt einen Gefrierätzbruch durch das photosynthetische
Bakterium *Rhodospseudomonas viridis*. Im Zellinnern hochgeordnete Stapel
von intracytoplasmatischen Membranen, die den Photosyntheseapparat tragen.
Aufn. u. Präp. J. R. Golecki.

Die 1. Auflage dieses Werkes erschien unter dem Titel
„Mikrobiologisches Praktikum für Naturwissenschaftler“

ISBN 3-540-07829-0 3. Aufl. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
ISBN 0-387-07829-0 3rd Ed. Springer-Verlag New York Heidelberg Berlin

ISBN 3-540-06748-5 2. Aufl. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
ISBN 0-387-06748-5 2nd Ed. Springer-Verlag New York Heidelberg Berlin

Library of Congress Cataloging in Publication Data. Drews, Gerhart.
Mikrobiologisches Praktikum. First ed. published in 1968 under title: Mikro-
biologisches Praktikum für Naturwissenschaftler. Includes bibliographies and
index. I. Microbiology--Technique. I. Title. QR65.D7. 1976. 576°. 028. 76-20605.
Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte,
insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, der Entnahme von
Abbildungen, der Funksendung, der Wiedergabe auf photomechanischem oder
ähnlichem Wege und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben,
auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten.
Bei der Vervielfältigung für gewerbliche Zwecke ist gemäß § 54 UrhG eine
Vergütung an den Verlag zu zahlen, deren Höhe mit dem Verlag zu vereinbaren ist.
© by Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1968, 1974 and 1976
Printed in Germany

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen
usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht
zu der Annahme, daß solche im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-
Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt
werden dürften.

Offsetdruck und Bindearbeiten: Beltz Offsetdruck, Hemsbach/Bergstr.

Vorwort zur dritten Auflage

In der vorliegenden 3. Auflage wurde der gesamte Text überarbeitet und die Literatur ergänzt. Auch das Versuchsprogramm wurde modifiziert, um methodischen Fortschritten in der Wissenschaft Rechnung zu tragen. Die wesentliche Aufgabe des Buches bleibt es aber, dem Studenten oder interessierten Wissenschaftler zu helfen, Zugang zur Biologie der Mikroorganismen zu finden. Mein Dank gilt wiederum allen Mitarbeitern und Freunden, die mir bei der kritischen Durchsicht des Textes halfen.

Freiburg, im Mai 1976

G. DREWS

Vorwort zur zweiten Auflage

In den letzten Jahrzehnten hat man auf vielen Gebieten der Grundlagenforschung und in angewandten Disziplinen der Biologie der Mikroorganismen steigende Beachtung geschenkt. An Mikroorganismen als relativ einfach gebauten, lebendigen Systemen mit kurzer Generationsdauer und hoher Reproduktionsleistung wurden grundsätzliche Erkenntnisse auf biochemischem, molekularbiologischem und genetischem Gebiet gewonnen. Mikroorganismen sind auch industriell bedeutsame Stoffproduzenten geworden, mit deren Hilfe Antibiotica und andere pharmazeutisch wichtige Stoffe sowie in der Lebensmittelindustrie verwendete Substanzen wie z.B. Glutaminsäure, Citronensäure, Essigsäure, Äthanol und viele Enzyme produziert werden. Untersuchungen über den Stoffumsatz in der Natur und den Abbau von Abfallprodukten der Zivilisation können an den Mikroorganismen nicht vorübergehen und haben taxonomische, biochemische und populationsdynamische Arbeiten angeregt. Mikroorganismen werden vielfach auch als Modellsysteme für die Untersuchung von Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen eingesetzt. Es ist daher notwendig, daß die Mikrobiologie im naturwissenschaftlichen Unterricht der Gymnasien und Hochschulen eine gebührende Berücksichtigung findet.

