

## BEREITUNG VON NÄHRMEDIEN [7, 14,15]

### 1. Sterilisation: Keimfreimachung von Nährmedien, Lösungen und Geräten

**A) ABTÖTUNG der Keime im Substrat / auf Geräten**, abhängig von Temperatur, Zeit, Mikroorganismen, Substrat (Bakterienleichen bleiben im Nährboden).

#### I. Hitzesterilisation:

1. Trockene Hitze: (für weitgehend hitze-unempfindliche Gegenstände, nicht für Nährmedien)

a) Ausglühen:

Nadeln, Ösen; im heißen Teil der Gasflamme; ca. 15-20 sec. Erkalten lassen.

b) Abflammen: (Endosporen von Bakterien werden nicht abgetötet)

Scheren, Pinzetten, Skalpelle, Löffel; (vorher in unverdünnten Spiritus getaucht);

c) Heißluftsterilisation:

in trockener heißer Luft bei ca. 160°C zwei Stunden lang:

Glasgeräte (Petrischalen, Pipetten usw., in Sterilisierbüchsen untergebracht oder in geeignetes Papier eingewickelt);

Wasserfreie, hochsiedende Flüssigkeiten (Paraffinöl, Glycerol) 2h bei 180°C sterilisieren;

2. Feuchte Hitze:

a) Normaldruck: Dampftopf

gewährleistet eine vollkommene Sterilisation nur durch sogen. fraktionierte (stufenweise) Sterilisation:

Das zu sterilisierende Gut wird einer dreimaligen Erhitzung im strömenden Dampf (15 - 30 min bei 100°C - praktisch nur ca. 98°C) mit Zwischenpausen von 12 - 24 Std. ausgesetzt. Durch die erste Erhitzung werden die nichtsporenbildenden Keime und die vegetativen Formen der Sporenbildner abgetötet. Die überlebenden Sporen werden in der Zwischenpause durch eine Temperaturhaltung bei 30 - 37°C zum Auskeimen gebracht und die vegetativen Formen durch die darauffolgende Erhitzung abgetötet. Zur Sicherheit wird der Vorgang noch einmal wiederholt.

b) Überdruck: Autoklav

Sterilisation mit einmaliger Erhitzung

15 - 30 min bei 1 bar (= ca. 120°C)

10 min bei 2 bar (= ca. 134°C)

Einige Sporenbildner überstehen unter gewissen Bedingungen selbst diese Erhitzung. Die Sterilisation mit gespanntem Dampf ist nicht für alle Zwecke geeignet (Denaturierung mancher Nährböden!), in diesen Fällen ist die fraktionierte Sterilisation anzuwenden.

Gesättigter Wasserdampf hat eine viel höhere keimtötende Wirkung als ungesättigter. Die keimtötende Wirkung trockener, heißer Luft ist bedeutend geringer als die von feuchter, heißer Luft.

### II. Chemische Sterilisation:

Räume: Zerstäubung von Desinfektionsmitteln,  
Formaldehyd

Oberflächen, wie Tischplatte, Impfkasten, Hände:

60 - 70 %iger denat. Alkohol

70 %iger Isopropanol

Geräte aus Kunststoff: Äthylenoxid (gasförmig)

**III. Bestrahlung:**

Folgende Strahlenarten sind von Bedeutung:

- UV-Strahlen
- Gammastrahlen
- Röntgenstrahlen (für Oberflächenentkeimung)

UV-Strahlen

Die antimikrobiellen Eigenschaften der UV-Strahlen werden auf die photochemischen Veränderungen der Nukleinsäuren zurückgeführt. Der wirksamste Wellenlängenbereich liegt zwischen 240 und 280 nm; diese Strahlen werden von wichtigen Zellinhaltsstoffen absorbiert.

UV-Strahlen werden von den verschiedensten Stoffen, wie Staubteilchen und Feuchtigkeitsfilmen absorbiert und dringen nicht in die Tiefe.

