

Sterilisationsverfahren

Die thermoresistentesten Lebensformen sind Endosporen von Bacillaceae.

1. Abtöten durch Hitze

- 1.1 Trockene Heißluft
- 1.2 Ausglühen
- 1.3 Abflammen
- 1.4 Feuchte Hitze [Autoklav, Schnellkochtopf (Notlösung), Tyndallisation]

2. Abtöten durch Gifte

- 2.1 Ethylenoxid
- 2.2 Ethanol 70%, Isopropanol 70% (Koagulation der Proteine)
- 2.3 Neutralseifen, Detergenzien, usw.

3. Abtöten durch Strahlen

UV-Strahlung (Schädigung des Genoms)

4. Abscheiden durch Filtration

- 4.1 Membranfilter
- 4.2 Wattefilter für Gase

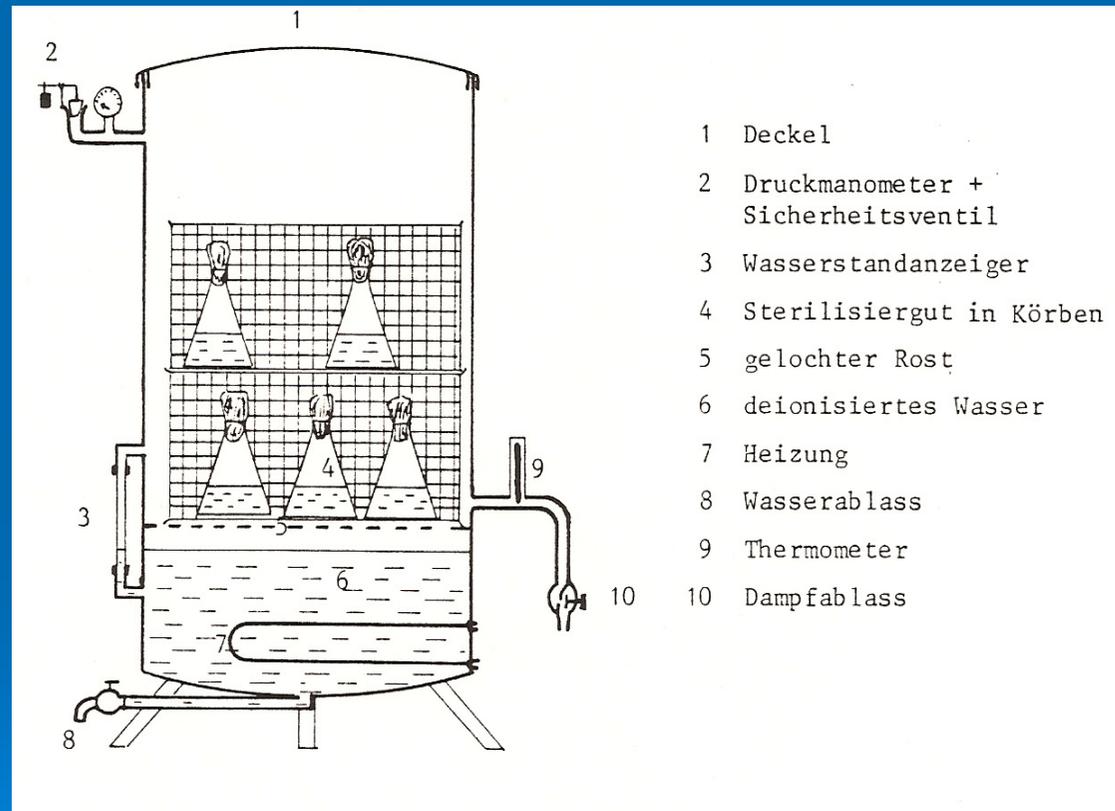
Der Autoklav

PRINZIP:

Ein Autoklav ist ein druckfester, gasdicht verschließbarer Behälter. Im Inneren herrscht eine Atmosphäre aus reinem Wasserdampf. Bei einem Überdruck von 1 bar (10^5 Pa) erreicht man eine Temperatur von $121\text{ }^\circ\text{C}$. Bei einer Sterilisierzeit von 15 Minuten werden dabei Alle Mikroorganismen einschließlich der Endosporen abgetötet.

