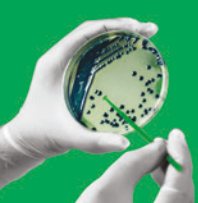


Methoden der Mikrobiologie



HigVeg™ Pulvermedien: Die pflanzliche Alternative

100% VEGGIE

Gut für Forschung und Produktion

- frei von TSE / BSE-Risiken
- Wachstum der Keime mindestens gleichwertig

Gut für die Umwelt

- keine Aufzucht und Schlachtung von Tieren notwendig
- 92 % weniger CO₂-Ausstoß und 99 % weniger H₂O-Verbrauch im Herstellungsprozess

Gut zu wissen

- alle tierischen Peptone können ersetzt werden
- über 1.500 HiVeg™ Medien verfügbar



20% Rabatt
auf alle
Erstbestellungen

Wechseln Sie jetzt!

Telefon +49 6251 989 24 26
infoeu@himedialabs.com

www.hiveg.com

HIMEDIA 

Anja Störiko
(Hrsg.)

Astrid Brandis-Heep
Erika Kothe
Timo Zimmermann
Autoren

Methoden der Mikrobiologie

Ein Praxishandbuch

 Springer Spektrum

Hrsg.

Anja Störiko

Hofheim am Taunus, Deutschland

Autoren

Astrid Brandis-Heep

Fachbereich Biologie
Philipps-Universität Marburg
Marburg, Deutschland

Erika Kothe

Institut für Mikrobiologie
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Jena, Deutschland

Timo Zimmermann

Advanced Light Microscopy Unit
CRG-Centre for Genomic Regulation
Barcelona, Spanien

ISBN 978-3-662-60553-0 ISBN 978-3-662-60822-7 (eBook)

<https://doi.org/10.1007/978-3-662-60822-7>

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über ► <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

© Springer-Verlag GmbH Deutschland, ein Teil von Springer Nature 2020

Das Werk einschließlich aller seiner Teile ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsgesetz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlags. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

Die Wiedergabe von allgemein beschreibenden Bezeichnungen, Marken, Unternehmensnamen etc. in diesem Werk bedeutet nicht, dass diese frei durch jedermann benutzt werden dürfen. Die Berechtigung zur Benutzung unterliegt, auch ohne gesonderten Hinweis hierzu, den Regeln des Markenrechts. Die Rechte des jeweiligen Zeicheninhabers sind zu beachten.

Der Verlag, die Autoren und die Herausgeber gehen davon aus, dass die Angaben und Informationen in diesem Werk zum Zeitpunkt der Veröffentlichung vollständig und korrekt sind. Weder der Verlag, noch die Autoren oder die Herausgeber übernehmen, ausdrücklich oder implizit, Gewähr für den Inhalt des Werkes, etwaige Fehler oder Äußerungen. Der Verlag bleibt im Hinblick auf geografische Zuordnungen und Gebietsbezeichnungen in veröffentlichten Karten und Institutionsadressen neutral.

Dieses Buch erfordert Grundkenntnisse in Laborarbeit, insbesondere Kenntnisse in Sterilarbeit und sicherheitsrelevante Kenntnisse. Die Methoden basieren auf Standardprotokollen, die sich ständig ändern. Einzelne Originalquellen werden daher nicht angegeben.

Planung/Lektorat: Stefanie Wolf

Springer Spektrum ist ein Imprint der eingetragenen Gesellschaft Springer-Verlag GmbH, DE und ist ein Teil von Springer Nature.