Das vorliegende Buch soll allen helfen, die sich mit den Objekten, Problemen und Methoden der Mikrobiologie vertraut machen wollen. Es ist in Anlehnung an die im Rahmen des Biologiestudiums an der Universität Freiburg i.Br. durchgeführten mikrobiologischen Praktika entstanden, und es enthält sowohl Versuche für einen halbtägigen Anfängerkurs als auch für ein ganztägiges Fortgeschrittenenpraktikum. Selbstverständlich konnten nicht alle Gebiete der Mikrobiologie Berücksichtigung finden. Obwohl Aspekte und Methoden der Biochemie, Genetik, Immunbiologie und Medizinischen Mikrobiologie integriert wurden, kann und soll der Text nicht Praktikumsvorschriften der genannten Disziplinen ersetzen. Ich möchte noch darauf hinweisen, daß sich viele der angegebenen Methoden auch auf andere Objekte und Probleme übertragen lassen.

In der vorliegenden zweiten, überarbeiteten und erweiterten Auflage wurden viele Anregungen, die ich von Mitarbeitern, Kollegen und Freunden erhielt, berücksichtigt. Ich möchte allen danken, die mir mit ihrer Erfahrung bei der kritischen Durchsicht des Textes und der Ausarbeitung der Arbeitsvorschriften halfen. Mein Dank gilt auch dem Verlag für sein Verständnis und Entgegenkommen bei der Ausstattung und Drucklegung.

Freiburg, im April 1974 G. DREWS

Inhaltsverzeichnis

I. Die wichtigsten Voraussetzungen für das Arbeiten mit Mikroorganismen	1
1. Nährböden	1
a) Allgemeine Gesichtspunkte	1
b) Kohlenstoffquelle	2
c) Stickstoffquelle	5
d) Anorganische Ionen	5
e) Nährbodenzusätze	6
f) pH-Wert, Pufferung	7
g) Gelierungsmittel	7
h) Standardnährböden für Bakterien und Pilze	9
2. Kulturgefäße und ihre Verschlüsse	10
3. Sterilisation	12
a) Sterilisation durch trockene Heißluft	12
b) Sterilisation im Dampf	13
c) Sterilisation durch Filtration	15
d) Andere Sterilisationsverfahren	16
4. Prinzipien des sterilen Arbeitens	18
5. Kulturtechnik	21
a) Aerobe Verfahren	21
b) Anaerobe Verfahren	26
Literatur	29
II. Die Anreicherung und Isolierung von Mikroorganismen	30
1. Anreicherung von Bakterien und Blaualgen	31
2. Anreicherung von Pilzen	51
3. Anreicherung von Bacteriophagen	53
4. Isolierung aminosäurebedürftiger Mutanten von Escherichia coli	54
5. Reinkultur	58
a) Kochsches Plattengußverfahren und Plattieren auf Agaroberflächen	58
b) Isolierung und Reinkultur von Anaerobiern	61
c) Das Lindnersche Tröpfchenverfahren	65

d) Der Mikromanipulator	66
e) Pipettier- und Waschmethode ...	66
Literatur	67
III. Die Untersuchung der Morphologie und Cytologie von Mikroorganismen	69
1. Mikroskopische Beobachtungen an der lebenden Zelle	69
a) Phasenkontrastverfahren	69
b) Herstellung von Objektträger-Agarkulturen	71
c) Mikroskopische Beobachtung von Pilzmaterial	75
2. Beobachtungen an makroskopisch sichtbaren Zellansammlungen	75
3. Die Untersuchung fixierter und gefärbter Objekte	77
a) Herstellung von Ausstrichpräparaten	77
b) Durchführung der Färbungen ...	78
Literatur	88
IV. Methoden zur Identifizierung von Bakterien	89
1. Verschiedene Nachweise	90
a) Bewegungsfähigkeit von Bakterien	90
b) Verwertbarkeit von Zuckern ...	90
c) Indolnachweis	93
d) H ₂ S-Nachweis	94
e) Urease nachweis	94
f) Nachweis proteolytischer Exoenzyme	95
g) Voges-Proskauer-Reaktion	95
h) Amylasen	96
i) Denitrifikation	96
Schema des Isolierungsganges bei Verdacht auf Salmonella- und Shigella-Infektionen	98
2. Bestimmung von photosynthetischen Bakterien der Familie Rhodospirillaceae (früher Athiorhodocae)	101
Literatur	105
V. Die Messung von Wachstum und Vermehrung	106
1. Direkte Bestimmung der Zellzahl (Gesamtkeimzahl)	106
a) Thomakammer	106
b) Membranfiltermethode	108