Sterilisiergut:

Medien und Geräte, die höhere Temperaturen nicht vertragen.



Kulturmedien

Lösung, die alle für das Wachstum der betreffenden Organismen erforderlichen Bestandteile enthält.

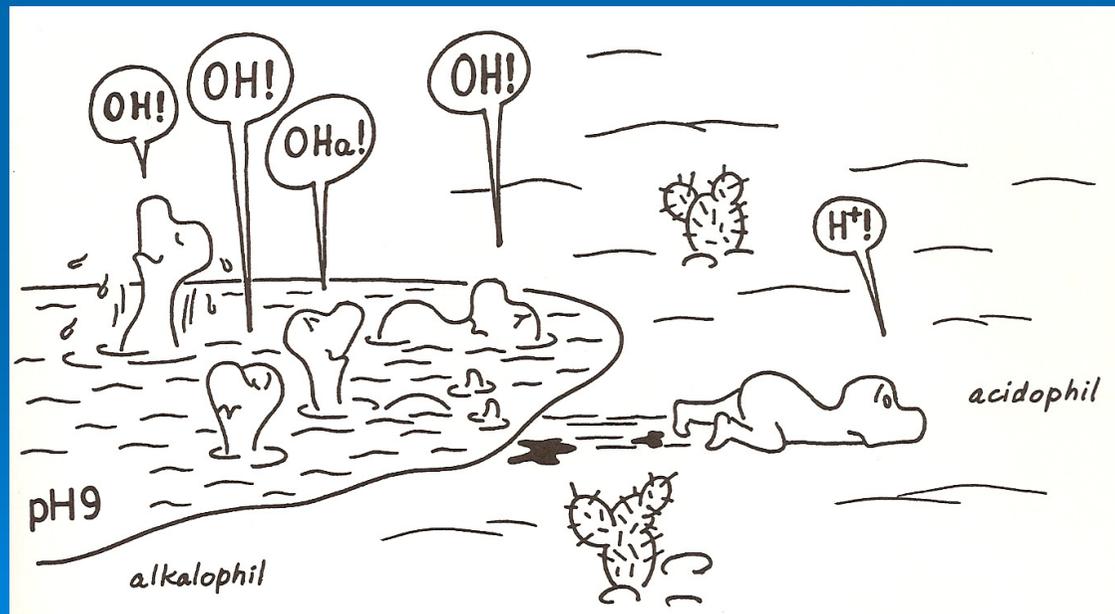
Energiequelle (häufig organische Kohlenstoffverbindung)

folgende Elemente in größeren Mengen: C O H N S Mg K P Ca Fe

Spurenelemente

Hauptbestandteil: destilliertes Wasser

pH-Wert





Definiertes (synthetisches) Kulturmedium

Zusammensetzung aus definierten chemischen Verbindungen

Beispiel:

KH_2PO_4	0,5 g
NH_4Cl	1,0 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,01 g
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,01 g
Glucose	5,0 g
dest. Wasser	1000 ml
Spurenelemente-SL	1 ml

Vollmedium enthält neben unbedingt erforderlichen Nährstoffen auch Verbindungen, die dieser Organismus selbst herstellen kann, deren Zusatz das Wachstum jedoch meistens beschleunigt.

Selektiv-Medium bietet nur einer bestimmten Gruppe von Mikroorganismen gute Wachstumsbedingungen (Selektion).

Beispiel: Brillantgrün-Galle-Lactose-Medium

Brillantgrün und Gallensalze hemmen das Wachstum fast aller Bakterien. Enterobacteriaceae (Darmbakterien) sind unempfindlich dagegen.

Feste Kulturmedien enthalten neben den anderen Bestandteilen Geliermittel, die ihnen eine gelartige Konsistenz verleihen.

Agar: stark vernetztes, komplex zusammengesetztes Polysaccharid aus Meeresalgen

Gelatine: Gerüsteiweiß (Kollagen)

Komplexes Kulturmedium

komplexe Bestandteile

Beispiele:

Peptone und Tryptone werden aus Fleischabfällen durch enzymatische Hydrolyse hergestellt.