Die Anschrift der Gesellschaft ist: Heidelberger Platz 3, 14197 Berlin, Germany

ONE AFFINITY TAG FOR ALL PROTEIN APPLICATIONS

Cloning



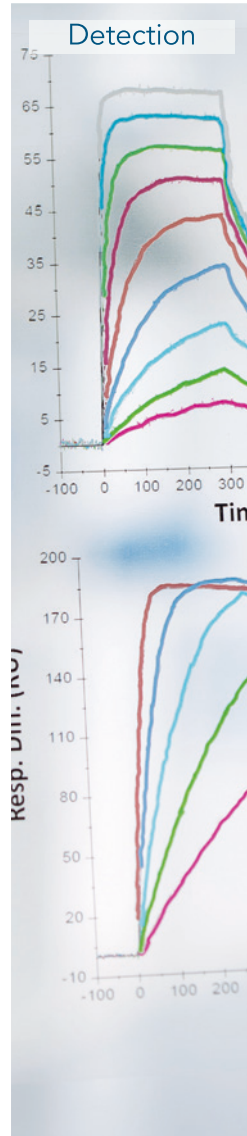
Expression



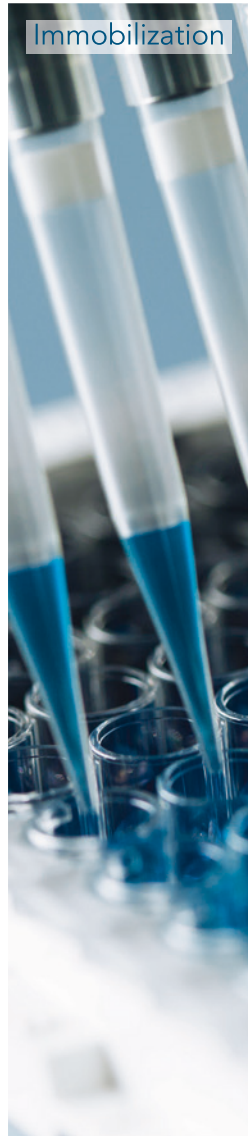
Purification



Detection



Immobilization



Inhaltsverzeichnis

1	Isolierung und Kultivierung von Bakterien	1
	<i>Astrid Brandis-Heep</i>	
1.1	Anreicherung von Bakterien aus einer Bodenprobe	3
1.1.1	Anreicherung von <i>Bacillus subtilis</i>	3
1.1.2	Kultivierung von <i>Bacillus subtilis</i> auf Minimalmedium	7
1.1.3	Anreicherung von <i>Clostridium pasteurianum</i>	9
1.2	Anreicherung aus einer Wasserprobe	11
1.2.1	Anreicherung von <i>Escherichia coli</i>	11
1.2.2	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> auf Minimalmedium	13
1.3	Spezielle Verfahren bei der anaeroben Anreicherung	15
1.3.1	Spezielle GefäÙe und Verschlüsse für die Anaerobentechnik	15
1.3.2	Medienherstellung für die Kultivierung anaerober Bacteria und Archaea	15
1.4	Isolierung anoxygener phototropher Bakterien	27
1.4.1	Winogradski-Säule	27
1.4.2	Anreicherung grüner Schwefelbakterien (z. B. <i>Chlorobium</i>)	29
1.4.3	Anreicherung von Schwefelpurpurbakterien (z. B. <i>Chromatium</i>)	30
1.4.4	Anreicherung von Nicht-Schwefelpurpurbakterien	32
1.5	Direktisolierung von Bakterien	33
1.5.1	Verdünnung einer Schlamm- oder Wasserprobe	33
1.5.2	Verdünnungsreihe für aerobe Bakterien	34
1.5.3	Verdünnungsreihe für anaerobe Bakterien (Agar Shake)	35
1.6	Gewinnung von Reinkulturen	39
1.6.1	Vereinzelung durch Drei-Strich-Technik	39
1.6.2	Vereinzelung durch Kreuzstrich	42
1.6.3	Flächenausstrich mit dem Drigalski-Spatel	43
1.6.4	Vereinzelung aerotoleranter anaerober Bakterien	44
1.7	Bestimmung von Wachstum	45
1.7.1	Bestimmung der (Gesamt-)Zellzahl mit der Zählkammer	45
1.7.2	Bestimmung der Zellzahl mit der Membranfiltertechnik	47
1.7.3	Bestimmung der Lebendzellzahl	52
1.7.4	Bestimmung der Zellmasse	57
2	Identifizierung und Differenzierung von Bakterien	63
	<i>Astrid Brandis-Heep</i>	
2.1	Morphologische Eigenschaften von Bakterien	65
2.1.1	Zellwand: KOH-Test	65
2.1.2	Zellwand: Gram-Färbung	66
2.1.3	Nachweis von Endosporen	69
2.1.4	Test auf Beweglichkeit von Bakterien	70
2.1.5	Kapseldarstellung	72