Nachteile der UV-Behandlung sind: Beschleunigung autooxidativer Prozesse (Zersetzung von Fetten, Vitaminen und Bildung von Peroxiden (Ozon))

UV-Strahlen können beim Menschen Bindehautentzündungen, Sonnenbrand und bei starker Bestrahlung Krebs auslösen.

Gammastrahlen

Gammastrahlen sind kurzwellige, äußerst energiereiche elektromagnetische Wellenstrahlen mit einer Wellenlänge von  $10^{-11}$  cm. Als Strahlungsquelle wird meist Co-60 eingesetzt.

Gammastrahlen haben eine große Eindringtiefe und können deshalb auch für verpackte Waren eingesetzt werden.

Gammastrahlen werden z.B. zur Sterilisation von Einwegartikeln (Petrischalen, Spateln und dgl.) eingesetzt.

**B) ABTRENNUNG der lebenden Keime vom Substrat = FILTRATION**

CHAMBERLAND führte 1884 die Filtration als Sterilisationstechnik ein. Es fanden zunächst Glassinterplatten und Keramikfilter Einsatz. Heute verwendet man Membranfilter aus Cellulosederivaten.

Arbeitsweise:

Durchsaugen (Vakuum) oder Durchdrücken (mit Druckluftpumpe) des flüssigen Substrates durch Membranfilter aus Cellulosederivaten (Porengröße 0,20 – 0,45  $\mu\text{m}$ );

**2. Nährsubstrate**

Einteilung der Nährsubstrate

nach der chemischen Zusammensetzung:

- a) natürliche (komplexe):
  - genaue chemische Zusammensetzung nicht bekannt.
  - Naturprodukte aus dem Tier- und Pflanzenreich.
- b) synthetische:
  - Zusammensetzung aus definierten chemischen Verbindungen.

nach der Konsistenz:

- a) flüssig: Bouillon, Milch usw.
- b) halbfest: 0,8 % Agar
- c) fest: 1,5% Agar oder 10 - 15 % Gelatine

nach der Verwendung:

- a) Standardnährböden: auf ihnen wachsen viele Bakteriengattungen und Bakterienarten.

b) Spezialnährböden: Nährböden mit besonderen Zusätzen, damit ganz bestimmte Arten anwachsen können.

- Anreicherungsmedien: Vermehrung möglichst „aller“ Mikroorganismen
- Differenzierungsmedien: ein Medium, das das Wachstum mehrerer Keimarten gestattet und gleichzeitig das Erkennen bestimmter Kolonien erleichtert
- Selektivnährmedien: durch bestimmte Zusätze wird das Wachstum der unerwünschten Begleitflora verhindert.
- Testmedien: z.B.: Hemmstoff-, Wuchsstofftests

- Hefen und Schimmelpilze	YGC	S
- Säurebildner und Nichtsäurebildner	CBL	D
- Pseudomonaden und Aeromonaden	GSP	D
- Coliforme	VRB	S
- <i>E. coli</i>	BRILA	S
- Gesamtkeimzahl	PCA	Stand.

### Zusammensetzung der Nährsubstrate:

#### 1. Kohlenstoffquelle

Sehr viele Mikroorganismen können verschiedene Zucker als C-Quelle verwerten. Man muß aber beachten, daß die Zucker während der Hitzesterilisation umgewandelt werden oder mit anderen Nährlösungskomponenten reagieren. Es entstehen schwer verwertbare oder sogar hemmende Substanzen. Es ist zu empfehlen, die zuckerhaltige Nährlösung durch Filtration keimfrei zu machen oder eine konzentrierte Zuckerlösung getrennt von der übrigen Nährlösung im Autoklaven bzw. durch wiederholtes Erhitzen im Dampftopf bei 100°C zu sterilisieren und erst nach Erkalten mit der Nährlösung zu mischen.

