

Allgemeine Mikrobiologie und Hygiene
320 107
VO, 2-stündig / SS

W. Kneifel

wolfgang.kneifel@boku.ac.at

Version 11/ 03-2013

TERMINE 2013

04.3. (17.00 - 19.00h)
11.3. (17.00 - 19.00h)
18.3. (17.00 - 19.00h)
08.4. (17.00 - 19.00h)
15.4. (17.00 - 19.00h)
29.4. (17.00 - 19.00h)
06.5. (17.00 - 19.00h)
13.5. (17.00 - 19.00h)
27.5. (17.00 - 19.00h)
03.6. (17.00 - 19.00h)
10.6. (17.00 - 18.00h) PRÜFUNG (Pharmaziezentrum)

Vorlesungsunterlagen



<http://www.boku.ac.at>

Dept. f. Lebensmittelwissenschaften u.- technologie

<http://www.dlwt.boku.ac.at/>

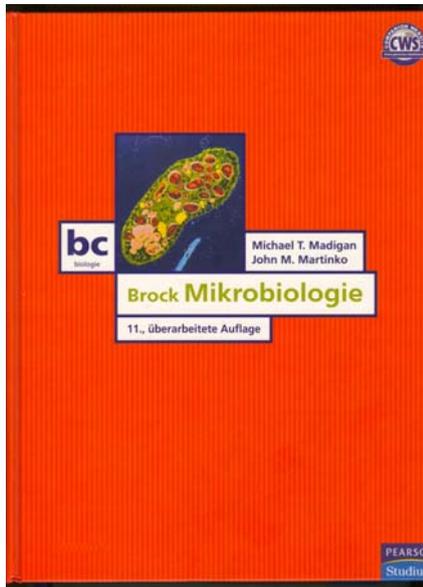
- Institut für Lebensmittelwissenschaften
 - Arbeitsgruppe Lebensmittelqualitätssicherung
 - „Lehre“
- download unter link: „Allg. Mikrobiologie & Hygiene“

Online Skripten und Vorlesungsunterlagen

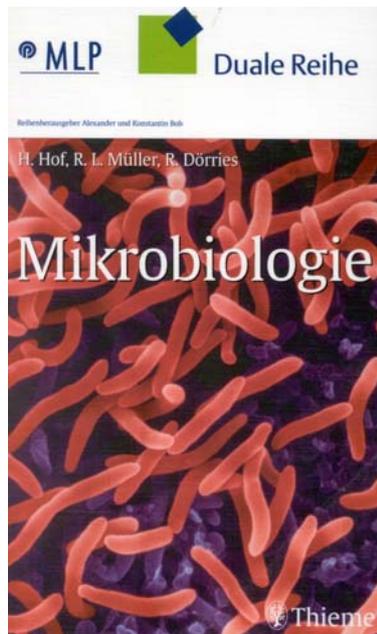
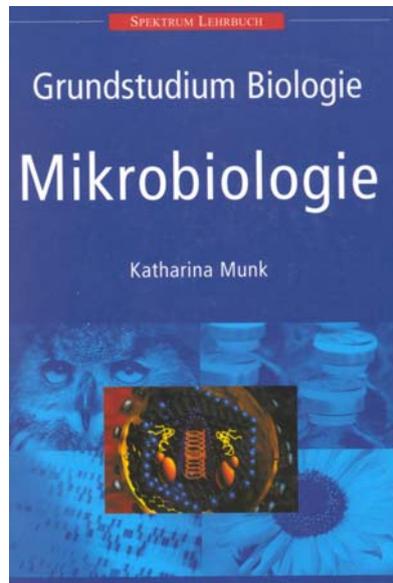
des Departments f. Lebensmittelwiss. u. –technologie

PW kp7zb

Literaturhinweise



aktualisiert 2009



H. R. Widmer

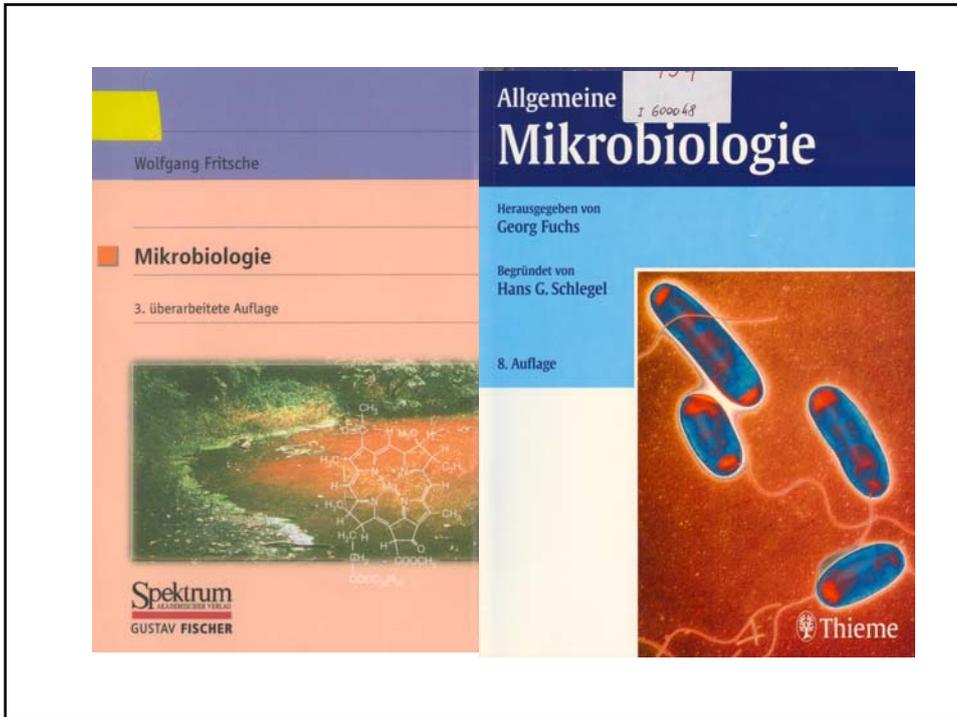
Mikrobiologie und Infektiologie für Ärzte und Apotheker

Paperback WVG - Paperback WVG - Paperback WVG

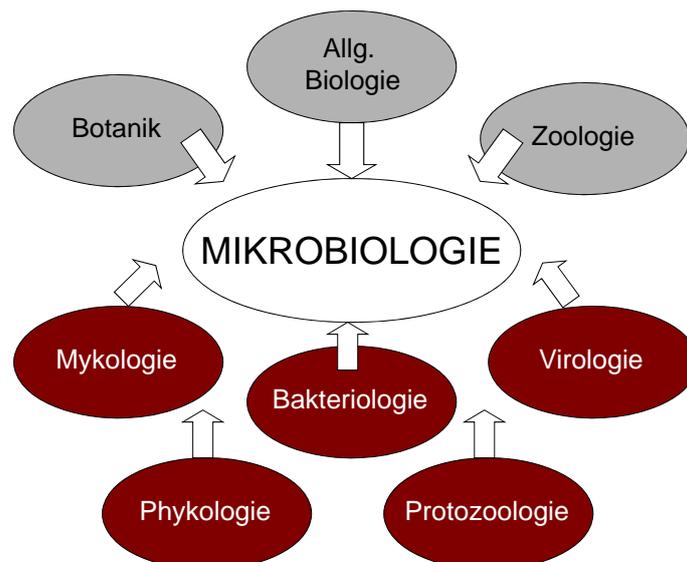
Prophylaxe und Antibiotikatherapie -
Desinfektion und Sterilisation

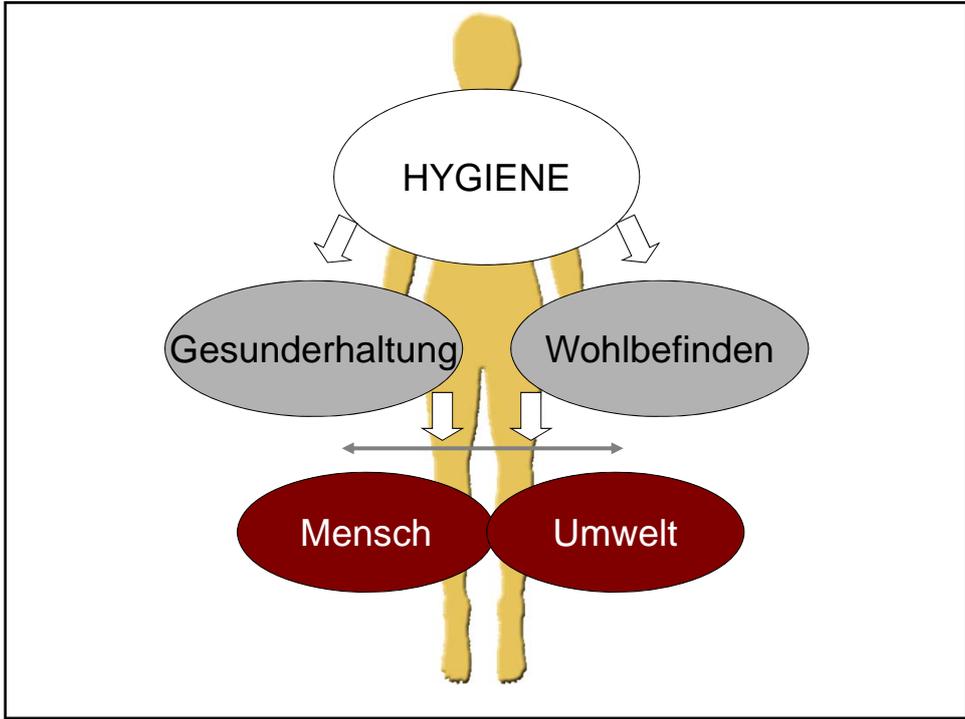
WVG

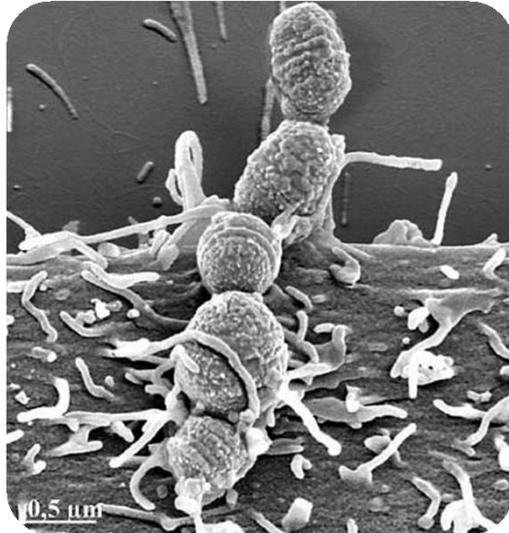
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart



1. EINFÜHRUNG

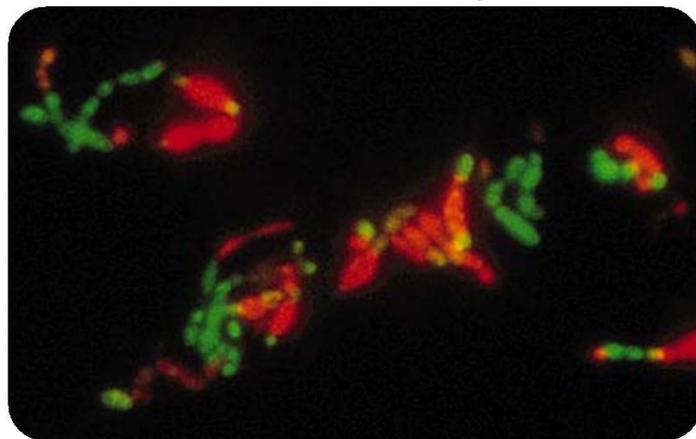






Streptococcus pyogenes

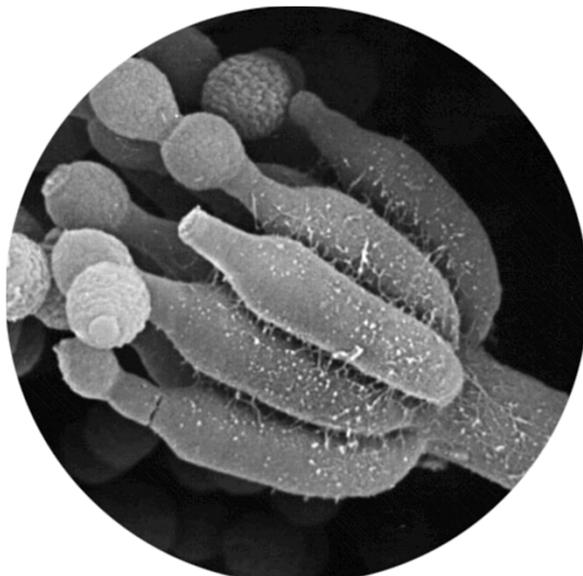
Bifidobacterium sp.



Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme



Candida albicans



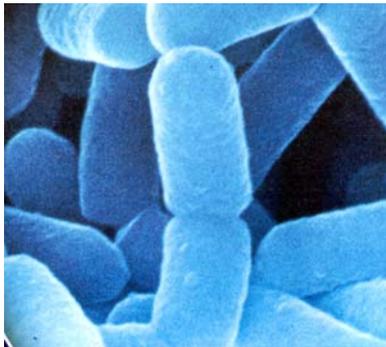
Penicillium camemberti



Aspergillus niger



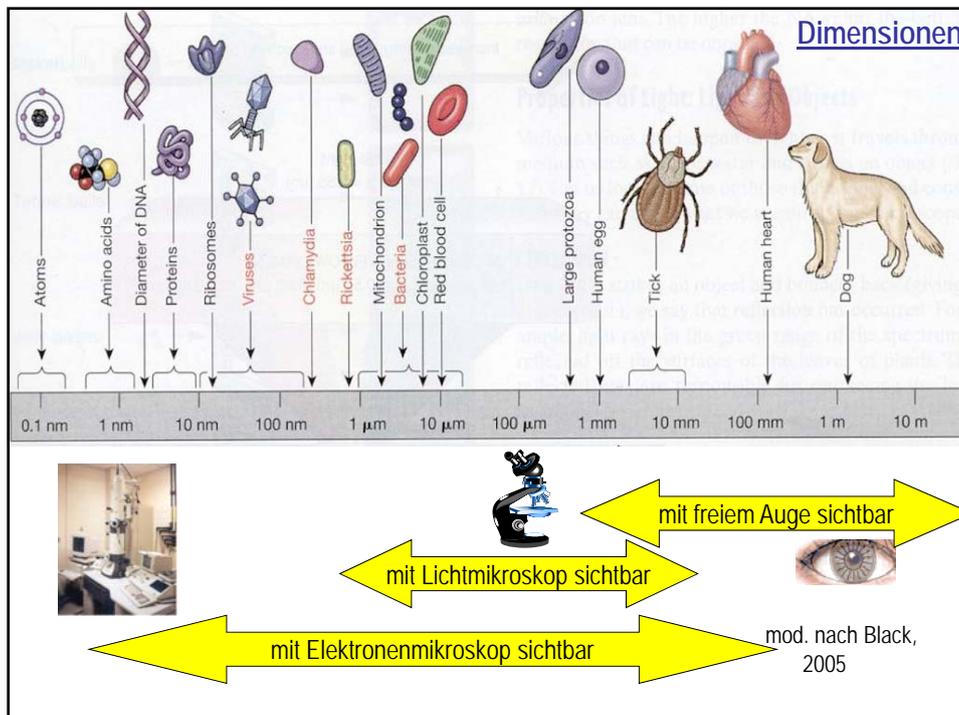
Mit bloßem Auge nicht zu erkennen:



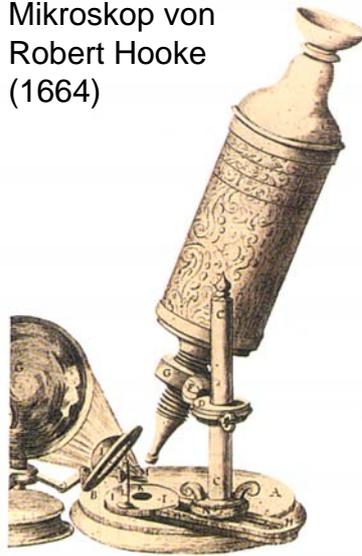
MIKROORGANISMEN

Begriffserklärung

Unter dem Begriff **MIKROORGANISMUS** darf nicht automatisch ein Lebewesen verstanden werden. Eine nicht unerhebliche Zahl von Infektionskrankheiten wird von Viren oder virusartigen Strukturen verursacht. Es handelt sich hierbei um infektiöse Partikel, die jedoch keinen eigenen Stoffwechsel aufweisen und deshalb im klassischen Sinne auch keine Lebewesen sind !



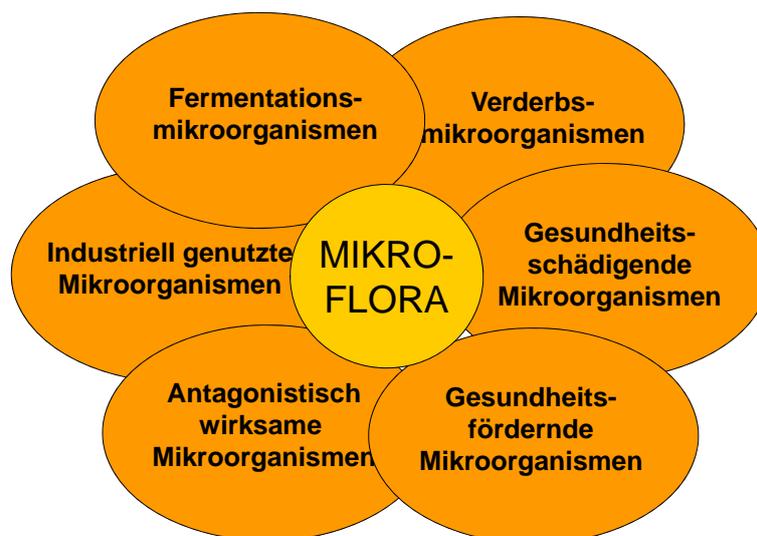
Mikroskop von
Robert Hooke
(1664)



Blauschimmelkolonie auf Leder

Brock, 2001

Hauptaspekte der Mikrobiologie



„Mikroorganismen in und um uns“

- Physiologische Mikroflora (Mensch und Tier, Umwelt)
- Pathogene Keime
- Mikroorganismen „im Dienste des Menschen“

→ **Lebensmittel**

→ **Biotechnologie**

DEFINITIONEN NEUER BEGRIFFE

MIKROBIOTA

Vielfalt an Mikroorganismen (im Darm, an den verschiedenen Oberflächen und Schleimhäuten)

MIKROBIOM

Gesamtheit des genetischen Potenzials von Mikroorganismen in bestimmten Habitaten

Einteilung von Mikroorganismen

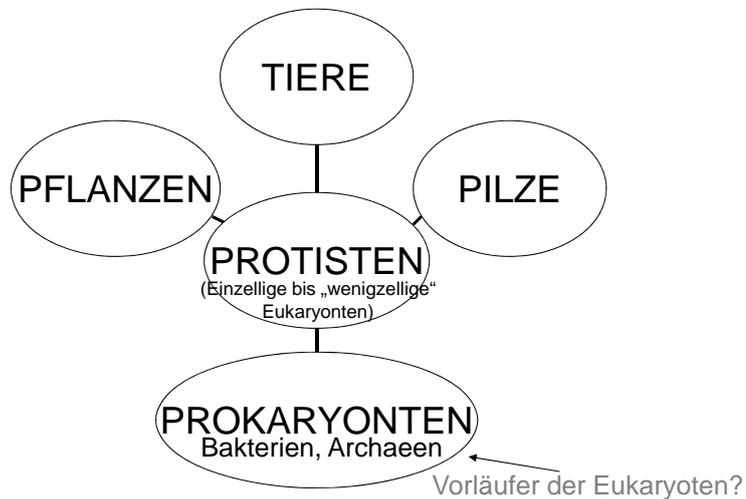
- **Künstliche Einteilung** ➔ orientiert sich an typischen Merkmalen und Eigenschaften, sehr oft zweckmäßig
- **Natürliche Einteilung** ➔ orientiert sich an der Evolution, berücksichtigt molekularbiologische Fakten



D.H. Bergey

Archives of the ASM
DAVID HENDRICKS BERGEY
1860-1937
Bergey set up the Trust on January 2, 1936

Einteilung der (Mikro)organismen in einem „5-Reiche-System“



Untersuchung molekularer Kriterien zur Aufklärung der phylogenetischen Verwandtschaft



16S rNA-Analyse
(Carl Woese)



Phylogenetischer Stammbaum

Untersuchung molekularer Kriterien zur Aufklärung der phylogenetischen Verwandtschaft

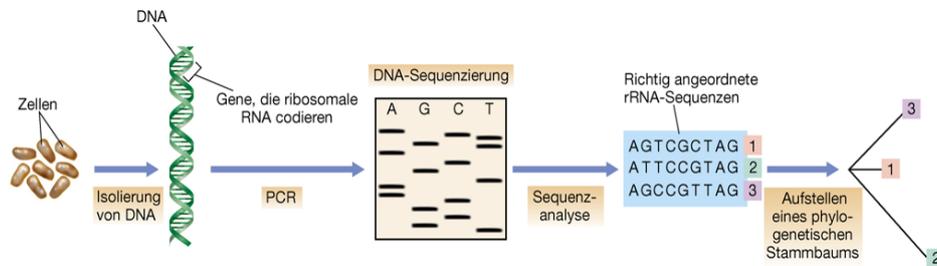


16S rRNA-Analyse, 18S rRNA-Analyse

(Carl Woese)

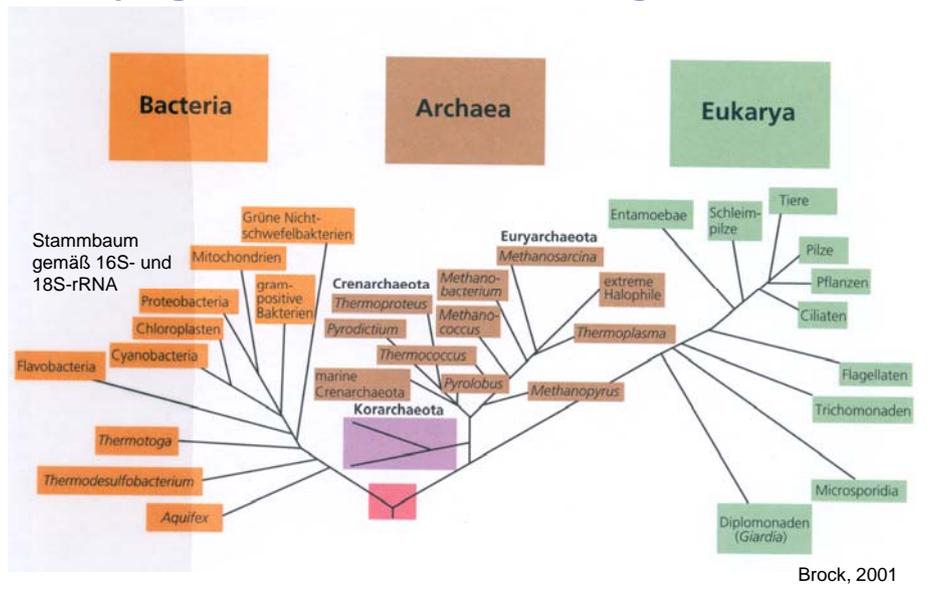


Phylogenetischer Stammbaum



Madigan et al., 2006

Phylogenie der Lebewesen - Allg. Überblick



Aktivitäten in der Mikrobiologie

- Auffinden, Detektieren und Zählen der Mikroorganismen
- Identifizieren und Typisieren der M.Org.
- Entfernen der M.Org. (reinigen, desinfizieren,...)
- Nützen der M.Org. (fermentieren, Biotechnologie..)

Geschichtliches - Meilensteine der Mikrobiologie

1600	A. van Leeuwenhoek	Bakterien
	L. Spallanzani	Bakt. Präparat
1800	E. Jenner	Pockenschutzimpfung
	L. Pasteur	Alkohol. Gärung
	R. Koch	Cholera, TBC
1900	C. Gram	Gramfärbung
	F. Rous	Tumurviren
	E. Behring	Serologie
1920	P. Ehrlich	Immunbiologie
	A. Fleming	Penicillin
	G. Domagk	Sulfonamide
	Watson & Crick	DNA-Struktur
1990	O. Kandler	Archae
	R. Gallo	HIV-Virus
	K.B. Mullis	PCR Technik
	S.B. Prusiner	Prionen

Pioniere der Mikrobiologie und Hygiene



Antony van Leeuwenhoek
(1622-1723)



Ignaz Semmelweis
(1818-1865)

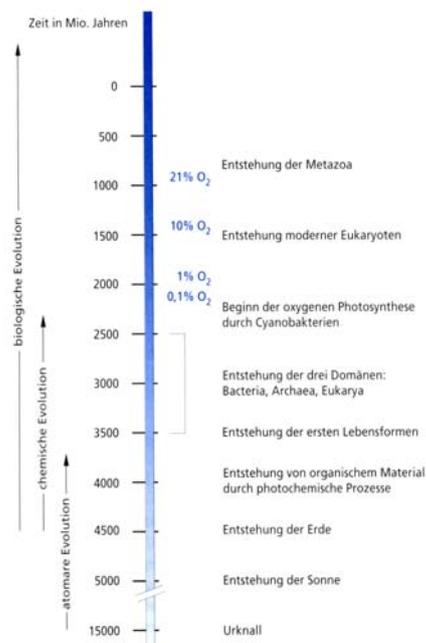


Louis Pasteur
(1822-1895)



Robert Koch
(1843-1910)

Chemische und biologische Evolution der Erde



Munk, 2001

Einteilung der Mikroorganismen

Subzelluläre biologische Objekte

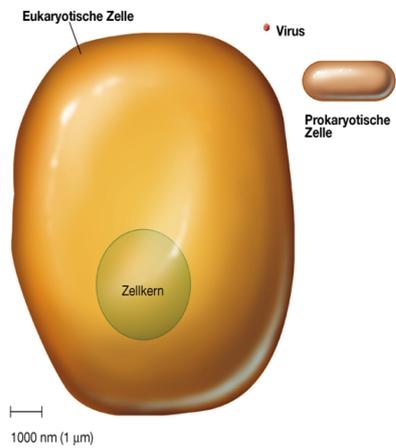
- Viren
- Viroide
- Prionen

Einzellige Mikroorganismen:

- **Prokaryonten**
 - Bacteria (Eubakterien)
 - Archaea (Archaeobakterien)
- **Eukaryonten**
 - Hefen, Mikroalgen, Protozoen,...

Mehrzellige eukaryontische Lebewesen:

- Schimmelpilze,...



Madigan et al., 2006

Einteilung der Mikroorganismen

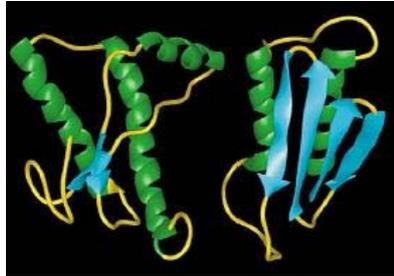
Prionen

< 5 nm

PR oteinhaltiges
I nfectöses Agens
O ohne isolierbare
N ucleinsäure

„proteinaceous infectious agent“
Stanley Prusiner, 1982

Jakob-Creutzfeldt-Erkrankung
BSE, Scrapie
„Kuru“ Disease



**Computerisierte Darstellung
des Prion-Proteinmoleküls:**
links die physiologische („gesunde“),
rechts die pathologische
(„krankhafte“) Form

Quelle: Bhakdi S., Bohl, J. (2002) Deutsches Ärzteblatt

Einteilung der Mikroorganismen

Viroide

< 5 nm

- Fremde Nucleinsäure innerhalb einer Zelle
- Nackte Nucleinsäure ohne Hülle
- Geringe Zellmasse
- Vermehrung noch unklar
- Pflanzenkrankheiten

Einteilung der Mikroorganismen

Viren

20 -200 nm

- Obligate Zellparasiten
- Fertige Partikel mit jeweils 1 Typ Nucleinsäure (DNA oder RNA)
- kein eigener Stoffwechsel
- immer 2 typische Strukturen:
 - Nucleinsäure
 - Kapsid (aus Kapsomeren)
 - verschiedene Formen

Einteilung der Mikroorganismen

Prokaryonten

- Einzellige Lebewesen
- enthalten DNA **und** RNA
- eigener Stoffwechsel
- Vermehrung durch Zweiteilung
- keine eigener Zellkern (ohne Membran)
- entwicklungsgeschichtlich: Vorstufe für Eukaryonten
- Unterteilung in Eubakterien und Archae(bakterien) —→ Extreme Ansprüche

Binäre Nomenklatur

Deutsch	Latein	Beispiel
Reich	Regnum	Bacteria
Abteilung	Divisio	Firmicutes (Gram+)
Klasse	Classis	Bacilli
Ordnung	Ordo	Lactobacill ales
Familie	Familia	Lactobacill aceae
Gattung	Genus	<i>Lactobacillus</i>
Art	Species	<i>acidophilus</i>
Stamm		DSM 590027

Binäre Nomenklatur: Der erste Name bezeichnet hier die **Gattung (Genus)** und der zweite Name gibt die **Art (Species)** an.

2. GRUNDLAGEN DER BAKTERIOLOGIE

Bakterien

- typische Formen (Coccen, Stäbchen)
- typische Zellanordnungen
- typischer Zellwandaufbau
- keine Membran um den Zellkern
- beweglich oder unbeweglich
- typische Antigenmuster ihrer Oberfläche
- typisches Stoffwechselverhalten
- Vermehrung durch Zweiteilung

Formen, Größe und Zellverbände von Bakterien

Morphologie

1. Kugelförmige Bakterien („Kokken“)

einzelnen, paarweise oder in Zellverbänden (Ketten, Haufen, Viererpakete und Trauben)

Durchmesser: ca. 0,5 - 2 µm

Beispiele:

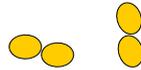
Micrococcus

Streptococcus

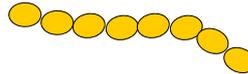
Staphylococcus

Kugelförmige Bakterien („Kokken“)

paarweise: **Diplokokken**



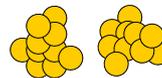
Ketten: **Streptokokken**



Viererpakete: **Sarcinen**



Trauben- und Haufenform: **Staphylokokken**

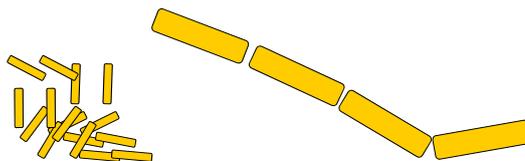


Formen, Größe und Zellverbände von Bakterien

2. Zylinderförmige Bakterien („Stäbchen“)

Gerade Stäbchen

einzelnen oder in Zellverbänden, bevorzugt
in Ketten



Formen, Größe und Zellverbände von Bakterien

	Kurzstäbchen	Langstäbchen
Breite	ca. 0,5 μm	ca. 1 - 1,5 μm
Länge	1,5 - 3 μm	4 - 8 μm
z.B.:	Pseudomonas Serratia Escherichia Enterobacter Proteus	Bacillus Lactobacillus Clostridium

Formen, Größe und Zellverbände von Bakterien

3. Gekrümmte und schraubenförmige Stäbchen

Breite ca. 0,5 - 1 μm
Länge 3 - 6 μm

Beispiele:

Ancylobacter (gekrümmt)
Vibrio (gekrümmt)
Aquaspirillum (spiralförmig)

„Spezialformen“ bei Bakterien

Chlamydien

0,3 - 1 μm



besitzen DNA und RNA , vermehren sich nur **parasitär** in eukaryotischen Zellen, **Entwicklungszyklus** innerhalb der Wirtszelle

Rickettsien

0,3 - 0,7 μm



besitzen DNA und RNA, vermehren sich nur in eukaryotischen Zellen durch Zweiteilung (**kein Entw. Zyklus**)

Mykoplasmen

0,2 - 0,3 μm



Vermehren sich wie Bakterien **extrazellulär**, besitzen jedoch **keine starre Zellwand**, variable Formen (kokkoid bis fadenförmig)

Bakterielle Zellformen

Kokken



rund



nierenförmig



Diplo-
kokken



Staphylo-
kokken



Strepto-
kokken



Tetra-
kokken



Sarcinen

Stäbchen



Stäbchen



fusiform



Vibrionen

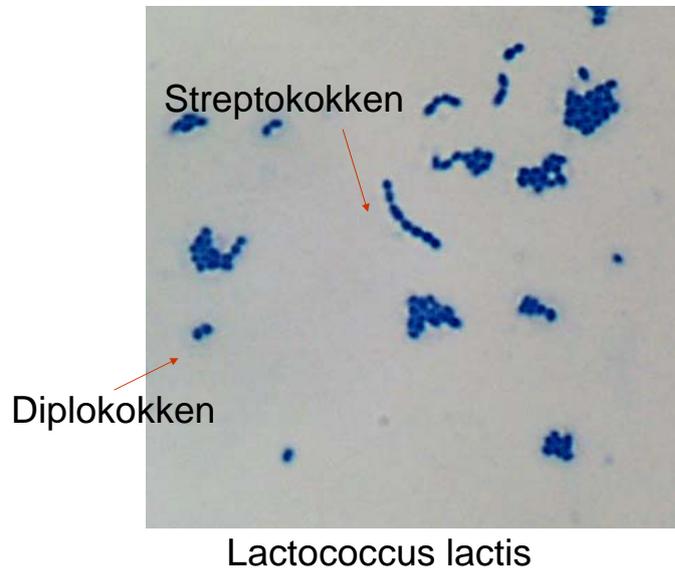


Spirillen
Spirochäten

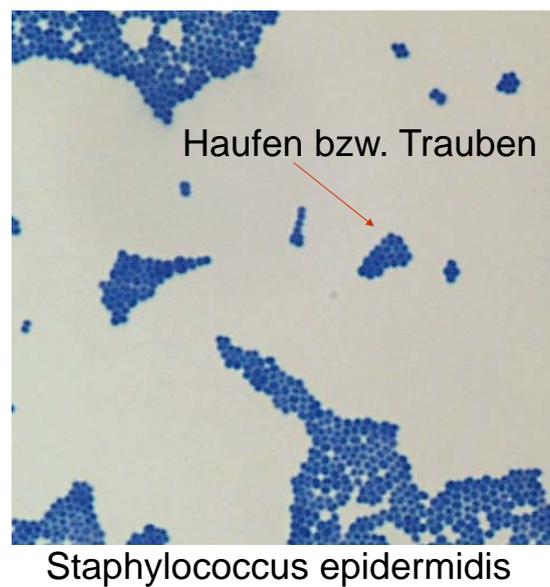


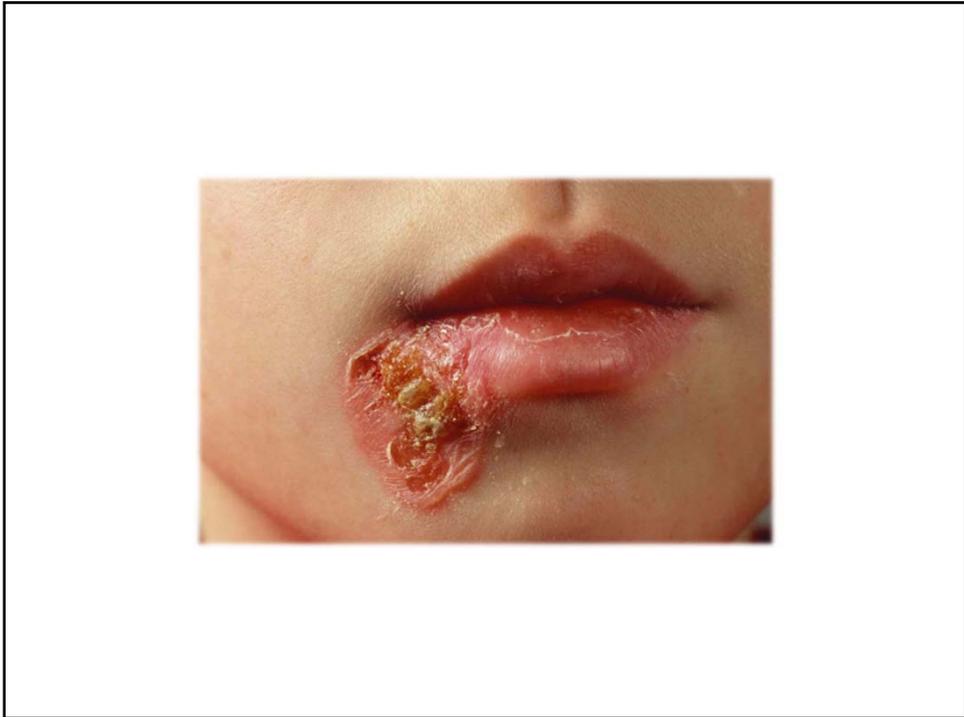
Coryneforme

Bakterielle Zellformen - Beispiele

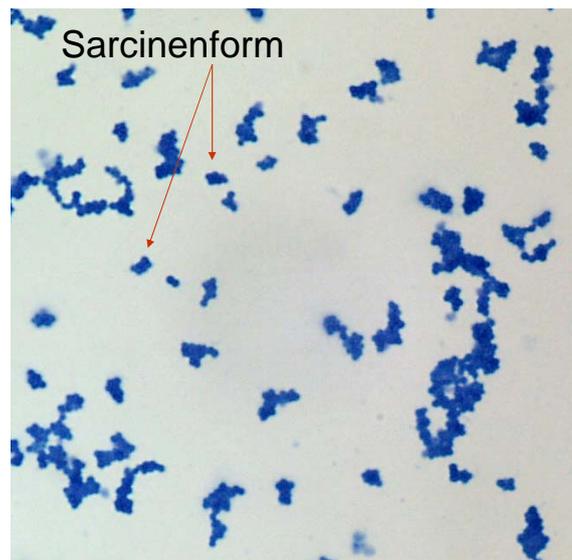


Bakterielle Zellformen - Beispiele



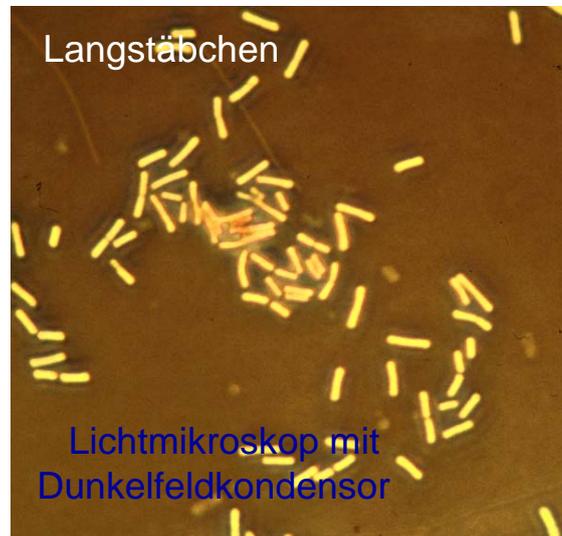


Bakterielle Zellformen - Beispiele



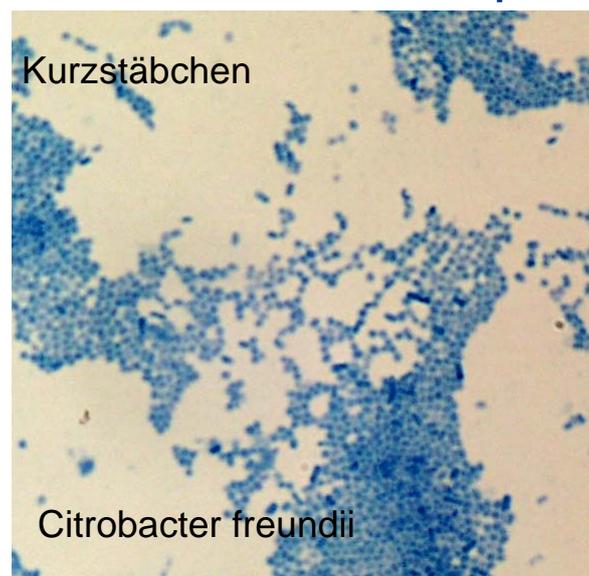
Micrococcus luteus

Bakterielle Zellformen - Beispiele



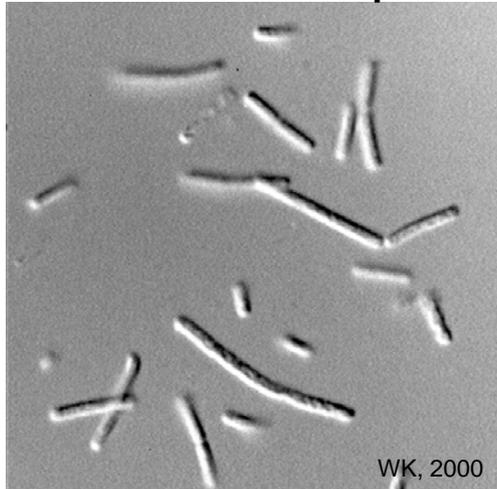
Bacillus subtilis

Bakterielle Zellformen - Beispiele



Bakterielle Zellformen - Beispiele

Lactobacillus acidophilus



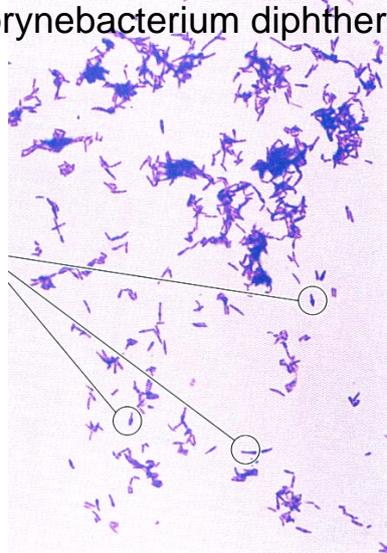
Phasenkontrastmikroskop-Aufnahme



Bakterielle Zellformen - Beispiele

Corynebacterium diphtheriae

Keulenform



Bakterielle Zellformen - Beispiele

Vibrio cholerae



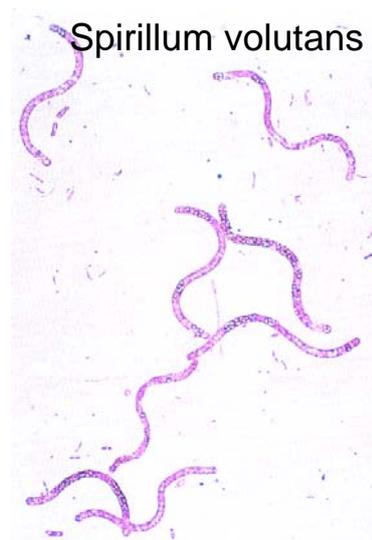
Gekrümmte Stäbchen

Elektronenmikroskopische Aufnahme

Bakterielle Zellformen - Beispiele



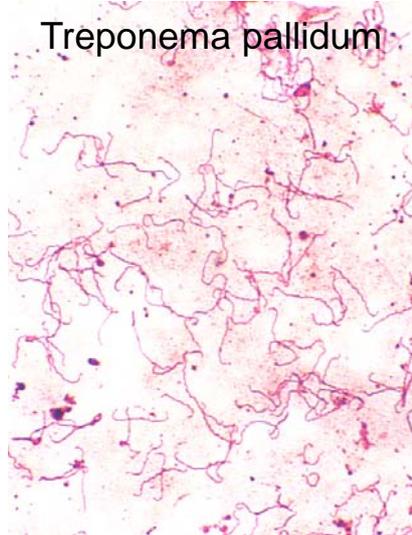
Bakterielle Zellformen - Beispiele



Spirillenform

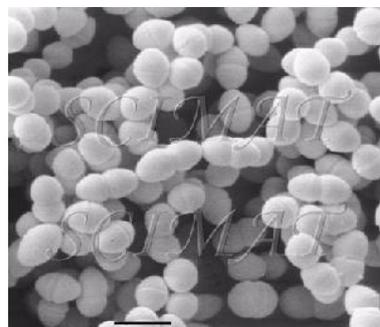
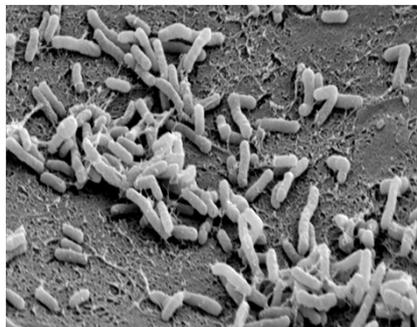
Bakterielle Zellformen - Beispiele

Treponema pallidum



Spirochätenform

Bakterien - kleine Zellen - große Oberfläche !