2.2	Physiologische Eigenschaften von Bakterien: Nachweis auf Identifizierungsmedien	73
2.2.1	Eosin-Methylenblau-Agar (EMB-Agar)	73
2.2.2	MacConkey-Agar	75
2.2.3	Nachweis des oxidativen/fermentativen Abbaus von Zuckern (OF-Test)	76
2.2.4	Methylrot-Test: Säure- und Gasbildung	78
2.2.5	Citrat-Agar – Citratlyase	79
2.2.6	SIM-Agar, MIO-Agar, MIL-Agar	82
2.3	Physiologische Leistungen: Nachweis von Enzymaktivitäten	87
2.3.1	Nachweis der Katalase-Aktivität	87
2.3.2	Nachweis der Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität	87
2.3.3	Nachweis von Indol: Tryptophanase-Aktivität	89
2.3.4	Nachweis von Acetoin (Voges-Proskauer-Test)	90
2.3.5	Nachweis der Urease-Aktivität	90
2.3.6	Nachweis der Lysin-Deaminase und -Decarboxylase-Aktivität	92
2.3.7	Nachweis der Phenylalanin-Deaminase-Aktivität	94
2.3.8	Nachweis der Gelatinase-Aktivität	95
2.3.9	Nachweis der Amylase-Aktivität	97
2.3.10	Nachweis der Cellulase-Aktivität	99
2.3.11	Nachweis der Nitrat- und Nitritreduktase-Aktivität	101
2.3.12	Nachweis von Hämolysin-Aktivität	104
2.3.13	Multitestsystem	105
3	Pilze	107
	<i>Erika Kothe</i>	
3.1	Isolierung und Kultivierung von Hefen und filamentösen Pilzen	109
3.1.1	Hefen	109
3.1.2	Kultivierung filamentöser Pilze in Flüssigmedien	112
3.1.3	Kultivierung filamentöser Pilze auf festen Medien	114
3.1.4	Isolierung von Pilzen aus flüssigen Umweltproben	117
3.1.5	Isolierung von Pilzen aus Bodenproben	119
3.1.6	Isolierung von Pilzen aus Fruchtkörpern	121
3.1.7	Isolierung von Pilzen aus Pflanzenmaterial	123
3.1.8	Stammhaltung von Pilzen	126
3.2	Identifizierung von Pilzen durch mikroskopische und DNA-abhängige Methoden	128
3.2.1	Mikromorphologische Bestimmung	128
3.2.2	Färbungen zur Beobachtung von Zellkompartimenten in Pilzen	130
3.2.3	Bestimmung von Pilzen durch parasitische bzw. symbiotische Stadien	133
3.2.4	Bestimmung von Pilzen durch Sequenzierung der ITS-Region	136
3.3	Untersuchungen zu Lebenszyklen von Pilzen	138
3.3.1	Lebenszyklus und Zellzyklus bei <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	138
3.3.2	Hefen und der Übergang zu Hyphenformen	141
3.3.3	Entwicklung asexueller Sporen	144