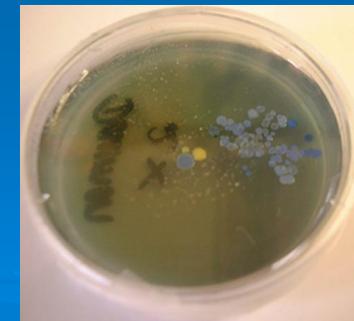
Hefeextrakte werden aus Back- oder Bierhefe hergestellt.

Säfte sind Auspressungen pflanzlicher Gewebe, z. B. Tomatensaft, Mohrrübensaft

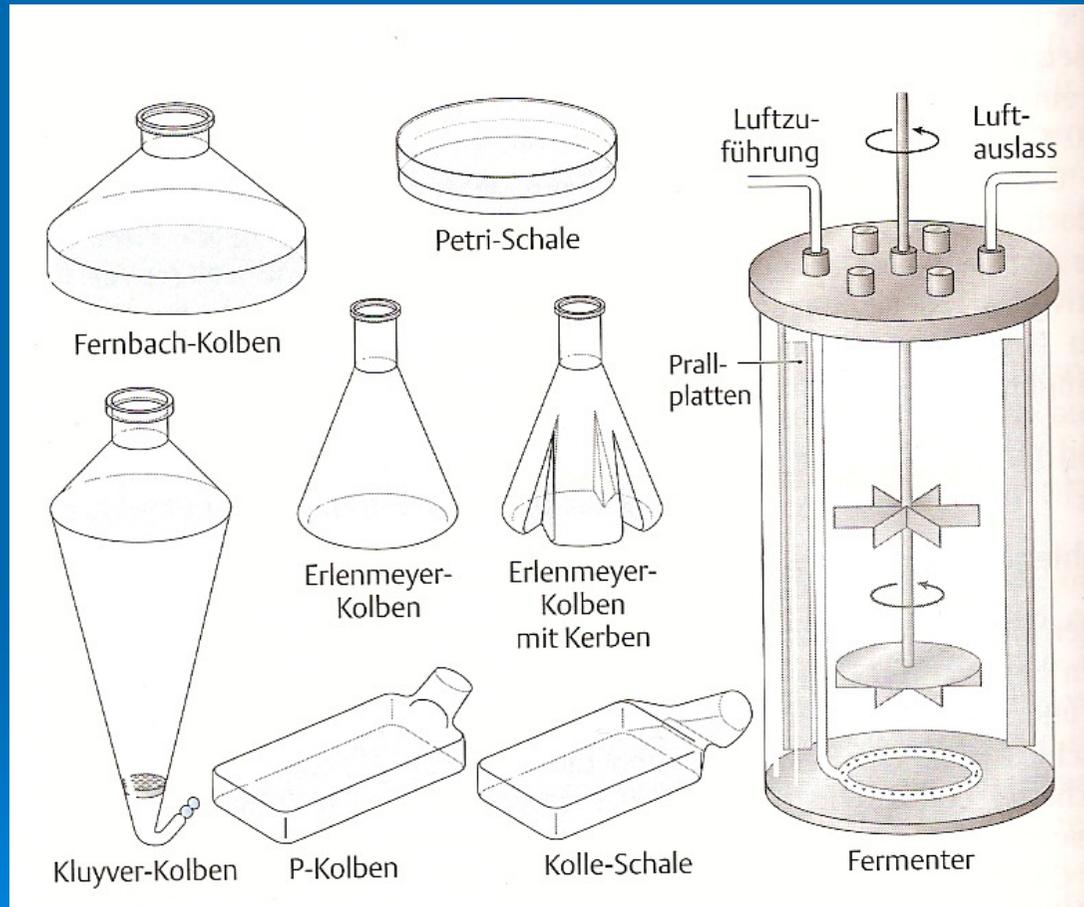
Minimalmedium (ausschließlich definierte Medien) Es enthält nur die Bestandteile, die die Mindestansprüche des Organismus erfüllen.