Bakterienvolumen: ca. $1 \mu\text{m}^3$

Erklärung:

Würfel: Kantenlänge 1 cm (Vol. 1 cm^3)
unterteilt in μmergibt 10^{12} Würfel á $1 \mu\text{m}^3$

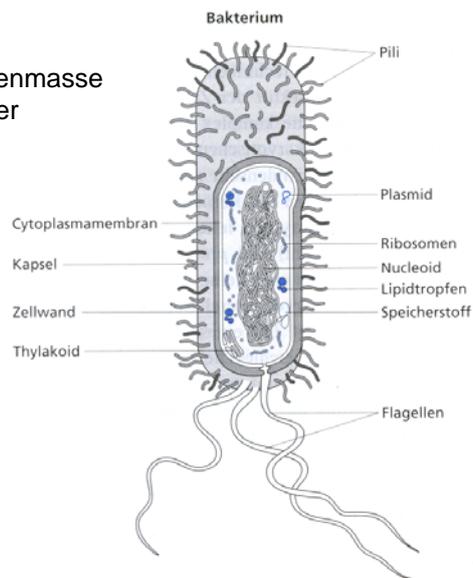
Vergrößerung der Oberfläche
 1 cm^3 -Würfel gegenüber $10^{12} \mu\text{m}^3$ -Würfel:



FAKTOR 10.000

Aufbau einer Bakterienzelle

30 - 15 % Trockenmasse
70 - 85 % Wasser



Munk, 2001

Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Bakterienzelle



Aufbau einer Bakterienzelle

Tabelle 2.2: Chemische Zusammensetzung einer prokaryotischen Zelle^a

Molekül	Prozent Trockengewicht ^b	Moleküle pro Zelle	unterschiedliche Arten
Makromoleküle insgesamt	96	24610000	etwa 2500
Protein	55	2350000	etwa 1850
Polysaccharide	5	4300	2 ^c
Lipid	9,1	22000000	4 ^d
Lipopolysaccharid	3,4	1430000	1
DNA	3,1	2,1	1
RNA	20,5	255500	etwa 660
Monomere insgesamt	3		etwa 350
Aminosäuren und Vorläufer	0,5		etwa 100
Zucker und Vorläufer	2		etwa 50
Nucleotide und Vorläufer	0,5		etwa 200
anorganische Ionen	1		18
insgesamt	100		

^a Daten aus: Neidhardt, F. C. et al. (Hrsg.) *Escherichia coli and Salmonella typhimurium – Cellular and Molecular Biology* (2. Aufl., American Society for Microbiology, Washington, DC.) 1996.

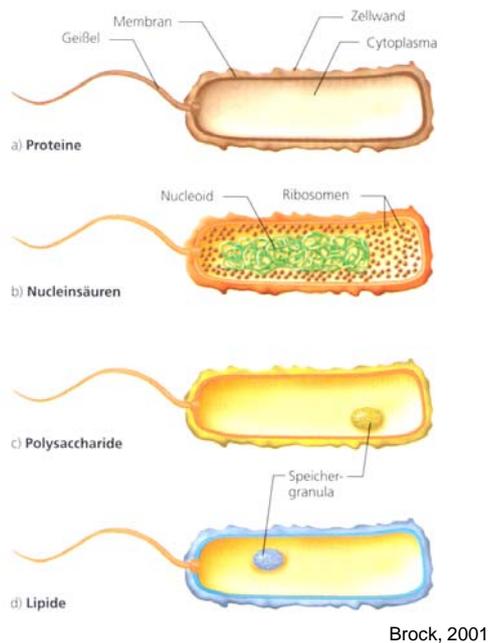
^b Trockengewicht einer aktiv wachsenden *E. coli*-Zelle: etwa $2,8 \times 10^{-13}$ g; Gewicht insgesamt (70 % Wasser): $9,5 \times 10^{-13}$ g.

^c Unter der Annahme, dass Peptidoglykan und Glykogen die wichtigsten Polysaccharide sind.

^d Es gibt mehrere Arten von Phospholipiden in jeweils unterschiedlichen Ausprägungen, da die Zusammensetzung der Fettsäuren von Spezies zu Spezies und je nach Wachstumsbedingung variiert.

Brock, 2001

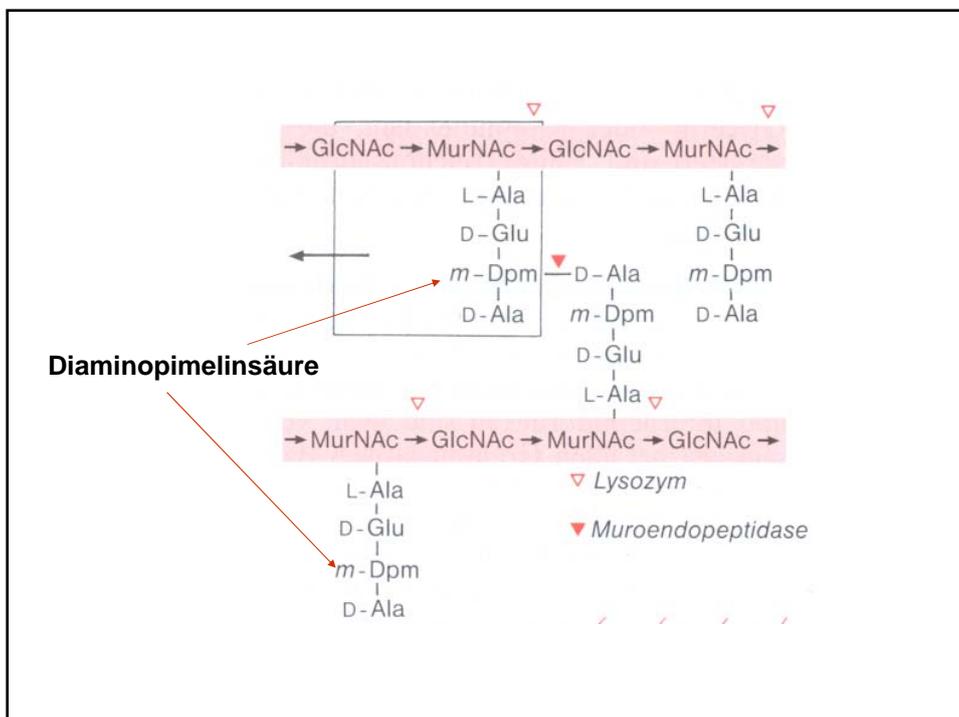
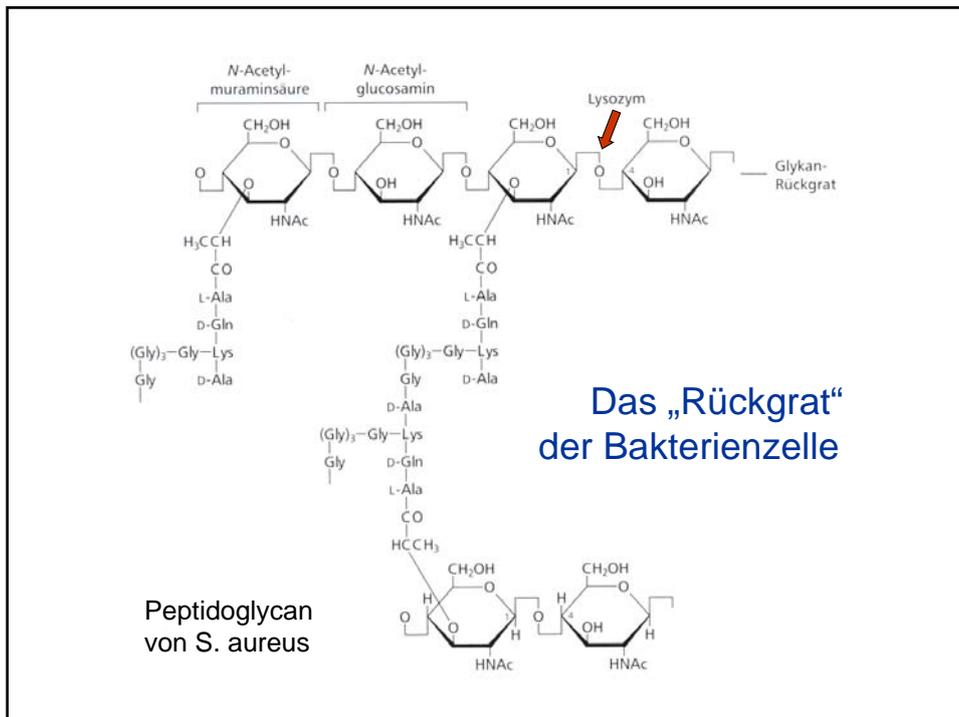
Aufbau einer Bakterienzelle

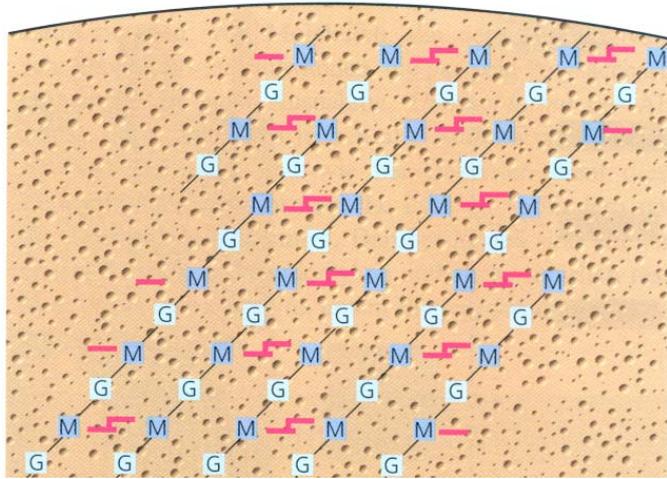


Die bakterielle Zellwand - Grundcharakteristik

- dünn
- elastisch
- stabilisierend
- durchlässig für Nährstoffe
- Grundgerüst: „Murein-Sacculus“
Peptidoglycan (Polymer) aus Zuckern und Aminosäuren (Zus.setzung variabel, > 100 Arten)

➔ N-Acetylglucosamin
N-Acetylmuraminsäure
β-1,4 glycosidisch verknüpft



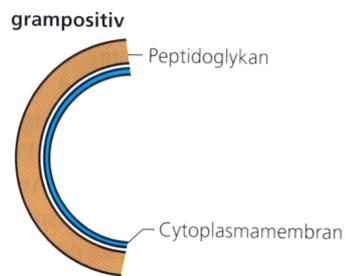


G...N-Acetylglucosamin
M...N-Acetylmuraminsäure
—...Peptidbindungen

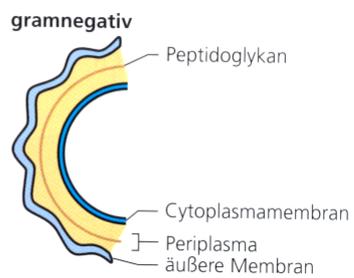
Brock, 2001

Unterschiede im Zellwandaufbau

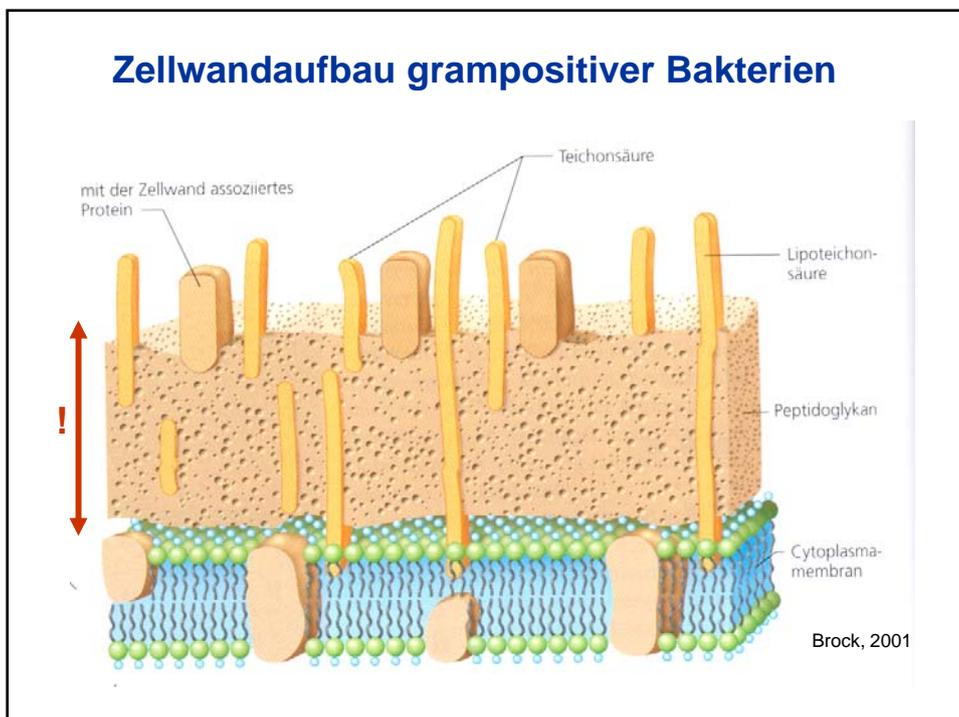
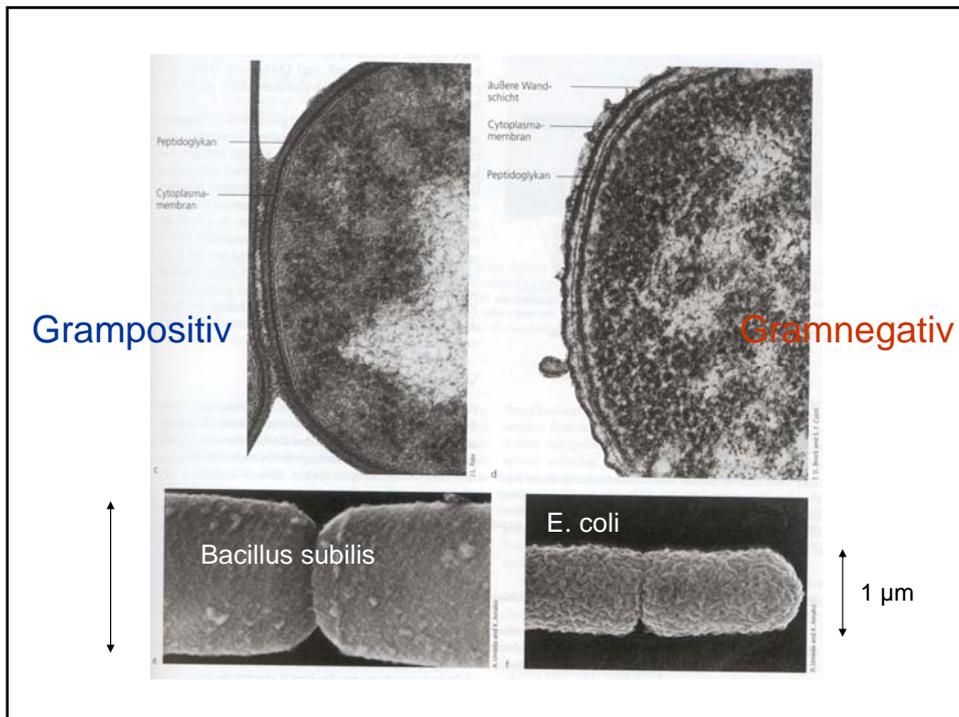
Auswirkung auf die Gram-Reaktion



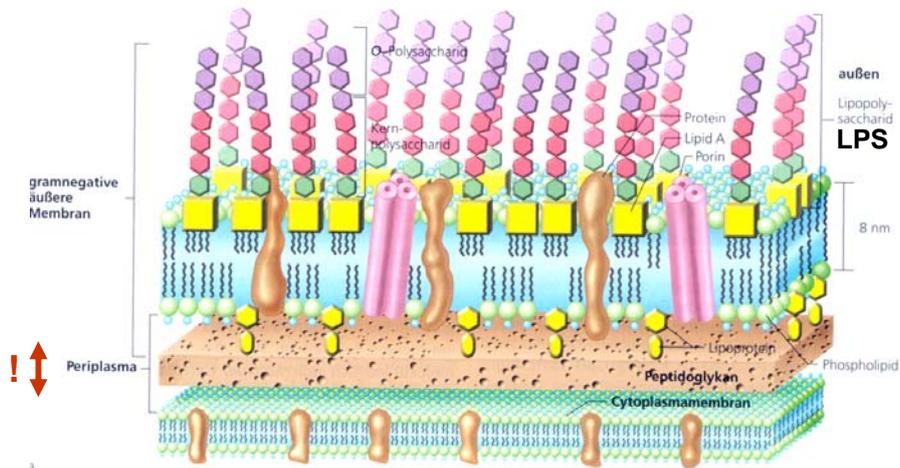
ca. 20-30 nm DM



ca. 2 nm DM



Zellwandaufbau gramnegativer Bakterien



Brock, 2001

➡ Periplasmatischer Raum bei Gram-neg.

Zellwandaufbau der Archaeen

Große Vielfalt !

Bei einigen Arten:

- Pseudopeptidoglycan
- Polysaccharidstruktur
- Bestandteile:

N-Acetylglucosamin

N-Acetyltalosaminuronsäure

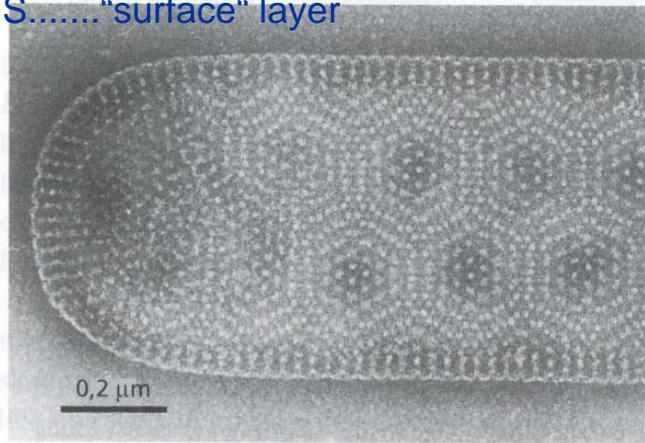
β -1,3-verknüpft

Ebenfalls möglich:

- parakristalline Oberflächenschichten („S“)

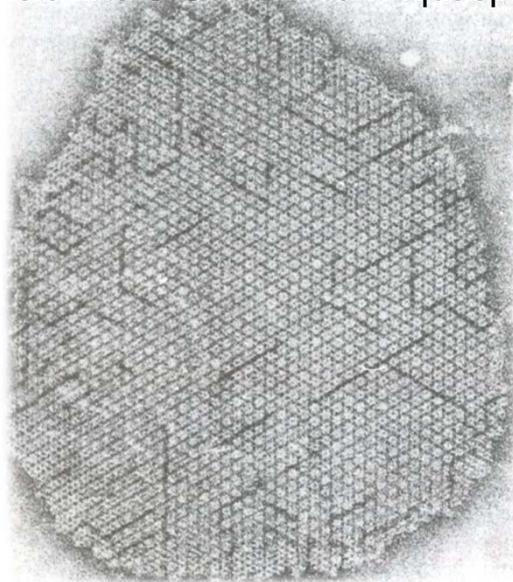
Parakristalline S-Schicht von Thermoproteus

S....."surface" layer



Munk, 2001

Parakristalline S-Schicht von Aquaspirillum



Besonderheiten im Zusammenhang mit den unterschiedlichen Zellwandaufbauformen

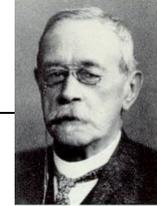
„Stichwortliste“

- Lysozym
- Gramreaktion
- Antibioticaempfindlichkeit
- LPS/Endotoxine
- Aminopeptidase-Reaktion
- Coryneforme Bakterien
- Protoplasten, Sphäroplasten

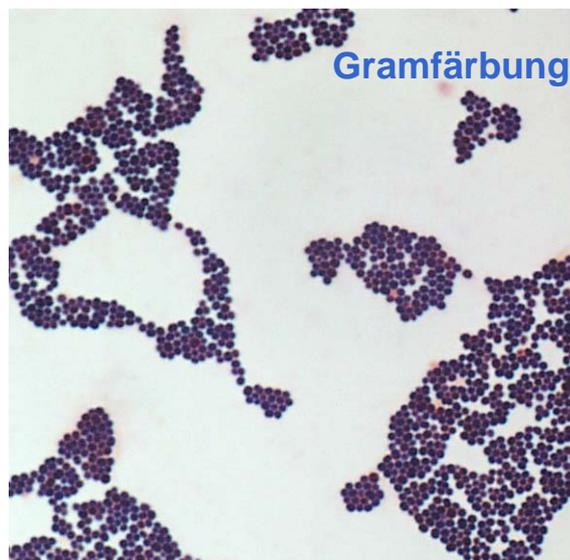
Lysozym

- N-Acetyl-Muramylhydrolase (Enzym)
- spaltet β -1,4-Bindung zwischen N-Acetylglucosamin u. N-Acetylmuraminsäure
- Vorkommen: Tränenflüssigkeit
Hühnereiklar

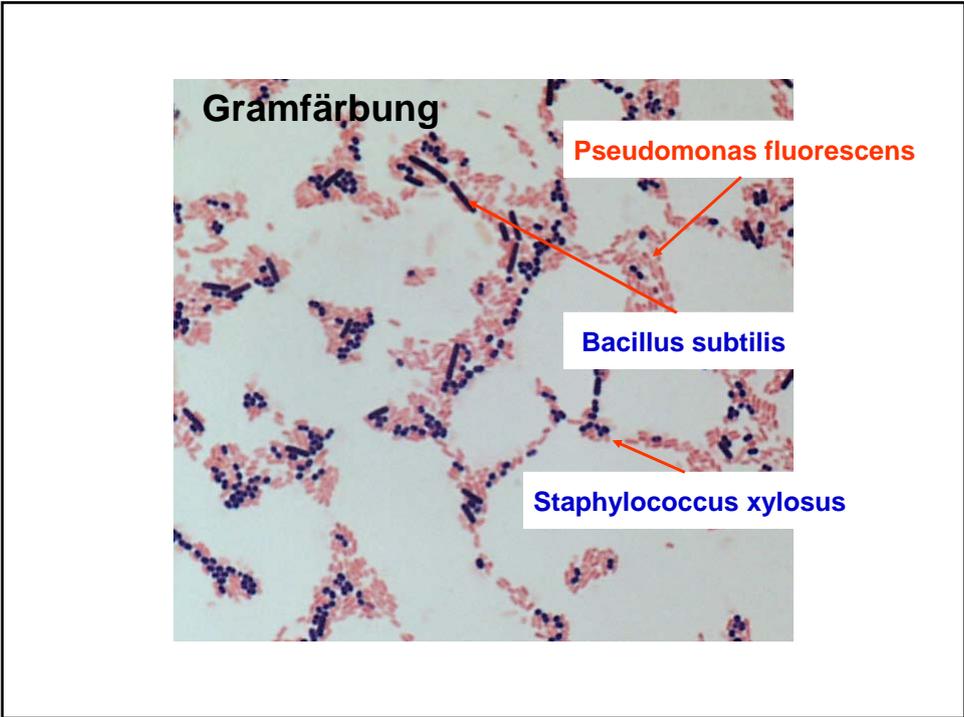
Die Gramfärbung



- H.C. Gram, 1884
- bakterielle Diagnostik
- unterschiedliches Färbeverhalten, bedingt durch Zellwandaufbau
- Alter der Bakterienkultur beeinflusst Färbeverhalten
- säurefeste Bakterien nicht Gram-differenzierbar (z.B. Nocardia, Mycobacterium) → Ziehl-Neelsen-Färbung
- Coryneforme Bakterien ebenfalls nicht Gram-differenzierbar

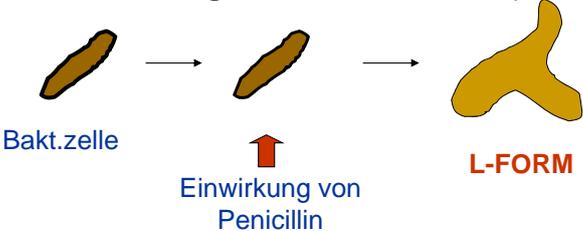


Staphylococcus epidermidis

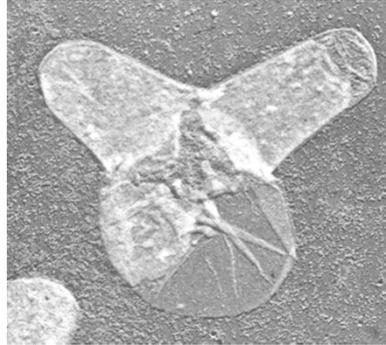


Antibioticaempfindlichkeit

- „Medizinische Achillesferse“
- Antibiotica (bakt. Zellwandsynthetase-Hemmer)
- Schritt der sogen. **Transpeptidierung** blockiert
- Ausbildung von „**L-Formen**“ (...large)



E.coli Zelle
nach Einwirkung von Penicillin



9000-fache Vergrößerung

Schlegel, 1992

Antibiotica:

Hemmung der bakteriellen Zellwandsynthese

- Penicilline (β -Lactam-Antibiotica)
- Cephalosporine
- Monobactame/Carbapeneme
- Glycopeptide

LPS / Endotoxine

- Bestandteil der gramnegativen Zellwand
- nach dem Tod der Bakterienzelle freigesetzt
- aktives exogenes **Pyrogen**
- regt im menschl. u. tier. Organismus die Bildung von Cytokinen an
- führt letztlich zum Temperatur(Fieber)anstieg
- LPS-Nachweis mittels **Limulustests**



Aminopeptidase

- typisches Enzym der gramnegativen Zellwand
- gramnegative Bakterien zeigen starke Aktivität
- Alternative/Ergänzung zur Gramfärbung

Coryneforme Bakterien

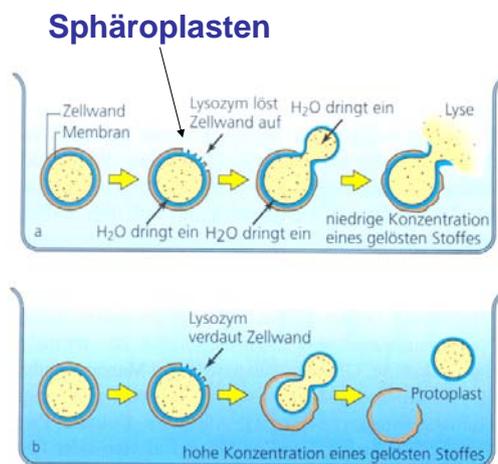
- Peptidoglycan-Schicht mit Arabinogalactan vernetzt
- Ausbildung wachsartiger Polymere
- Gramfärbung funktioniert nicht

Protoplasten

Def.: Zelle ohne Zellwand, z.B.nach Einwirkung von Lysozym



Osmotischer Druck



3.34 Protoplasten. a) In wässriger Lösung setzt die Zerstörung der Zellwand den Protoplasten frei, er lysiert aber sofort, weil die Cytoplasmamembran sehr schwach ist. b) In einer Lösung, die hohe Konzentrationen eines gelösten Stoffes wie Saccharose enthält, dringt kein Wasser in den Protoplasten ein; er bleibt daher stabil.



Mycoplasmen

im Grunde genommen freilebende, sehr kleine, parasitäre Protoplasten, die durch Zellwand-orientierte Antibiotica (z.B. Penicillin) nicht beeinträchtigt werden („Weichhäuter“....*Mollicutes*)

3. ZELLSTRUKTUREN

Das Gen - die funktionelle Einheit der genetischen Information

- bestimmt die Aminosäure-Zusammensetzung von Proteinen und Peptidketten
-Proteine enthalten 20 verschiedene Aminosäuren
-Proteine enthalten Hunderte von Aminosäureresten

Die Pioniere der Aufklärung der DNA-Struktur



James Dewey Watson

James Watson entdeckte 1953 in der Zusammenarbeit mit Francis Crick den Aufbau und die Struktur der DNS am Cavendish-Labor der Universität Cambridge. Das war die Geburtsstunde der modernen Genetik auf molekularer Ebene. Gemeinsam mit Francis Crick und Maurice Wilkins erhielt er 1962 den Nobelpreis für Physiologie.



Francis Crick

Francis Crick wirkte gemeinsam mit James Watson an der Entdeckung der DNS-Struktur, die 1953 publiziert wurde, mit. Anhand von kristallographischen Untersuchungen und Modellen zeigten sie, dass die Moleküle der DNS die Grundstruktur einer Doppelhelix, einer in sich verdrehten Strickleiter, aufweisen. Gemeinsam mit James Watson und Maurice Wilkins erhielt er 1962 den Nobelpreis für Physiologie.

Das bakterielle Genom^{*)}

Zellkern ohne Zellmembran

- Träger der genetischen Information
- Makromolekül: **Desoxyribonucleinsäure** (DNA)
- besteht aus

Desoxyribose
Phosphorsäure

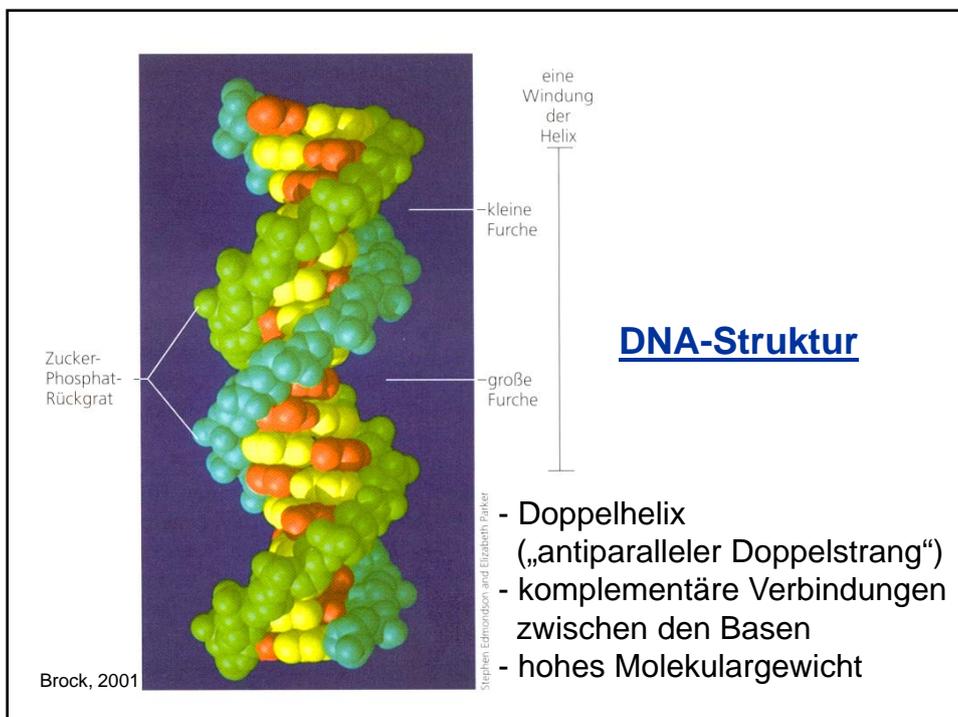
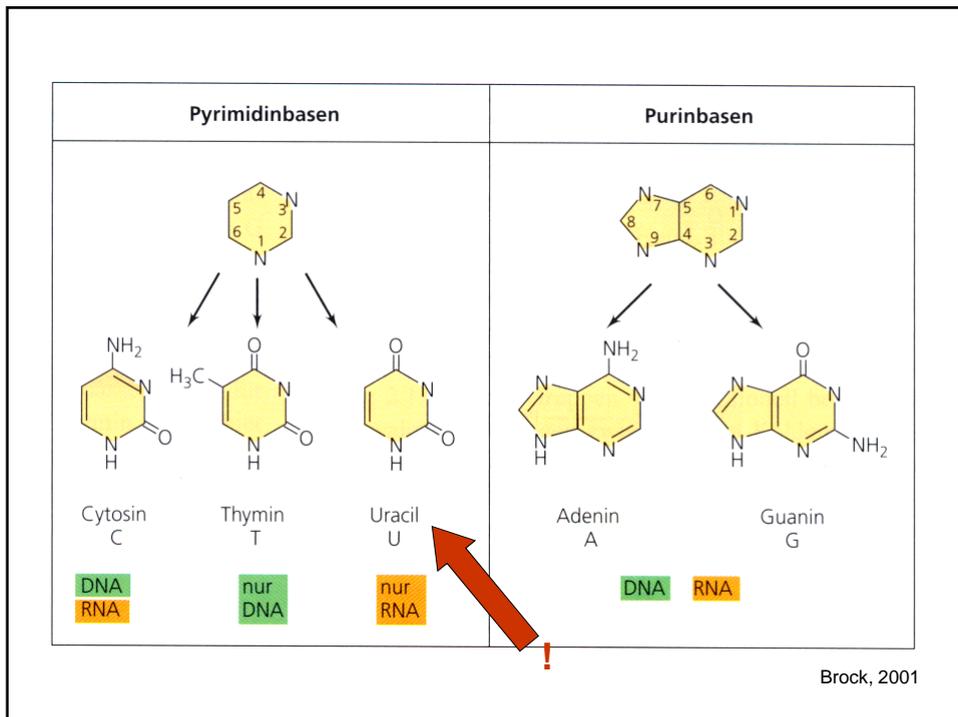
Purinbasen
Pyrimidinbasen

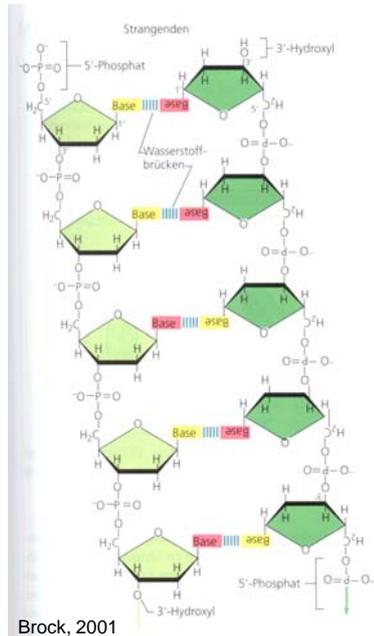
Adenin
Guanin

Cytosin
Thymin (Uracil)

- paarweise Vernetzung durch H-Brückenbindung
- genetische Information auf Basis der Basenfolge festgelegt
- Größe: 0.8 bis 8 Mio. Basenpaare

^{*)} Winkler, 1920





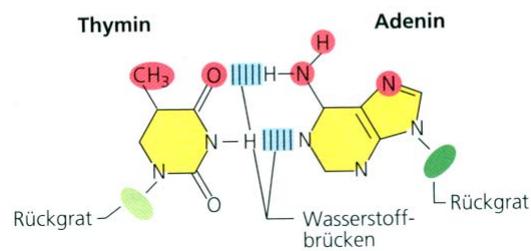
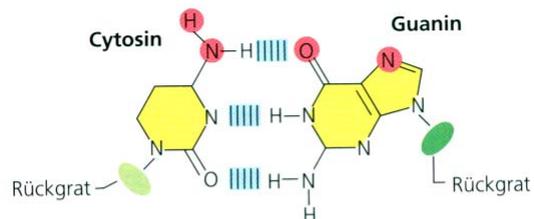
DNA-Struktur

- Nucleotidstrang
 - Basenpaare.....
 -Kilobasenpaare (kbp)
- 1000

Beispiel:

- E.coli-Genom: 1.000.000
- ca. 4600 Mbp
 - pro bp ca. 0.34 nm lang
 - pro Helixdrehung: 10 bp

Anordnung der Basenpaare



Brock, 2001

Taxonomische Bedeutung des Genoms

- Genomaufklärung revolutionierte Systematik
- „GC-Gehalt“ (Guanin/Cytosin) der DNA typisch für alle Lebewesen

$$(G+C) / (A+T+G+C) \times 100 = \text{GC-Gehalt in \%}$$

- heute eines der wichtigsten taxonomischen Merkmale
- unterschiedliche Spannweite !

Anteil der Basen Guanin und Cytosin an der Gesamtheit aller Basen

Gruppe	GC-Gehalt (mol%)
--------	------------------

Tiere	35 - 43
Pflanzen	33 - 57
Algen	35 - 68
Pilze	21 - 60
Einzellige Eukaryonten	21 - 66
Bakterien	20 - 78
Archae	26 - 61

Quelle: Munk, 2001

Genetischer Informationsfluss in der Bakterienzelle

➔ 3 Stadien:

➔ Proteinbiosynthese

Replikation



Transkription

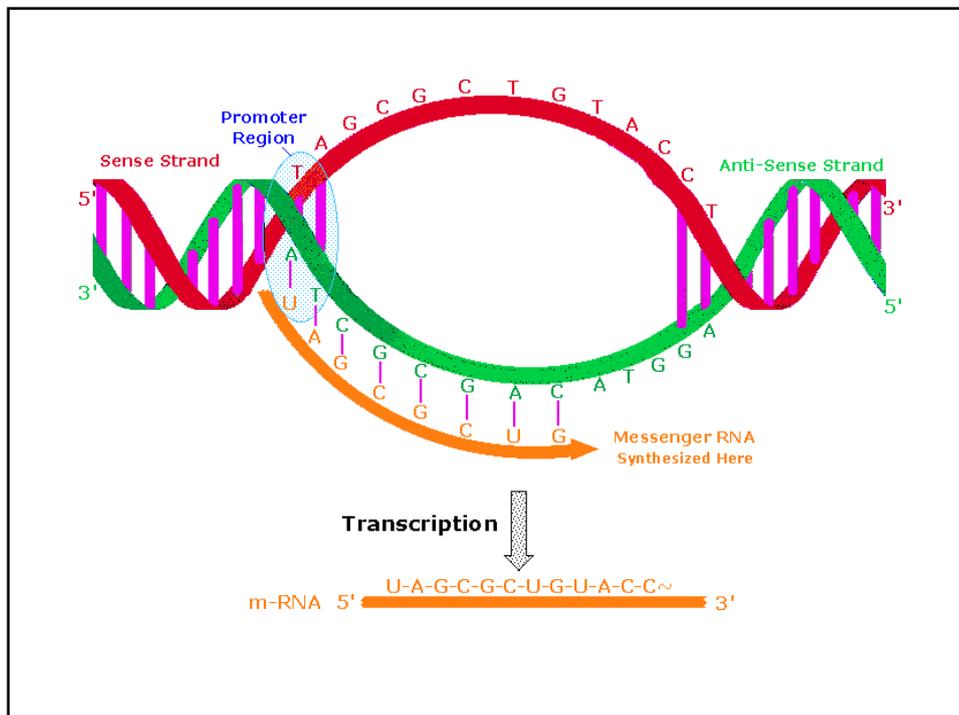


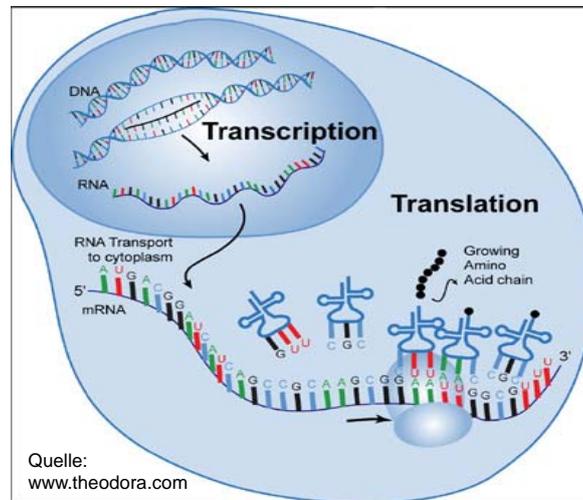
Translation

DNA verdoppelt sich, es entstehen 2 Doppelhelices, d.h. aus 2 Strängen werden 4 !