3.3.4	Nachweis der Einflüsse von Licht, Tagesrhythmen und Kreuzung bei der Bildung asexueller Sporen	146
3.3.5	Kreuzung bei Basidiomyceten am Beispiel von <i>Schizophyllum commune</i>	149
3.3.6	Pilzkulturen und Fruchtkörperbildung bei Basidiomyceten	151
3.3.7	Kreuzung filamentöser Ascomyceten am Beispiel von <i>Aspergillus nidulans</i>	153
3.3.8	Tetradenanalyse bei <i>Sordaria fimicola</i>	155
3.4	Lokalisierungen von Proteinen und Zellkomponenten <i>in situ</i>	157
3.4.1	Färbungen für den Nachweis von Enzymen und Naturstoffen	157
3.4.2	Immunologischer Nachweis von Proteinen	161
3.4.3	Fluoreszenz-Videomikroskopie bei Pilzen	163
3.4.4	Separieren unterschiedlicher Zellkompartimente	166
3.5	Transformationssysteme in Pilzen	168
3.5.1	Vektoren und Stabilität der Transformation	168
3.5.2	LiCl-basierte Transformation	170
3.5.3	Elektroporation von Conidiosporen	171
3.5.4	PEG-vermittelte Transformation bei <i>Schizophyllum commune</i>	173
3.5.5	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> -vermittelte Transformation beim Ektomykorrhizapilz <i>Tricholoma vaccinum</i>	175
4	Molekularbiologische Methoden	179
	<i>Erika Kothe</i>	
4.1	Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren	181
4.1.1	Isolierung von Gesamt-DNA aus Reinkulturen und Umweltproben	181
4.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA	182
4.1.3	Isolierung von RNA	183
4.1.4	Konzentrationsbestimmung für Nukleinsäuren	185
4.1.5	Agarose-Gelelektrophorese	186
4.2	Isolierung und Analyse von Proteinen	188
4.2.1	Herstellung von Proteinextrakten für die SDS-Gelelektrophorese	188
4.2.2	Quantifizierung von Proteinen	189
4.2.3	Proteingelelektrophorese	189
4.3	DNA-modifizierende Enzyme	192
4.3.1	Restriktionsendonukleasen	192
4.3.2	Vektoren und Klonierung	193
4.3.3	Elektroporation von <i>Escherichia coli</i>	195
4.4	Nachweis von Nukleinsäuren und Proteinen durch Hybridisierung und Antikörper-abhängige Methoden	196
4.4.1	Southernblot-Analyse	196
4.4.2	Northernblot-Analyse	199
4.4.3	Westernblot-Analyse	200
4.4.4	Enzyme-linked Immuno-Sorbent-Assay (ELISA)	201
4.5	Nachweismethoden durch Polymerase-Kettenreaktion	203
4.5.1	Genspezifische Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	203
4.5.2	PCR zum Nachweis von Transkripten (RT-PCR)	205

4.5.3	Quantitative real-time-PCR (qPCR).....	206
4.6	Sequenzierung und Genanalyse	208
4.6.1	Sequenzierung, Mikrobiomanalyse, Metagenom, Transkriptom	208
4.6.2	Homologiesuche mit BLAST	209
4.6.3	Stammbaumerstellung	211
5	Lichtmikroskopische Methoden	213
	<i>Timo Zimmermann</i>	
5.1	Das Lichtmikroskop: Funktion und Komponenten	216
5.1.1	Objektive, Vergrößerung und Auflösung	217
5.2	Durchlichtmikroskopie	222
5.2.1	Köhler'sche Beleuchtung	223
5.2.2	Phasenkontrast	224
5.2.3	Differenzialinterferenzkontrast	226
5.3	Fluoreszenzmikroskopie	229
5.3.1	Epifluoreszenzmikroskopie	230
5.3.2	Digitale Bilderfassung	234
5.3.3	Konfokale Mikroskopie	237
5.3.4	Lichtmikroskopie jenseits der Beugungsgrenze (Superauflösende Fluoreszenzmikroskopie)	239
5.4	Präparationsmethoden für die Mikroskopie	240
5.4.1	Herstellung lebender Proben	240
5.4.2	Herstellung fixierter Proben	244
5.5	Lebendfärbungen für die Durchlichtbetrachtung	250
5.5.1	Tuschepreparat für den Kapselnachweis	251
5.5.2	Negativfärbungen	252
5.5.3	Vitalfärbung mit Methyleneblau	253
5.5.4	Färbung von Speicherstoffen	254
5.6	Färbungen fixierter Proben für die Durchlichtbetrachtung	256
5.6.1	Einfach-Färbungen	258
5.6.2	Differenzialfärbungen	261
5.6.3	Strukturfärbungen	268
5.7	Färbungen für die Fluoreszenzbetrachtung	277
5.7.1	Fluoreszenzlebendfärbungen	278
5.7.2	Bleichschutz	281
5.7.3	Fluoreszenzfärbungen fixierter Proben	282
5.7.4	Einbettungen und Bleichschutz	284
	Serviceteil	287
	Stichwortverzeichnis	289