2.	Plattieren auf Nähragar (Lebendkeimzahlbestimmung)	110
3.	Methoden zur Bestimmung der Bakterienmasse (Nephelometrie)	113
	a) Lichtstreuungsmessung	113
	b) Trübungsmessung	113
4.	Bestimmung des Trockengewichtes ..	115
5.	Proteinbestimmung	115
6.	Bestimmung von Wachstum und Vermehrung	117
7.	Das Wachstum mycelbildender Organismen	121
	Literatur	123
VI.	Bacteriophagen	124
1.	Nachweis und quantitative Bestimmung von Phagen	124
2.	Wirtskreis	127
3.	Einschritt-Wachstumskurve	128
4.	Fluktuationstest	130
	Literatur	131
VII.	Bdellovibrio bacteriovorus	132
	Literatur	133
VIII.	Nachweis und quantitative Bestimmung von Stoffen mit Hilfe von Mikroorganismen (Niacintest)	134
	Literatur	137
IX.	Antibiotica und Desinfektionsmittel .	138
1.	Nachweis der Antibiotikaproduktion bei isolierten Streptomyceten (qualitativer Test)	138
2.	Quantitative Bestimmung der Antibiotica	140
	a) Agardiffusionstest	140
	b) Reihenverdünnungstest	148
3.	Prüfung von Desinfektionsmitteln .	150
4.	Produktion von Penicillin durch Penicillium chrysogenum	151
5.	Versuche zur Wirkung von Antibiotica	153
	a) Penicillin	153
	b) Chloramphenicol, Streptomycin und Puromycin	157
	Literatur	160

X.	Serologische Methoden	161		
	1. Agglutination	162		
	2. Präzipitation	164		
	a) Präzipitation in der Interphase	164		
	b) Quantitative Präzipitations-	reaktion	165	
	c) Agargelpräzipitation	165		
	3. Komplementbindungsreaktion -	Immunhämolyse	166	
	4. Hämagglutinationshemmungsreaktion	(Neutralisation)	169	
	Literatur	170		
XI.	Isolierung und Untersuchung von Zell-	strukturen	171	
	1. Homogenisation von Bakterien	171		
	2. Isolierung von intracytoplasmatischen	Membranen (ICM) aus Bakte-	rien (Zonenzentrifugation).....	173
	3. Aufnahme eines in-vivo-Spektrums	intracytoplasmatischer Membranen .	177	
	4. Photophosphorylierung	179		
	5. Messung der Membrandifferenzierung	bei photosynthetischen Bakterien .	184	
	Literatur	189		
XII.	Versuche zum Gasstoffwechsel	190		
	1. Nitrataatmung bei <i>Micrococcus dini-</i>	<i>trificans</i>	190	
	2. Oxydative Phosphorylierung bei	<i>Mycobacterium phlei</i>	195	
	3. Gärung, Atmung, Pasteur-Effekt ...	202		
	4. Wasserstoffproduktion durch Nitro-	genase	205	
	Literatur	206		
XIII.	Versuche zur Regulation der Enzym-	aktivität und Enzymsynthese	207	
	1. Induktion der Synthese von β -Ga-	lactosidase in <i>E. coli</i>	207	
	2. Regulation der Threonindehydra-	tase aus Hefe	209	
	3. Versuche zur induktiven Synthese	der Enzyme im Mandelsäureweg bei	<i>Pseudomonas putida</i>	211
	Literatur	214		

XIV. Genübertragung bei Bakterien	215
Literatur	218
XV. Versuche zur Phototaxis bei Bakterien und Blaualgen	219
Literatur	221
XVI. Produktion von Citronensäure durch Aspergillus niger	222
Literatur	225
Namen- und Sachverzeichnis	227

I. Die wichtigsten Voraussetzungen für das Arbeiten mit Mikroorganismen

1. Nährböden

a) Allgemeine Gesichtspunkte

Für die Kultur von Mikroorganismen oder von Zellen höherer Lebewesen benötigt man einen Nährboden. Dieser sollte alle für Wachstum und Vermehrung erforderlichen Substrate (ausgenommen gasförmige) enthalten, einen optimalen pH-Wert, eine ausreichende Pufferkapazität und ein geeignetes Ionenmilieu besitzen. Die Konzentration der Substrate ist in der Regel, vor allem in der statischen Kultur, um ein Vielfaches höher als für eine maximale Wachstumsrate erforderlich, um hohe Populationsdichten zu erreichen.