Ausbildung einer einzelsträngigen **Messenger RNA (mRNA)**, mit der die genet. Information vom DNA-Strang weitergeleitet wird.

Erstellung spezifischer Aminosäuresequenzen auf Basis der Basenfolge (**genetischer Code**)....Polypeptidkette, unter Beteiligung der **Transfer-RNA**





Messenger RNA ...Kopie eines DNA Segments, Basis für ein best. Protein
Transfer RNA ... unterstützt den Transport von Aminosäuren zu den Ribosomen, um dort Proteine zu synthetisieren
Ribosomale RNA ...Bestandteil der Ribosomen, dient der Synthese von Proteinen

Genetischer Code

- 3 mRNA-Basen codieren 1 Aminosäure
- „Proteinsyntheseapparat“ übersetzt Code in die Proteinform
- **CODE = CODON = TRIPLETT**
- 4 Basen → 4^3 Möglichkeiten → **64**
- zusätzlich Startcodons und Stoppcodons
- Beispiele: (AUG) (UAG, UAA, UGA)
- Glycin.....GGA
- Arginin.....CGA
- Tyrosin.....UAC
- Ort der Synthese: **Ribosomen**
- Beteiligung der **Polymerasen**

Ribosomen

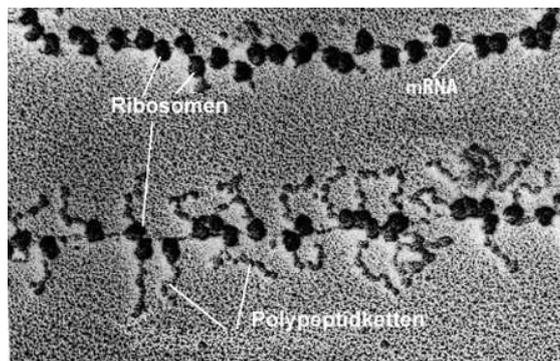
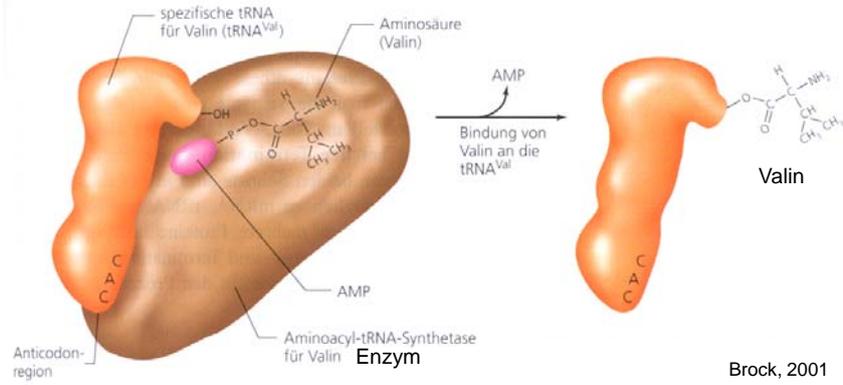
- Orte der Proteinbiosynthese bei den Pro- (und Eukaryonten)
- Träger der RNA
- Aufbau aus Untereinheiten mit unterschiedlicher Größe (Sedimentationsverhalten, „S“...Svedberg-Einheit)
- Antibioticaempfindlichkeit
- in stärkster bakterieller Wachstumsphase: viele Ribosomen.....**Polysomen**

Transfer-RNA (tRNA):

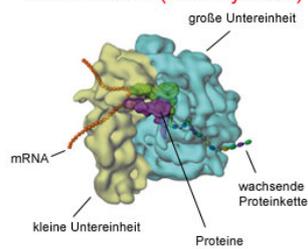
- bestimmte Enzyme bringen tRNA und ihre spezifische Aminosäure zusammen
- ATP fungiert als Aktivator



Beispiel für die Katalyse der Aminosäure Valin



70s Ribosom (Prokaryonten)



Angabe des Sedimentationskoeffizienten in „Svedberg-Einheiten“ (10^{-13}s)

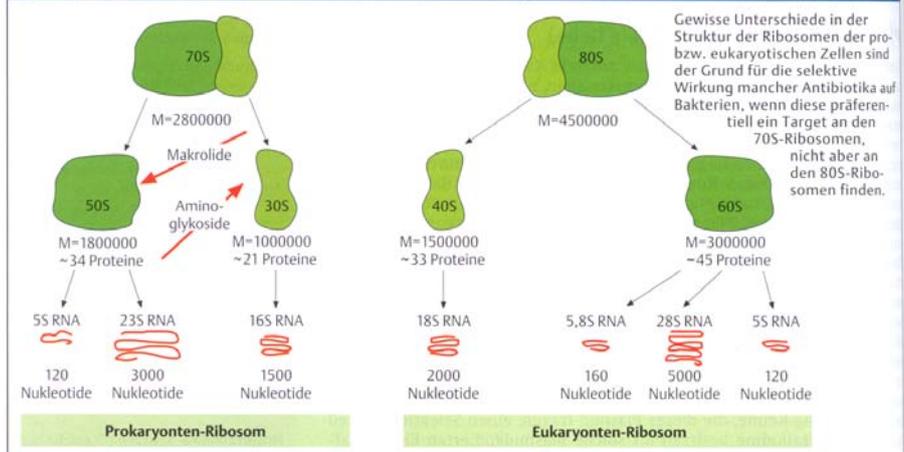


Theodor Svedberg (1884-1971)



Ultrazentrifuge

118 Synopsis Aufbau der 70S-Ribosomen der Prokaryonten im Vergleich zu den 80S-Ribosomen der Eukaryonten



Hof, Müller, Dörries, 2000

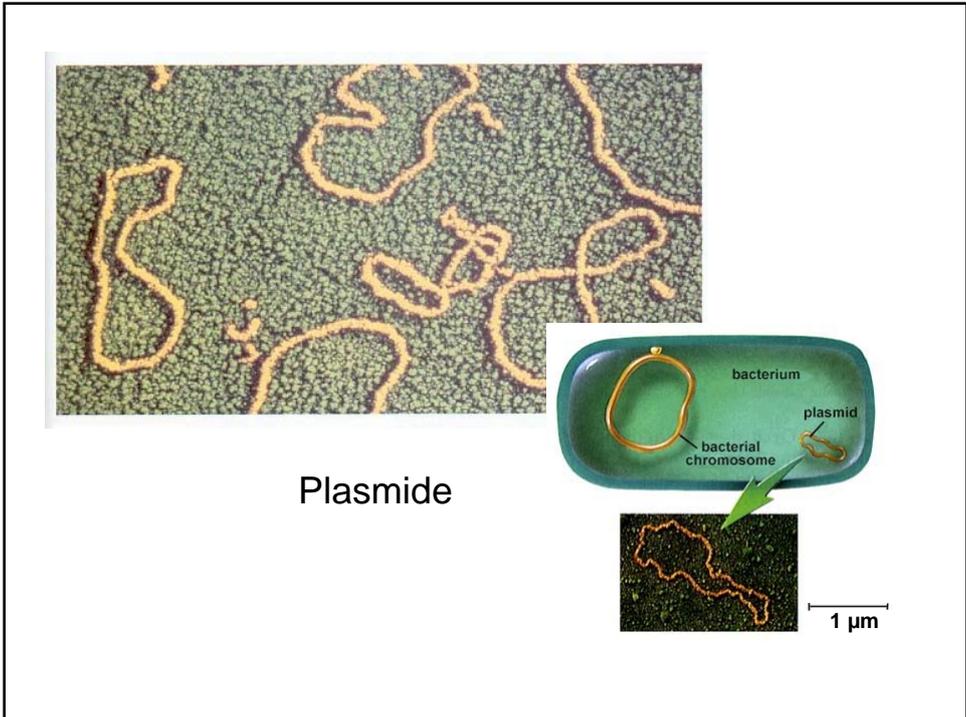
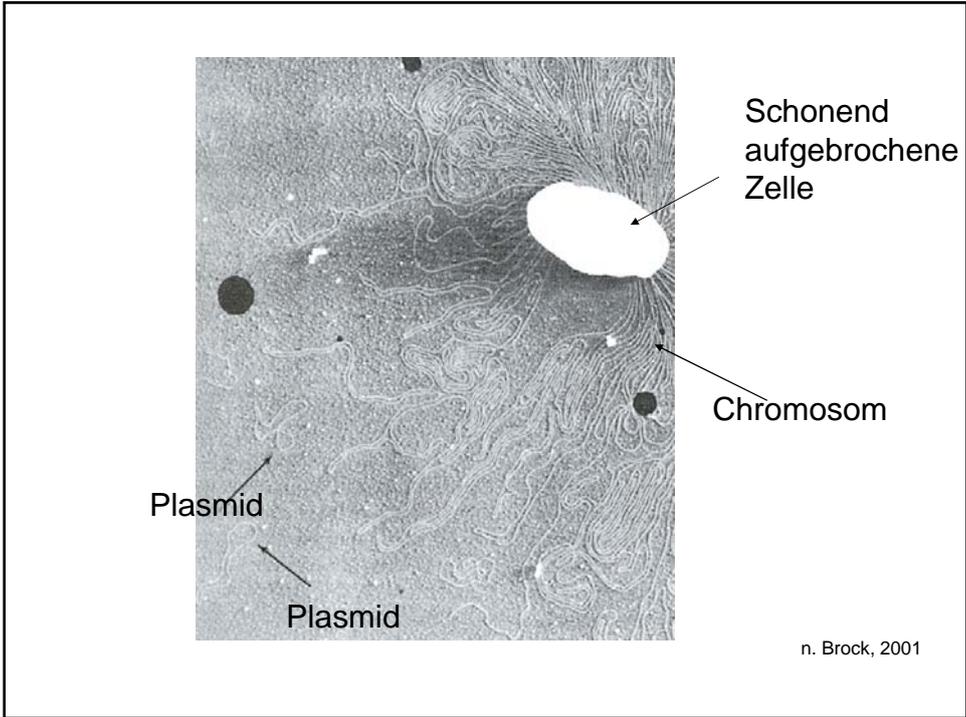
Antibiotica:

Hemmung der bakteriellen Proteinbiosynthese

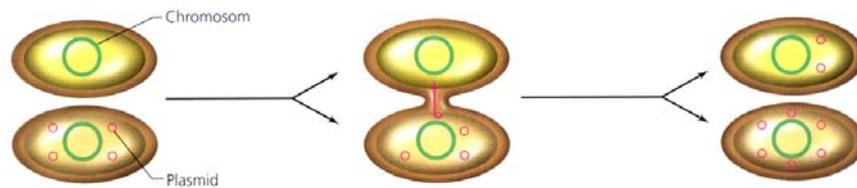
- Aminoglycoside
- Makrolide
- Lincosamide
- Tetracycline
- Chloramphenicol
- Oxazolidone
- Ketolide
- Streptogamine

Plasmide

- kleine genetische Elemente, die vom eigentlichen Chromosom getrennt sind
- doppelsträngig
- unterschiedliche Größe (wenige bis tausende kb)
- meist zirkuläre Form, selten linear („Haarnadelstruktur“)
- verantwortlich für bestimmte **Eigenschaften**
- replizieren sich autonom
- Austausch von Plasmiden zwischen Bakterienzellen möglich (**Konjugation**)
- **Episome**: im Chromosom integriertes Plasmid



Übtragung von Plasmiden durch Zellkontakt während der Konjugation



n. Brock, 2001

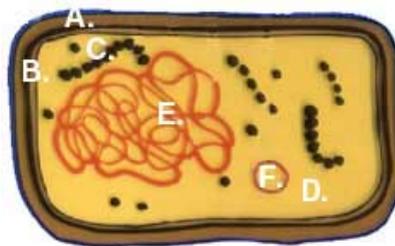
Kategorien von Plasmiden

- **Metabolische Plasmide** Gene für die Metabolisierung von Nährstoffen, Synthese von Bacteriocinen
- **Resistenzplasmide** gegen Schwermetalle, Antibiotica
- **Virulenzplasmide** für pathogene Eigenschaften, z.B. die Kolonisierung von Wirtszellen
- **Toxinbildungsplasmide** codieren Synthese von Toxinen, z.B. Enterotoxin oder B. thuringiensis-Toxin
- **Kryptische Plasmide** verleihen der Zelle keine neuen Eigenschaften

Cytoplasma

- flüssiger Anteil der Zelle, die durch Cytoplasmamembran begrenzt wird
- enthält verschiedene Organellen
- Hauptanteil: Wasser, daneben Makromoleküle, Ribosomen, kl. organische Substanzen, anorganische Ionen
- reagiert auf osmotische Einflüsse

Bakterielle Zelle



- A Zellwand
- B Cytoplasmamembran
- C Ribosomen
- D Cytoplasma
- E Chromosom
- F Plasmid

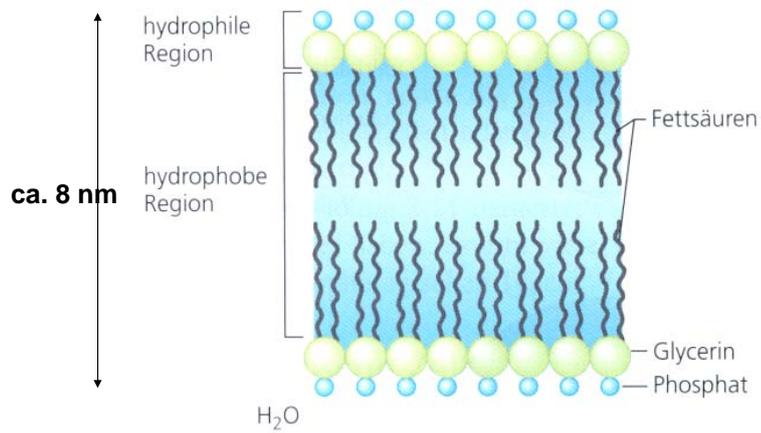
Cytoplasmamembran

- semipermeable Lipiddoppelschicht:
 - nach außen : hydrophil
 - nach innen: hydrophob
- Sitz des „Permeasesystems“  
- selektive osmotische Schranke
- Barriere nach innen und nach außen:
 - verhindert „Auslaufen“ und dient dem Transport von Nährstoffen hinein und hinaus
- eingelagerte Proteine
 - wichtig für Transport („Carrier“), Bioenergetik, Chemotaxis

Cytoplasmamembran: Weitere wichtige Funktionen

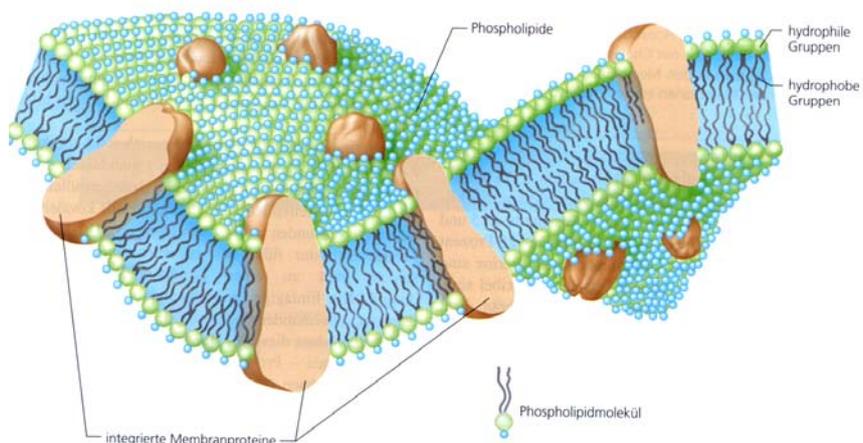
- Stoffwechselregulation
 - Elektronentransport
 - Oxidative Phosphorylierung
 - bzw. Energiegewinnung (ATP)
- Rolle bei der Endosporenbildung
- empfindlich gegen oberflächenaktive Substanzen u. einzelne Antibiotica

Grundstruktur der Phospholipid-Doppelschicht der Cytoplasma-Membran



Brock, 2001

Schema der Cytoplasmamembran



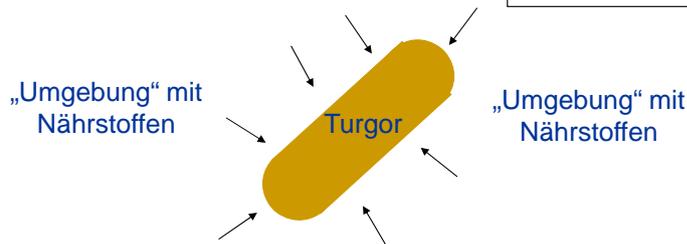
Brock, 2001

Turgor

- Innendruck innerhalb der bakteriellen Zelle
- Osmotische Verhältnisse:

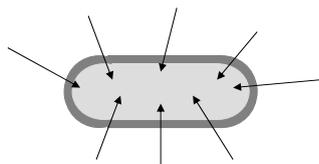
Wassermoleküle
gelöste Teilchen

Diffusion
Permeation
aktiver Transport (Carrier)



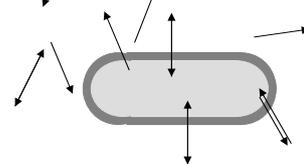
Einfluss des osmotischen Drucks auf Mikroorganismenzellen

Normale hypotonische Umgebung
(außen niedrigere Konz. als innen)

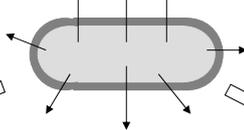


Wassereintritt durch Osmose,
semipermeable Zellmembran,
Stabilisierung durch Zellwand

Isotonische Umgebung
(Gleichgewicht zy. Innen und außen)



Hypertonische Umgebung
(außen höhere Konz. als innen)



(mod. n. Garbutt, 1997)

Plasmolyse



Grampositive Bakterien
Hefen
Schimmelpilze

Zellschrumpfung

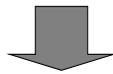


Gramnegative Bakterien

Einschlüsse im Cytoplasma

Verbindungen aus:

- Kohlenstoff
- Stickstoff
- Schwefel
- Phosphor

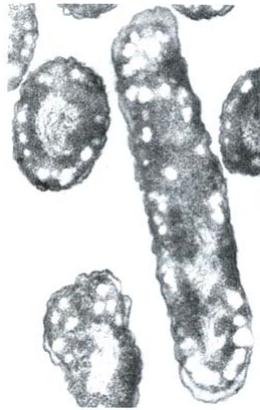


Reservfunktion

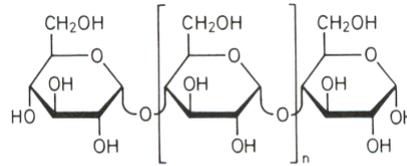
Einschlüsse/Reservestoffe

- Stärke
- Glykogen
- Fettgranula u. -tröpfchen
- Poly-β-Hydroxybuttersäure (PHB)
- Neutralfette u. Wachse
- Polyphosphate
- Schwefelkügelchen
- Parasporale Kristalle
- Gasvakuolen
- Carboxysomen
- Cyanophycingranula

Stärke / Glykogen



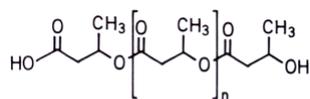
Glykogeneinschlüsse
in E. coli



Stärke, Glykogen

Schlegel, 1992

PHB

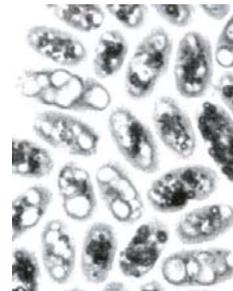


Poly- β -hydroxybuttersäure ($n \approx 60$)

- Thermoplastische Eigenschaften
- Plastikersatz
- Biokompatibilität (Medizintechnik)



PHB in Zellen von
Alcaligenes eutrophus



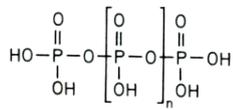
PHB in Zellen von
Chromatium

Industrielle Nutzung:
100 g Zucker \rightarrow 30 g PHB

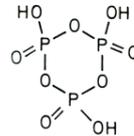
Schlegel, 1992

Polyphosphate

- erstmals bei *Spirillum volutans* beschrieben
→ „Volutinkörner“
- Typische Anfärbbarkeit mit Farbstoffen
(Methylenblau, Toluidinblau)
- langkettige u. ringförmige Phosphate



Polyphosphat



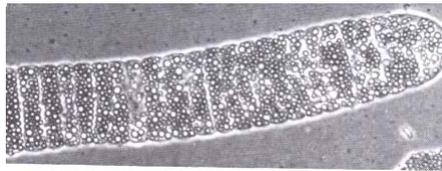
Trimetaphosphat



Volutinkörner in *Spirillum volutans*

Schwefel

- bei Sulfid-oxidierenden Bakterien
- temporäre Schwefelkügelchen
- Energiequelle

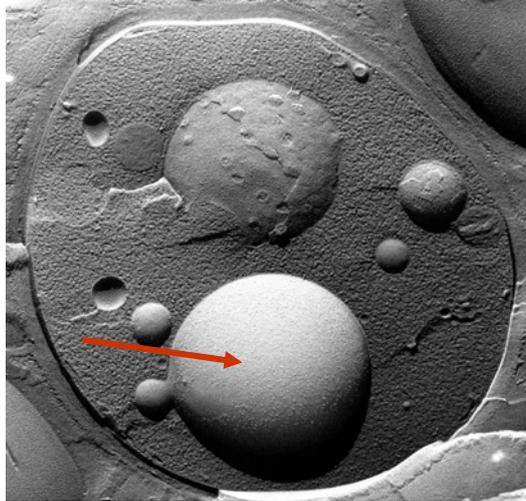


Schwefeleinschlüsse bei
Beggiatoa gigantea

Schlegel, 1992

Gasvakuolen

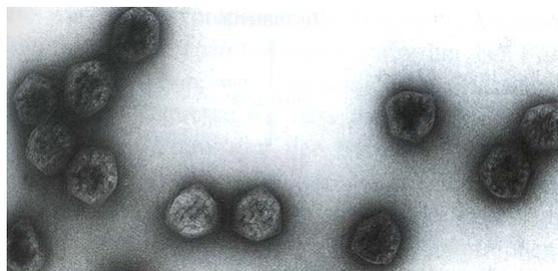
- verleihen Schwebefunktion
- bestehend aus ein od. mehreren Gasvesikeln
- spindelförmige Vesikel mit Proteinwand (2 nm)
- bei vielen Wasserbakterien



Vakuole in einer Hefezelle
(rasterelektronenmikroskopische Aufnahme)

Carboxysomen

- polyedrische Gebilde
- Größe: durchschn. ca. 100 nm
- bei Cyanobakterien, nitrifizierenden Bakt.
- dienen der Fixierung von CO₂



Präparat von Carboxysomen
aus *Thiobacillus neapolitanus*

Brock, 2001

Cyanophycingranula

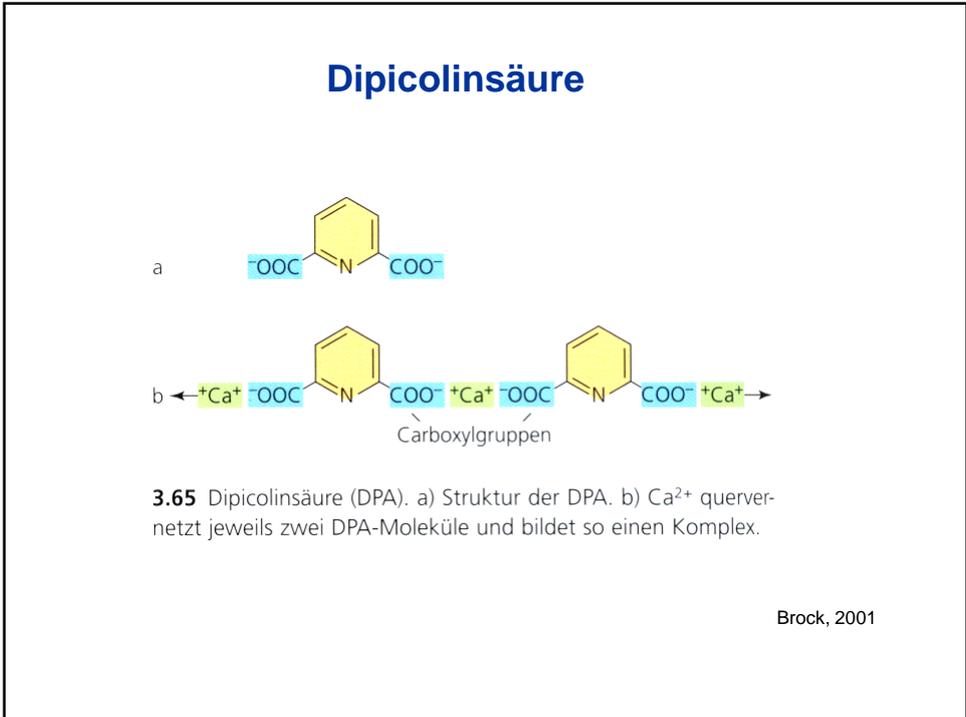
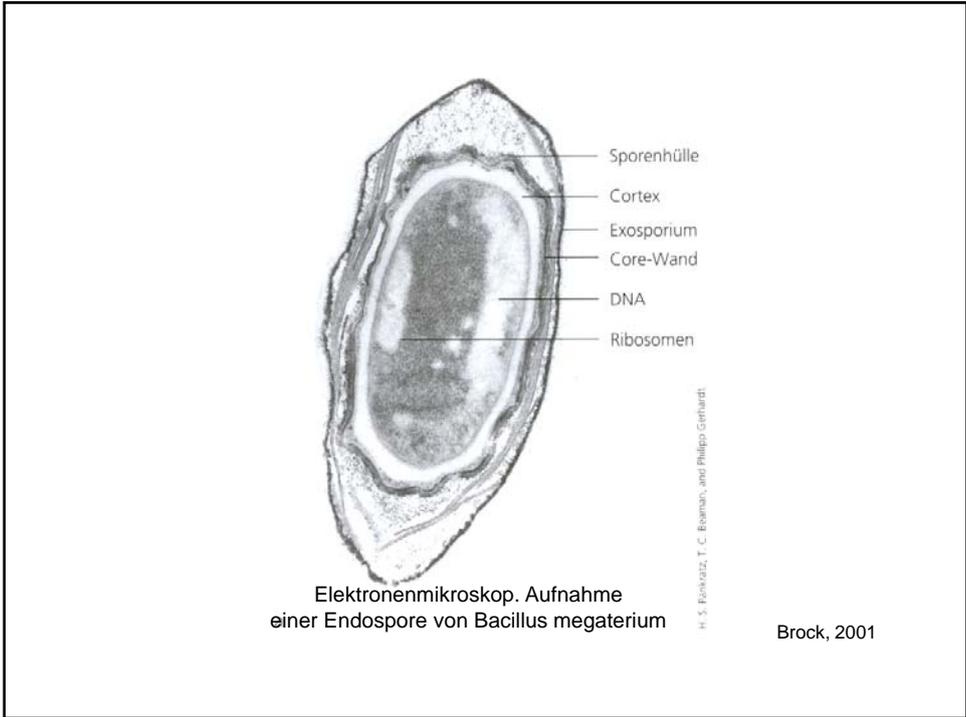
- Speicher f. gebundenen Stickstoff
- nur bei Cyanobakterien
- Polypeptidstruktur (Asparaginsäure und Arginin)

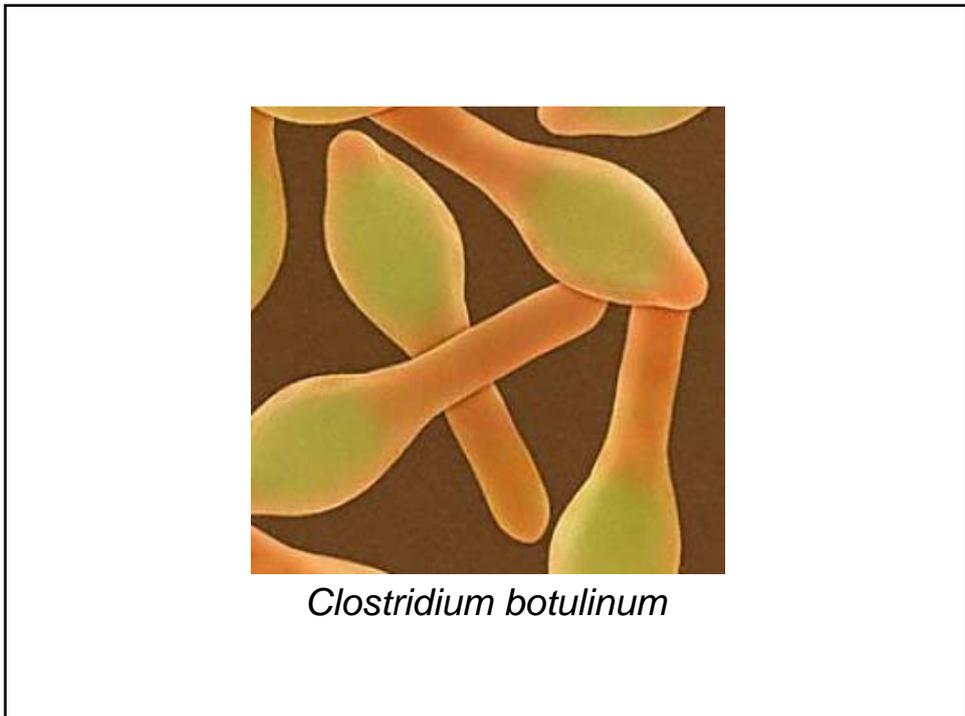
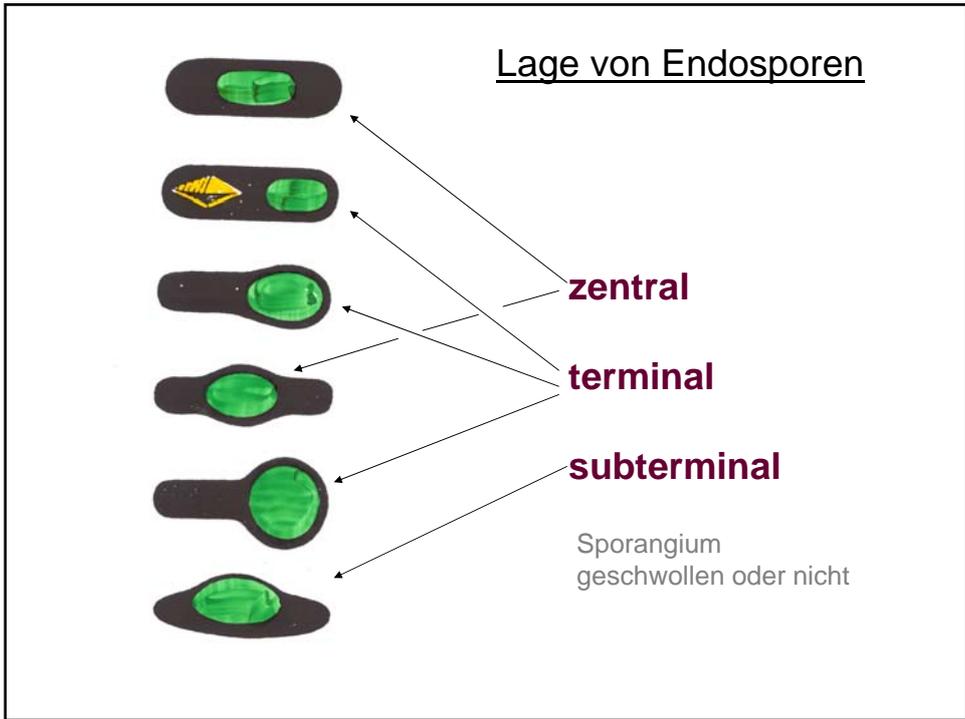


Endosporen

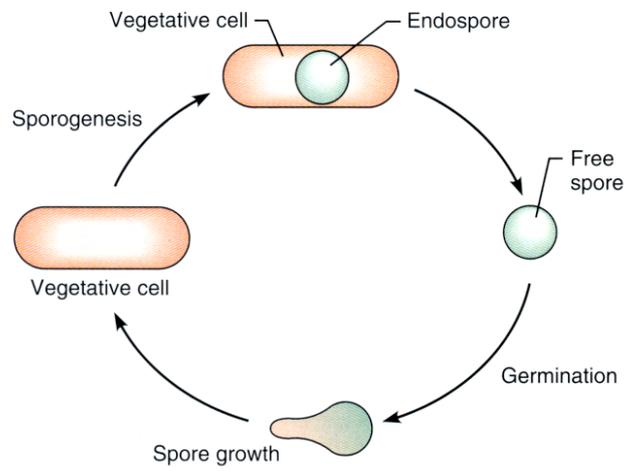
Bacillus
Clostridium
Sporosarcina
Heliobacterium

- resistente **Dauerform** bei bestimmten grampositiven Bakterien
- sehr hitze- und umweltresistent
- dickwandig
- runde oder elliptische Formen
- Spore mit hoher Dichte und hoher Lichtbrechung
- hoher Anteil an Ca-Dipicolinat
- typische Lage innerhalb der Bakterienzelle
- Endosporenbildung durch äußere Einflüsse induzierbar

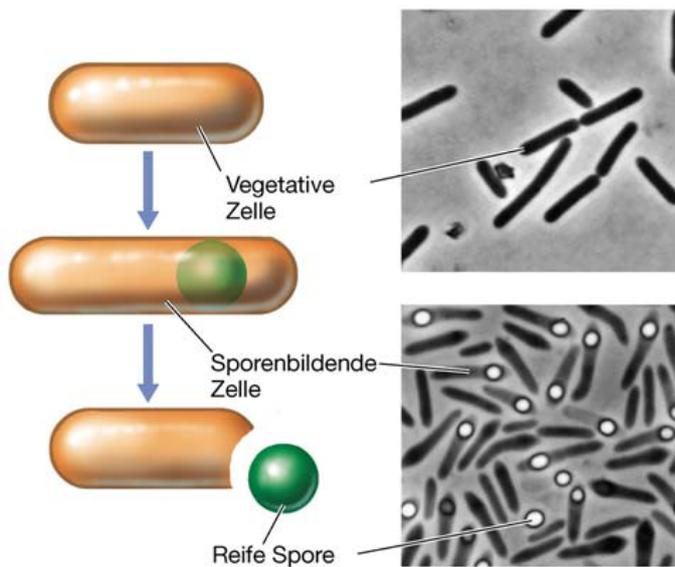




Vereinfachter Lebenszyklus endosporenbildender Bakterien

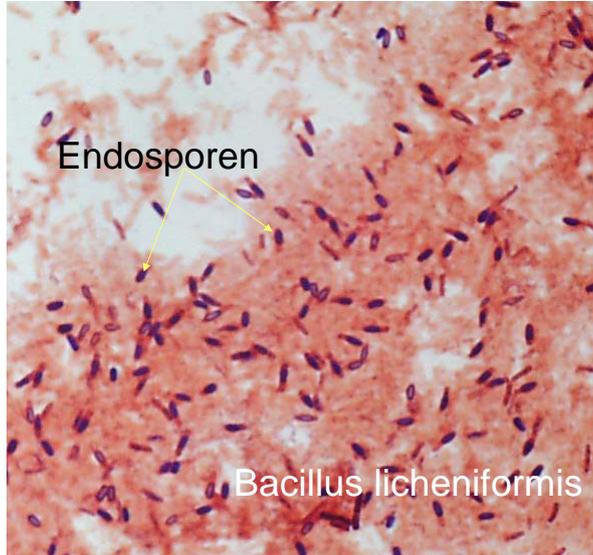


Alexander & Streete, 2000

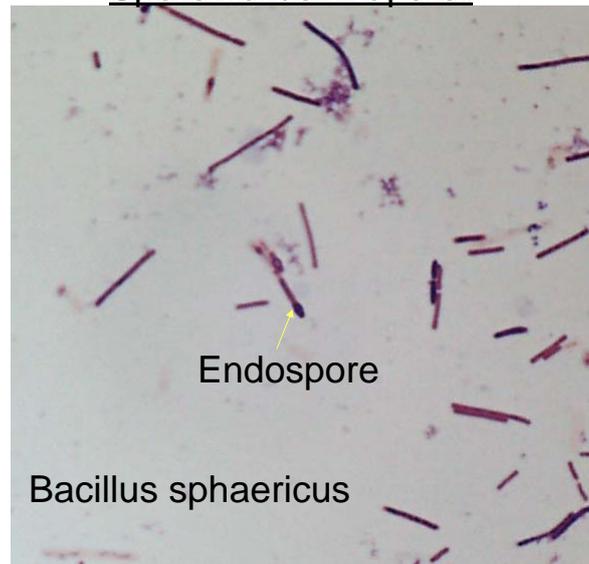


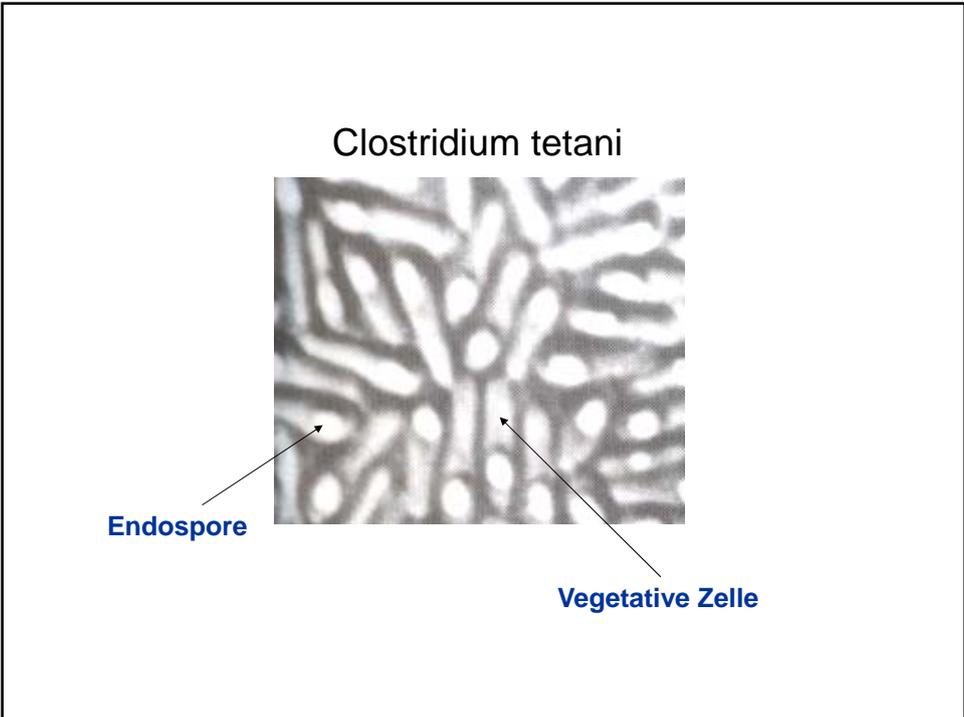
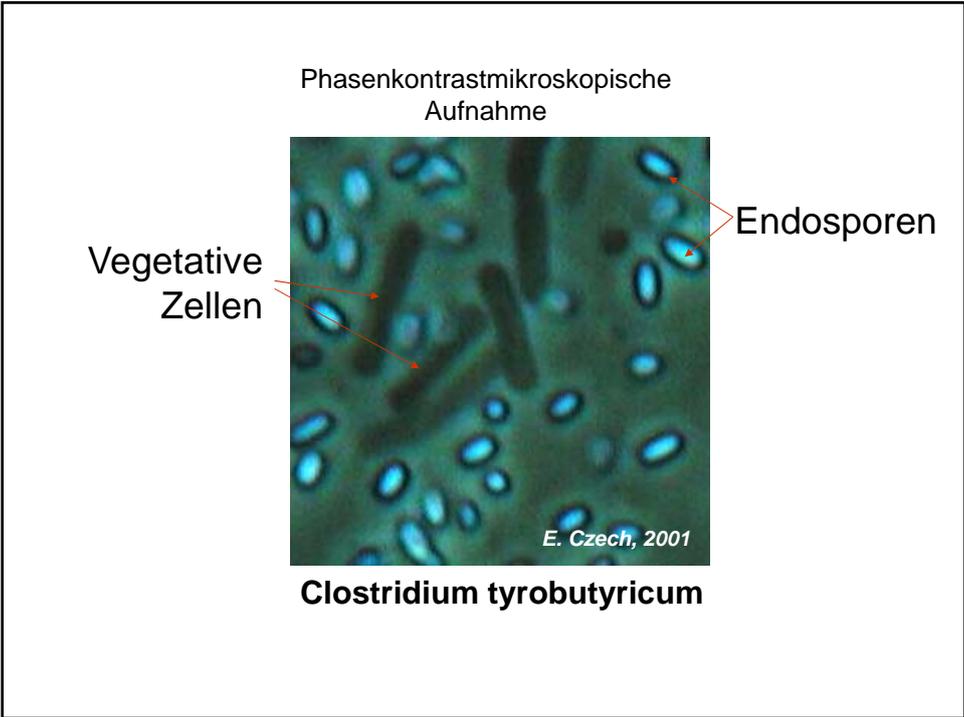
Madigan et al., 2006

Sporenfärbe-Präparat



Sporenfärbe-Präparat





Praktische Bedeutung von endosporenbildenden Bakterien

- ubiquitäre Präsenz
- keine Abtötung durch normale Pasteurisation
- Sterilisation erforderlich
- Desinfektionsmittel nur teilweise wirksam
- extrem lange Überlebenszeiten !