*Wichtige C-Quellen sind:* verschiedene Mono- bis Polysaccharide (z.B. Stärke), ein- bis mehrwertige Alkohole (z.B. Glycerin und Mannit), verschiedene Säuren;

Fettsäuren werden mit zunehmender Kettenlänge im allgemeinen schlechter umgesetzt. Abbauprodukte von Glucose, wie Citrat, Lactat usw. sind nicht immer gute C-Quellen, weil sie unter bestimmten Bedingungen nicht oder schlecht aufgenommen bzw. umgesetzt werden.

*Malzextrakt* ist eine sirupartige Masse, die durch wäßrige Extraktion von Malz bei 50 - 60°C und anschließender Konzentration der Lösung bei reduziertem Druck und 55°C gewonnen wird.

Bei der Züchtung von Hefen, vor allem im industriellen Maßstab, werden häufig *Melassen und Würze* (ungehopfte Bierwürze) verwendet.

#### 2. Stickstoffquelle

Peptone (Dieser Ausdruck ist nur in der Mikrobiologie gebräuchlich) 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". Ein gutes Pepton ist ein hellgelbes, stark hygroskopisches und klar lösliches Produkt, das ein breites Spektrum an Aminosäuren, Peptiden und Makropeptide und anderen löslichen Produkten wie Zuckern (Glucose 0,1%) und Salzen enthält.

Eine 1%ige Peptonlösung reagiert neutral bis schwach sauer.

Fleischextrakt wird durch wäßrige Extraktion von magerem Fleisch bei 100°C gewonnen und anschließend zu einer dicken Paste (80% Gehalt an Feststoffen) konzentriert.

Caseinhydrolysat (casamino acids) ist ein salzsaures Hydrolysat von Casein, das keine Peptide und Makropeptide mehr enthält, sondern weitgehend aus Aminosäuren und anderen einfachen Bausteinen besteht (Gesamt-N: 7 %).

Andere N-Quellen: Ammonium, Aminosäuren, Nitrat, Harnstoff

#### 3. Mineralstoffe, Spurenelemente

Die Mehrzahl der Mikroorganismen brauchen die folgenden Ionen in relativ hoher Konzentration: Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. Sie werden, wie das Phosphat (auch Pufferwirkung) oder Mg<sup>++</sup> in

organische Verbindungen eingebaut, beeinflussen Transportvorgänge durch Membranen, wie Na, K und Mg und sind für die Struktur und Aktivität von Enzymproteinen von Bedeutung.

Als Spurenelemente bezeichnet man Ionen, die in sehr geringen Konzentrationen zugesetzt werden bzw. wirksam sind, in höheren Konzentrationen sogar stark hemmen können. In der Regel Mn, Mo, Fe, Co, und Cu benötigt.

#### 4. Wachstumsfaktoren (Vitamine, Aminosäuren, Hefeextrakt usw.)

*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.

#### 5. Verfestigungsmittel (Agar oder Gelatine)

##### *Gelatine:*

Knochen (auch Häute) werden mit HCl behandelt um  $\text{CaCO}_3$  und  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  herauszulösen. Der Rest ist eine poröse Masse (Ossein), die größtenteils aus Kollagen besteht. Der mit heißem Wasser gelöste Anteil ist die Gelatine, welche nach Abkühlung ein Gel bildet. Gelatine ist ein Peptid, es enthält 16 - 17% N und besteht aus etwa 15 Aminosäuren (Prolin, Hydroxyprolin, Glycin). Verschiedene Herstellungschargen sind nie ganz einheitlich.

Für Nährböden wird Gelatine in einer Konzentration von 10 - 12% verwendet. Bei Erwärmung auf 25 - 30°C schmilzt das Gel. Bei oftmaligem Schmelzen und bei hohen Temperaturen treten allmählich irreversible Veränderungen ein. Deshalb soll Gelatine nicht unnötig erhitzt werden. Da Veränderungen über 100°C sehr rasch eintreten, ist bei Gelatine-Nährböden die fraktionierte Sterilisation anzuwenden. Da Gelatine in heißen Säuren und Laugen leicht hydrolysiert, muß der pH-Wert bei der Sterilisation nahe 7,0 liegen.