Differential-Medium

Beispiel: Chinablau-Lactose-Agar

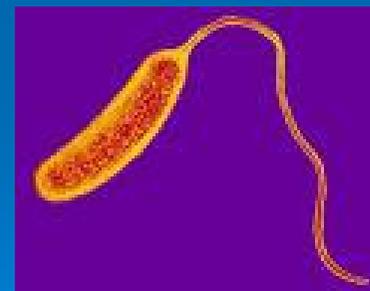
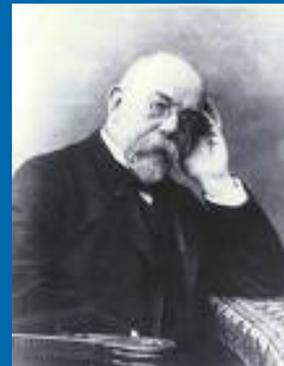


Kulturgefäße



Robert Koch

- * 11. Dezember 1843 in Clausthal-Zellerfeld
- † 27. Mai 1910 n Baden-Baden an Herzschwäche
- Medizinstudium in Göttingen
- Erste große Entdeckung 1876
Erreger des Milzbrandes:
Bacillus anthracis
- Später identifizierte Koch den Erreger der Tuberkulose (Schwindsucht):
Mycobacterium tuberculosis
Er klärte auch den Ansteckungsweg über die Atemwege auf.
- 1883 Isolierung des Cholera-Erregers:
Vibrio cholerae
- Für seine Tuberkulose-Forschungen erhielt Robert Koch 1905 den Nobelpreis für Medizin.



Bestimmung von Mikroorganismenkonzentrationen

Bestimmung der MO-Konzentrationen durch direktes Auszählen

1. Auszählen in Zählkammern
2. Auszählen in Ausstrichen auf Objektträgern
3. Auszählen auf Membranfiltern

Bestimmung der Keimkonzentrationen

Keimzahl (Koloniezahl)

nach der Gussplattenmethode
durch Auspateln auf Agarplatten
nach der Methode von Miles und Misra
nach dem Tauchverfahren
nach der Schüttelagarmethode
nach der Membranfiltermethode

Der Keimtiter gibt das kleinste Volumen der Probe an, in dem gerade noch ein MO durch seine Vermehrung nachweisbar ist

Wahrscheinlichste Keimzahl:

MPN (most probable number)

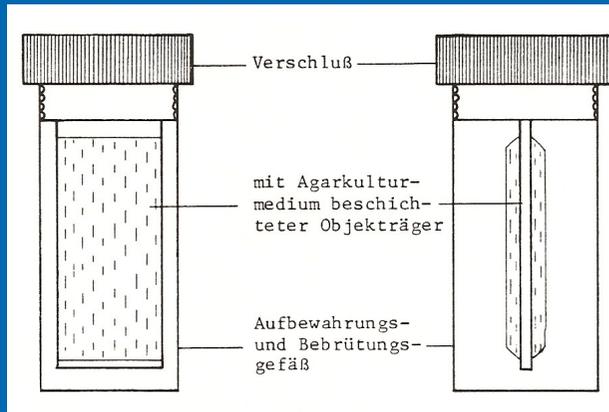
Keimzahl (= Koloniezahl)

- Gussplattenmethode

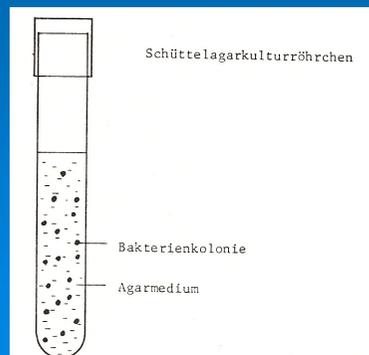
Vermischung des flüssigen Agarmediums mit einem bekannten Volumen der Probe bzw. einer Verdünnung

Geeignet für Keimkonzentrationen ab etwa 10^4 ml^{-1}

- Tauchverfahren



- Schüttelagarmethode



„Keimtiter“

Verschiedene Volumina der flüssigen Probe bzw. von Verdünnungen einer Probe in einer abgestuften Reihe werden jeweils mit einem geeigneten flüssigen Kulturmedium vermischt und unter geeigneten Bedingungen bebrütet.

Die Bestimmung des Titers ist bei Routineuntersuchungen schnell und einfach durchzuführen.