- **Nachweis:**
 - Färbemethoden
 - Kultureller Nachweis („Sporenzahl“)

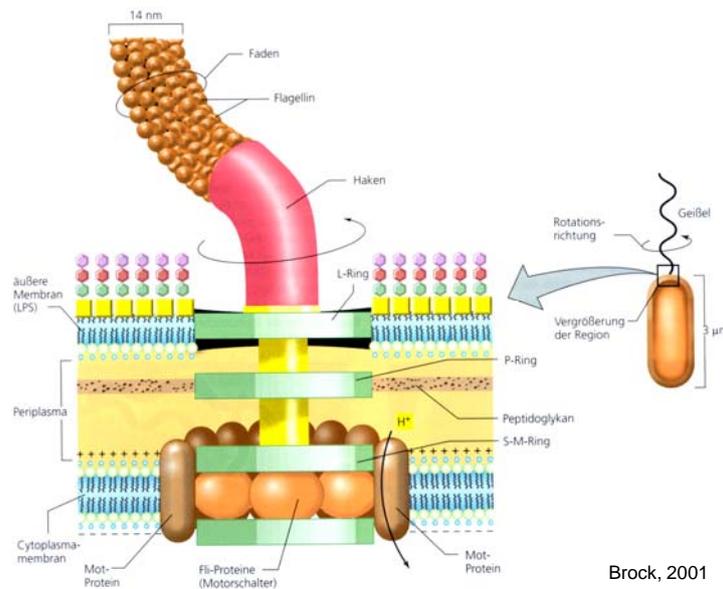
Bakterielle Oberflächenorganellen

- **Geißeln (Flagellen)**
- **Fimbrien**
- **Fibrillen**
- **Pili**

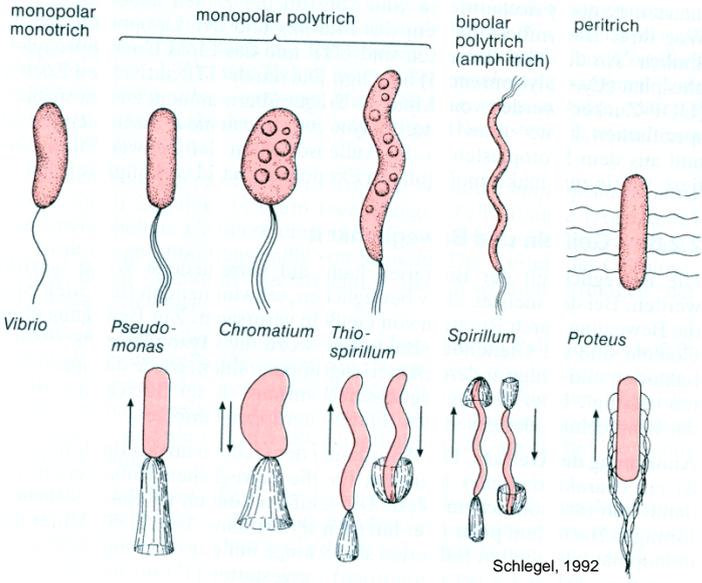
Geißeln (Flagellen)

- ermöglichen Beweglichkeit der Bakterienzelle
- helikal gewundene Fäden
mit ca. 10 - 20 nm Durchmesser
bis zu 20 µm Länge
- Rotationsprinzip
z.B.: E.coli: 100 U / sec → 1.5 mm / min
- typischer Aufbau:
Filament - Haken - Basalkörper
- typische Substanz: Flagellin (Protein)
- Unterschiede im Feinbau Grampos./Gramneg.

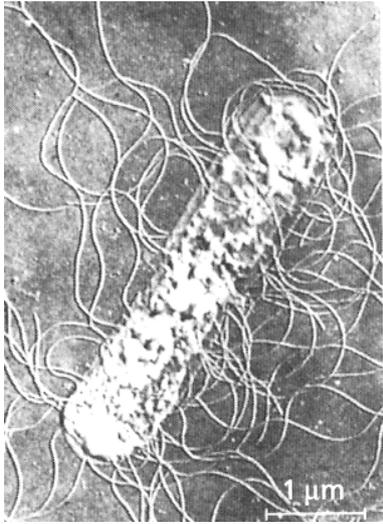
Struktur einer prokaryotischen Geißel



Begeißelungsformen

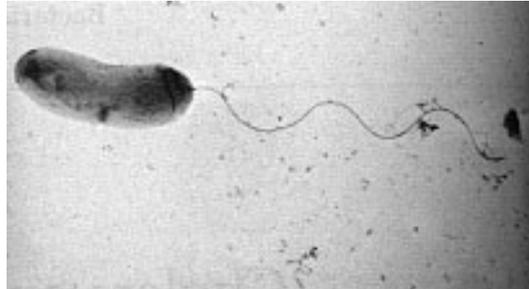


Elektronenmikroskopische Aufnahme von Proteus



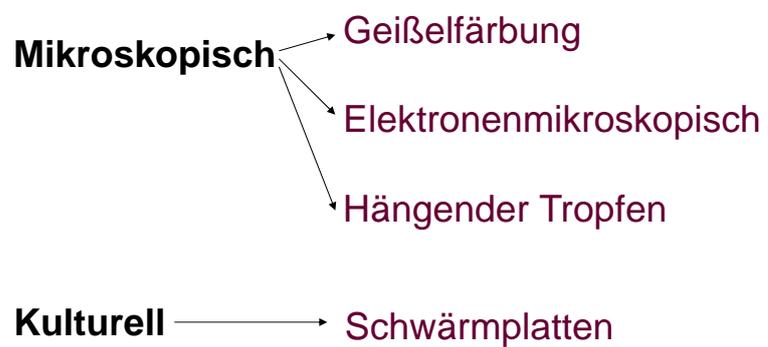
Munk, 2001

Vibrio cholerae

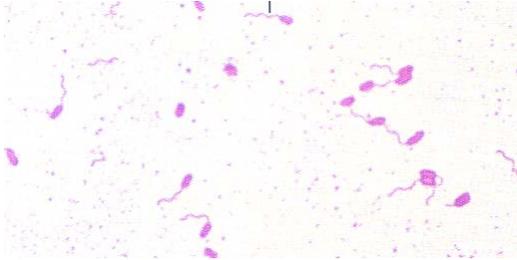


Monopolare, monotriche
Anordnung der Geißel

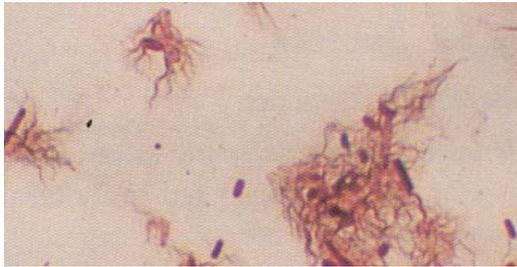
Nachweis der Begeißelung bzw. Beweglichkeit



Geißelfärbepreparate



Pseudomonas aeruginosa



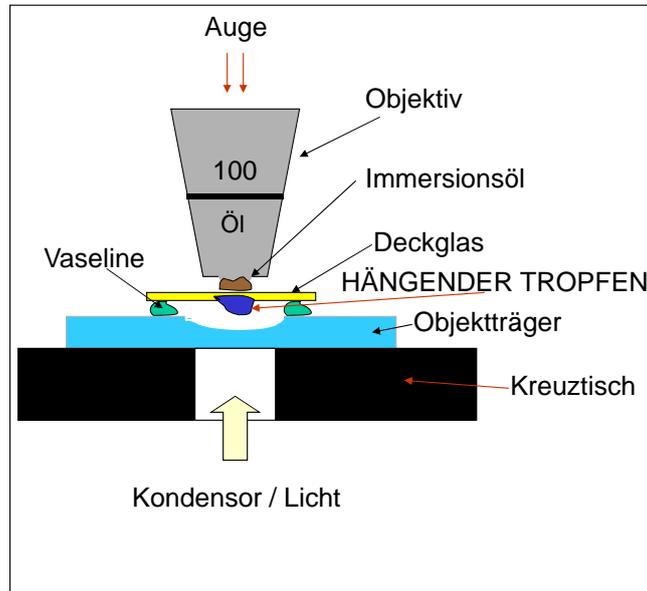
Proteus vulgaris

Phasenkontrastmikroskopische
Aufnahme einer Geißelfärbung

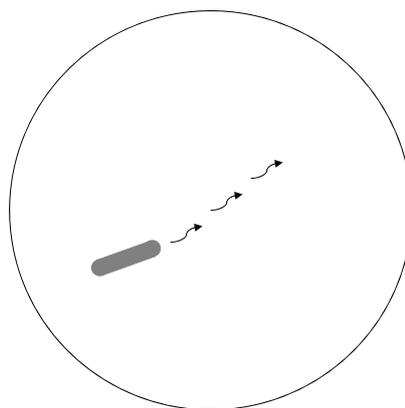


Bacillus subtilis

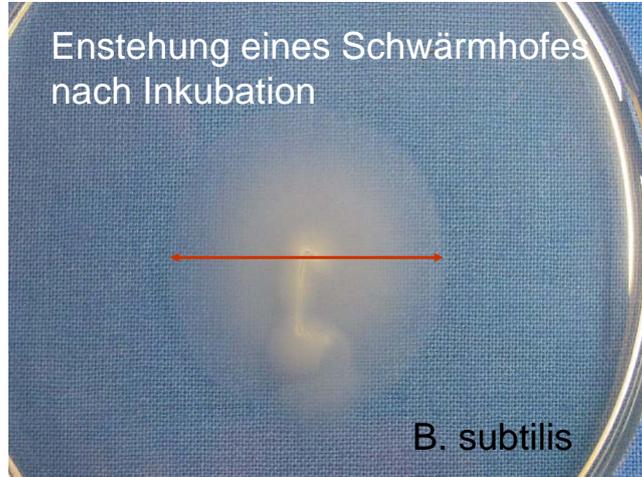
Mikroskopieren des Hängenden Tropfens



Bewegliche Zellen im mikroskopischen Gesichtsfeld



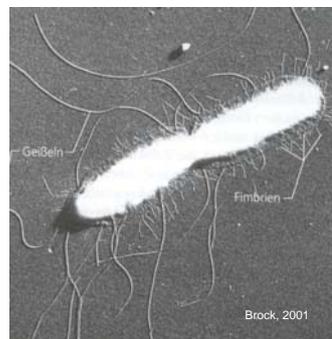
Entstehung eines Schwärmhofes
nach Inkubation



B. subtilis

Fimbrien

- höchstwahrscheinlich Adhärenzfaktoren
- kurze (2 - 5 μm) ca. 30 - 40 nm dicke Fädchen
- von Bedeutung für Pathogenität
- aus Protein aufgebaut
- viele Fimbrien pro Zelle



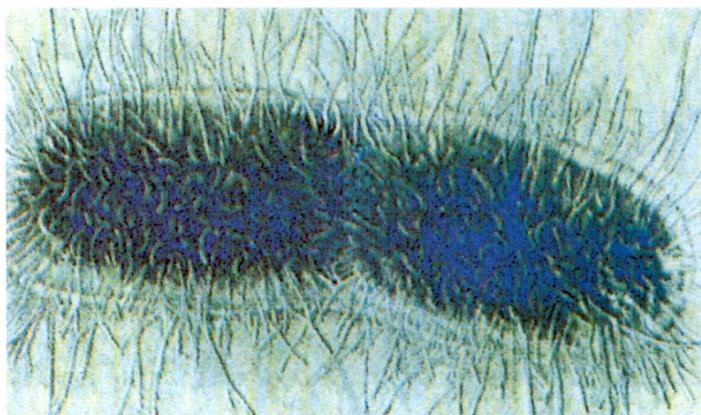
Geißeln und Fimbrien
einer *Salmonella typhi*-Zelle

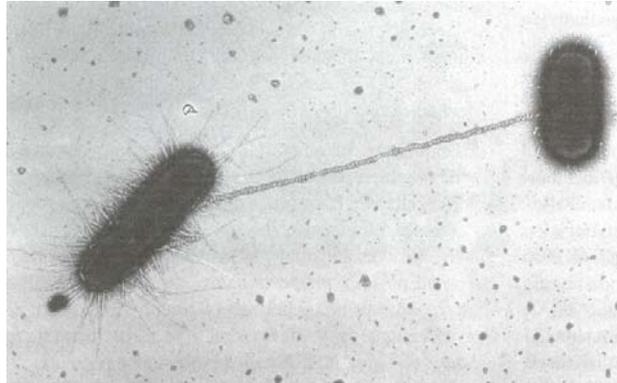
Pili

Pilus (latein.: „Haar“)

- bei gramnegativen Bakterien
- unterteilt in:
 - F-Pili** (lang) ← **Sex-Pili**
 - I-Pili** (kürzer)
- röhrenförmige Struktur
- länger als Fimbrien (bis zu 20 µm)
- Durchmesser ca. 5 - 8 nm
- nur ein bis wenige Pili pro Zelle
- Beteiligung am **Konjugationsprozess**
- Gene für Pili auf Plasmiden codiert

Salmonellenzelle mit Pili





Kontakt zwischen zwei konjugierenden Bakterien über Pili

Spezielle Oberflächenstrukturen bei Bakterien

scharf abgegrenzt



diffundierend

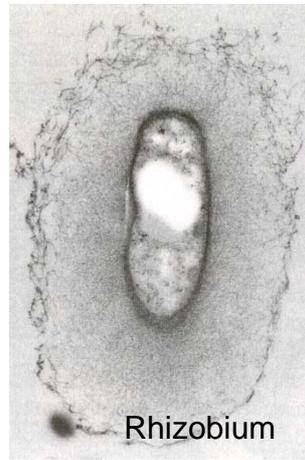
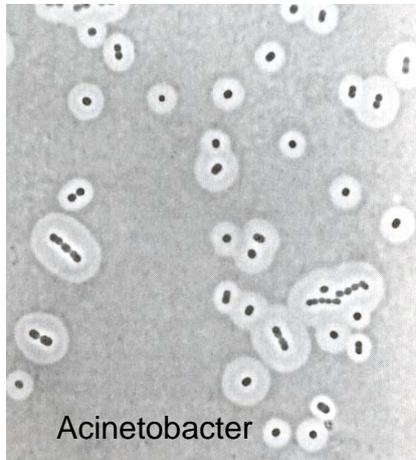
Kapseln und Schleimschichten

- Exopolymere
- „Glycokalyx“
- unterschiedliche Form und Struktur
- starr oder flexibel
- Schutzfunktion
- Schleimabgabe in das Medium möglich
- biotechnologisch interessant

Polysaccharide
Glycoproteine
Aminozucker
Polyalkohole
Protein

Bacillus anthracis

Bakterienkapseln



Brock, 2001

Kapseln: Medizinische Bedeutung

- Virulenzfaktor
- Schutz vor Phagozytose
bzw. vor Angriff des Immunsystems
- Zahnbelag ([Laevan](#), Streptococcen)

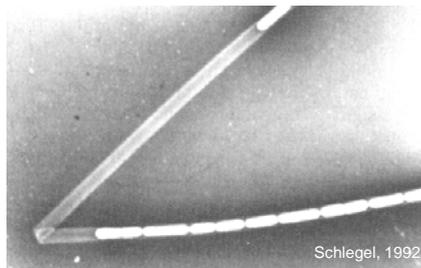
Streptococcus pneumoniae } Resistenzfaktor
Bacillus anthracis }
 ↑
 Proteinkapsel

(Bio)technologische Bedeutung

- **Dextran** Blutplasmaersatz (*Leuconostoc mesenteroides*)
- **Sephadex** Molekularsieb (*Leuconostoc mes.*)
- **Xanthan** Verdickungsmittel (*Xanthomonas campestris*)
- **Cremige Sauermilchprodukte** EPS-bildende Milchsäurebakterien

Bakterien mit röhrenförmigen Hüllen

- Material: **Heteropolysaccharid**
- oft mehrere Zellen von Scheide umgeben
- in Tümpeln, Abwasser
- bildet lange Fäden
- fallweise Probleme bei Kläranlagen
- *Sphaerotilus*, *Beggiatoa*



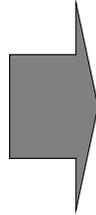
Sphaerotilus natans

Schlegel, 1992

Beweglichkeitsreize für Bakterien

Taxien

anziehend
oder
abstoßend -
„Lockstoff“-
„Schreckstoff“



Chemotaxis

Osmotaxis

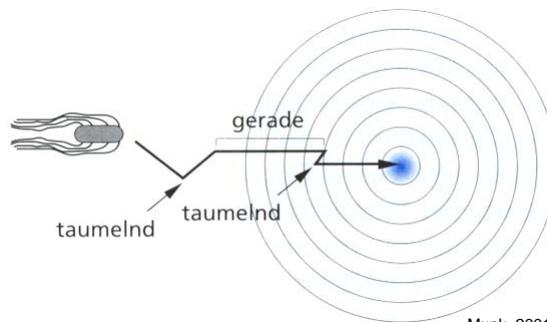
Aerotaxis

Phototaxis

Magnetotaxis

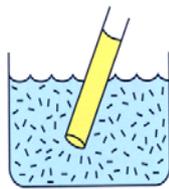
Chemotaxis:

in Abhängigkeit von der Lockstoff-Konz.:
taumelnde oder geradlinige Bewegung

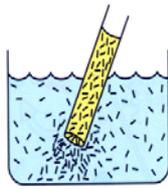


„Kapillarexperiment“ zur Chemotaxis

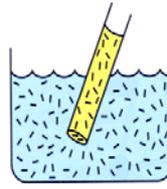
Bakteriensuspension



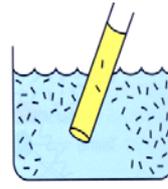
Kapillare



Kapillare
mit Lockstoff

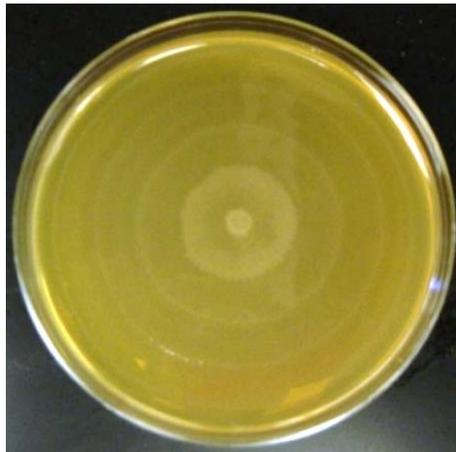


Kapillare
mit phys. NaCl



Kapillare
mit Schreckstoff

mod n. Brock, 2001



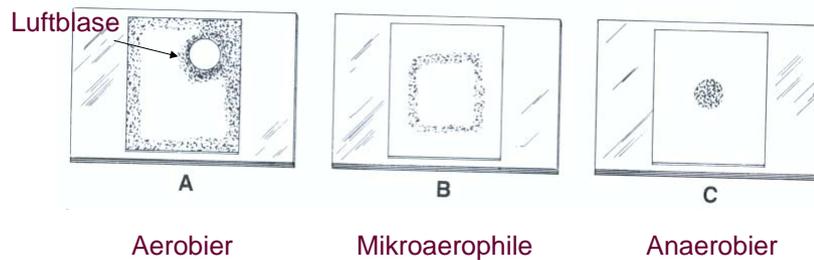
Chemotaxis von *Pseudomonas*

(Schwärmverhalten hin zu nährstoffreicheren
Regionen der Nährbodenplatte)

Aerotaxis:

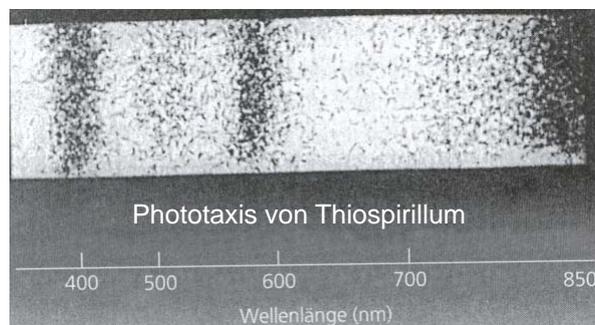
Bewegung auf Sauerstoff zu oder
von ihm weg

„Beijerinck'sche Atmungsfiguren“



Phototaxis:

bei phototrophen Bakterien starke
Affinität hin zum Licht



Brock, 2001

Magnetotaxis:

- Bakterien orientieren sich im Magnetfeld
- schwimmen entlang der Feldlinien
- enthalten eisenhaltige Grana:
„Magnetosomen“
- häufig anaerobe bis mikroaerophile Keime



Magnetosomen (Eisenoxid) bei *Aquaspirillum*

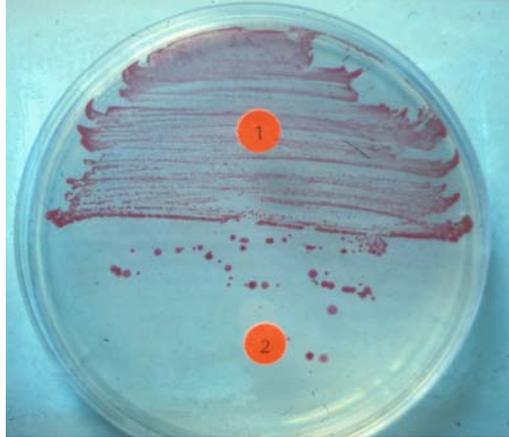
Sonstige Merkmale von Prokaryonten



Bedeutung und Eigenschaften von Pigmenten

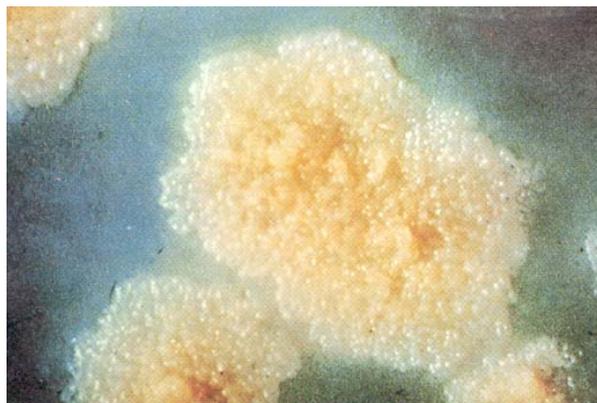
- **Schutzfunktion**
- **Sekundäre Metabolite**
- überwiegend **gelbe, rote, orange** Farbtöne → **Carotinoide** →
 - Mycobacterium
 - Rhodotorula
 - Serratia marcescens
- **blaue bis violette** Pigmente →
 - Corynebacterium
 - Chromobacterium
 - Pseudomonas aeruginosa
- **gelbgrün-fluoreszierende** Pigmente „Siderophore“ →
 - Pseudomonas aeruginosa

Pigmentierung von Mikroorganismen



Fraktionierter Ausstrich von *Serratia marcescens*

Pigmentierung von Mikroorganismen



Mycobacterium tuberculosis
auf Löwenstein-Jensen-Agar

Pigmentierung von Mikroorganismen



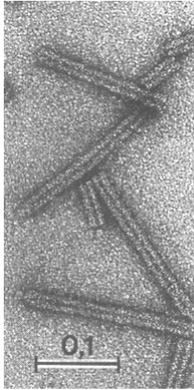
Rhodotorula sp.

4. GRUNDLAGEN DER VIROLOGIE

Charakteristik der Viren

- Obligate Zellparasiten
 - Vermehrung in Wirtszelle (.....Tod)
 - Fertige Partikel mit jeweils 1 Typ Nucleinsäure (DNA oder RNA oder beide)
 - DNA und RNA entweder einzel- oder doppelsträngig
 - kein eigener Stoffwechsel
 - immer 2 typische Strukturen:
 - Nucleinsäure
 - Kapsid (Protein aus Kapsomeren) verschiedene Formen
- 20 -200 nm

Geschichtliches:



- 1892: **Ivanowski**, Tabakmosaikvirus
- Viren passieren Bakterienfilter
- Infektion bei Tabakpflanzen
- 1898: **Beijerinck**, neue Klasse von Mikroorganismen
- 1935: **Stanley** präparierte TMV



1400 v.Chr.:
ägypt. Tempelpriester
mit Poliomyelitis-
Symptomen

Eigenschaften von Viren

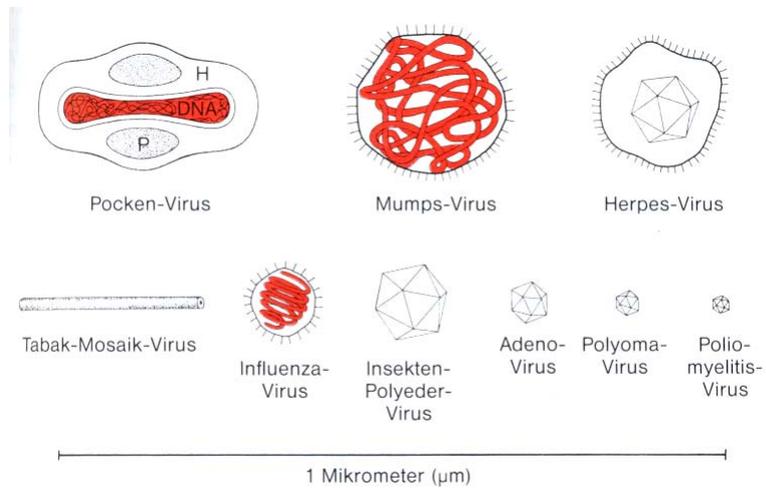
- liegen **intra-** oder **extrazellulär** vor
- Viruspartikel: **Virion**
- Virion überträgt virales Genom auf andere Zelle (...Wechsel von extra auf intrazellulär)
- danach Virusreplikation mit Synthese der Virenbestandteile im **Wirt**
- Virusreplikation eng mit Wirtsstoffwechsel verknüpft
 - Bekämpfung des Virus richtet sich auch immer gegen den Wirt

Klassifizierung von Viren

- DNA oder RNA oder DNA + RNA-V.
- einzel -oder doppelsträngige Nucleinsäure
- nach ihren Wirten

- **Tierviren (und humanspezifische V.)**
- **Pflanzenviren**
- **Bakterienviren etc.**

Morphologie von Viren: Größenordnungen



Schlegel, 1992

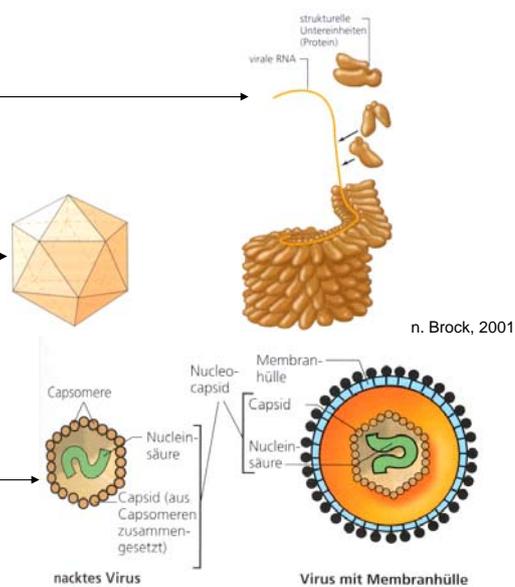
Morphologie von Viren: Zellstruktur

- **helikal**

- **ikosaedrisch bzw. kubisch**
 ➔ + „komplexe“

- **nackt**

- **umhüllt**
 („Envelope“)

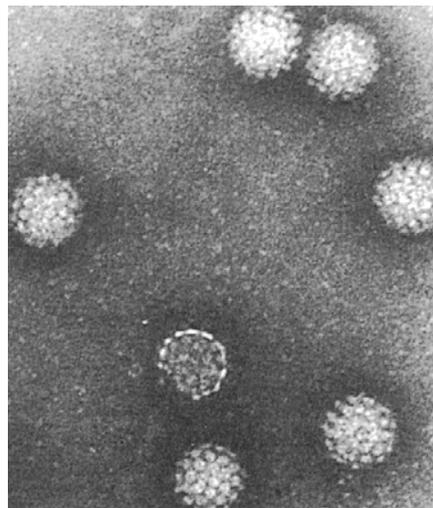


Beispiele für morphologisch unterschiedliche Virentypen

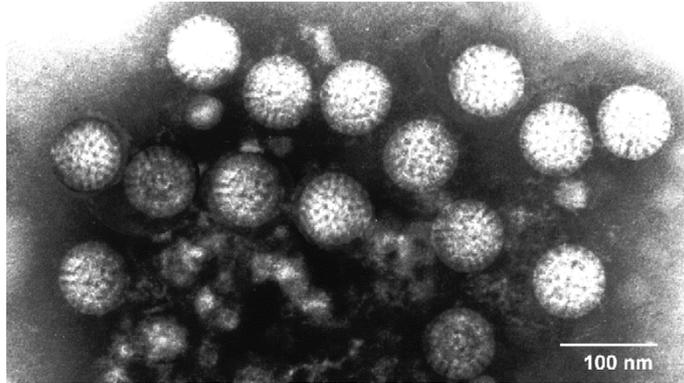
Helikale → Nackte: TMV, viele Pflanzenviren
Umhüllte: Influenzaviren, Parainfluenzaviren

Ikosaeder → Nackte: Picornaviren, Polioviren, MKS-Viren
Umhüllte: Retroviren, onkogene Viren

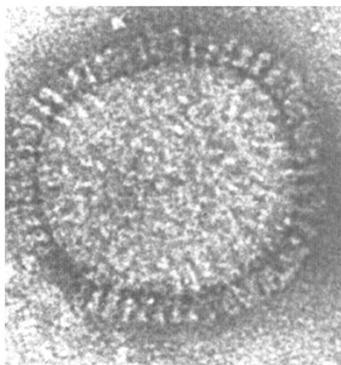
„Komplexe“ → Umhüllte: Pockenviren, Kuhpockenviren



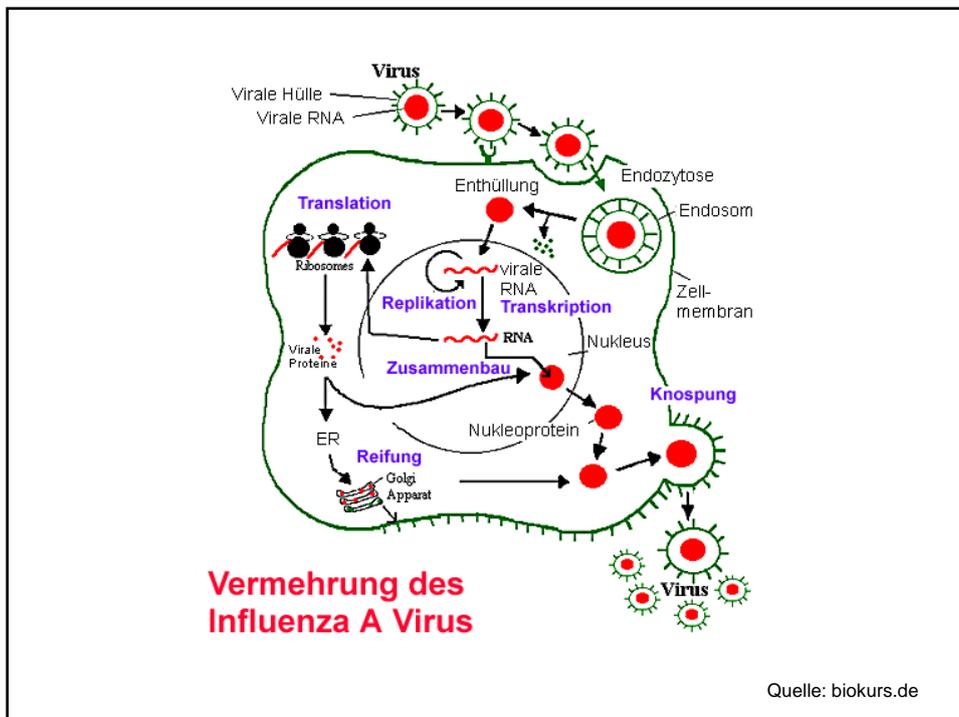
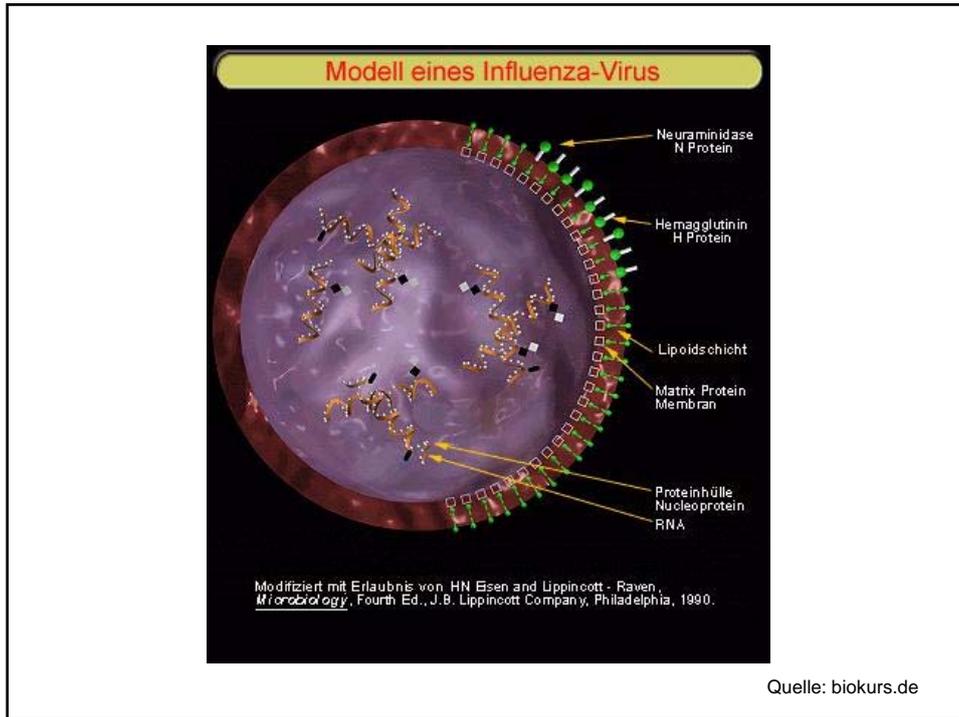
Menschliches Warzenvirus



Rotaviren

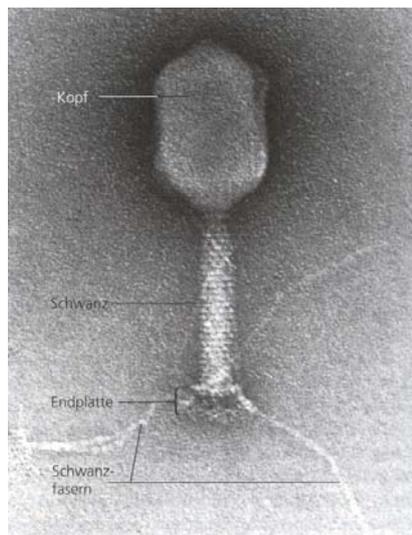


Influenzavirus

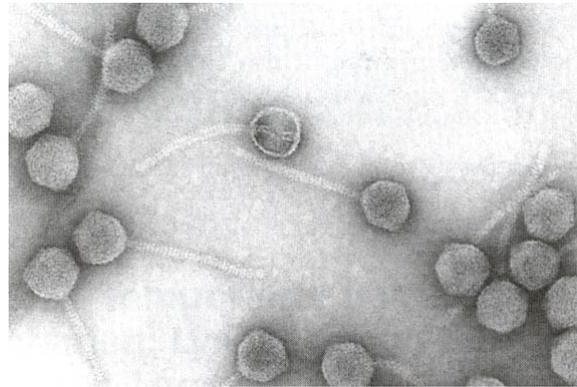


Interessante Animation

<http://www.johnkyrk.com/virus.html>



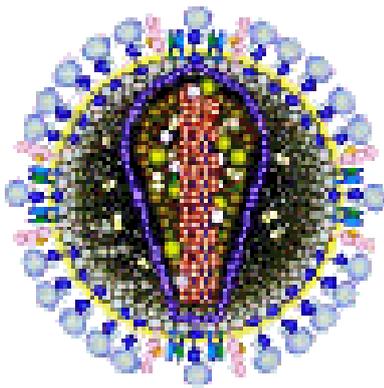
T4-Bakteriophage von E.coli



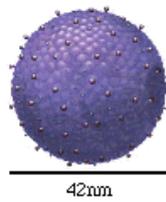
Bakteriophagen Lambda

Brock, 2001

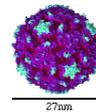
Virenmodelle



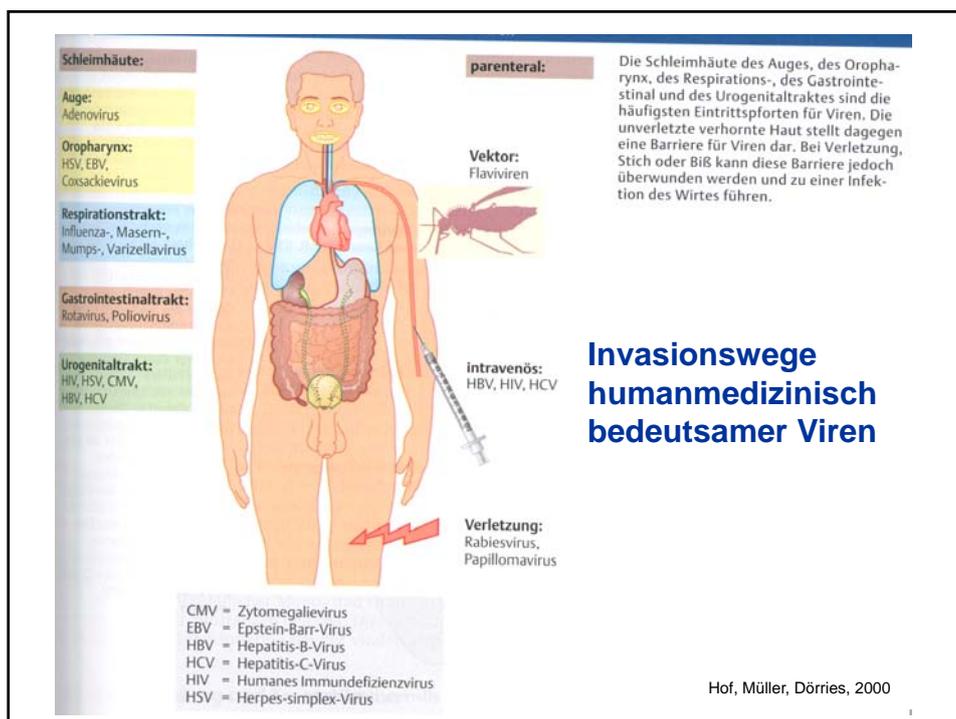
120nm
HIV-Virus
Human Immunodeficiency Virus



42nm
Hepatitis B-Virus



27nm
Poliomyelitis-Virus



Virale Infektionen

- **Direkte/indirekte Infektion durch einzelne bzw. mehrere Vektoren:**
 - Insektenstiche und –bisse (v.a. blutsaugende Insekten: Zecken, Stechmücken,...)
 - Bissverletzungen durch kranke Haus-, Nutz- und Wildtiere
 - kontaminierte Spritzen und chirurgische Bestecke
 - Wasser-, Lebensmittel- u. Futtermittelkontaminationen (über Verdauungstrakt)
 - Haut- u. Schleimhautkontakte (v.a. bei Verletzungen)
 - Körperflüssigkeiten u. Bluttransfusionen
 - Verdauungs- und Ausscheidungsprodukte (Schmierinfektionen)
 - Aerosol-Übertragung (Atemwege => Lunge)
- **Folgen sind abhängig von der Virulenz der Virusstämme und der Konstitution der erkrankten Individuen:**
 - akute Erkrankung
 - chronische Erkrankung
 - Sekundär-/Spätfolgen
 - Ausheilung
 - Immunität (temporär od. lebenslang, nur selten keine Immunantwort)

Übersicht über humanpathogene Viren - 1

RNA-Viren

Picornaviren	Polio, Hepatitis
Caliciviren	Hepatitis E
Reoviren	Rotavirus-Diarrhoe
Coronaviren	Atemwegserkrankungen, SARS *)
Togaviren	Röteln
Flaviviren	Gelbfieber
Arenaviren	Lassa-Virus
Filoviren	Ebola-Virus

*) Severe Acute Respiratory Syndrome

Übersicht über humanpathogene Viren - 2

RNA-Viren

Bunyaviren	Krim-Kongo-Virus
Orthomyxoviren	Influenza A, B, C
Paramyxoviren	Mumps, Masern
Rhabdoviren	Tollwut
Retroviren	HIV

Übersicht über humanpathogene Viren - 3

DNA-Viren

Herpesviren	Herpes, EBV
Papovaviren	Warzen
Parvoviren	Röteln
Adenoviren	Div. Schleimhautrekrankungen
Poxviren	Pocken
Hepadnaviren	Hepatitis B

Grundsätzliche Unterschiede im Virenbefall

Prokaryonten

Eukaryonten



Virusgenom
dringt in Zelle ein,
Proteinhülle bleibt
außerhalb des Wirts



Aufnahme des gesamten
Virus durch Endocytose
Trennung von der
Proteinhülle findet
im Wirt statt

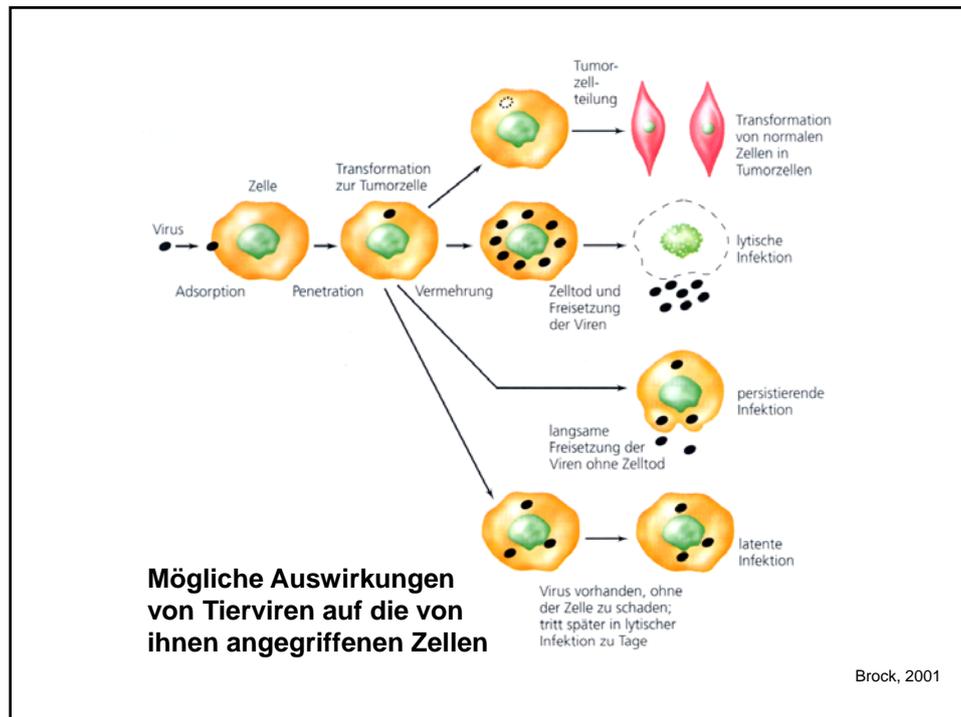
Tierviren *)

- morphologische und strukturelle Vielfalt
- verschiedene Infektionsformen:
 - lytische
 - persistierende
 - latente
- Potenzial, normale Zellen in Tumorzellen umzuwandeln (**onkogene Viren**)

*) auch humanrelevant

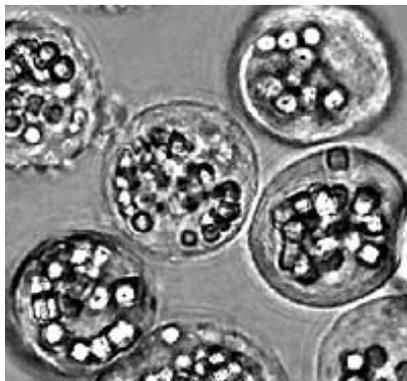
Onkogene Viren

- Schätzung, dass rund 15-20% der Krebserkrankungen Spätfolgen einer viralen Infektion sind
- Vorwiegend bei langer Persistenz des Virus und nicht erfolgter Replikation
- z.B. Papillomaviren (Gebärmutterhalskrebs), Hepatitisviren, Leberkarzinom, etc.