Bei der Auswahl eines Nährbodens nach der Literatur oder bei der Zusammenstellung und Optimalisierung eines Nährbodens nach eigenen Erfahrungen muß man von folgenden Überlegungen ausgehen:

1. Der Nährboden muß alle für das Wachstum erforderlichen, assimilierbaren Substrate und Wuchsstoffe enthalten.

Beispiele: Thiobacillus thiooxidans verwertet als chemolithotropher Organismus CO_2 als Kohlenstoffquelle. Organischer Kohlenstoff kann sogar hemmend wirken. Escherichia coli dagegen benötigt eine organische Kohlenstoffquelle wie Glucose oder Glycerin. E. coli kann mit NH_4^+ seinen N-Bedarf decken. Die Wachstumsrate, wird jedoch durch ein Gemisch von Aminosäuren (Pepton) erhöht. Lactobacillen sind auf organischen Stickstoff angewiesen. Art und Konzentration der Substrate können nicht nur die Wachstumsrate sondern auch regulativ den Stoffwechsel beeinflussen. Ein Minimalmedium erfüllt qualitativ die Mindestansprüche eines Organismus. Es besteht bei heterotrophen Organismen in der Regel aus einer mineralischen Nährlösung und einer organischen Kohlenstoffquelle. Ein Vollmedium enthält neben den essentiellen auch viele Verbindungen, die der Organismus selber synthetisieren kann. Die Wachstumsrate auf dem Vollmedium ist höher als auf dem Minimalmedium.

- 2.a) Durch Variation der Nährboden-Bestandteile und ihrer Konzentration können je nach dem Zweck der Kultur Populationsdichte, Wachstumsrate, Ausbeute an Zellmasse oder an Metaboliten verändert werden.
(NORRIS und RIBBONS, 1969, 1970; AUDEN et al., 1967; NÜESCH, 1969).

Produktionsmedien für Antibiotica u.a. Sekundärmetabolite enthalten geeignete Vorläufer (precursors), und stimulierende oder spezifisch hemmende Substanzen, um den Stoffwechsel auf eine bestimmte Stoffproduktion umzulenken. Sie haben in der Regel ein hohes C/N-Verhältnis. Für hohe Zellausbeuten dienen reiche Vollmedien.

- 2.b) Die Anreicherung bestimmter Organismen aus dem natürlichen Milieu oder die Isolierung von Mutanten mit bestimmten Eigenschaften geschieht mit Hilfe streng selektiver Nährböden, d.h. Medien, die nur einer möglichst geringen Zahl an Stämmen günstige Entwicklungsmöglichkeiten bieten (siehe Kapitel II).
- 2.c) Für den Nachweis bestimmter Stoffwechselleistungen dienen Indicator-Nährböden (Kapitel IV).
- 2.d) Die quantitative Bestimmung von Stoffen geschieht auf Minimalmedien in denen ein Stoff die Wachstumsrate begrenzt (Kapitel VIII).
- 2.e) Die Aufbewahrung und Kultur einer großen Zahl von Stämmen (Stammkultursammlung) geschieht auf Vollmedien mit geringer Selektivität unter Zugabe von Schutzstoffen (NORRIS und RIBBONS, Vol. 1 - 3).