Gelatine wird von zahlreichen MO hydrolysiert.

##### *Agar:*

Agar ist ein Kohlenhydrat, das aus Meeresalgen (Gelidium-Arten) gewonnen wird. Die Algen werden 12 Stunden mit 0,015 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  bei 80°C behandelt. Die Lösung wird filtriert, das erstarrte Gel wird getrocknet und pulverisiert. Früher kam Agar auch in "Stangenform" in den Handel.

Die Algen, welche 12 - 100 ppm Jod und eine Reihe organischer "Verunreinigungen" enthalten, werden 10 - 15 Tage bei häufigem Wasserwechsel gewässert und hierauf getrocknet. Der gewaschene Agar enthält kaum noch Bestandteile, welche das MO-Wachstum beeinflussen. Agar ist ein Polysaccharid aus ca. 14 Einheiten D-Galaktose.

Agar erleidet beim Erhitzen keine irreversible Veränderung zwischen pH 6-9; daher können Agar-Nährböden autoklaviert werden.

#### 6. Indikatoren für Spezialnährböden

Chinablau, Bromkresolpurpur, Neutralrot, Bromthymolblau, Lackmus u.a.

#### 7. Wasser (destilliertes bzw. entionisiertes)

Alle Nährstoffe müssen in Lösung sein, bevor sie in die Mikroorganismenzelle eintreten können. Mineralsalze in Leitungswasser und z.B. gelöste Kohlensäure können mit Nährbodenbestandteilen reagieren und diese für die MO unbrauchbar machen.

#### 8. Selektive Agentien

Um bestimmte MO selektiv zu isolieren werden Chemikalien (Gallensalze, Farbstoffe, Selenit, Tetrathionat, Tellurit u. a.) oder antimikrobielle Substanzen (Antibiotika) zugesetzt.

**Grundeigenschaften eines Nährmediums:**

- ausreichende Feuchtigkeit
- ausreichende Mengen entsprechender Nährstoffe
- optimale oder mindestens tolerable Temperatur
- optimaler oder mindestens tolerabler pH-Wert
- optimaler oder mindestens tolerabler osmotischer Wert
- entsprechendes Redox-Potential

**Probleme und Fehlerquellen bei der Herstellung von Nährmedien**

Unterscheide: autoklavierbare und **nicht** autoklavierbare Substanzen

Achtung: auch autoklavierbare NM halten Hitze nur begrenzt aus

Erhitzung: Selektivitätsverlust des NMs durch zu langes oder zu hohes Erhitzen bzw. durch mehrmaliges Aufschmelzen des NMs

Wasser: entionisiert (Ionen des Wassers + Peptone → Trübung)  
frisch zubereitet (Achtung vor Aufnahme von CO<sub>2</sub> und anderen Substanzen aus der Luft) → pH-Wert-Verschiebung, durch Trübung erschwerte Auswertung, durch Ausfällen der Salze ev. Wachstumshemmung der MO

Agar: zu starke Erhitzung → Gelstruktur des Agars wird zerstört  
Erhitzung im sauren Bereich → Depolymerisation  
Lösungen neigen zum Sedimentieren → bei Herstellung von NM ist auf die Homogenität durch Rühren zu achten (Gefahr des Anbrennens, ev. nicht Festwerden des NMs bei Inhomogenität)

Peptone: sind hygroskopisch → Verklumpung  
enthalten Phosphate + Ca /Mg → Trübung, Ausfällung  
durch zu starke Erhitzung → chem. Veränderungen