Insektenviren

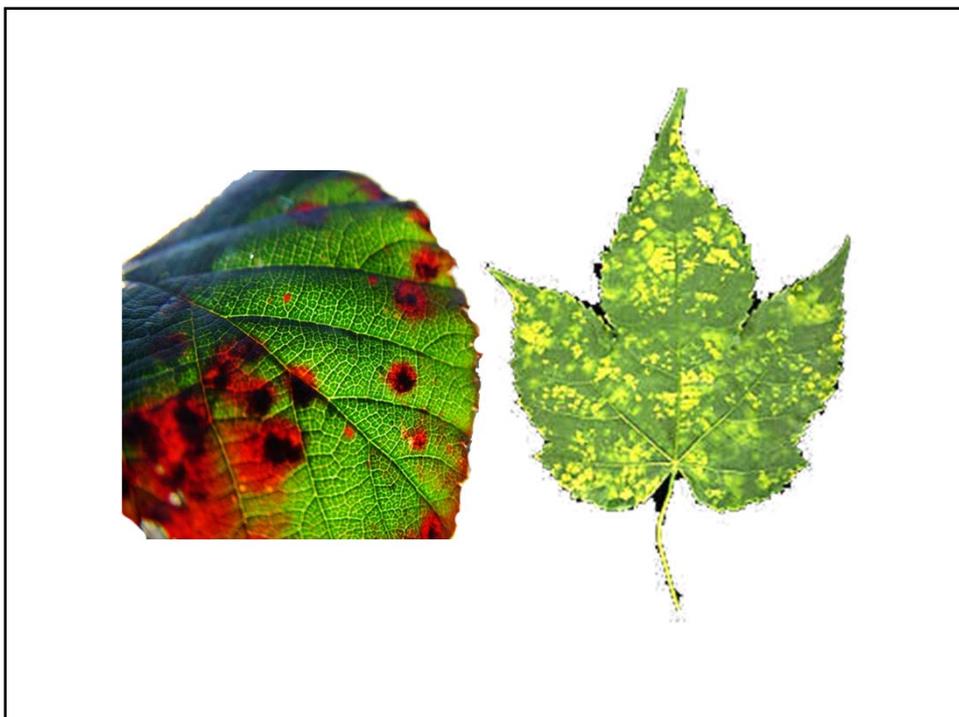
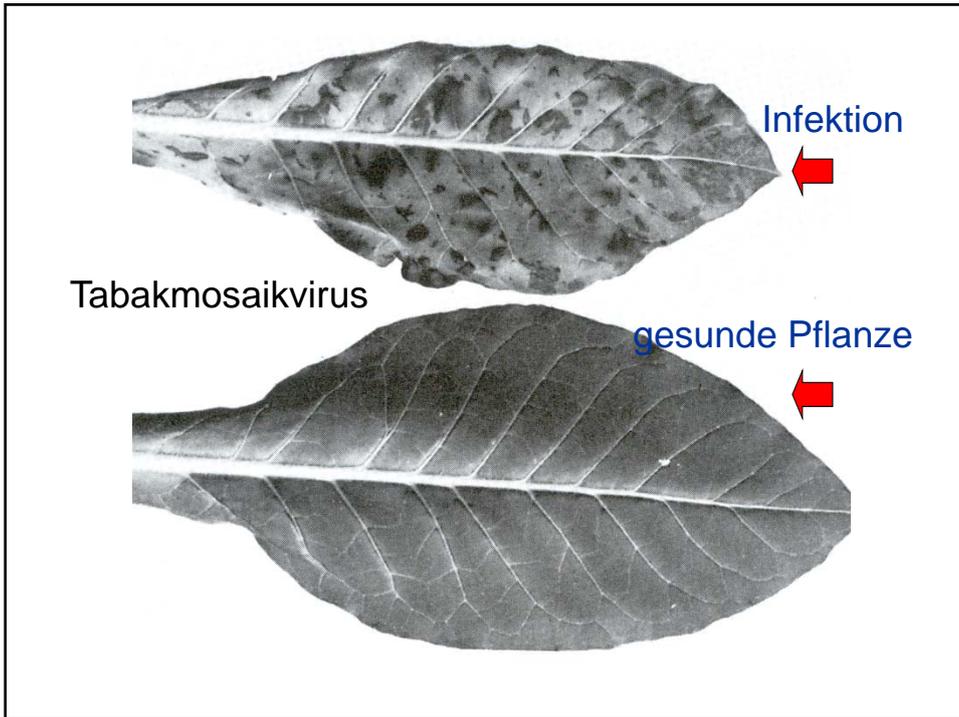
- Biologische Schädlingsbekämpfung
- Präparate mit Hilfe von Raupenzuchten
- stäbchenförmige **Baculoviren** (doppelstr. DNA-Viren)
- Fettkörperzellen und Darmepithel von Insekten befallen → Tod
- **Kernpolyederviren** → Kiefernbuschhorn-Blattwespe, Apfelwickler etc.



Mit Baculoviren infizierte Zellen

Pflanzenviren

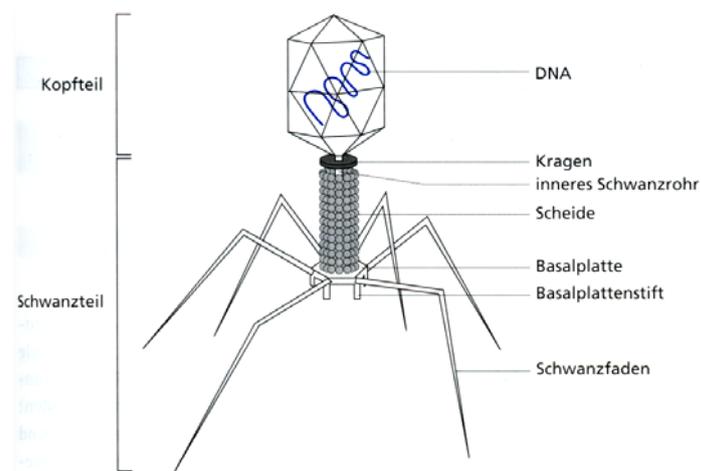
- ca. 600 Arten
- vorwiegend einsträngige, stäbchenförmige RNA-Viren
- Eintritt über Wunden oder über **Vektoren**
- häufig systemischer Befall
- Chlorosen, Wachstumsstörungen, Blattkräuselungen, und -rollungen



Bakterienviren

- infizieren Bakterien (meist Darmbakterien)
- nur plasmidhaltige Bakterien befallen
- gut geklärte Modellmechanismen
- typische Strukturen
- RNA- (hauptsächlich) und DNA-Viren
- wichtige Werkzeuge in der Gentechnik

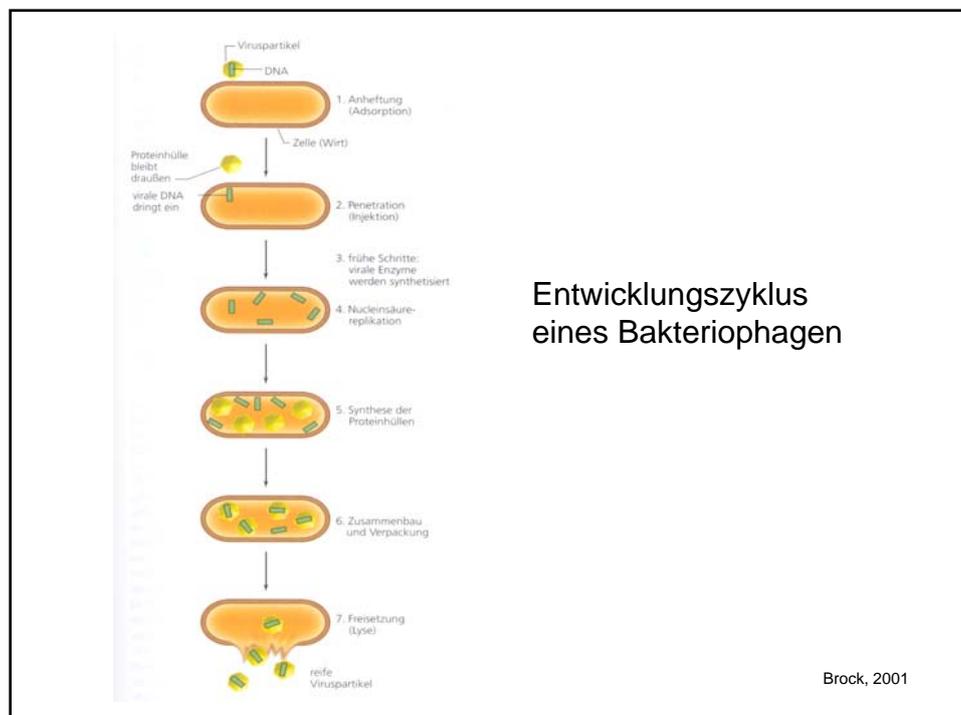
Bakteriophagenmodell



Munk, 2001

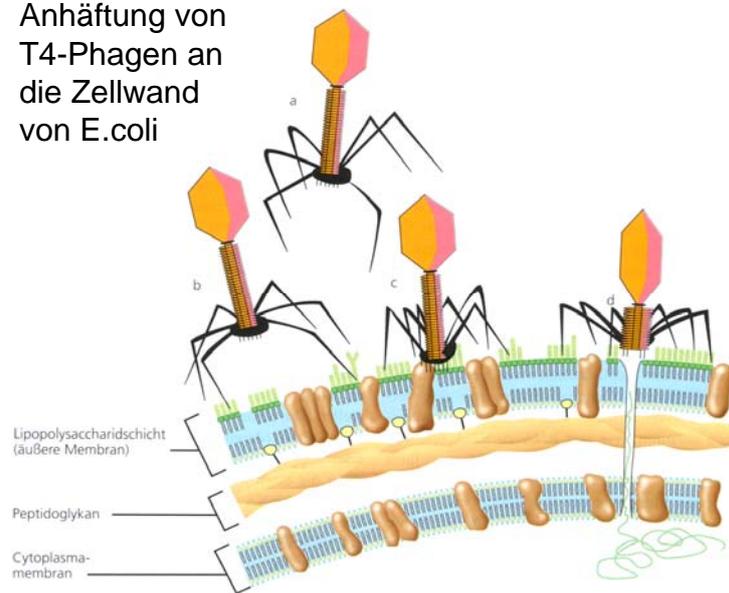
Schritte der Virusreproduktion

1. Anheftung
2. Penetration
3. Frühe Schritte der Replikation (Enzyme)
4. Replikation der viralen Nucleinsäure
5. Synthese von Struktur-Proteinen
6. Zusammenbau der Struktureinheiten
7. Freisetzung reifer Virionen
aus der Wirtszelle



Entwicklungszyklus
eines Bakteriophagen

Anhängung von T4-Phagen an die Zellwand von E.coli



Brock, 2001

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer phageninfizierten Bakterienzelle

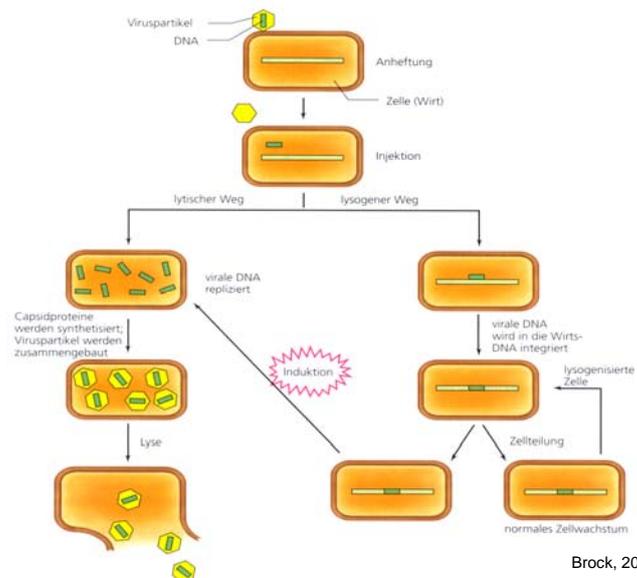


Quelle: Danisco-Cultor

Eigenschaften von Bakteriophagen

- hohe Wirtsspezifität → Gentechnologie, Diagnostik
- Aktivität:
 - virulent → infizieren, lysieren, töten
 - temperant → virale Gene nicht exprimiert, synchrone Vervielfältigung mit Wirtschromosom, Ausbildung sogen. „Prophagen“
- Lysogenie → Stadium der temperanten Infektion (auch bei anderen Viren)

Alternative Entwicklung von Bakteriophagen



Virenbefall bei anderen Mikroorganismen

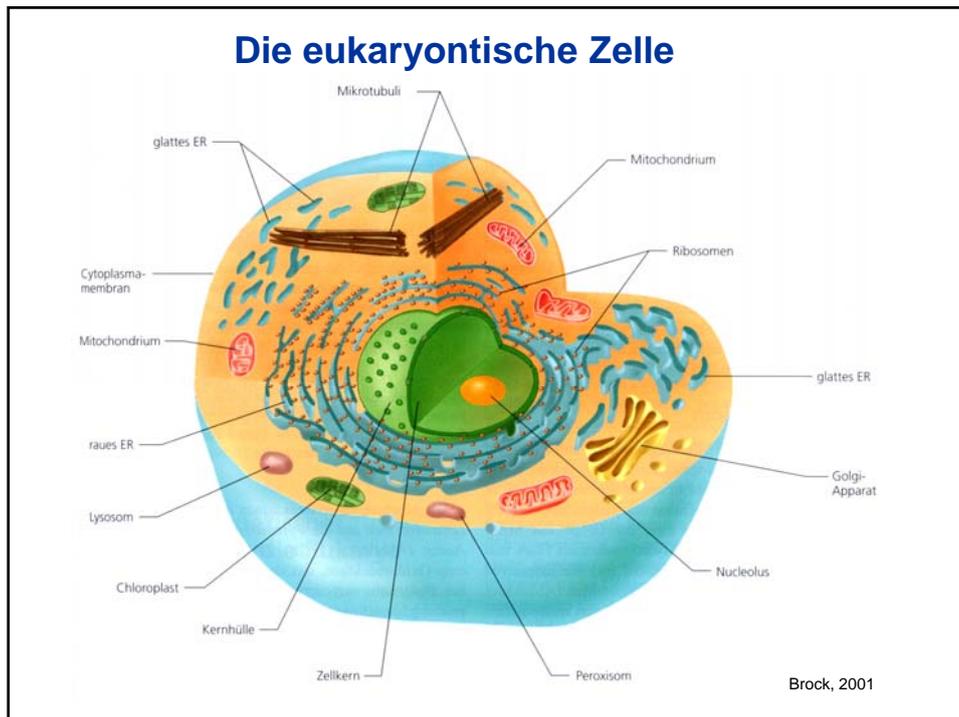
Pilze: Penicillium
(z.B. auch bei Champignonkulturen)

Hefen: „Killerphänomen“
bei Infektion mit Mykoviren (RNA-Viren)
Synthese von Toxinen durch Viren in
Hefen codiert, zuerst Vorstufen, nach
Reifungsphase in der Hefe ausgeschieden
→ zerstören Zellmembran

5. GRUNDLAGEN DER MYKOLOGIE

Eukaryontische Mikroorganismen (allgemeine Charakteristika)

- strukturell und genetisch verschieden zu den Prokaryonten
- morphologisch und größenordnungsmäßig verschieden zu den Prokaryonten
- einzellig oder mehrzellig
- Vermehrung asexuell oder sexuell
- diploider oder haploider Chromosomensatz
- starre Zellwand
- im Gegensatz zur Pflanze keine Photosynthese
- geschätzte 300.000 Pilzarten



Wesentliche Unterschiede zwischen pro- und eukaryontischen Zellen

PRO

EU

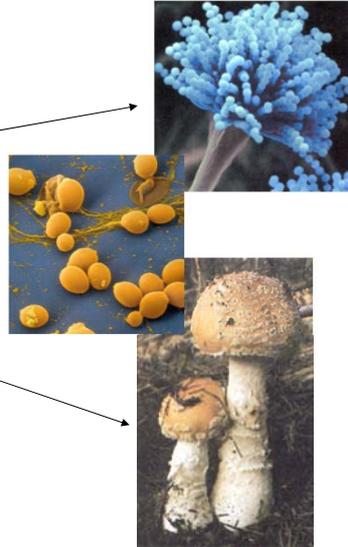
Größe	0.2 - 5 μm	1 - 50 μm
Organisationsform	einzellig	ein oder mehrzellig
Zellwände	Murein, Prot., Polysacch.	Polysacch., Cellulose, Chitin
Bewegung	Flagellen	Geißeln, Cilien, Pseudopodien
Organellen	--	Mitochondrien (Plastiden)
Ribosomen	70S	80S (und 70S...Mitoch.)
Vermehrung	Zellteilung	ungeschlechtlich oder geschl.
Erythromycin	sensitiv	nicht sensitiv
Kernstruktur	Kernäquivalent	echter Zellkern
Chromosom. DNA	ringförmig, 1 Chromosom	linear, mehrere Chromosomen
Extrachrom. DNA	Plasmide	Plasmide (Pilze), Plasmon (Mit.)
RNA-Polymerasen	1	3
Histone	nein, Histon-ähnliche	ja
Endosporen	ja, fallweise	nein

Pilze (Fungi)

Schimmelpilze

Hefen

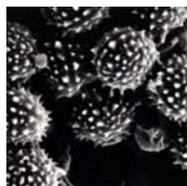
Ständerpilze



Schimmelpilze

TELEOMORPHE

Sexuelle Vermehrung
mit typischen Fruchtkörpern
z.B. *Eupenicillium*



Fungi perfecti

ANAMORPHE

asexuelle Vermehrung
mit typischen asexuellen Sporen
z.B. *Penicillium*

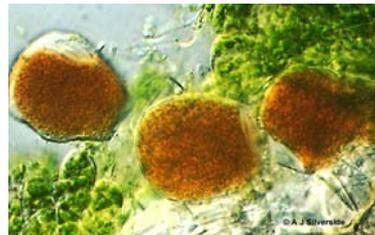


Fungi imperfecti

Einteilung der Pilze

- Chytridiomycota
- Zygomycota
- Ascomycota
- Basidiomycota
- Oomycota

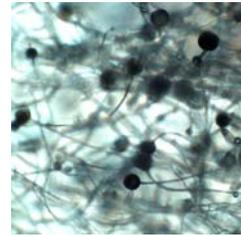
Chytridiomycota:



Beispiel: Synchytrium

- einzellig
- sexuelle Fortpflanzung durch bewegl. **Gameten**
- **Zoosporen** für asexuelle Vermehrung
- aquatischer und bodenspezifischer Lebensraum
- einige Vertreter sind Parasiten

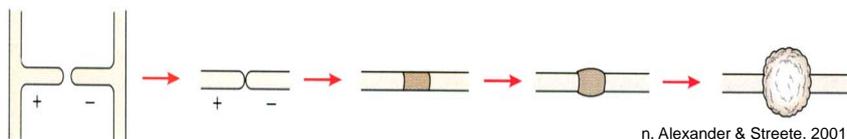
Zygomycota:



Beispiel: Mucor

- fädig wachsende Mikroorganismen
- Hyphen (größtenteils) unseptiert
- asexuelle Vermehrung durch **Sporangien**
- sexuelle Vermehrung durch **Zygosporen**

Entwicklungszyklus einer Zygospore



Ascomycota:



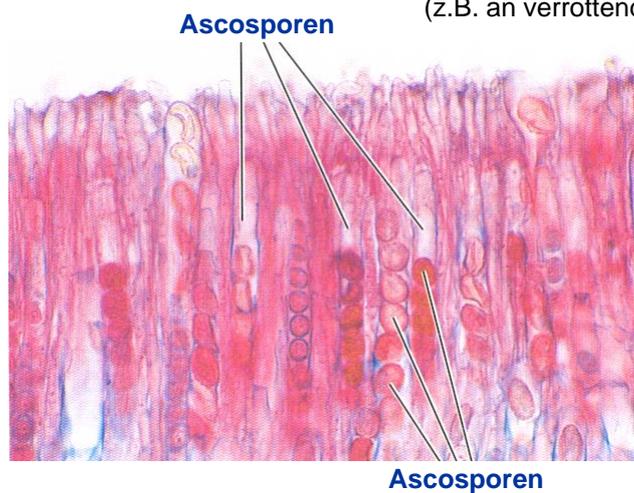
Beispiel: Hefe
(Candida)

- einzellige oder fädig wachsende Mikroorganismen
- Hyphen größtenteils septiert
- sexuelle Vermehrung in schlauchartigen Zellen („Ascus“)
- daneben asexuelle Vermehrung weit verbreitet

Deuteromycota → →

Ascosporenpräparat von Peziza

(z.B. an verrottendem Holz)



Alexander & Streete, 2001

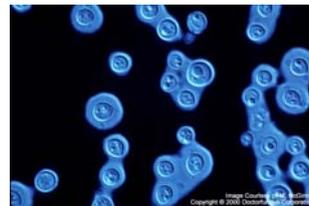


Rostpilz an Birnenblättern

Basidiomycota:



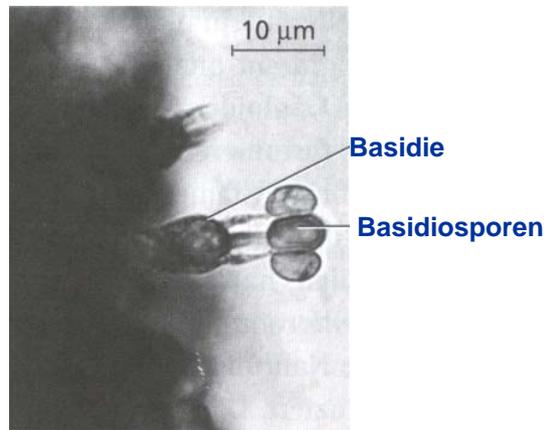
Russula



Cryptococcus
(hefeartig)

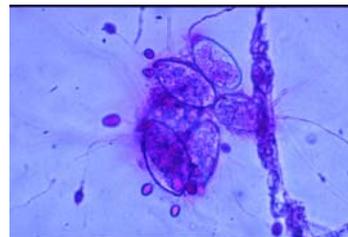
- fädig wachsende Mikroorganismen
- Name von der Vermehrungsstruktur (Basidie / Ständer)
- sexuelle Vermehrung:
Basidie mit 4 meiotischen Sporen
- einige Vertreter zur asexuellen Vermehrung befähigt
- Speisepilze, Rostpilze, Brandpilze

Basidiosporen von Tricholomopsis



Munk, 2001

Oomycota:



Phytophthora

- fädig wachsende Mikroorganismen
- Hyphen unseptiert
- sexuelle Vermehrung durch Ausbildung von **Oosporen**
- asexuelle Vermehrung durch **Sporangiosporen**
- viele Pflanzenschädlinge

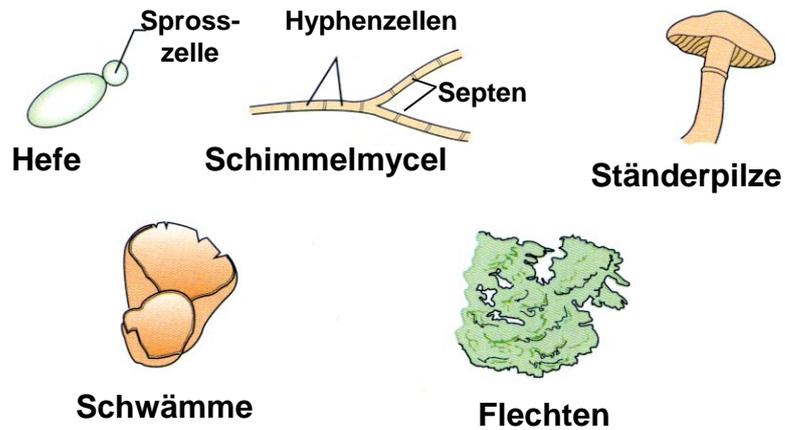


Krankheitsbilder
Phytophthora



Quelle: Ontario CropIPM

Vielfalt an Wuchsformen bei den Fungi



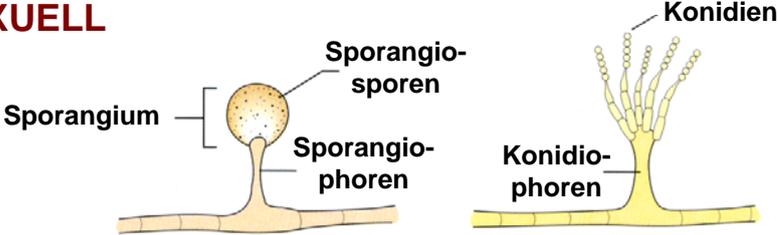
n. Alexander & Streete, 2001

Schimmelpilze

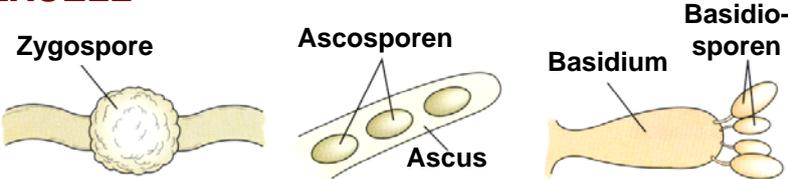
- Filamentöse Pilze
- in der Natur weit verbreitet
- typischer Aufbau
 - Cellulose
 - Chitin
 - Glucane (Mannane, Galactosane etc.)
- Wachstum:
 - Boden, totes Pflanzenmaterial
 - Lebensmitteln
 - oder parasitär (Pflanze, Tier, Mensch)
- geringe Nährstoffansprüche
- Befähigung zur sexuellen und asexuellen Sporenbildung

Sporenformen

ASEXUELL

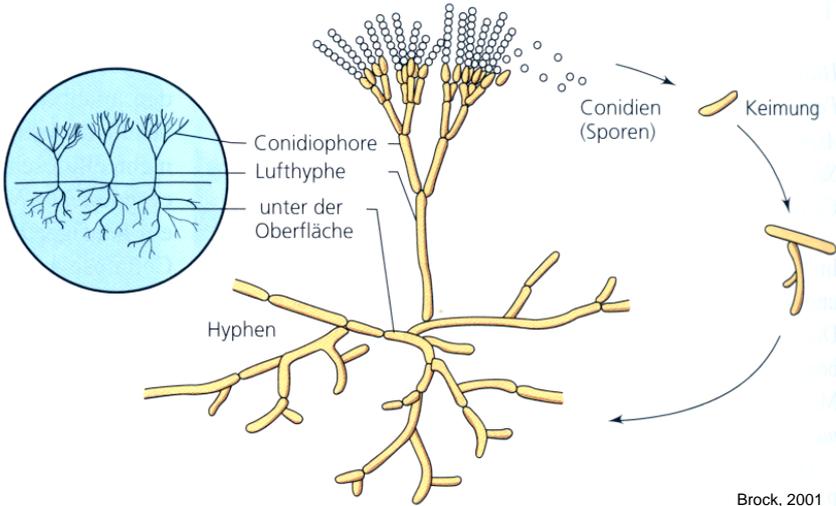


SEXUELL

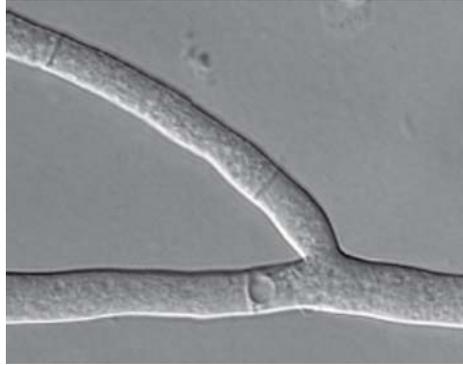


n. Alexander & Streete, 2001

Hyphen- bzw. Mycelstruktur von Pilzen

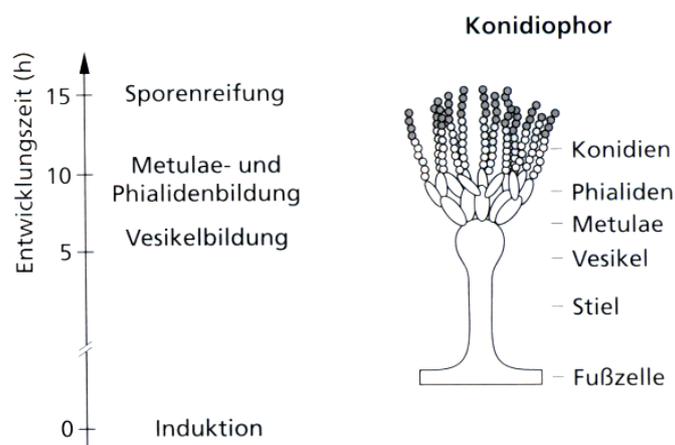


Brock, 2001



Septierte Hyphen

Schematische Darstellung der Bildung von Konidiophoren



Munk, 2001

Deuteromyceten / Deuteromycota

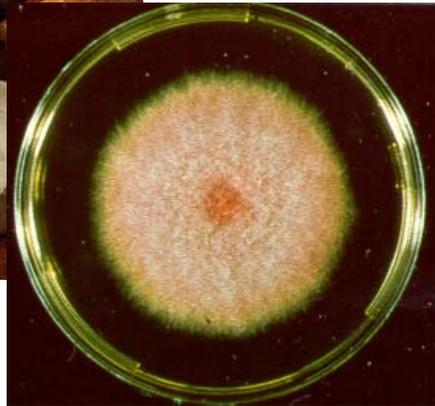
- Gruppe, in der die asexuell reproduzierenden Schimmelpilze zusammengefasst werden
 - Vermehrung über Konidiosporen
 - viele Vertreter von Bedeutung für:
 - Lebensmittelindustrie
 - Biotechnologie
- Mycotoxinbildung
Schleimhautinfektionen

+ Bedeutung ausgewählter Deuteromyceten

Penicillium candidum	Camembert-Käse
camemberti	Camembert Käse
roquefortii	Roquefort-Käse
nalgiovensis	Rohwurst (Salami)
chrysogenum	Penicillin
griseofulvum	Griseofulvin
Aspergillus niger	Citronensäure
oryzae	Amylasen, Proteasen
Trichoderma viride	Cellulasen
Mucor miehei	Lab-Ersatzenzym



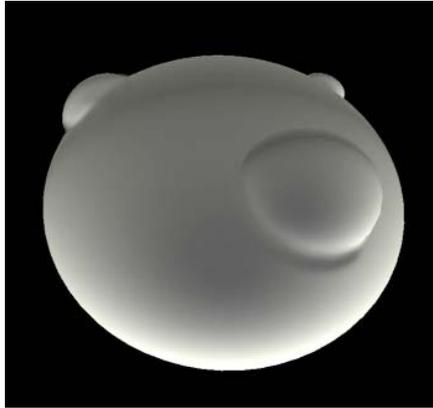
Penicillium candidum
(z.B. Camembert-Käse)



■ Bedeutung ausgewählter Deuteromyceten

Aspergillus flavus	Aflatoxine
Penicillium viridicatum	Ochratoxin
Botrytis cinerea	Grauschimmel (Wein)
Fusarium sporotrichioides	Trichothecene
Candida albicans	Schleimhautinfektionen

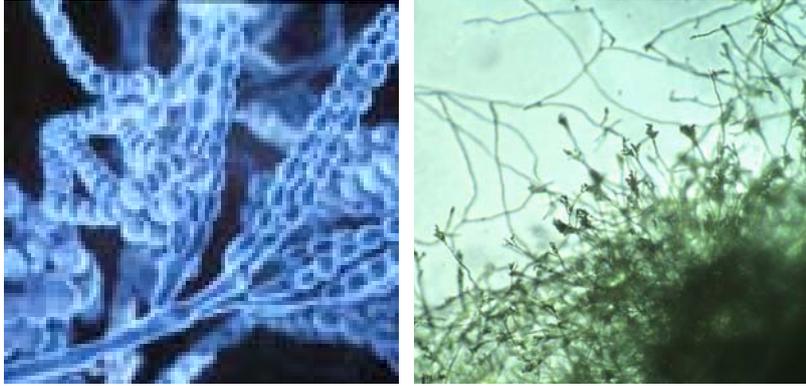
Candida albicans



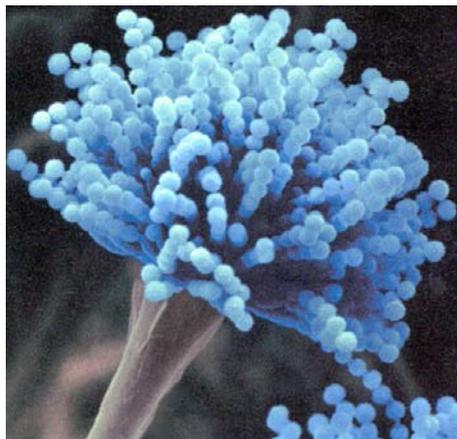
Agarplatte mit Schimmelkolonien
aus der Luft



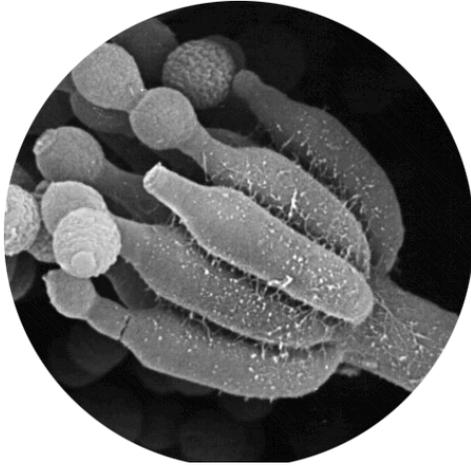
Penicillium



Aspergillus



Penicillium camemberti



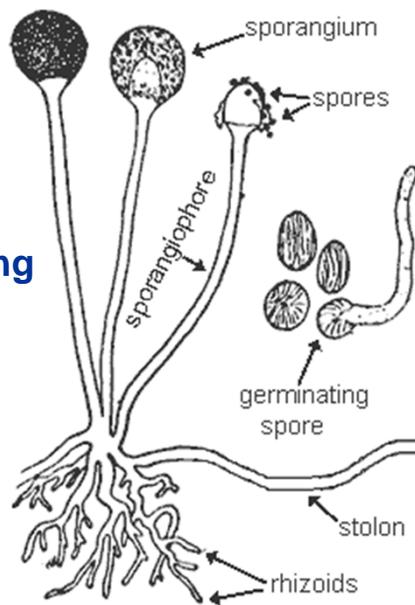
Penicillium chrysogenum



Rhizopus



Asexuelle Vermehrung von Rhizopus



Quelle: Backyardnature.net

Hefen

- einzellige Pilze
- kugelförmig bis oval und zylindrisch
- größer als Bakterienzellen
- Zellteilung durch **Knospung/Sprossung**
- zu Ascomyceten (→ sexuelle Vermehrung)
- Bildung von **Sprossverbänden**
- fallweise Bildung eines **Pseudomycel**