Die Kosten der Nährbodenbestandteile dürfen, besonders bei großen Nährlösungsmengen nicht vernachlässigt werden. Es werden heute von verschiedenen Firmen getrocknete Fertignährböden angeboten (z.B. DIFCO, Detroit, Mich., U.S.A., MERCK, Darmstadt, OXOID, London und Wesel), die zwar den Arbeitsaufwand verringern aber im Anschaffungspreis höher liegen als die Summe der Einzelkosten für die Nährbodenbestandteile.

b) Kohlenstoffquelle

Die meisten Mikroorganismen können mehrere Zucker als C-Quelle verwerten. Man muß beachten, daß Zucker reaktionsfähig sind und während der Dampfsterilisation umgewandelt werden oder mit anderen Nährlösungskomponenten reagieren. Es entstehen schwer verwertbare oder sogar hemmende Substanzen. Man prüft daher nach der Sterilisation zuckerhaltiger Nährlösungen, ob die Organismen normal wachsen. Es ist zu empfehlen, die zuckerhaltige Nährlösung durch Filtration keimfrei zu machen oder eine konzentrierte Zuckerlösung getrennt von der übrigen Nährlösung im Autoklaven zu sterilisieren und erst nach Erkalten mit der Nährlösung zu mischen. Polysaccharide, wie Stärke, werden nur von solchen Organismen verwertet, die durch Exoenzyme größere Moleküle hydrolytisch zu spalten vermögen (Beispiel: viele Aspergillus- und Bacillusarten). Gute C-Quellen sind auch ein- bis mehrwertige Alkohole, wie Glycerin (gutes Substrat für viele Mykobakterien) und Mannit sowie verschiedene Säuren. Fettsäuren werden mit zunehmender Kettenlänge im allgemeinen schlechter umgesetzt und können sogar hemmend wirken (Beeinflussung der Stoffaufnahme). Säuren des Intermediärstoffwechsels wie Pyruvat, Citrat, Succinat, Malat, Lactat und Acetat sind nicht immer gute C-Quellen, weil sie unter bestimmten Bedingungen nicht oder schlecht aufgenommen bzw. umgesetzt werden. Für bestimmte Aufgaben, vor allem für stoffwechselphysiologische Untersuchungen wird man Nährmedien

wählen, die in ihrer Zusammensetzung genau bekannt sind (synthetische Nährböden).

Wenn man dagegen nur Organismen kultivieren will oder für technische Großproduktion eine billige Kohlenstoffquelle sucht, aber auch dann, wenn die Ernährungsansprüche des zu isolierenden Organismus nicht genau bekannt sind, wird ein komplexes oder natürliches Nährmedium bevorzugt. Die folgenden Substanzen werden heute häufig im Labor und in der Fermentationsindustrie als Kohlenstoffquellen, aber zum Teil auch gleichzeitig als Lieferanten für Stickstoff, Vitamine und essentielle anorganische Anionen und Kationen verwendet:

Peptone sind Eiweißspaltprodukte, die durch Einwirkung proteolytischer Enzyme (Pepsin, Trypsin und Papain) auf tierisches oder pflanzliches Protein (Muskeleiweiß, Casein, Sojamehl) entstanden sind. Manchmal gibt der Handelsname Auskunft über Ausgangsmaterial und Art der Spaltung z.B. "Pepton aus Fleisch, tryptisch verdaut" oder "Casitone". Entsprechend der Herkunft des Proteins und der Art und Dauer des fermentativen Abbaues gibt es verschiedene Peptone. Verschiedene Firmen garantieren für die konstante Zusammensetzung ihrer Handelsprodukte. Ein gutes Pepton ist ein hellgelbes, stark hygroskopisches und klar lösliches Produkt, das ein breites Spektrum an Aminosäuren und Peptiden sowie andere lösliche Produkte wie Zucker, Vitamine und Salze enthält. Der Wassergehalt beträgt maximal 5%. Die Analysendaten zeigen, in Abhängigkeit vom Ausgangsmaterial und der Aufbereitungsmethode, beträchtliche Unterschiede. Die folgenden Angaben sind Richtwerte (nach MERCK und SYKES): Gesamt - N 14 - 15%, Phosphor (P_2O_5) 1%, Aschegehalt 3 - 7%, NaCl max. 1% bei Fleischpepton, bis 25% bei Caseinhydrolysat, Aminosäuren ($\mu\text{mole}/10\text{ mg}$) Asp 6,90, Threo 3,55, Ser 3,60, Pro 4,25, Glu 8,05, Gly 9,55, Ala 5,52, Val 3,2, Leu 3,96, Tyr 0,26, Phe 0,80, Lys 4,96, His 1,72, Arg 2,66 (Pepton aus Fleisch, tryptisch), Vitamine ($\mu\text{g}/\text{g}$) B_1 27,0, B_2 11,95, B_6 11,32, B_{12} 86,8, Biotin 0,59, Nikotinsäure 121,0, Folsäure 1,34, Pantothenre. 15,0; Metalle ($\mu\text{g}/\text{g}$): Mg 300 - 1000, Fe 20 - 200, Cu 10 - 100. Eine 1%ige Peptonlösung reagiert neutral bis schwach sauer. Der Gehalt an fermentierbaren Zuckern sollte sehr gering sein. Diese wenigen Angaben zeigen, daß man Peptone dann sorgfältig testen muß, wenn auxotrophe Organismen kultiviert oder Indicatornährböden hergestellt werden sollen. Die Schwermetalle können, wenn sie bedingt durch pH-Wert und Nährbodenzusammensetzung vollständig als freie Ionen vorliegen, eine toxische Konzentration erreichen. Pepton wird in einer Konzentration von 2 - 20 g pro 1000 ml Nährlösung angewandt.