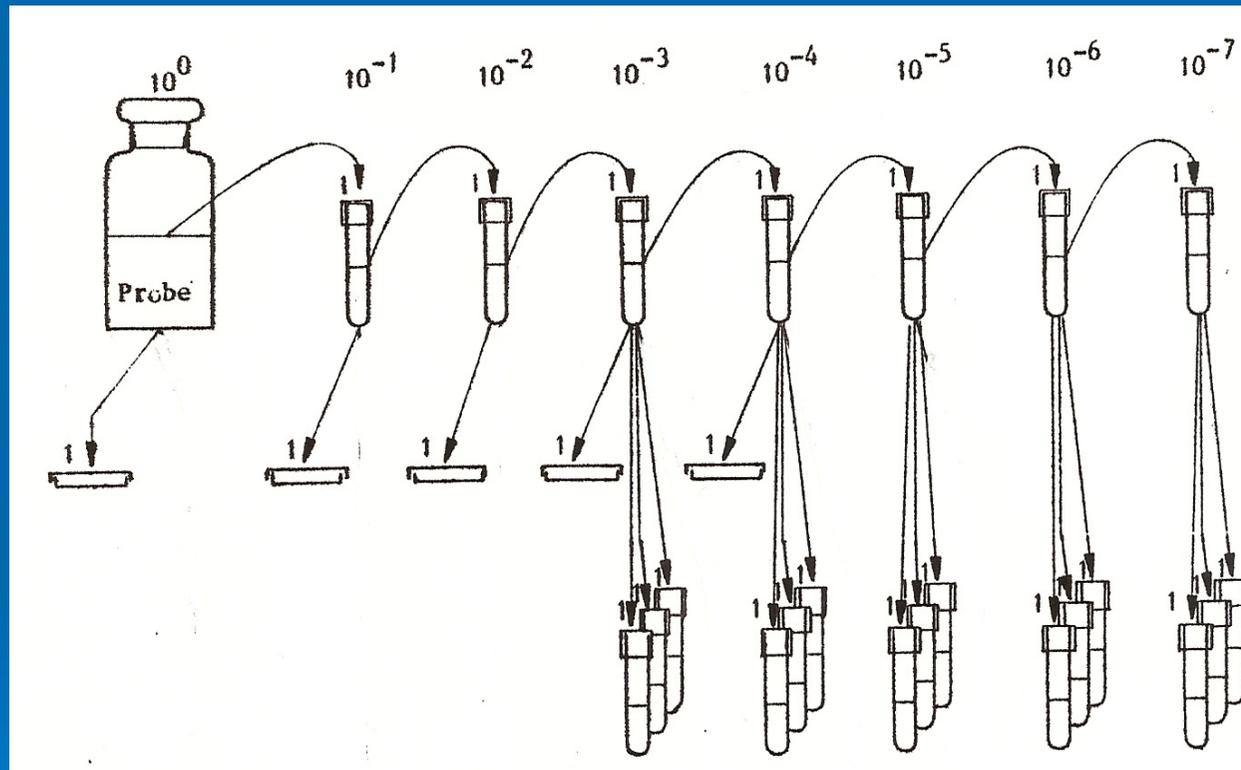
Sie ergibt jedoch nur sehr ungenaue Werte für die Keimkonzentration. Die Abweichungen sind mindestens von der Größenordnung der Verdünnungsstufen.

„Wahrscheinlichste Keimzahl“ (MPN)

Genauere Werte erhält man, wenn man mehrere Parallelkulturen mit dem gleichen Volumen der Probe bzw. ihrer Verdünnungen ansetzt.

Dadurch wird die tatsächliche Keimkonzentration etwas genauer bestimmt, der Einfluss des Zufalls eingeschränkt.

Schema des Arbeitsgangs



Verdünnungsfaktor

Röhrchen
mit je 9 ml dest. Wasser
Verdünnungsreihe

Petrischalen 1 ml
Verdünnung + 15 bis 20 ml
Agar Koloniezahl

Röhrchen mit je 6 ml
Flüssigmedium
Gesamtkeimtiter und MPN +
1 ml Verdünnung