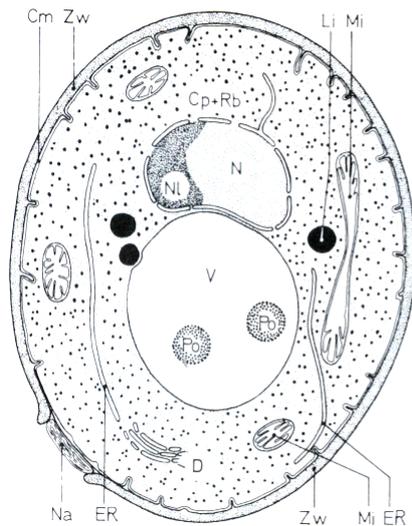
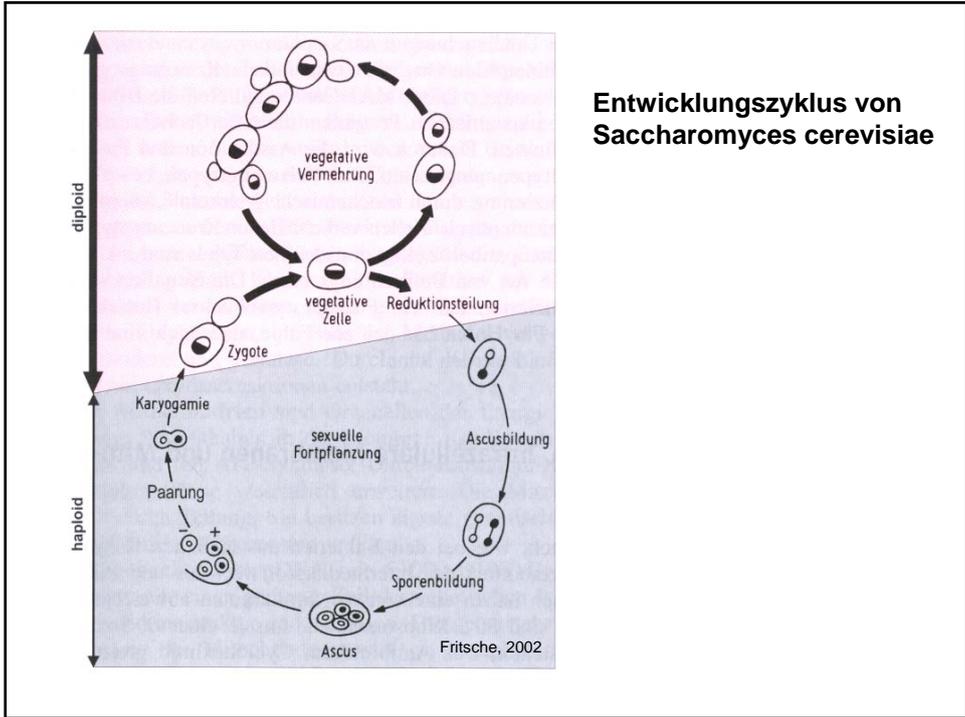
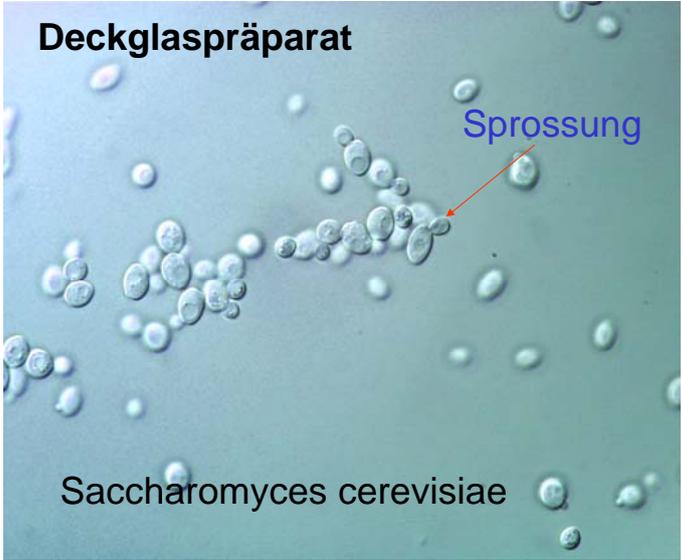


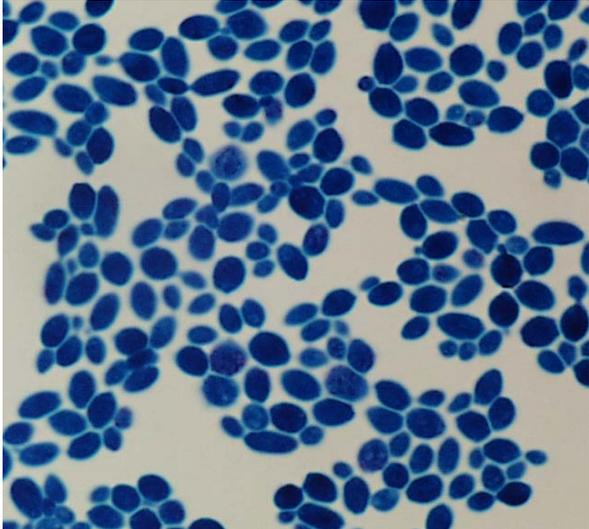
Abb. 5.9 Schematisches Querschnittsbild einer Hefezelle. Die einmalige Knospung einer Tochterzelle hat eine Narbe hinterlassen. Cm = Cytoplasmamembran, Cp = Cytoplasma, D = Dictyosom, ER = Endoplasmatisches Reticulum, Li = Lipidtröpfchen, Mi = Mitochondrien, N = Nucleus oder Kern, Na = Narbe, NI = Nucleolus, Po = Polyphosphate, Rb = Ribosomen, V = Vakuole, Zw = Zellwand

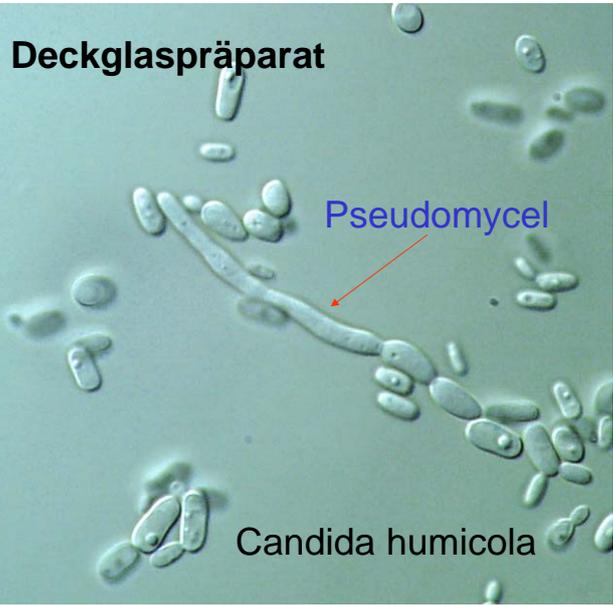
Schlegel, 1992



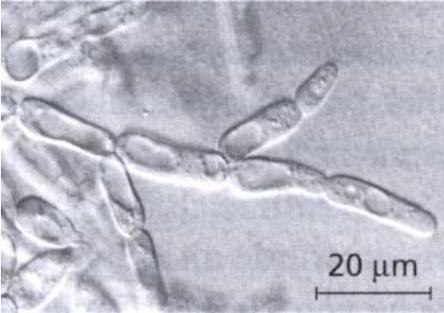


Methylenblau-Präparat Presshefe



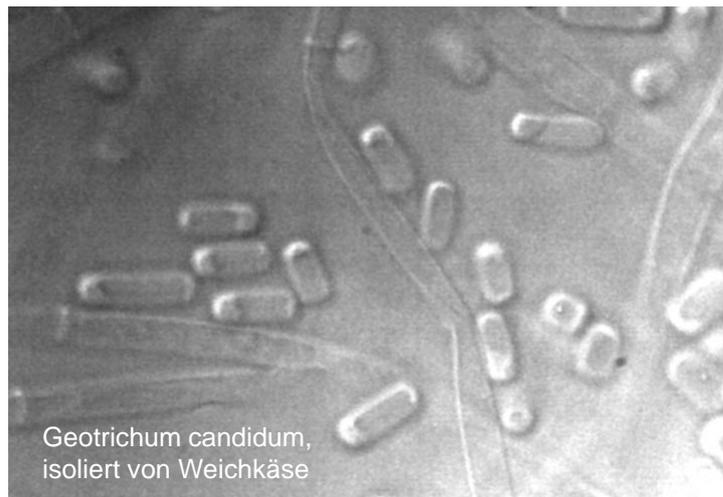


Ausbildung von Pseudohyphen
(Pseudomycel) bei Hefen

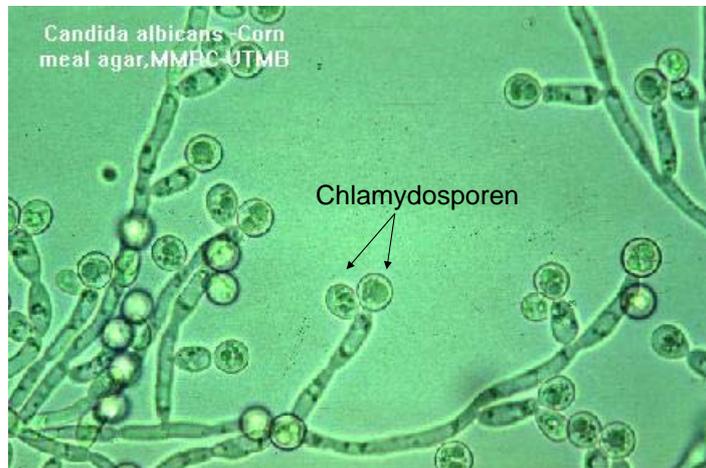


Munk, 2001

Spezielle Wachstumsformen bei Pilzen „Arthrosporen“ / Hyphenfragmentierung



Candida albicans

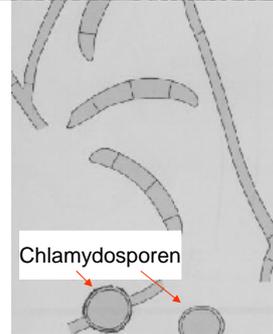


Chlamydosporen

- Dickwandige, Zellen zur Überdauerung ungünstiger Umweltbedingungen
- Oft größer als Nachbarzellen und teilweise gefärbt
- Lage entweder endständig oder innerhalb von Zellkomplexen
- Asexuelle Dauerform



„Sudden Death“ Phänomen
bei Sojabohnen
(Infektion mit *Fusarium solani*)

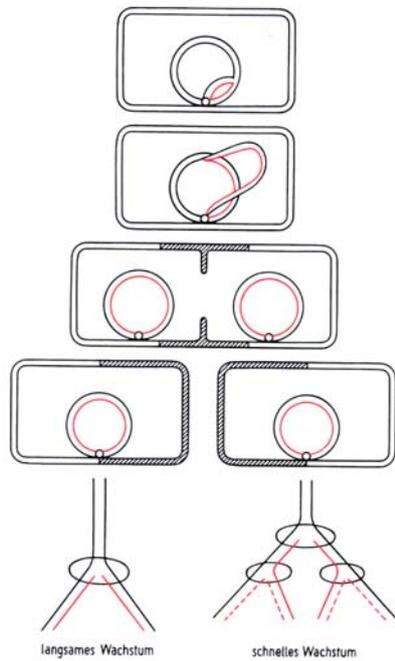


6. MIKROBIELLES WACHSTUM

Definition

**Wachstum ist die irreversible Zunahme
der lebenden Substanz**

- Energiegewinnung
- Aufbau von Zellmaterial
- Ansprüche der Mikroorganismen unterschiedlich



Wachstum und Zelldifferenzierung von Bakterien

Identische Replikation und Zellteilung

Fritsche, 2002

Kinetik des Zellteilungsvorgangs -1

Beispiel: rasch wachsende Bakterien

Zeit (h)	Gesamtzahl der Zellen
0	1
0,5	2
1	4
1,5	8
2	16
2,5	32
3	64
3,5	128
4	256
4,5	512
5	1024
5,5	2048
6	4096
.	.
a 10	1048576

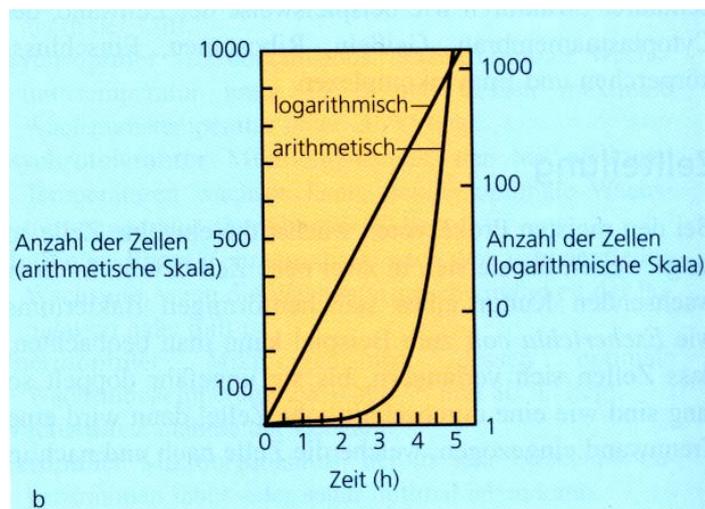
Brock, 2001

$1 \rightarrow 2^1 \rightarrow 2^2 \rightarrow 2^3 \rightarrow 2^4 \rightarrow 2^5 \rightarrow 2^6 \dots \dots \dots n \text{ Zellen}$

Geometrische Reihe

Kinetik des Zellteilungsvorgangs -2

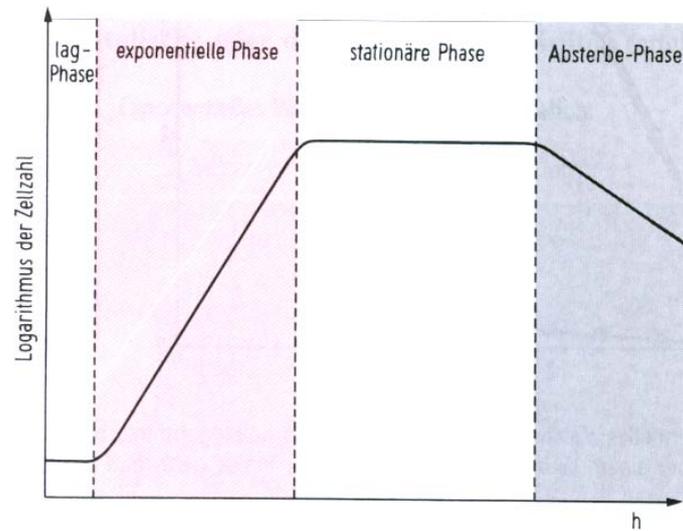
Beispiel: rasch wachsende Bakterien



b

Brock, 2001

Bakterielle Wachstumskurve in statischer Kultur



Fritsche, 2002

Wachstumsgeschwindigkeit:

Änderung der Zellzahl oder der Zellmasse pro Zeiteinheit

Generationszeit („Verdoppelungszeit“):

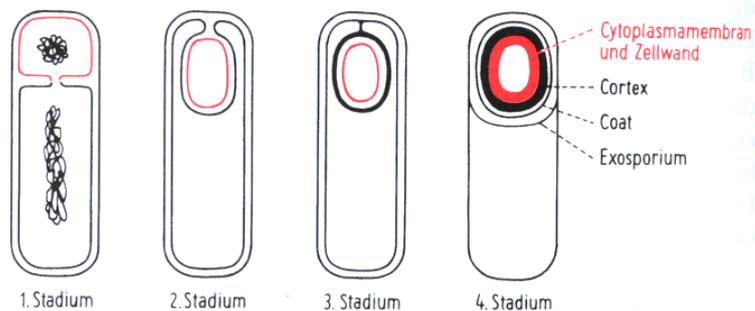
Zeit, die eine Zellpopulation benötigt, um sich zu verdoppeln

Beurteilung des Wachstums

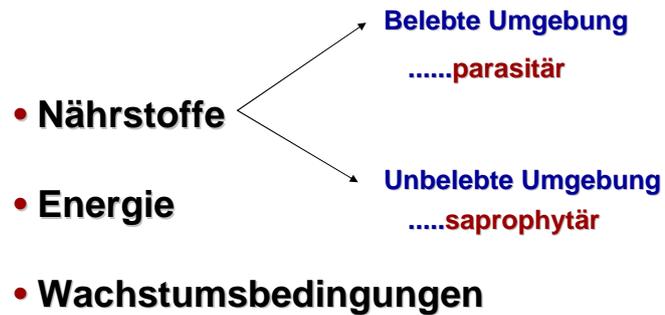
$$\text{Spezifische Wachstumsrate (pro h)} \rightarrow \mu = \frac{\ln 2}{t_d} \leftarrow \text{Verdoppelungszeit (in h)}$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Wachstum endosporenbildender Bakterien



Voraussetzungen für das Wachstum von Mikroorganismen



Ernährung von Mikroorganismen

Elementare Ansprüche

Wasser

Makroelemente C, O, H, N, S, P
K, Na, Ca, Mg, Fe

→ Siderophore

Mikro- und Spurenelemente

Mn, Mo, Zn, Cu, Co, Ni,
Va, B, Cl, Se, Si, Wo etc.

Wachstum „milieuabhängig“

ad Stoffwechsellistung



Ein Laktose-vergärendes Bakterien setzt pro Stunde das 1000 - 10.000fache seines Eigengewichts an Substrat um (zum Vergleich: Mensch 250.000 h = halbes Leben).



Energieklassen von Mikroorganismen

Mikroorganismen nützen verschiedene Energiequellen.....

.....**“troph“** (Griech.: „füttern“)

Einteilung von Mikroorganismen nach ihren Nährstoffansprüchen -1

phototroph



**nutzen Licht als
Energiequelle**

z.B. Cyanobakterien

chemotroph

**nutzen die im Verlauf
einer chem. Reaktion,
vorwiegend Redox-Reaktion,
freigesetzte Energie**

z.B. Pseudomonaden,
Bacillen etc.

Einteilung von Mikroorganismen nach ihren Nährstoffansprüchen -2

heterotroph

**verwertet organische
Kohlenstoffverbindungen**

z.B. Fungi

autotroph

verwertet CO₂

z.B. Pseudomonas
carboxidovorans

organotroph

**Verwendet organischen
Elektronen-Donor**

z.B. E. coli etc.

lithotroph

**verwendet anorganischen
Elektronen-Donor**

z.B. Desulfovibrio

Einteilung von Mikroorganismen nach ihren Nährstoffansprüchen -3

prototroph

z.B. Enterobacterien

benötigen außer einer
einzigsten organischen
Verbindung (Energie- und
Kohlenstoffquelle) keine
weiteren organischen
Verbindungen

auxotroph

z.B. Milchsäurebakterien

müssen entsprechende
Vorstufen für organische
Substanzen aufnehmen



Supplie, Wachstumsfaktoren

- Vitamine
- Aminosäuren
- Purine/Pyrimidine

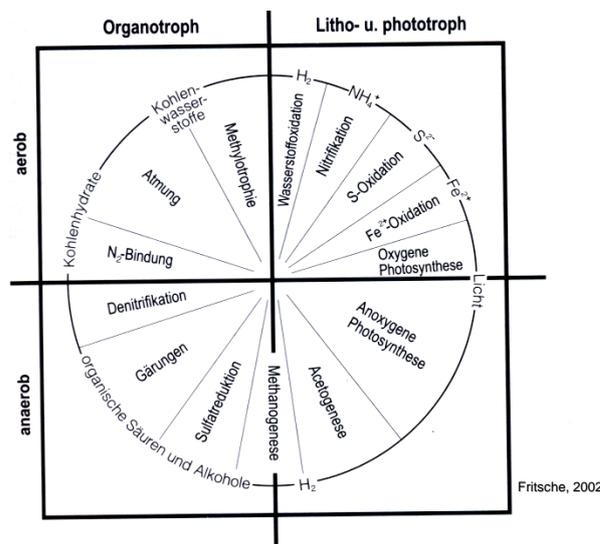


Abb. 2-3. Vielfalt des Stoffwechsels. Die Koordinaten verdeutlichen die Ernährungsweisen und Lebensbedingungen der Mikroorganismen. Das Spektrum der Substrate und wesentliche Stoffwechselprozesse sind im Kreis angeführt.

Bedeutung von Nährstoffkomponenten

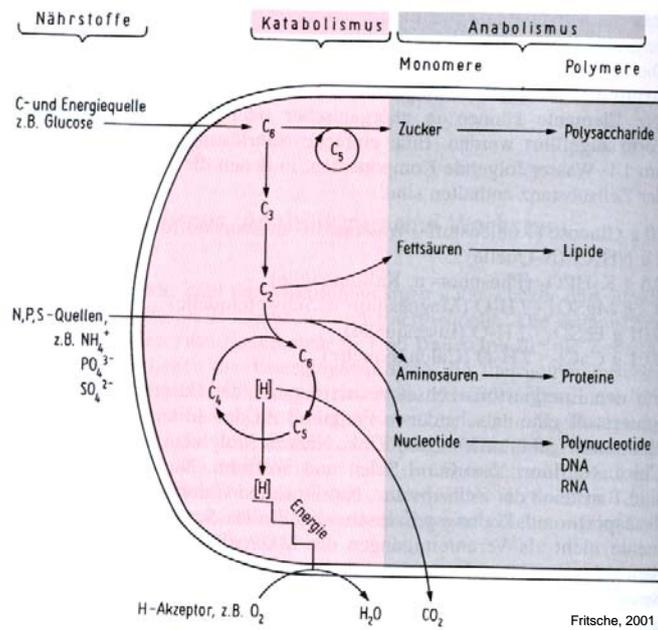
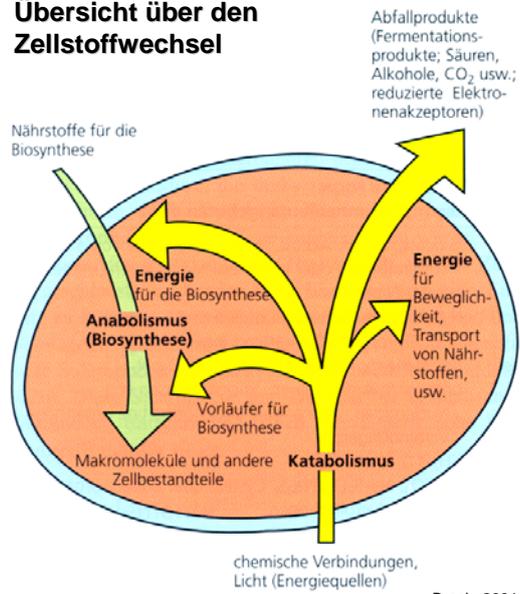
C	organ. Moleküle
O	organ. Moleküle, Elektronenakzeptor aerober Organismen
H	organ. Moleküle, Elektronendonator bei vielen Prokaryonten
N	Proteine, Nucleinsäuren, Coenzyme
S	Proteine, Coenzyme, Vitamine etc.
P	Nucleinsäuren
Fe	Cytochrome, Proteine, Enzyme etc.
Na	Zellwandstabilisierung
K	Proteinbiosynthese (Enzyme)
Mg	Stabilisierung von Ribosomen, Nucleinsäuren, Enzyme

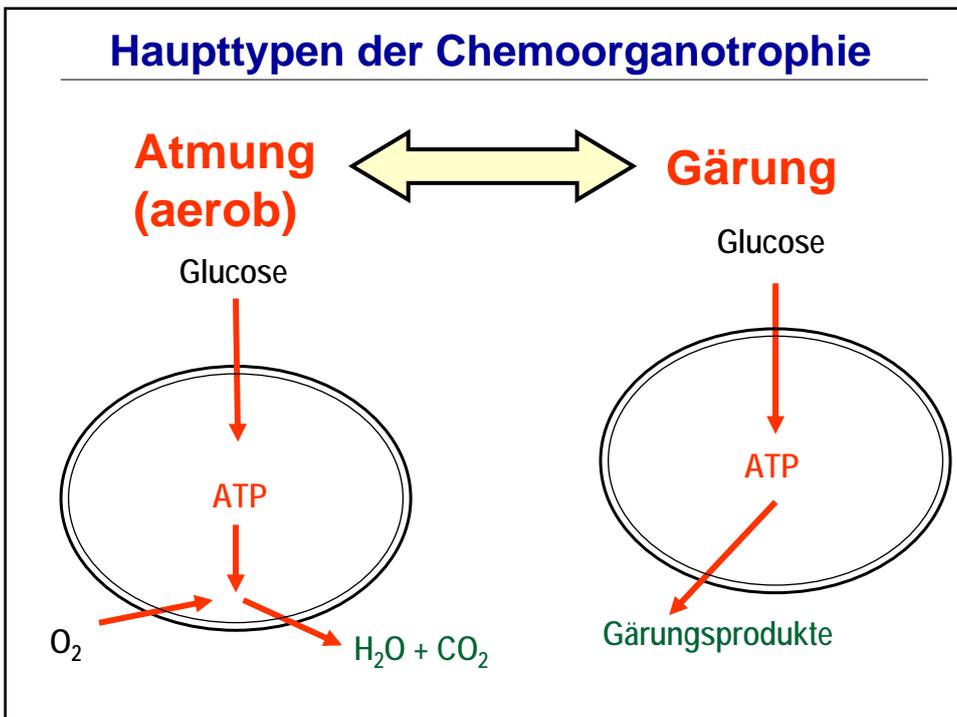
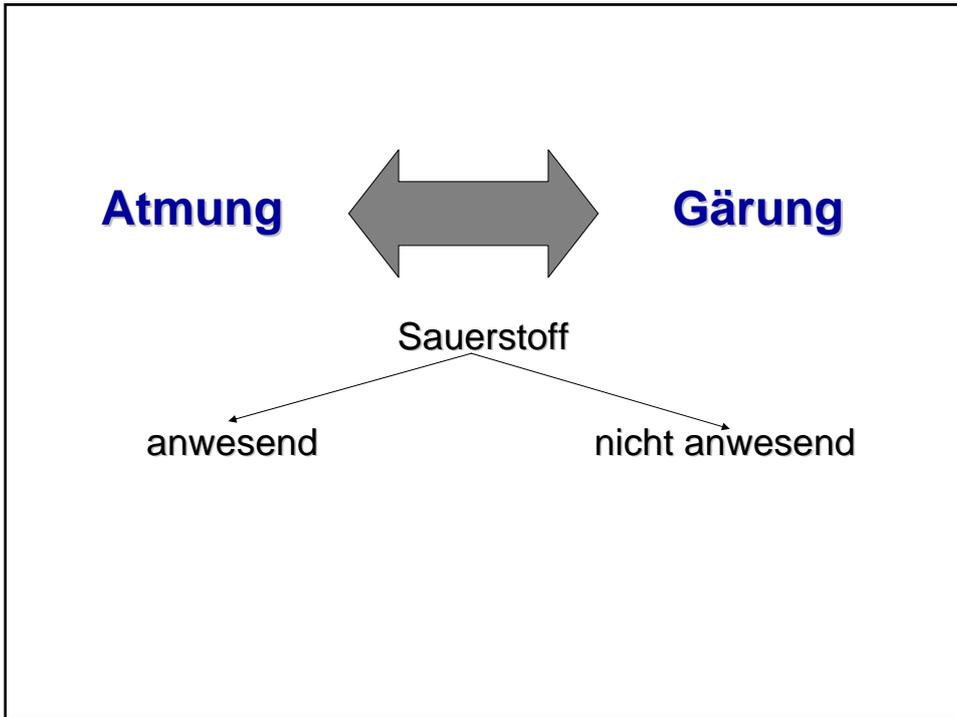
Mikrobieller Stoffwechsel (Metabolismus)

**Enge Verflechtung von Stoffumwandlungen
und Energietransformationen**

**ABBAU.....KATABOLISMUS
AUFBAU.....ANABOLISMUS**

Übersicht über den Zellstoffwechsel





Atmung

....katabole Reaktionsfolge, bei der organische Substanz zu CO_2 und H_2O abgebaut wird und freie Energie zur ATP-Bildung genutzt wird.

Glucoseabbau

F16BP-Weg KDPG-Weg PP-Zyklus



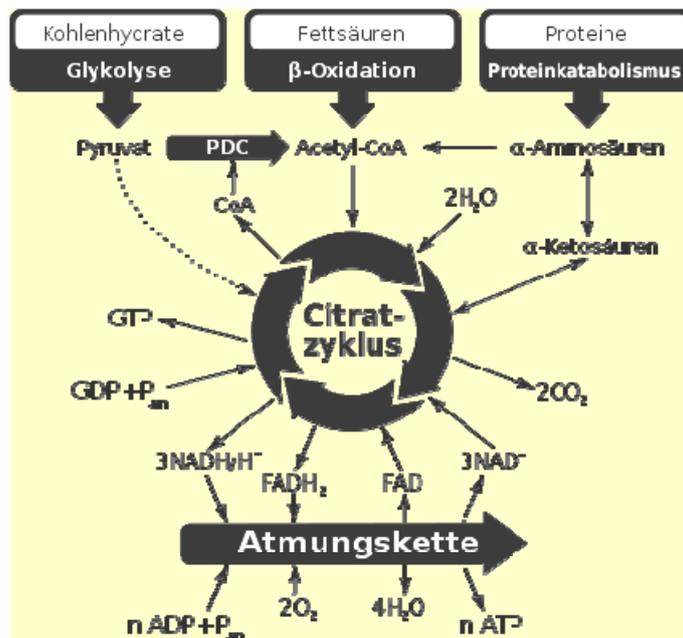
Oxidative Pyruvat-Decarboxylierung



Tricarbonsäure-Zyklus



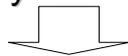
Atmungskette



Fructose-1,6-Bisphosphat-Weg (Embden-Meyerhof-Parnas-Weg)

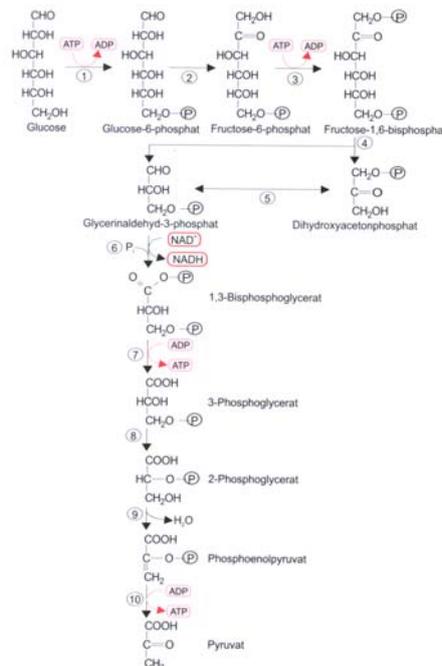
z.B.: Hefen, E.coli

- von vielen Eu- und Prokaryonten beschriften
- EMP-Weg leitet oft Gärungsprozesse ein
- Start mit Phosphorylierung der Glucose
- Pyruvat als Intermediärprodukt



- carboxyliert zu AcetylCoA
- AcetylCoA in den Citratzyklus eingeschleust
- Bildung von CO₂ und Oxalacetat (Acetylakzeptor)
- Citratzyklus: bioenergetische und biosynthetische Funktion
- Gewinnung von ATP in der Atmungskette

EMP-Weg



Fritsche, 2002

Andere Kohlenhydrat-Abbauwege

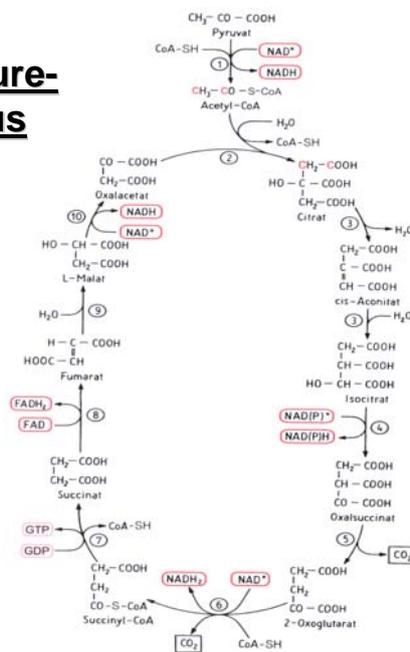
➤ **2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat-Weg (Entner-Doudoroff-Weg, KDPG-Weg)**

z.B.: Pseudomonas, Xanthomonas

➤ **Pentosephosphat-Zyklus**

z.B.: Gluconobacter, Brucella

Tricarbonsäure- (Citrat-)Zyklus



Fritsche, 2002

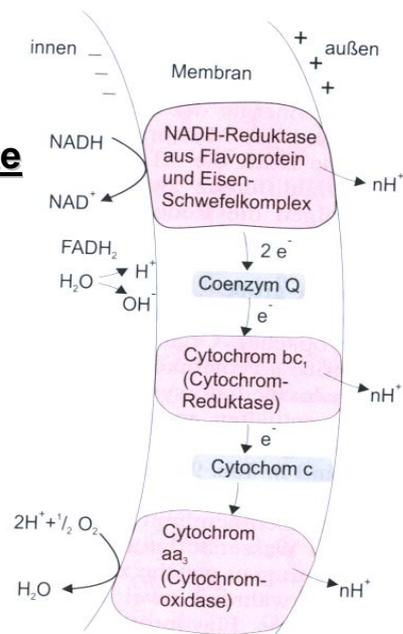
Funktion der Atmungskette

Umwandlung der freien Energie der Reduktionsäquivalente [H] in den Protonengradienten und das Membranpotenzial

Kaskadenartig ablaufende Redoxreaktionen, bei denen Energie „dosiert“ abgegeben wird

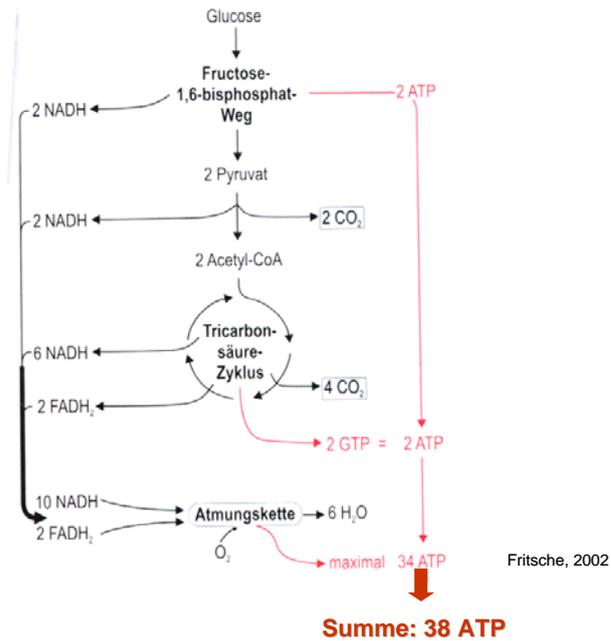
⇒ Eukaryonten.....Mitochondrien
Prokaryonten.....Cytoplasmamembran

Vereinfachtes Schema der Atmungskette



Fritsche, 2002

**Energiebilanz
des bei der Atmung
gebildeten ATP aus
den verschiedenen
Stoffwechselphasen**



Anaerobe Atmung

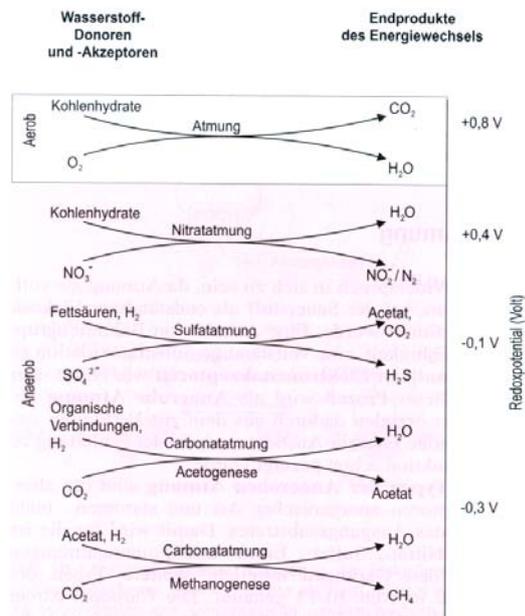
**...vollständige Substratoxidation zu CO₂ und H₂O
mit alternativen Elektronenakzeptoren (Nitrat,
Sulfat, Carbonat)**

Beispiele:

Nitratatmung: Pseudomonas, Bacillus

Sulfatreduktion: Desulfovibrio

Atmung und anaerobe Atmung



Gärung

L. Pasteur: „Gärung ist Leben ohne Sauerstoff“

Gärungen sind der Energiebereitstellung dienende Prozesse, bei denen auf Grund des Mangels an anorganischen Elektronenakzeptoren die während der Substratoxidation anfallenden Elektronen (Reduktionsäquivalente) auf organische Akzeptoren übertragen werden.

Fritsche, 2002

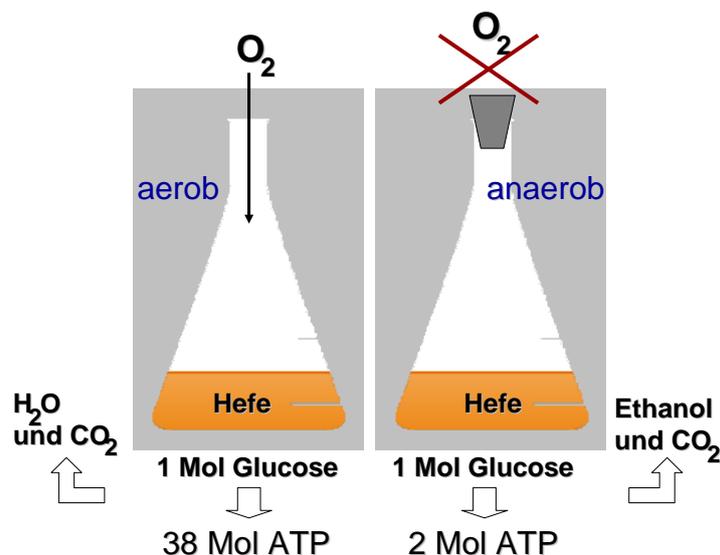
Prinzip der alkoholischen Gärung

z.B.: *Saccharomyces cerevisiae*

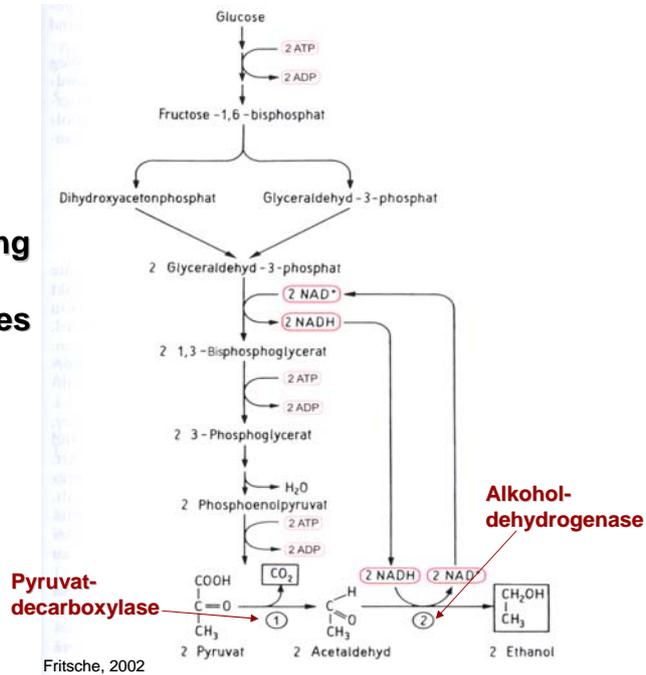
- Start mit EMP-Weg
 - Pyruvat wird decarboxyliert
 - Acetaldehyd fungiert als Akzeptor für Reduktionsäquivalente
 - NADH dient als Wasserstoff-Carrier
 - von insgesamt 4 ATP-Molekülen dienen 2 der Glucoseaktivierung
- ➡ pro Molekül Glucose werden 2 ATP-Moleküle gewonnen



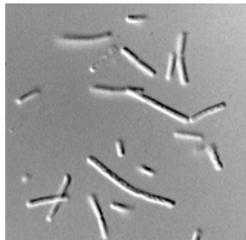
➡ „Pasteur-Effekt“ ➡



**Schema der
alkohol. Gärung
durch
Saccharomyces
cerevisiae**



Milchsäure-Gärung



Milchsäurebakterien:

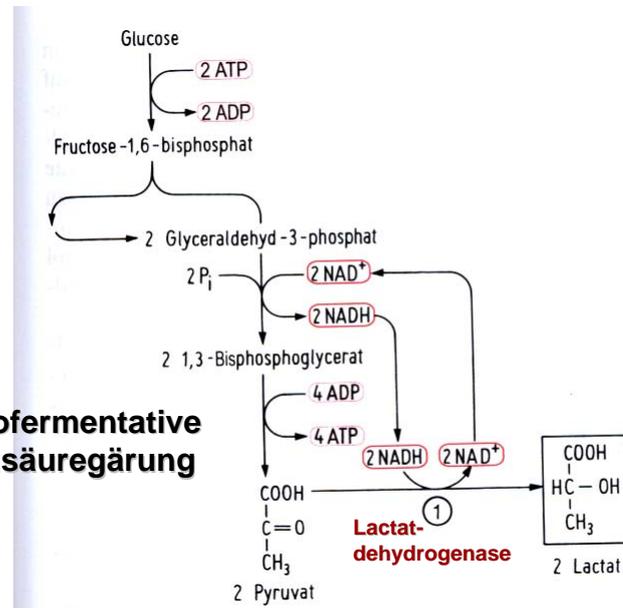
Pflanzen

Milch

Schleimhäute (Mensch, Tier)

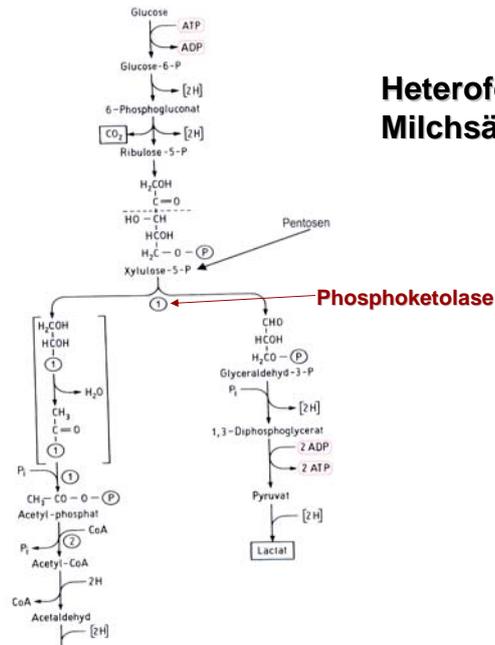
- Verwertung von Glucose und Lactose
- spezifische Funktion der β -Galactosidase
- homo- und heterofermentative MS-Gärung
- konservierende Bedeutung der Milchsäure

Homofermentative Milchsäuregärung



Fritsche, 2002

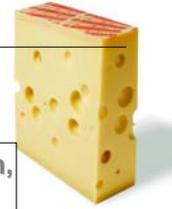
Heterofermentative Milchsäuregärung



Fritsche, 2002

Andere Gärungen

- Propionsäuregärung → Propionibacterium, Veillonella
- Ameisensäuregärung (Gemischte Säuregärung, 2,3-Butandiol-Gärung) → Enterobakterien (E.coli, Salmonella, Erwinia etc.)
- Buttersäuregärung → Clostridien, Fusobacterium, Eubacterium
- Essigsäure“gärung“ → Ruminococcen, Essigsäurebakterien



Proteinabbau und Vergärung von Aminosäuren

- Proteine dienen als C-, N- und Energiequelle
- Bakterien und Pilze
- Proteasen zerlegen Proteine in Peptide und Aminosäuren
- nach Transaminierung:Proteinbiosynthese
- nach Desaminierung und Decarboxylierung:
 C- und Energiequelle
- anaerob: unvollständiger Abbau
- aerob: vollständiger Abbau
- „Fäulnis“ → **Primäre Amine (....Geruch !)**
 → **Fuselöle (bei Vergärung eiweißhaltiger Substrate)**



Am Stoffwechsel beteiligte Substanzen - allgemeine Übersicht

- **Kohlenhydrate**
- **Proteine**
- **Enzyme**
- **Coenzyme und prosthetische Gruppen**
- **Metabolite**
- **ATP und energiereiche Verbindungen**
- **Intermediärprodukte**

Zusammenhang zwischen Milieubedingungen und mikrobiellem Wachstum

Einteilung

- Verhalten gegenüber Sauerstoff / Redoxpotenzial
- Temperaturoptimum
- Hitzeresistenz
- Bevorzugte pH-Bereiche
- Wasseraktivität und osmotischer Stress

Verhalten gegenüber Sauerstoff / Redoxpotenzial

Mindestens 3 Gruppen:

- **obligat aerobe Organismen** → Energie nur durch Atmung
 - **obligat anaerobe Organismen** → Energie nur durch Gärung
 - **fakultativ anaerobe Organismen** → Energie durch Gärung oder Atmung
- aerotolerante
 - mikroaerophile

BEISPIELE:

- **obligat aerobe Organismen**

Pseudomonaden, Aeromonaden,
Schimmelpilze

- **obligat anaerobe Organismen**

Clostridien, Bacteroides

- **fakultativ anaerobe Organismen**

Enterobacterien, Bacillen

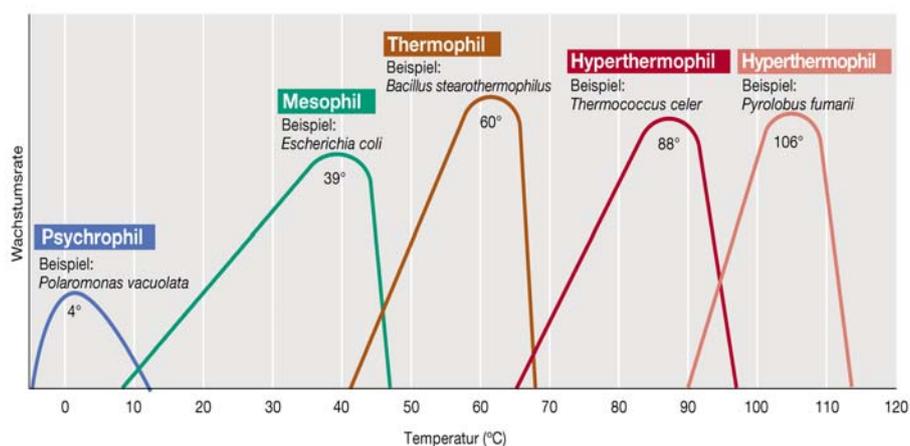
Hefen → „Pasteur-Effekt“

Temperaturoptimum

Mindestens 4 Gruppen:

- **psychrophile Organismen** → Wachstumsoptimum < 20 °C
- **mesophile Organismen** → Wachstumsoptimum 20 - 40 °C
- **thermophile Organismen** → Wachstumsoptimum > 40 °C
- **psychrotrophe Organismen**
 - ↓
 - Optimum wie mesophile,
aber auch bei Kühlttemperaturen
Wachstum möglich
 - psychrotolerante
 - thermotolerante
 - hyperthermophile
 - thermotrophe

Wachstumsrate von Mikroorganismen in Abhängigkeit von der Temperatur



Brock, 2006

BEISPIELE:

- psychrophile Organismen

Bacillen, Flavobakterien

- mesophile Organismen

E.coli, Staphylococcen

- thermophile Organismen

Geobacillus stearothermophilus, Thermus

- psychrotrophe Organismen

Pseudomonaden, Bacillen

Faktoren der Thermoresistenz

- Endosporen
- Problematik Pasteurisation
- Sterilisationsprozess notwendig
- Bacillen, Clostridien

pH-Optimum

- Acidophile Organismen

Sulfolobus, Thiobacillus
Schimmelpilze, Hefen

- Neutrophile Organismen

Alcaligenes, Pseudomonas etc.