Fleischextrakt wird durch wäßrige Extraktion von fettfreiem, enzymatisch vorverdaulichem Fleisch gewonnen und anschließend zu einer Paste konzentriert (80% an Feststoffen). Diese Paste enthält 9% Gesamt N, 0,45% Aminosäurestickstoff, einen hohen Gehalt an Peptiden unterschiedlicher Kettenlänge, Purinkörper, Harnstoff, bis zu 20% mineralische Bestandteile (in der Asche 30% P_2O_5 , 42% K_2O , 13% Na_2O , 0,6% CaO und 3,1% MgO) und Vitamine (Aneurin 2, Pyridoxin 6, Cobalamine 100, Biotin 0,1, Nicotinsäure 100, Folsäure 0,5 und Pantothenensäure 18 $\mu\text{g}/\text{g}$).

Fleischextrakt wird vor allem als Zusatz zu Nährböden (1%) für Organismen mit proteolytischen Exoenzymen verwendet (z.B. *Proteus vulgaris*).

Malzextrakt ist eine sirupartige Masse, die durch wäßrige Extraktion von Malz bei 50 - 60°C und anschließende Konzentrierung der Lösung bei reduziertem Druck und 55°C gewonnen wird. Malzextrakt enthält etwa 50% Maltose, Glucose, Dextrine und Stärke. Der Gehalt an reduzierenden Zuckern beträgt 57 - 86%. Der Gesamt-N-Gehalt beträgt etwa 1%. 12 - 44% der N-haltigen Verbindungen sind Proteine. An Vitaminen wurden vor allem Aneurin 10 µg/g, Riboflavin 5 µg/g, Nicotinsäure 100 µg/g, Biotin 0,1 µg/g, Pantothensäure 4 µg/g und Pyridoxin (Vit. B6) 0,2 µg/g nachgewiesen. Der Ca- und Mg-Gehalt beträgt etwa 0,6 mg/g. Malzextrakt ist in 3 - 5%iger Lösung ein guter Nährboden für viele Pilze.

Bei der Züchtung von Hefen, vor allem im industriellen Maßstab, werden häufig Melassen (Rückstände nach Auskristallisation der Saccharose aus dem Rübensaft) und Würze (ungehopfte Bierwürze) verwendet. Die Melasse enthält etwa 50% Saccharose, 23% Wasser und 19% organische Nichtzuckerverbindungen.