Salze: Gallensalze empfindlich bei zu tiefen pH  
Sulfit wird zu Sulfat oxidiert → unwirksam  
Azid zersetzt sich bei stärkerer Hitzeeinwirkung

Kohlenhydrate: Karamelisierung, Maillardreaktion, Hydroxymethylfurfurolbildung

pH-Wert: deionisiertes Wasser  
falsche Einwaage des NM-Pulvers  
falsche Lagerung des NMs (hohe Luftfeuchtigkeit) → pH-Verschiebung

Lagerung des fertig hergestellten NMs: zu lang → Austrocknungsgefahr, Kontamination  
durch psychrotrophe MO, Verlust der Wirksamkeit

Einfluss der Temperatur des Wasserbades:

- zu heiß → MO sterben ab
- zu kalt → Festwerden des NMs → Inhomogenität, schlechte Verteilung der Nährstoffe
- zu lange Lagerung → Selektivitätsverlust des NMs

## Hinweise zur Sterilisation von Kulturmedien im Autoklav

- 1) Gefäße max.  $\frac{3}{4}$  voll füllen (Überkochen bei Druckabsenkung)
- 2) Medium mit Agar vor dem Sterilisieren aufkochen (Homogenität)
- 3) Verschlüsse von Kulturmediumflaschen lose auflegen
- 4) Beschriftung in autoklavierfester Form vornehmen
- 5) Volumina gleicher Größenordnung einbringen
- 6) Nach Ablauf der Sterilisationszeit Druck langsam ablassen.

## Überprüfung von Nährmedien

Da Nährmedien die Grundlage für das mikrobiologische Arbeiten darstellen, sollten folgende Kontrolltests im Labor des Endverbrauchers durchgeführt werden:

- 1) *pH-Messung im fertigen Medium bei 25 °C:*  
Der gemessene Wert muß innerhalb der Grenzen der Produktdeklaration liegen.
- 2) *Sterilitätsprüfung:*  
Bei 100 abgefüllten Einheiten sollten 3-5 einem Bebrütungstest unterzogen werden, bei größeren Chargen sollten 10 Einheiten nach dem Zufallsprinzip gezogen werden (Bebrütung 2 Tage 37 °C oder 3 Tage 30 °C).  
Die für den Sterilitätstest verwendeten Platten oder Röhrchen dürfen keinesfalls aus „Materialspargründen“ bei Untersuchungen wieder verwendet werden.
- 3) *Prüfung der Effizienz von Nährmedien mit Hilfe von Testkulturen:*  
Es sind sowohl qualitative als auch quantitative Tests mit der alten als auch mit der neuen Nährbodencharge durchzuführen.

Medium	Positivkontrolle	Negativkontrolle
PC-MM-Agar	keine speziellen Teststämme	
VRB-Agar	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>Staph. aureus</i> ATCC 25923
BRILA-Bouillon	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>Staph. aureus</i> ATCC 25923
	<i>Ent. aerogenes</i> ATCC 13048	<i>B. cereus</i> ATCC 10876
YGC-Agar	<i>Sacch. cerevisiae</i> ATCC 9763	<i>E. coli</i> ATCC 25922
		<i>Staph. aureus</i> ATCC 25923
Slanetz-Bartley-Agar	<i>Ent. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922
Giolitti-Cantoni-Boillon	<i>Staph. aureus</i> ATCC 25923	<i>Staph. epidermidis</i> ATCC 12228
Baird-Parker-Agar	<i>Staph. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. subtilis</i> ATCC 6635
		<i>Staph. epidermidis</i> ATCC 12228

- 4) *Prüfung der Stabilität von Nährmedien :*  
Ob diese auch nach längerer Lagerung die gleichen Ergebnisse wie bei der Erstverwendung liefern.
- 5) *Prüfung der Verwendbarkeit von bereits gegossenen Agarplatten:*  
Agarplatten sind unbedingt zu verwerfen, wenn sie während der Lagerung mehr als 5% Wasser verloren haben.