- Alkaliphile Organismen

Bacillen, Nitrobacter



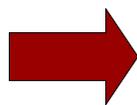
Säuretoleranz
Säureresistenz

Wasseraktivität und osmotischer Stress

Wasseraktivität:

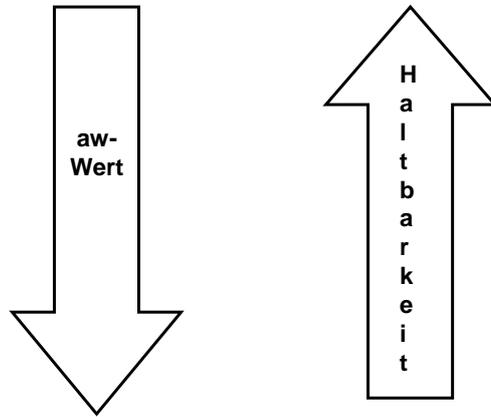
Maß für das „verfügbare Wasser“

$$a_w\text{-Wert} = \frac{\text{Wassergehalt im Dampfraum über dem Substrat}}{\text{Wassergehalt im Dampfraum über reinem Wasser}}$$

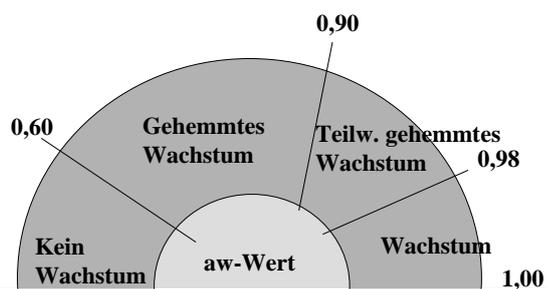


Osmotische Verhältnisse
Osmotoleranz
Osmophile Keime

Allgemeiner Zusammenhang zwischen aw-Wert und Produkthaltbarkeit



Zusammenhang zwischen aw-Wert und Mikroorganismenwachstum

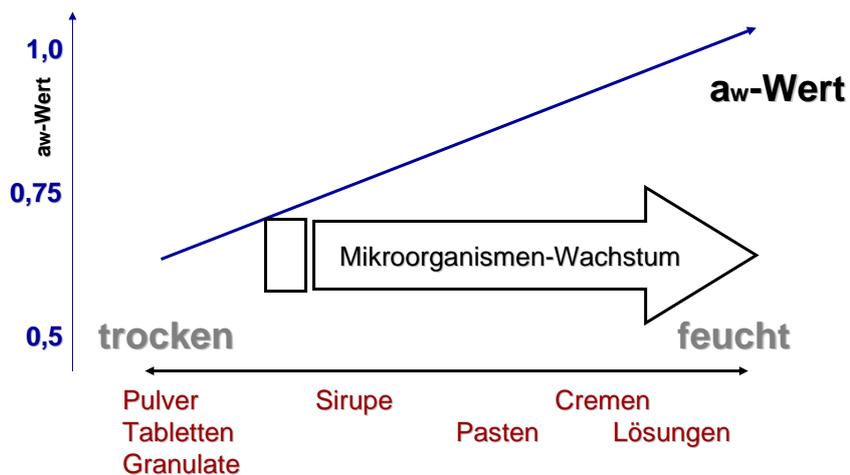


n. Pichhardt, 1998

Wasseraktivitätsbereiche für Mikroorganismen - allgemeine Übersicht

Mikroorganismus	aw-Wert-Bereich
Bakterien, generell	0,95 - 0,92
Micrococcen, Lactobacillen	0,90
Staphylococcus aureus	0,86
Halophile Bakterien	0,75
Hefen	0,94 - 0,88
Schimmelpilze	0,93 - 0,70
Osmophile Hefen	0,73

Einfluss der Produktfeuchte auf das Mikroorganismenwachstum

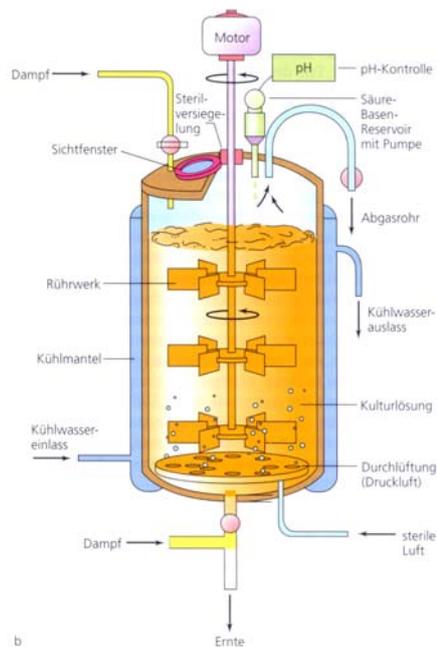


Industrielle Mikrobiologie / Biokatalyse

Herstellung von:

- Zellen (z.B. Hefezellen)
- Stoffen durch Umwandlung (z.B. biologisch modifizierte Steroide)
- Produkten aus Zellen:
 - Enzyme
 - Antibiotica
 - Lebensmittelzusatzstoffe
 - Alkohol
 - Chemikalien

Fermenter



Unterschiede zwischen statischer und kontinuierlicher Kultur

STATISCH

Typische
Wachstumsphasen

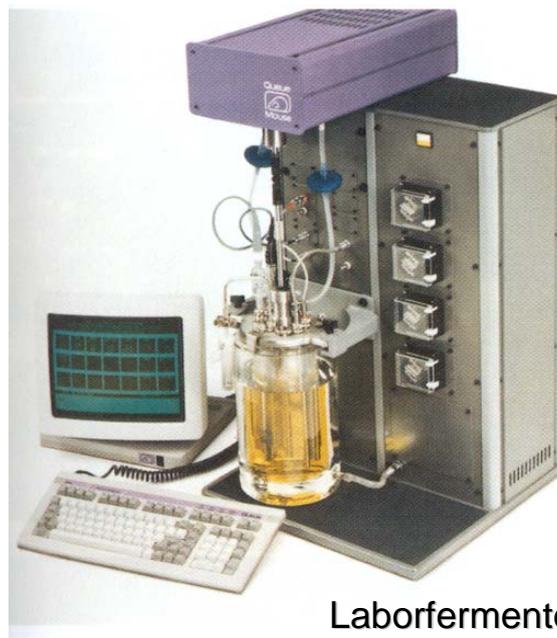
- lag
- log
- stationäre
- Absterbe-Phase

KONTINUIERLICH

Kontinuierliche log- Phase

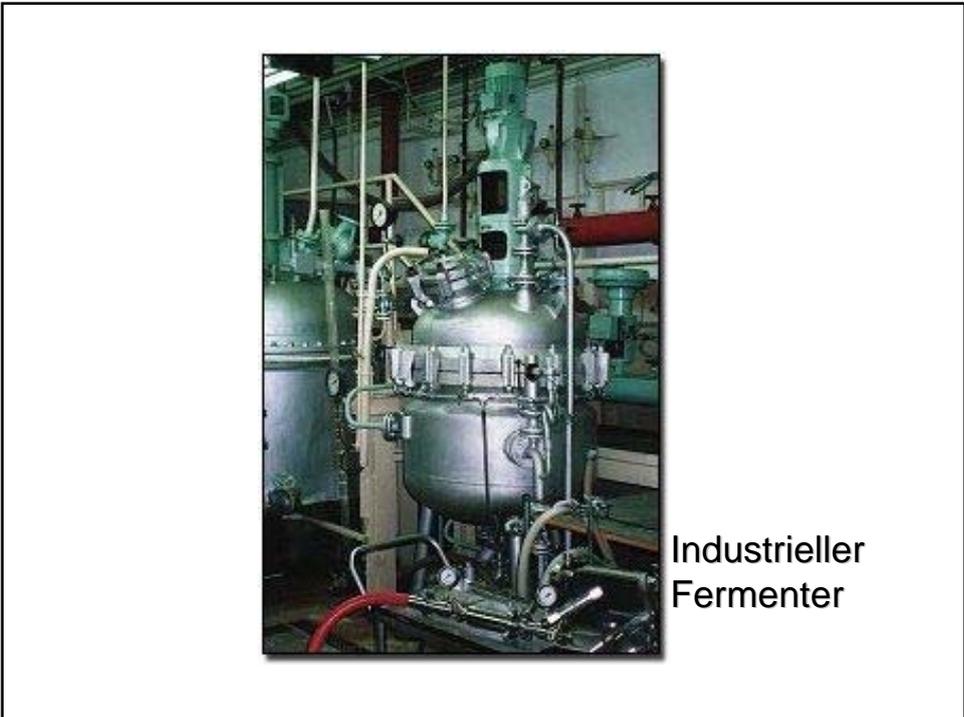
permanente Nährstoffzufuhr
Automatischer Austrag von
Zellmasse
pH konstant
Temperaturkonstanz
gleichbleibende Zelldichte

(in situ Sterilisation)



Laborfermenter

Queue Systems, Inc.



Industrielle Produktion von Bakterienkulturen



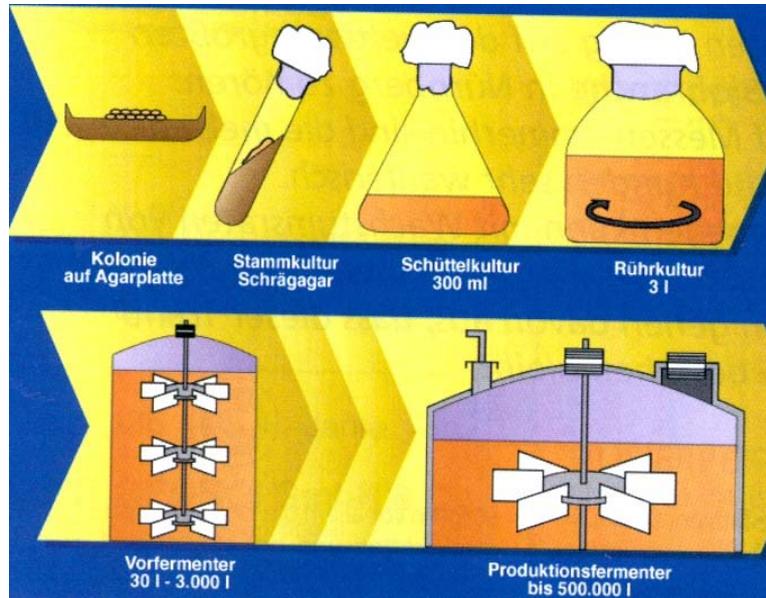
Quelle: Danisco-Cultor

Großtechnische Gefriertrocknung von Bakterienkulturen



Quelle: Danisco-Cultor

„Upscaling“ Prozess für Fermentationen



Industriell vorwiegend genutzte Mikroorganismen

- **Pilze (Hefen und Schimmelpilze)**
- **Prokaryonten (häufig Streptomyces)**

Zielsetzungen:

- hohe Ausbeute
- exakt definierte und hinterlegte Stämme

Internationale Kultursammlungen

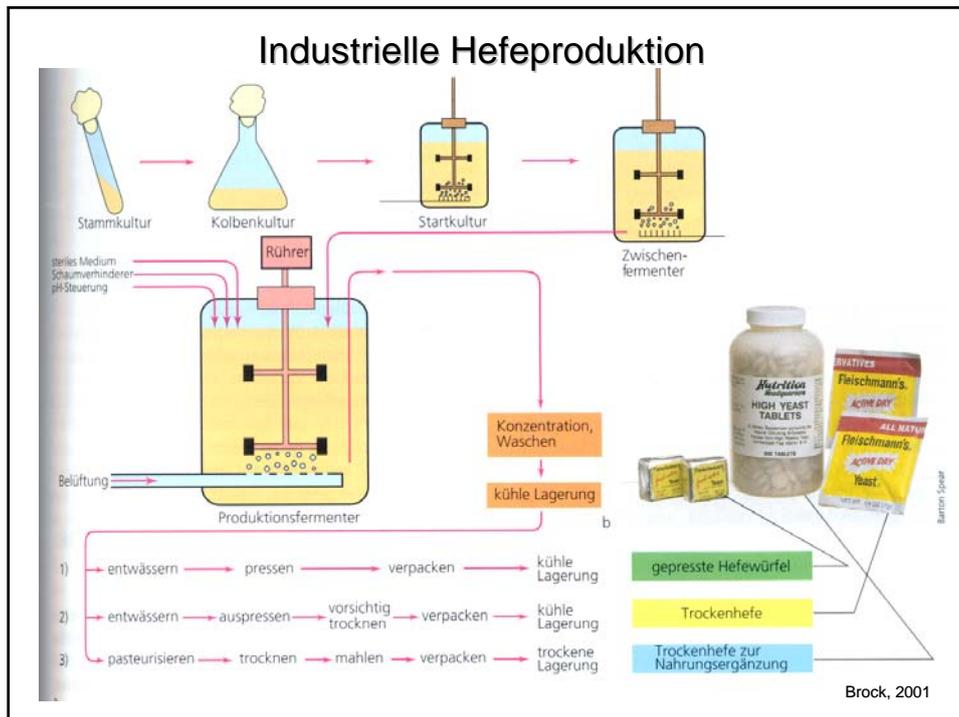
ATCC	American Type Culture Collection	USA
CBS	Centraalbureau voor Schimmelculturen	NL
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	D
PCC	Pasteur Culture Collection	F
NCTC	National Collection of Type Cultures	UK
NCIB	National Collection of Industrial Bacteria	UK
CCM	Czech Collection of Microorganisms	CZ
.		
.		
.		
.		

Verwendung von Hefe und Hefeprodukten in der Industrie

- Bäckerhefe und Broterzeugung
- getrocknete Lebensmittelhefe als LM-Zusatzstoff
- Futterhefe

- Hefeextrakt für Kulturmedien
- Vitamine der B-Gruppe
- Vitamin D
- Enzyme für die LM-Industrie (Invertase, Galactosidase)
- Biochemikalien f.d. Forschung (ATP, NAD⁺, RNA)

- Ethanol
- Glycerin
- Bier
- Wein
- Whiskey, Weinbrand, Wodka, Rum



Bedeutende Produkte der industriellen Mikrobiologie

Antibiotika

Actinomyceten, Bakterien, Schimmelpilzen

Chemikalien, die von Mikroorganismen produziert werden, die andere Mikroorganismen töten oder deren Wachstum hemmen.

<u>Beispiele:</u>	Bacitracin Polymyxin B Erythromycin Streptomycin Penicillin Cephalosporin	Bacillus licheniformis Bacillus polymyxa Streptomyces erythreus Streptomyces griseus Penicillium chrysogenum Cephalosporium sp.	B A S
-------------------	--	--	-------------

Selektive Toxizität von Antibiotika



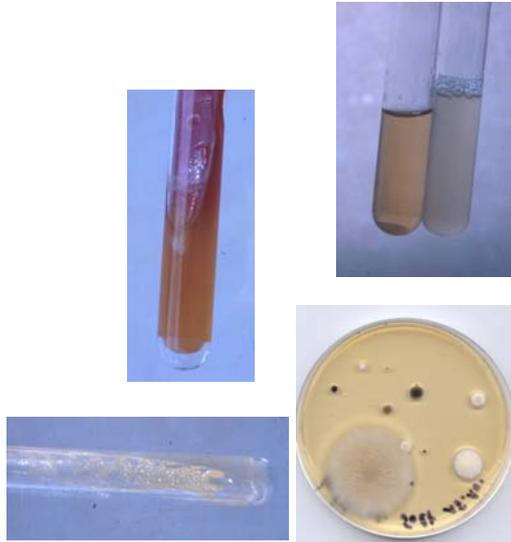
- Translationsvorgang in Ribosomen
- Zellwandsynthese
- Cytoplasmamembran
- DNA-Replikation
- Transkription

Anforderungen an einen industriell nutzbaren Mikroorganismus

- produziert die gewünschte Substanz
- steht als Reinkultur zur Verfügung
- ist genetisch stabil
- ist lagerungsstabil
- soll möglichst einfache Beimpfung des Fermenters gestatten
- soll schnell wachsen
- soll die gewünschte Substanz in möglichst kurzer Zeit produzieren
- soll in preiswertem Kulturmedium wachsen
- soll ggf. genetisch modifizierbar sein

Woran erkennt man mikrobielles Wachstum ?

- Trübung
- Sedimentbildung
- Gasbildung
- Koloniebildung



Wie kann man mikrobielles Wachstum messen ?

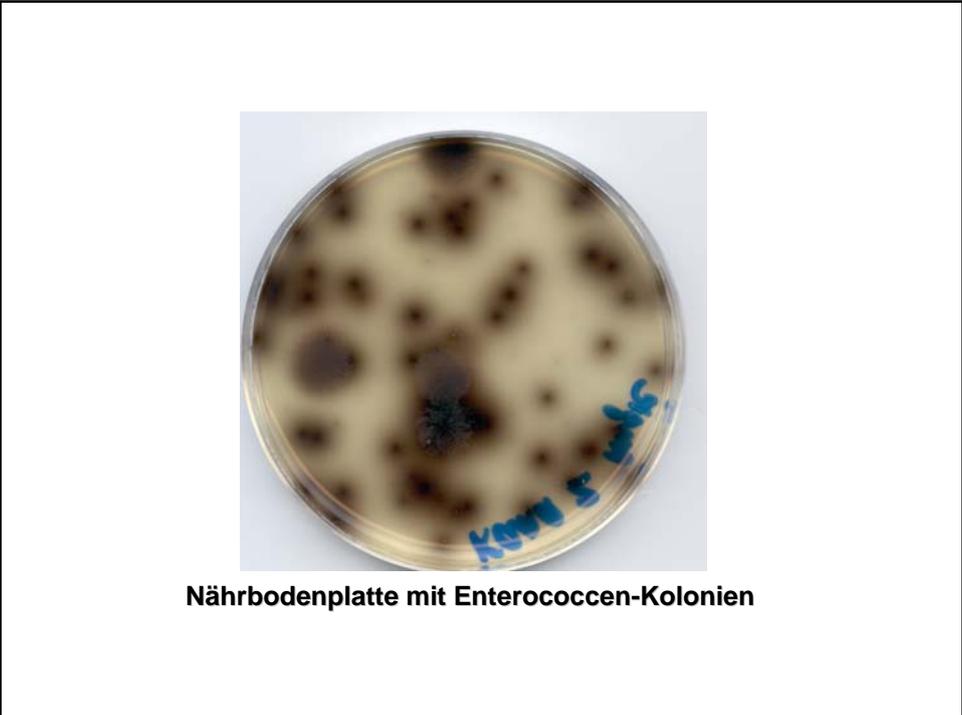
- Zählkammer-Präparat
- Kulturelle Lebendkeimzahl
- Trübungsmessung
- Biomasse-Bestimmung
- Indirekte Erfassung über Stoffwechselprodukte



.....s. auch Einheit 10



Blutkörperchenzählapparat 1925



Nährbodenplatte mit Enterococcen-Kolonien

7. EINFÜHRUNG IN DIE BIOTECHNOLOGIE

Allgemeine Definitionen

**Die Biotechnologie nutzt die biologische Zelle
und deren Inhaltsstoffe zur Entwicklung
von Verfahren.**

Glick & Pasternak, 1995

**Die Biotechnologie ist die Anwendung wissenschaftlicher
und technischer Prinzipien zur Stoffumwandlung durch
biologische Agenzien mit dem Ziel der Bereitstellung
von Gütern und Dienstleistungen.**

OECD 2005

Definitionen

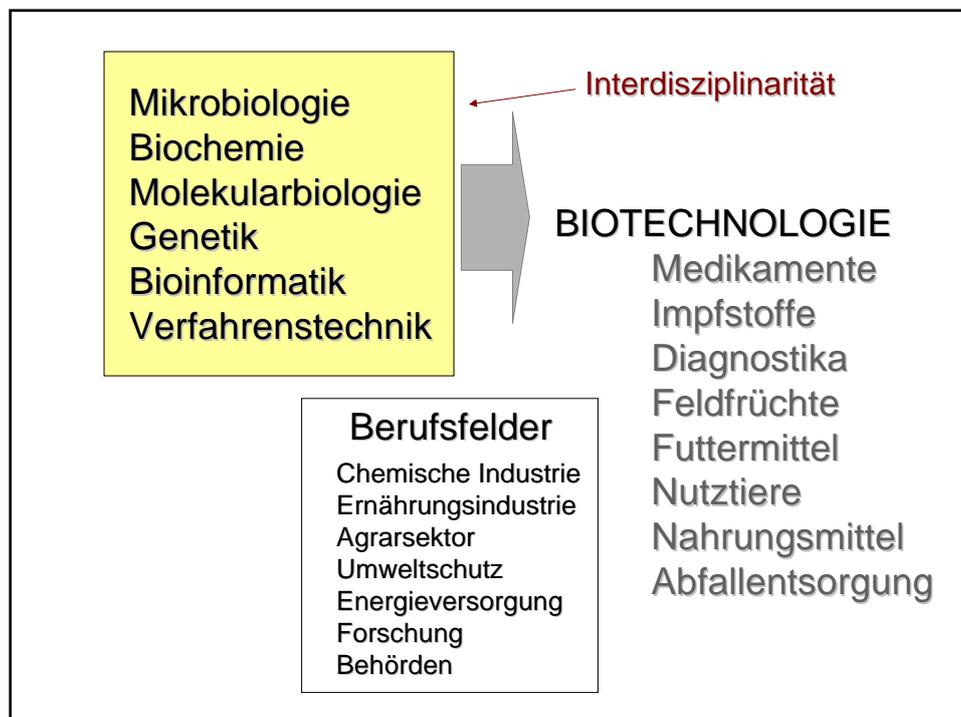
Biologische Agenzien:

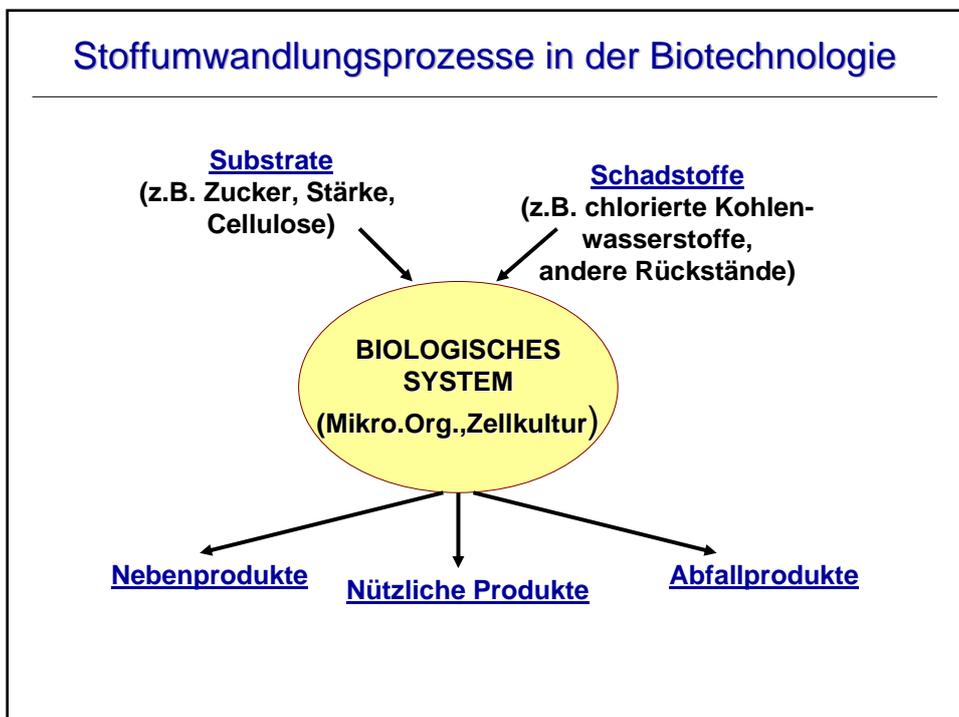
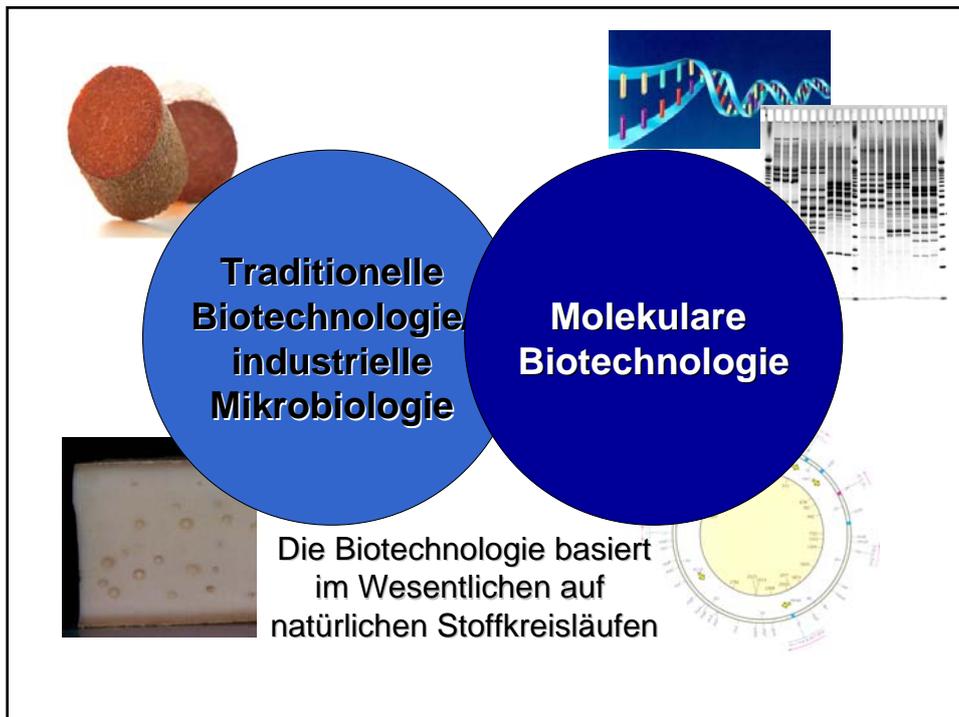
Mikroorganismen (inkl. genetisch veränderter Mikroorganismen) sowie Zellkulturen

Genetisch verändert:

Erbmaterial wird durch gentechnische Verfahren so verändert, wie dies unter natürlichen Bedingungen durch Kreuzen oder natürliche Rekombination nicht möglich ist.

...mit dem Ziel, verbesserte Zellfunktionen und Enzyme, bessere Produkte bei weniger Energie- und Produktionsaufwand zu erreichen.





Geschichtliche Daten: Biotechnologie

10.000 v.Chr.	Spontane alkoholische Gärung in Säften
3.000 v.Chr	Bierherzeugung (Ägypten, Kelten, Germanen)
Altertum u. Mittelalter	Fermentierte Lebensmittel (Käse, Joghurt, fermentierte Sojaprodukte usw.)
um 15. Jhdt.	Essigherzeugung (Frankreich)
19. Jhdt.	Pasteurisation, Gärungsindustrie
20.Jhdt.	Abwasseraufbereitung, Glycerinherzeugung, Citronensäureherzeugung, Penicillin etc.

Geschichtliche Daten: Biotechnologie

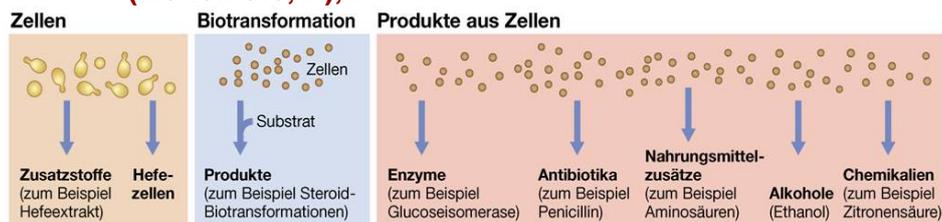
1917	K. Ereky prägt Begriff „Biotechnologie“
1943	Penicillin- großtechnische Herzeugung
1944	Avery, McLeod u. McCarthy beweisen, dass DNA das genetische Material ist
1953	Watson & Crick: DNA-Struktur
1961	Entzifferung des genetischen Codes
1972	Khorana et al. synthetisieren tRNA-Gen
1975	Köhler & Milstein: Herzeugung von monoklonalen Antikörpern
1976	Analyse der DNA-Sequenz
1978	Herzeugung von Humaninsulin mit E.coli
1981	erste automatisierte DNA-Synthesemaschine
1988	PCR-Technik
1990	Genherzeugung beim Menschen genehmigt (USA)

Nutzen der Biotechnologie: Beispiele

- Verfahren für die Diagnose, Prävention und Therapie ansteckender oder genetisch bedingter Krankheiten
- Erzeugung resistenter Pflanzen (gegen Insekten, Pilze, Viren, Stress, Dürre, Hitze etc.)
- Nutzung von Mikroorganismen zur Produktion von Chemikalien, Polymeren, Aminosäuren, Enzymen, Nahrungsmittelzusatzstoffen
- Beseitigung von Schadstoffen aus Abfallmaterial aus der Umwelt

Biokatalyse / Biotechnologie

- **Zellen** (z.B. Hefezellen)
- **Stoff-Umwandlung => Biotransformation**
 - biologisch modifizierte Hormone (z.B. Steroide),...
- **Produkten aus Zellen:**
 - **Enzyme, Antibiotika, Lebensmittelzusatzstoffe**
 - **Organische Säuren (Essig-, Zitronen-, Milch-, Propionsäure)**
 - **Alkohol (Ethanol, Zuckeralkohole,...), Chemikalien (Monomere,...),...**



Madigan et al., 2006

Molekulare Mechanismen der Rekombination

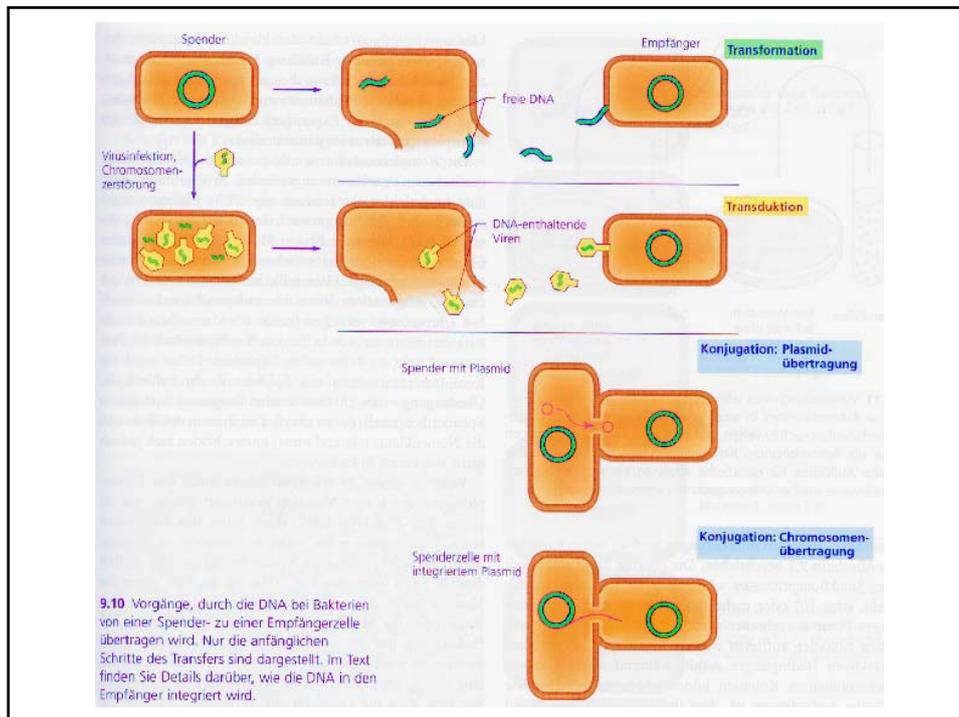
Gentransfer

- **Konjugation**
 - ↳ mit Plasmiden
 - ↳ durch Chromosomenübertragung
- **Transformation**
- **Transduktion**

Standorte, an denen horizontaler Gentransfer nachgewiesen wurde

	Konjugation	Transformation	Transduktion
an Land	Böden, auf Pflanzen	Böden	Böden, auf Pflanzen
im Wasser	Meere, Meeressedimente, Seen, Flüsse, Fluß-Epilithion (Schleimbelag auf Steinen), Abwässer in Kläranlagen	Meeressedimente, Flüsse, Fluß-Epilithion	Meere, Seen, Flüsse, Abwässer in Kläranlagen
innerhalb von Organismen	Pflanzen, Insekten, Hühner, Mäuse, Menschen	Pflanzen, Insekten, Mäuse	Muscheln, Mäuse

Miller: Spektrum der Wissenschaft -3/1998



Konjugation

Vorgang der Genübertragung über direkten Kontakt zwischen den Zellen („Paarung“)

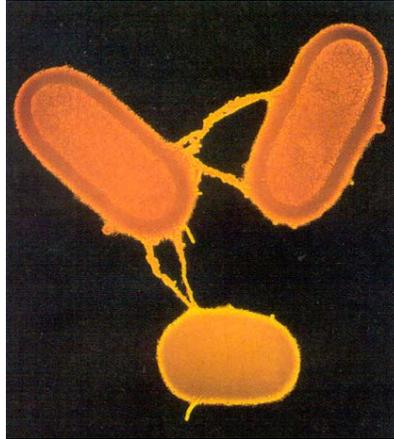
Plasmid-codierter Vorgang (z.B. F-Plasmide)

- A** Spender- oder Donorzelle überträgt Plasmide oder andere genetische Elemente auf Empfänger- oder Rezeptorzelle

➔ Funktion der **Pili**

- B** F-Plasmid kann auch Chromosom „mobilisieren“, dies führt zur Übertragung von chromosomaler DNA

Ausbildung der Pili vor der Konjugation



Miller: Spektrum der Wissenschaft -3/1998

Genetische Transformation

Vorgang, bei dem freie DNA in einer Empfängerzelle aufgenommen und eingebaut wird

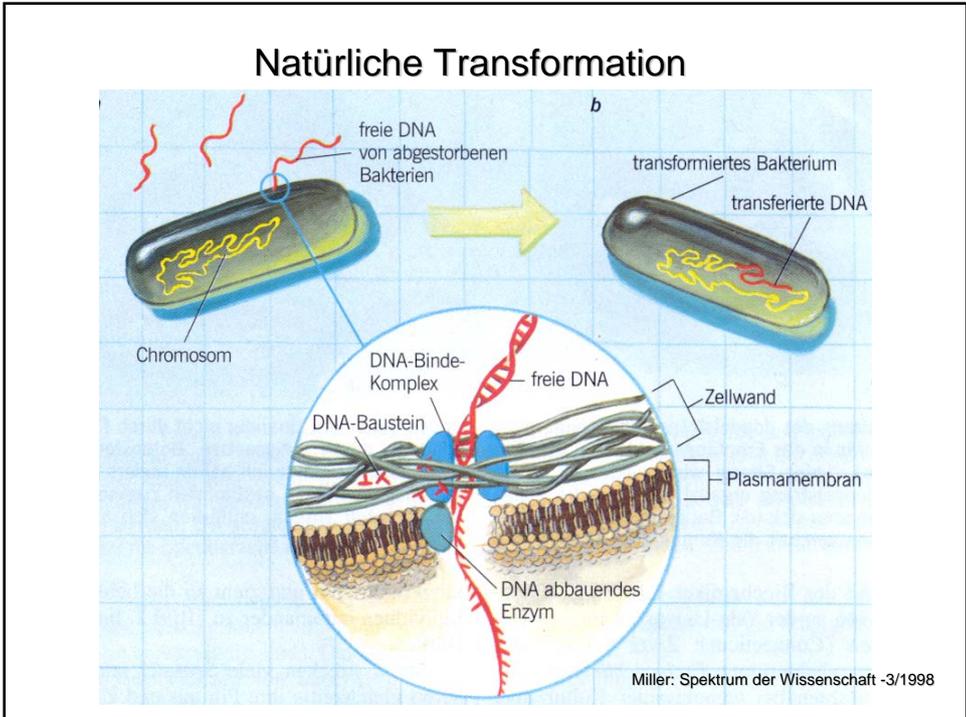
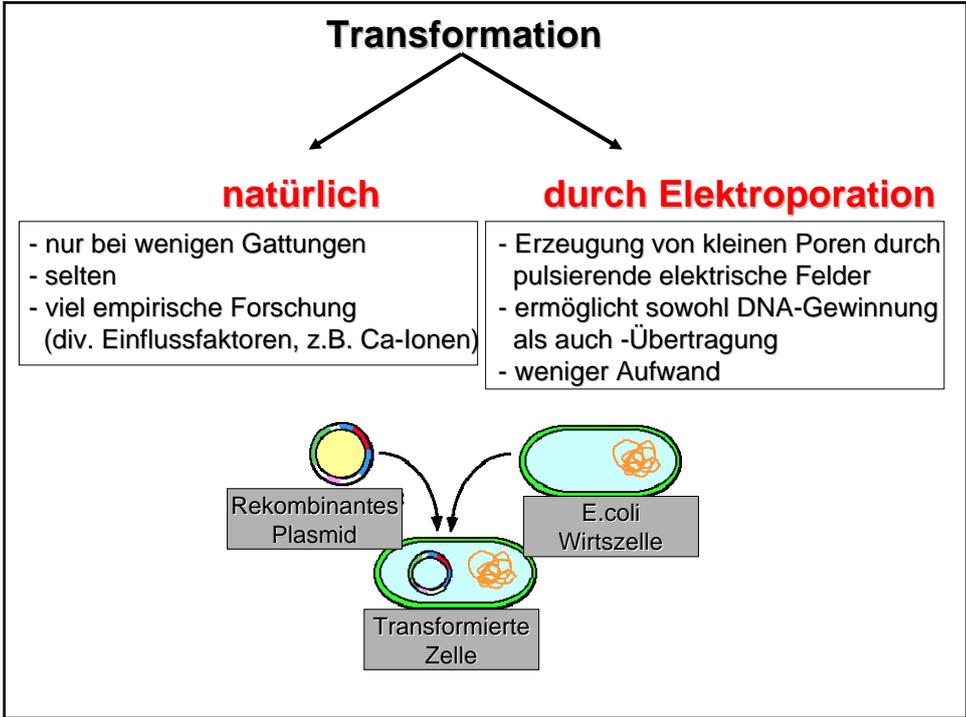
Zellen, die DNA aufnehmen können, sind „**kompetent**“