Hefeextrakt ist ein wäßriger Auszug aus autolyseierter Hefe (*Saccharomyces cerevisiae* oder *carlsbergensis*), der unter schonenden Bedingungen getrocknet wird. Er kann als zusätzliche C- und N-Quelle Verwendung finden, dient aber in erster Linie als Wuchsstoff- und Vitaminquelle z.B. zur Kultur der Milchsäurebakterien. Er enthält 10% Gesamtstickstoff, 5% Amino-stickstoff, 3% Phosphat (P_2O_5), 260 µg Thiamin, 100 µg Riboflavin, 1000 µg Nicotinsäure bzw. -amid, 120 µg Pantothensäure, 60 µg Pyridoxin, 28 µg Folsäure, 3 µg Biotin und 8 µg Inosit pro g Trockensubstanz Hefeextrakt. Von der Trockensubstanz wird 0,5 bis 5,0 g/l der Nährlösung zugesetzt.

Caseinhydrolysat, vitaminfrei (casamino acids) ist ein saures Hydrolysat von Casein, das keine Peptide und Proteosen mehr enthält, sondern weitgehend aus Aminosäuren und anderen einfachen Bausteinen besteht (Gesamt-N: 7%). Es eignet sich als N- und C-Quelle für Testnährböden. Es ist zu beachten, daß das Caseinhydrolysat einen hohen Gehalt an mineralischen Bestandteilen aufweist, die besonders durch die Neutralisation entstehen (NaCl bis 38%, Asche bis 41%).

Weitere, besonders in der Fermentationsindustrie verwendete komplexe Nährbodenzusätze sind: Maisquellwasser (corn steep liquor - 50% Trockensubstanz, 7 - 8% Gesamt-N, 3% Amino-N, 20% Milchsäure, 1,5 - 14% reduzierende Zucker, 18 - 20% Asche), verschiedene Hydrolysate aus Polysacchariden (Verzuckerung von Stärke mit Pilzamyase, zuckerhaltige Sulfitablaugen von der Cellulosegewinnung) und Sojamehl. Letzteres wird als enzymatisches oder saures Hydrolysat oder unbehandelt zugesetzt. Außer seinem Gehalt an Stärke und Eiweiß ist der Lipidanteil als natürliches Schaumbekämpfungsmittel, aber auch als stimulierender Faktor für die Synthese von Antibiotica und anderen Fermentationsprodukten von Bedeutung.

	Zucker total	N total	Protein %	Fett %	Asche %
Sojamehl, vollfett	28	8,4	50	20	5
Distillers soluble	45	4,1	26	9	8
Magermilchpulver	51	6,0	37	0,5	8
Erdnußmehl	12	8,6	55	9	5

CO_2 kann von der Mehrzahl der phototrophen Mikroorganismen und einer kleinen Zahl an chemolithotrophen Bakterien als alleinige C-Quelle assimiliert werden. CO_2 wird dem Gasgemisch für die Belüftung der Kultur zugesetzt (2% v/v) oder in anaeroben Flaschenkulturen als $\text{CO}_2/\text{NaHCO}_3$ appliziert.

c) Stickstoffquelle

Von den oben genannten komplexen Nährbodenzusätzen sind die meisten zugleich gute C- und N-Quellen. Da die überwiegende Zahl der Mikroorganismen stickstoffautotroph ist, kann man den Stickstoff aber auch ausschließlich als anorganische Verbindung anbieten. Bevorzugt wird Stickstoff in Form von NH_4^+ verwertet. Der Nitrat-Stickstoff kann nur von wenigen Mikroorganismen, besonders Vertretern der Asco- und Basidiomyceten sowie den Cyanophyta als einzige N-Quelle genutzt werden. Die Fähigkeit verschiedener Bakterien und Cyanophyceen elementaren Stickstoff zu binden, wird meist nur bei der Anreicherungskultur ausgenutzt. Eine Reihe von Mikroorganismen, so z.B. die Milchsäurebakterien, benötigen eine oder mehrere essentielle Aminosäuren. Da die meisten organischen N-Verbindungen von Organismen abgebaut werden können, kann man durch Zugabe dieser Substanzen zum Nährboden als einziger N- und C-Quelle stoffwechselphysiologisch interessante Spezialisten anreichern (z. B. Nicotinsäure abbauende Arthrobacter-Stämme).

d) Anorganische Ionen

Der Schwefel wird meist als Sulfat oder bei einigen S-Purpurbakterien, die SO_4^{2-} nicht reduzieren können, als H_2S angeboten. Folgende Ionen werden in relativ hohen Konzentrationen benötigt: Na^+ , K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} , PO_4^{3-} . Sie werden in organische Verbindungen eingebaut, beeinflussen Transportvorgänge an Membranen und sind für die Konformation und Aktivität von Proteinen von Bedeutung. Spurenelemente sind in geringen Konzentrationen (μg - mg/l) wirksam. Hohe Konzentrationen können toxisch wirken. Sie sind Bestandteile von Elektronencarrier und Enzymen (Mo und Fe in der Nitrogenase, Fe in Cytochromen und Ferredoxinen, Co in Cobalaminen und Cu in der Cytochromoxidase). Nährböden mit komplexen Zusätzen, wie Pepton, Erddekokt, Hefeextrakt enthalten die benötigten Elemente in ausreichender oder sogar zu hoher Konzentration. Bei der Herstellung voll-

synthetischer Medien empfiehlt sich der Zusatz einer Spurenelementlösung. Man beachte, daß die Konzentrationen in der Literatur sehr stark variieren. Über optimale Konzentrationen liegen nur wenige Untersuchungen vor. Für die in diesem Buch genannten Nährlösungen kann folgende Lösung verwendet werden:

Spurenelementlösung

Na-Eisen-Äthylen-	800 mg	SnCl ₂ · 2H ₂ O	0,5 mg
diamintetraacetat			
Mn Cl ₂ · 4H ₂ O	10 mg	H ₃ BO ₃	1 mg
Co Cl ₂ · 6H ₂ O	4 mg	KBr	2 mg
Cu SO ₄	1 mg	KJ	2 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	3 mg	BaCl ₂	0,5 mg
Zn Cl ₂	2 mg	Aqua dest. ad	1000 ml
Li Cl	0,5 mg	pH	6

5 - 10 ml dieser Lösung werden mit Nährlösung auf 1 l verdünnt.

e) Nährbodenzusätze

Erdextrakt wird verschiedenen Nährlösungen für Algen und Pilze zugesetzt. Der Gehalt an Spurenelementen und organischen Stoffen, aber auch die Pufferkapazität wirken fördernd auf das Wachstum dieser Organismen. Man erhitzt eine gut ausgereifte Lauberde mit der doppelten Gewichtsmenge an Wasser einige Minuten auf 100°C, dekantiert, filtriert und verdünnt den braunen Extrakt mit Kulturlösung 1 : 10 bis 1 : 50.

Extrakte aus Früchten, Organen etc.: Die Anreicherung sehr langsam wachsender Mikroorganismen gelingt oft nur auf streng selektiven Nährböden oder, wenn man die Ansprüche des Organismus nicht kennt, unter Anwendung von verdünnten Extrakten aus Tomaten, Pflaumen und anderen Früchten (Isolierung von Lactobacillen, Pilzen). Da frische Früchte nicht immer zur Verfügung stehen, kann man käufliche Extrakte zusetzen, muß dabei aber beachten, daß diese Produkte oft Konservierungsmittel enthalten.

Körperflüssigkeiten: Besonders in der medizinischen Bakteriologie und Virologie werden vielen Nährböden als wachstumsfördernde oder diagnostische Agentien Blut, Serum oder Aszitesflüssigkeit zugesetzt. Das durch Venenpunktion steril entnommene Blut wird entweder direkt mit dem flüssigen Nähragar bei etwa 48°C vermischt (Vollblutagar) oder durch Zusatz von Natriumcitrat (25 Vol.% einer Lösung von 5 g Na-Citrat in 100 ml Aqua dest.) ungerinnbar gemacht. Oft wird das Blut auch defibriert: Eine Weithals-Glasstöpselflasche mit einer 2 - 3 cm hohen Schicht aus Glasperlen (Ø 3 - 4 mm) wird 1/2 bis 2/3 mit Blut gefüllt und etwa 15 min kräftig geschüttelt und das Fibrin abgetrennt. Serum wird durch Dekantieren des gewonnenen Blutkuchens oder Abzentrifugieren der Erythrocyten gewonnen.