„Kompetenz“ durch **Regulationssysteme** gesteuert
(Proteine, Zellwandlysin)

DNA entweder als Einzel- oder Doppelstrang aufgenommen

Sonderform der Transformation:

Transfektion: DNA wird in eukaryontische Zelle übertragen



Transduktion

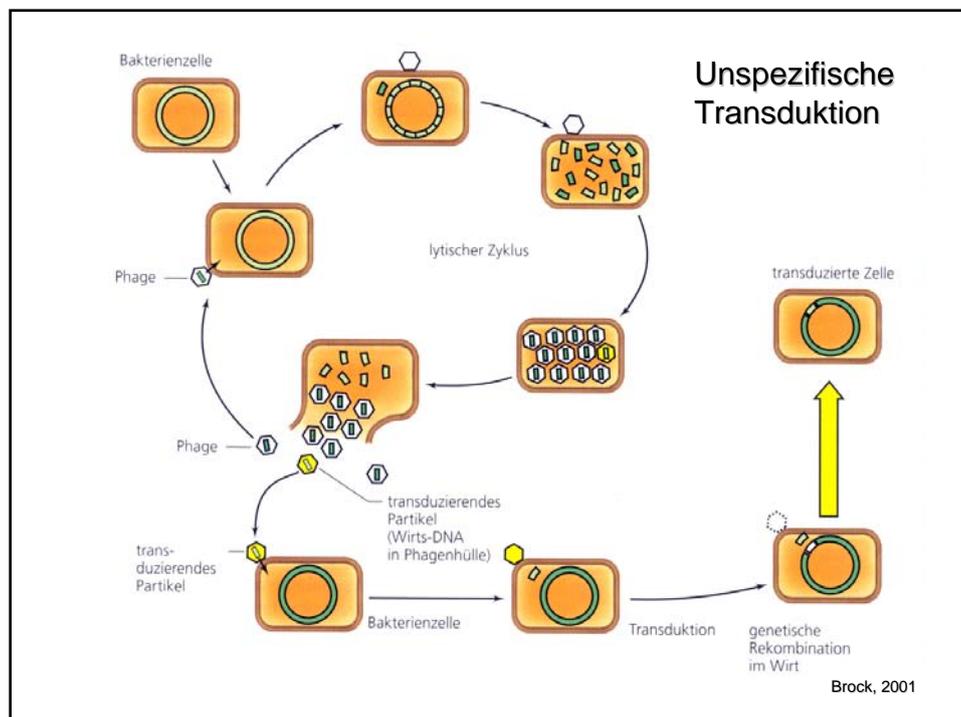
Vorgang, bei dem DNA mittels Viren von Zelle zu Zelle übertragen wird

unspezifische Transduktion: ➔ Virales Genom durch Wirtsgenom ersetzt

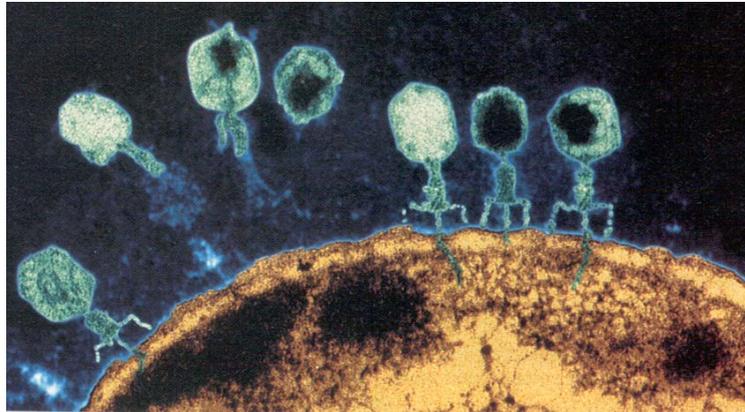
spezifische Transduktion: ➔ Wirtsgenom-DNA in virales Genom integriert, nur bei temperenten Phagen

nicht alle Phagen können transduzieren,
nicht alle Bakterien sind transduzierbar !

trotzdem: in der Natur weit verbreiteter Gentransfer



Transduktion - virusvermittelter Gentransfer



Miller: Spektrum der Wissenschaft -3/1998

Bedeutung der Reihenfolge der Gene auf der DNA

Reihenfolge der Gene auf dem Chromosom
nicht grundsätzlich fix

Vorgang der „Wanderung“ eines Gens von einer
Stelle zur anderen.....**Transposition** (mind. 1:100.000)

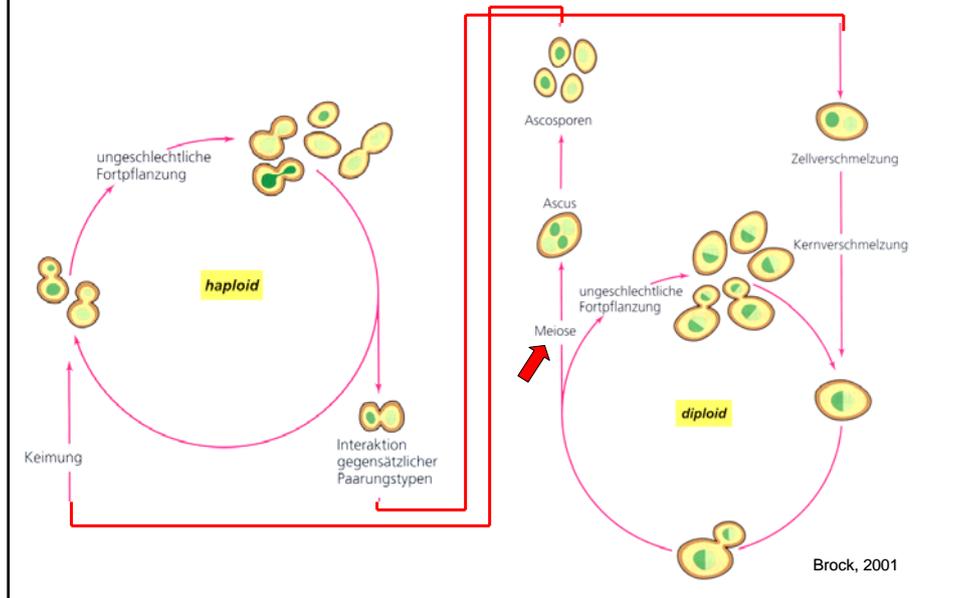
Transponierbare Elemente.....**Transposons**

Integrans.....“fangen Gene aus anderen Quellen ein“
(Bestandteil einiger Transposons)

Antibioticaresistenz-Problematik

Genetik in eukaryontischen Mikroorganismen

Beispiel: Lebenszyklus v. *Saccharomyces cerevisiae*



Möglichkeiten der Klonierung

- **Molekulare Klonierung**
- **Klonierung mit Hilfe von Plasmiden**
- **Klonierung mit Hilfe von Bakteriophagen**
- **Andere**

Klonierung

- Historisch: „künstl. Kernspaltung“
- Künstl. Vervielfachung ohne Mitwirkung von Keimzellen (...„Dolly, 1997)
- Fusion aus einem Zellkern (aus irgendeiner Zelle) mit einer „entkernten“ Zelle

- DNA-Fragment mit interessierendem Gen in das gereinigte Genom eines sich selbst replizierenden genetischen Systems (z.B. Virus oder Plasmid) eingebracht
- Virus oder Plasmid....**Klonierungsvektor**



Klonschaf Dolly (1996 – 2003)

Klonierung

.....bezieht sich immer auf das Vervielfältigen von DNA (also Molekülen) und nicht von Mikroorganismen

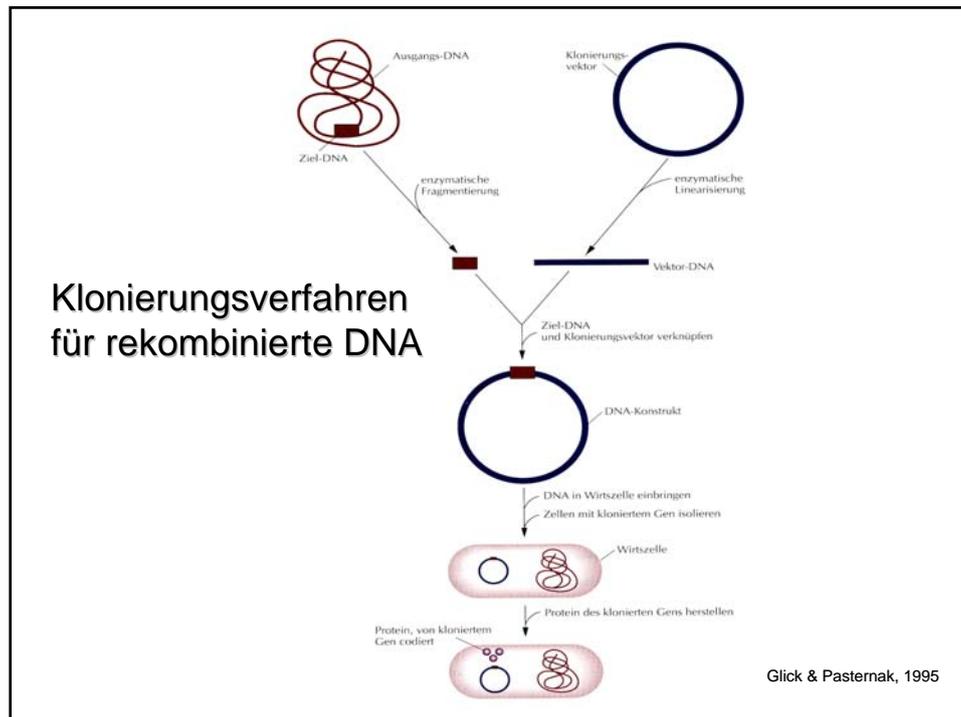
Klonen

.....Herstellung genetisch identer Organismen

DNA-Rekombinationstechnik (Genklonierung)

Übertragung genetischer Information (DNA)
von einem Organismus auf einen anderen





Ziele der Klonierung

- Kostengünstiges Vervielfachen der DNA (z.B. für diagnostische Zwecke)
- Exprimieren von Proteinen (z.B. pharmazeut. Industrie, Herstellung von Insulin etc., Erzeugung von Labferment, resistente Pflanzenarten)
- Genmanipulation (z.B. zur Verbesserung von Stoffwechselfvorgängen)

...ausprägen

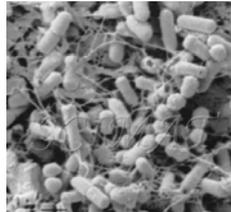
Wirte für Klonierungsvektoren

Anforderungen:

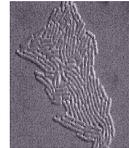
- schnelles Wachstum
- preiswert kultivierbar
- apathogen



Saccharomyces
cerevisiae

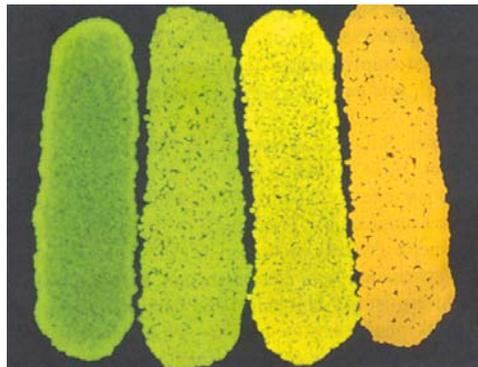


Bacillus subtilis



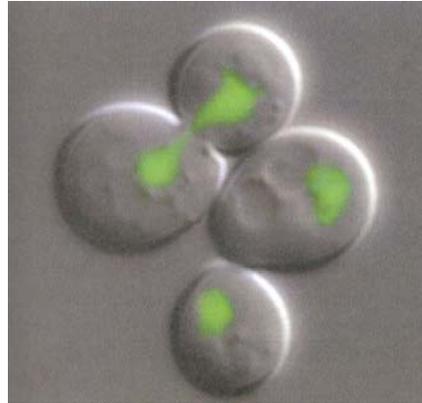
E.coli

Exprimierung von Genen



Kloniertes Luciferasegen in E.coli. Die 4 verschiedenen Gene entstammen jeweils einer anderen Art aus der Familie der Schnellkäfer. Jede Luciferase strahlt Licht einer anderen Farbe aus.

Quelle: Science 244:700 (1988)



**Einbau eines fluoreszierenden Proteins
in das Gen einer Saccharomyces cerevisiae**

Brock, 2001

Zusammenfassung der wichtigsten Prinzipien sowie Voraussetzungen der Gentechnik

DNA-Struktur und -Chemie Isolierung u. Sequenzierung der DNA

DNA-Enzymologie Bedeutung der Enzyme bei der Synthese der DNA

DNA-Replikation Erkenntnisse darüber, wie DNA-Replikation abläuft

Plasmide u. Konjugation Aufklärung der Mechanismen

Temperente Bakteriophagen Regulation der Replikation innerhalb
der Bakteriophagen

Transformation Methodische Entwicklungen, freie DNA zu übertragen

Translation Bedeutung der Ribosomen und der mRNA

Genetischer Code Entschlüsselung des genetischen Codes

8. ARBEITEN IM MIKROBIOLOGISCHEN LABOR - TEIL 1

Kultivierung von Mikroorganismen

Nährmedium - Nährsubstrat

Einteilungsmöglichkeiten:

- nach ihrer Zusammensetzung
- nach ihren physikalischen Eigenschaften
- nach ihrem Verwendungszweck

Kultivierung von Mikroorganismen

Nährmedium - Nährsubstrat

Zusammensetzung

Synthetische Nährmedien

Def. chem. Zusammensetzung

Komplexe Nährmedien

Mehr oder weniger exakt
definierte Bestandteile

Hefeextrakt
Tomatenpresssaft
Pepton,

Komplexe Nährbodenbestandteile

Pepton	Eiweißspaltprodukte, hergest. durch enzymatische Verdauung tierischer u. pflanzlicher Proteine
Fleischextrakt	Wässriger Extrakt von enzymatisch vorverdaulichem Fleisch
Caseinhydrolysat	Salzsaures Hydrolysat aus Milcheiweiß ohne niedermolekulare Spaltprodukte, liefert freie Aminosäuren
Malzextrakt	Wässriger Extrakt von Malz, spezieller Bestandteil von Pilz-Nährmedien
Hefeextrakt	Wässriger Extrakt aus autolyseierter Hefe, liefert viel C und N



**Lieferanten für C, N, Aminosäuren, Vitamine,
Mineralstoffe, Spurenelemente**

Kultivierung von Mikroorganismen

Nährmedium - Nährsubstrat

Physikal. Eigenschaften

FEST

WEICH

FLÜSSIG

Verfestigungsmittel

Agar-Agar

1,5 - 2 %

0,2 - 0,8%

Gelatine

10 - 15 %

(CMC, 1,5 %)

Agar-Agar

- Verfestigungsmittel aus marinen Rotalgen
- hoher Polysaccharidanteil (ca. 70%)
- Agarose und Agaropektin
- bedeutende Schmelz- und Erstarrungseigenschaften:

Schmelzbereich: 80 - 90 °C

Erstarrungsbereich: 32 - 38 °C

Kultivierung von Mikroorganismen

Nährmedium - Nährsubstrat

Verwendungszweck

Universal/Kollektivmedium

Selektivmedium

Elektivnährmedium

Differentialmedium

Anreicherungsmedium

Mangelmedium

Transportmedium etc.

Nährmedienbereitung

Nährbodenkonzentrat (oder Komponenten) einwiegen



Aufschlämmung in (dest.) Wasser



Ggf. Zugabe von Verfestigungsmittel



Nährsubstrat auflösen (Dampf, heizbarer Magnetrührer)



pH-Kontrolle/-korrektur



Sterilisation

Sterilisation

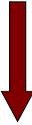
- Dekontaminationsmaßnahme
- **Abtöten und Entfernen aller Lebewesen einschließlich ihrer Ruhestadien.....**
.....vollständige Entkeimung (?)
- verschiedene Möglichkeiten:
 - Hitzesterilisation
 - Feuchte Hitze
 - Tyndallisation
 - Trockene Hitze
 - Filtration
 - Bestrahlung
 - UV
 - Ionisierende Strahlen
 - Begasung
 - Anwendung von Chemikalien

Hitzesterilisation

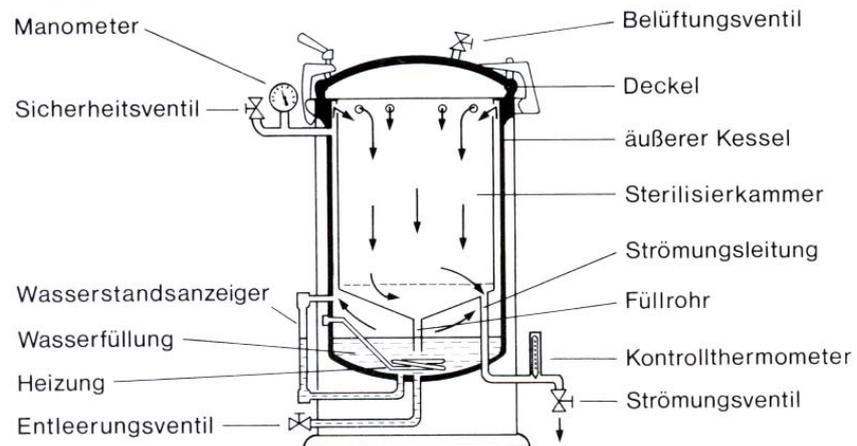
- Denaturierungseffekt
- Abgetötete Keime verbleiben im Sterilisiergut
- Autoklavierung (Überdruck)

121 °C / 20 min.

- Diskontinuierliche/fraktionierte Sterilisation
(**Tyndallisation**)


100 °C / 30 min.
30 °C / 12 - 24 h
100 °C / 30 min.

Aufbau eines Autoklaven



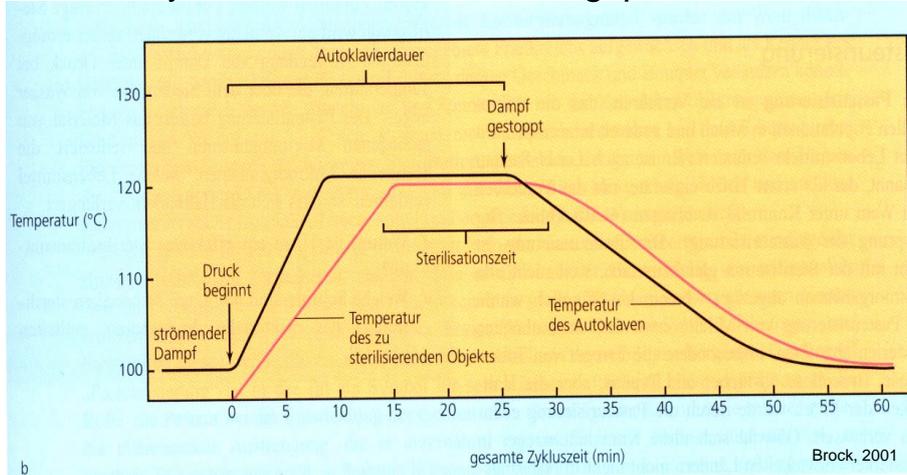
Autoklav um 1950

Diverse
Autoklaven-
modelle



Tischautoklav

Zyklus einer Autoklavierungsprozedur



Temperatur und Dampfdruck von gesättigtem Wasserdampf

Temp. °C	kPa.	bar	atm
100	101	1,01	1,00
105,3	122	1,22	1,20
109,7	142	1,42	1,40
115,2	170	1,70	1,68
120,6	203	2,03	2,00
133,9	304	3,04	3,00

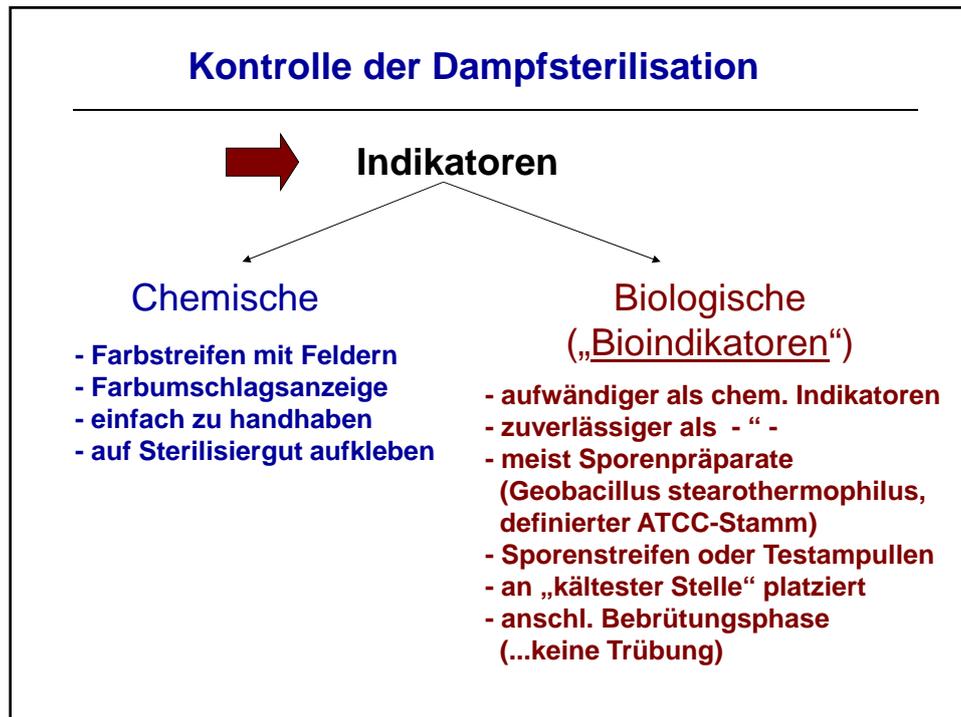
Sterilisdauer richtet sich nach dem Sterilisiervolumen !

Einzelvolumen	Sterilisierzeit bei 121 °C
bis 50 ml	15
20 - 200 ml	20
200 - 1000 ml	25
1 - 2 l	35
10 l	60 - 90
20 l	120 - 180

➔ Wärmeübergang !

Empfehlungen zur Durchführung einer Labor-Autoklavierung

-
- nur hitzesterilisierbares Gut sterilisieren
 - Gefäße nicht voll befüllen (→ 1/2-voll)
 - Dampfundurchlässige Verschlüsse nur lose aufsetzen
 - Wattestopfen mit Pergament oder Alufolie abdecken
 - Beschriftung mit autoklavensfestem Filzstift
 - Sterilisiergut möglichst senkrecht platzieren
 - separate Gefäße für Vernichtungssterilisation verwenden
 - nach Autoklavieren langsamer Druckabfall



**Im Europäischen Arzneibuch spezifizierte
Bioindikator-Mikroorganismen**

Staph. aureus	ATCC 6538
Bacillus subtilis	ATCC 6633
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 9027
Clostridium sporogenes	ATCC 19404
Candida albicans	ATCC 10231
Aspergillus niger	ATCC 16404

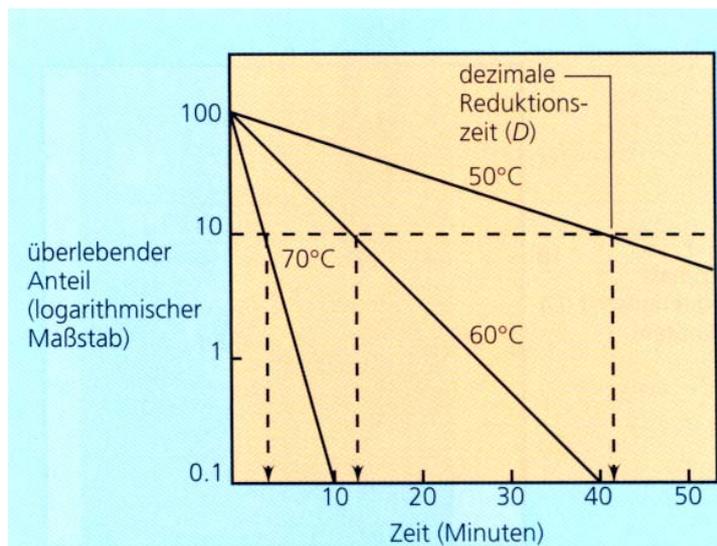
Sterilisationseffekt

Abtötung durch trockene Heißluft:
Erhitzungsdauer in min. bei 120 °C

Salmonella typhi	20
E. coli	30
Staphylococcus aureus	30
<u>Endosporen von:</u>	
Clostridium botulinum	120
Bacillus anthracis	120

mod. n. Wallhäusser, 1995

Kinetik der Hitzeinaktivierung



Brock, 2001

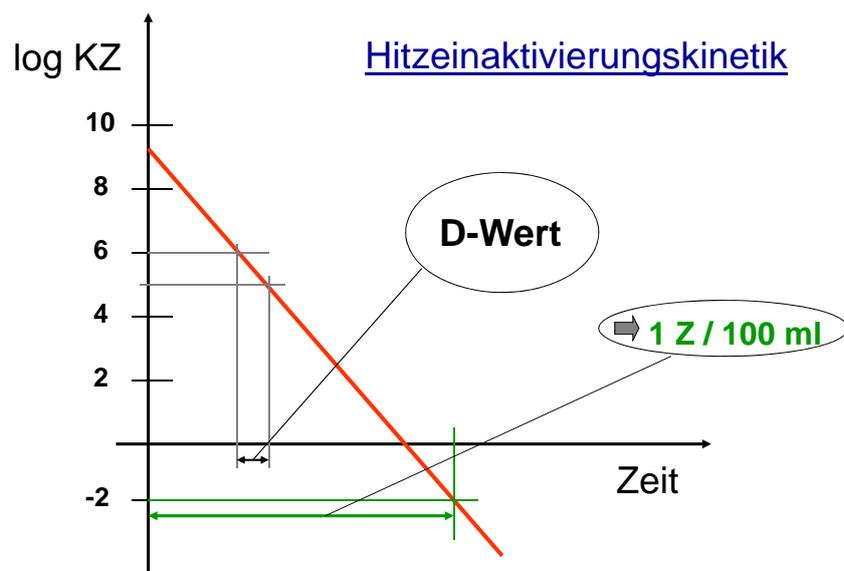
D-Wert

Dezimale Reduktionszeit

Zeit in Minuten, die bei vorgegebener Temperatur notwendig ist, um die Keimzahl um 90 % (= auf ein Zehntel) zu reduzieren

Einflussgrößen auf den D-Wert:

- „Natur“/Empfindlichkeit des Mikroorganismus
- Bestimmung des D-Werts aufwändig (mehrere KZ-Bestimmungsansätze)
-Abtötungskurve nicht immer eine Gerade



Thermische Abtötungszeit

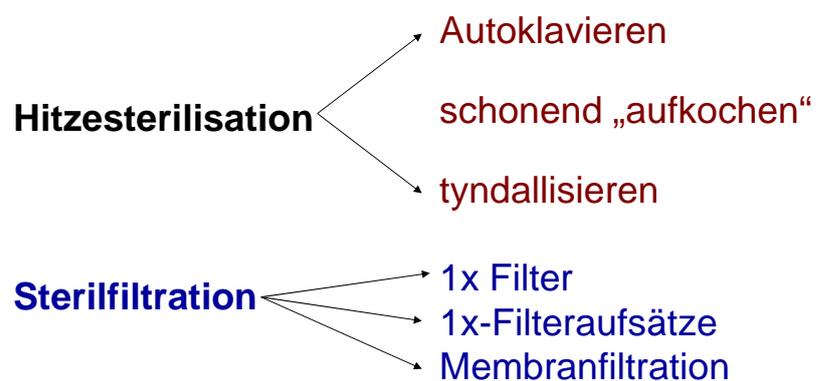
Jene Zeitdauer, die erforderlich ist, um bei vorgegebener Temperatur alle (?) Zellen abzutöten

- wesentliche Einflussgröße: Dichte/Keimzahl der betrachteten Keimsuspension bzw. Probe

Vorgangsweise:

Proben (def. Zellsuspensionen) für unterschiedliche Zeitspannen erhitzen, dann inkubieren und auf Wachstum kontrollieren

Sterilisation von Nährmedien



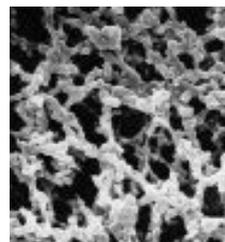
Andere thermische Entkeimungsverfahren

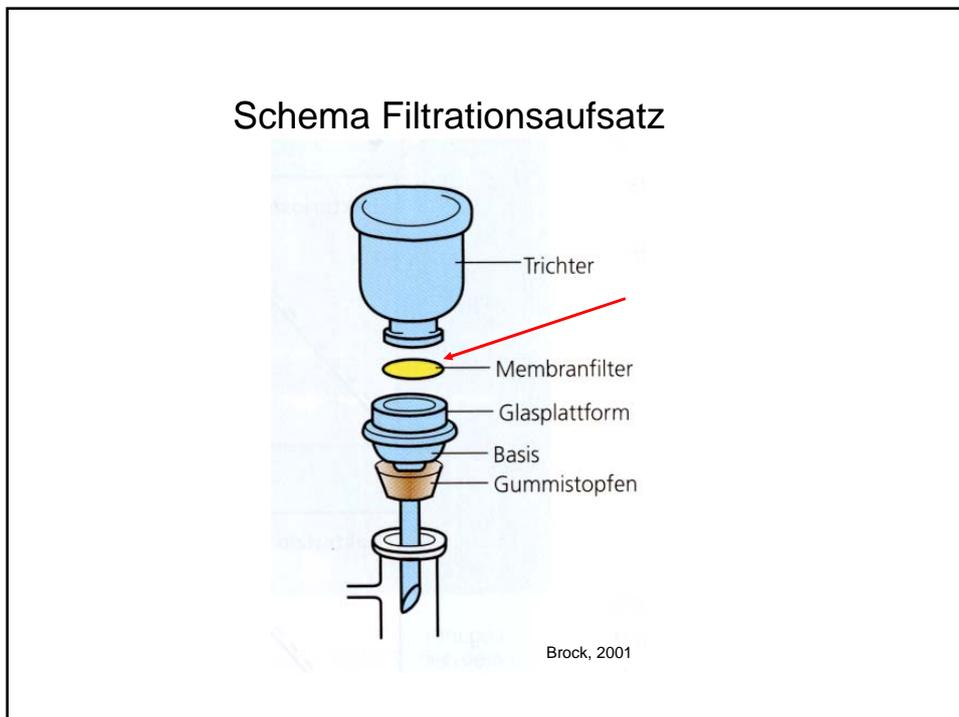
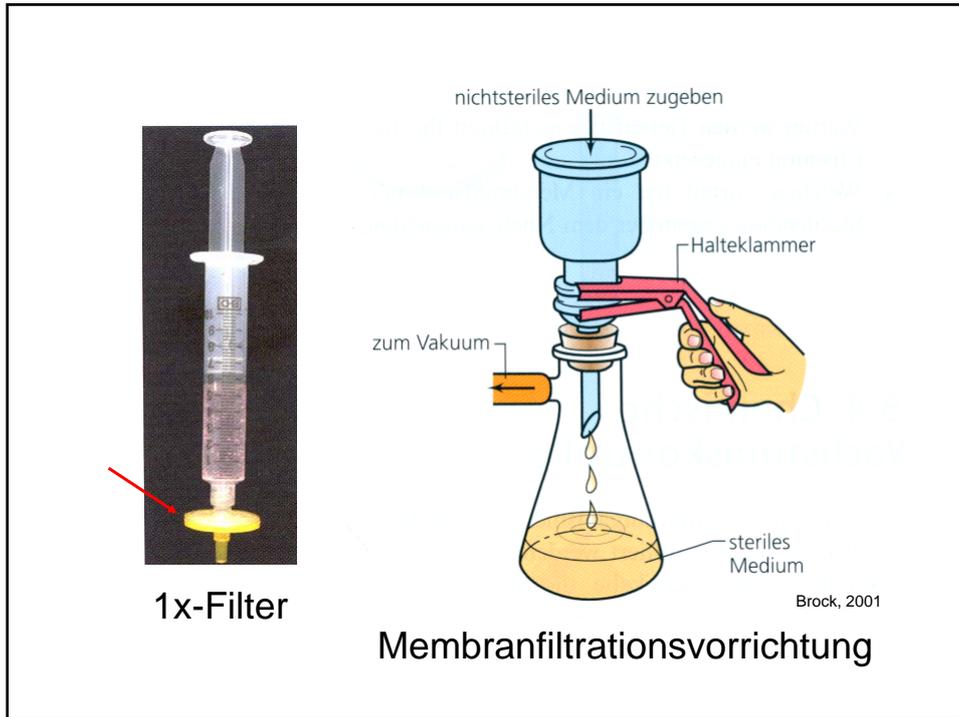
- **Pasteurisierung**
 - nur Teilentkeimung
 - Pathogene abgetötet
 - Verderbskeime reduziert
 - vorwiegend bei Lebensmitteln
 - Haltbarkeitsverlängerung
 - Verderb verzögert
- **UHT-Erhitzung**
 - Erhitzung auf 130 bis 150 °C für wenige Sekunden
 - Sterilisationseffekt
 - vorwiegend bei Lebensmitteln (z.B. H-Milch....“UHT“)

Membranfiltrations-Sterilisation

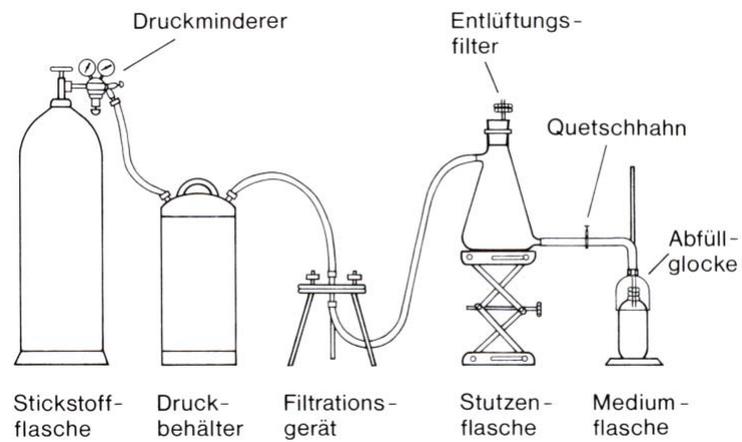
- „mechanische Sterilisation“
- Mikrofilter mit definierter Porenweite
 - 0,22 µm
 - 0,45 µm
- Celluloseacetat, Cellulosenitrat
- ggf. Vorfilter vor eigentlicher Sterilfiltration

Struktur eines
Celluloseacetat-Filters





Vorrichtung zur Membranfiltration unter Druck



Bast, 2001

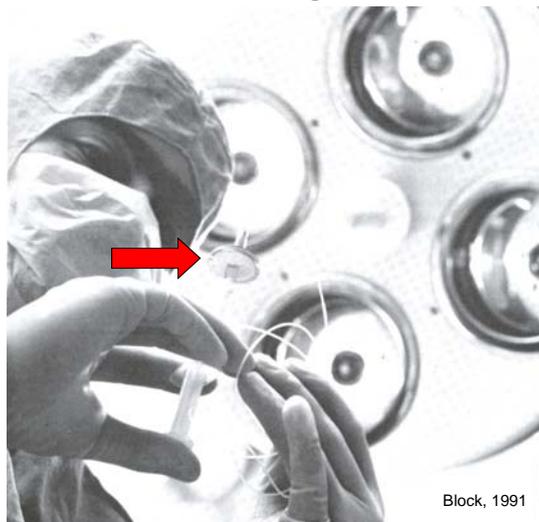
Filtrieranordnung des Microfil-Systems





Milliflex-System (Millipore)

Anwendung von Miniaturfiltern
für Entkeimungszwecke



Block, 1991

Spezialisiertes Filtrationssystem für kritische Anwendungen



Block, 1991

Beispiele für die Anwendung der Mikrofiltrations-Sterilisation

- Antibiotica
- Vakzine
- Intravenöse Lösungen
- Allergenextrakte
- Steroide
- Ophthalmolog. Produkte
- Organkonservierungslösungen

Anwendung von trockener Hitze

- Hitzesterilisation von (trockenen) Glasgeräten (Pipetten, Kolben, Röhrchen, Petrischalen etc.)
- Heißluftsterilisator, gute Luftzirkulation
- Sterilisiergut nicht zu dicht packen
- Check mittels Indikatorbändern oder Bioindikatoren
- Vorsicht bei Gummi- u. Kunststoffstopfen
- nur trockenes Gut sterilisieren

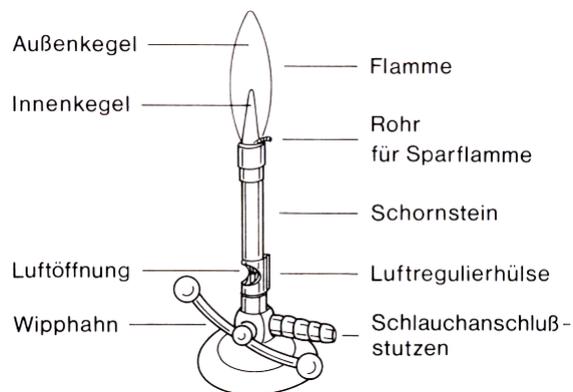
Kenndaten der Heißluftsterilisation

Temp.	Zeit
160 °C	180 min.
170 °C	120 min.
180 °C	30 min



Ausglühen von Impfösen und -nadeln

Bunsenbrenner



Bast, 2001



Sterilisation durch Bestrahlung

- UV-Strahlung

- Nucleinsäure-Schädigung
- Raumluft , Oberflächen, Trinkwasser
- geringe Eindringtiefe
- UV-C-Bereich am wirksamsten (200 - 280 nm)
- Quecksilber-Niederdruckstrahler (253,7 nm)
- Ozon !
- in unbenutzten Räumen

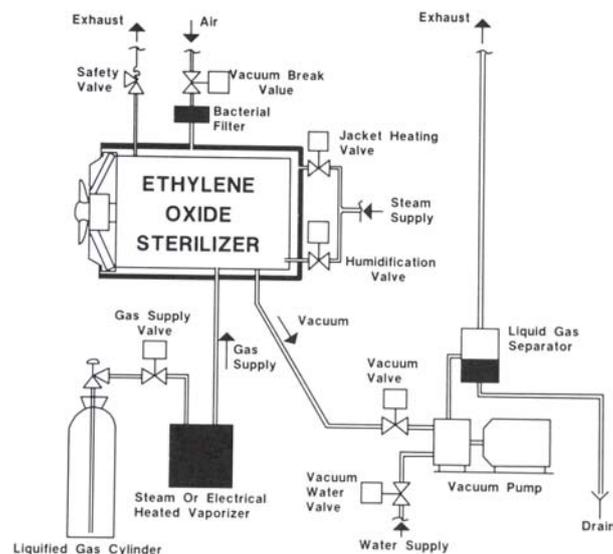
- Ionisierende Strahlung

- Sterilisation von Einwegmaterialien, Gewebersatz u. Antibiotica
- Gamma-Strahlen
- produzieren Elektronen, Radikale
- Schädigung der DNA
- Bestrahlungsdosis in Gray (Gy)

Chemische Sterilisation

- | | |
|---------------------------|---|
| - Ethylenoxidbegasung | Hohe Toxizität, sterile Nachbelüftung |
| - Formalinbehandlung | Raumluftdesinfektion, kanzerogen, Anw.Konz. 1- 3.5% |
| - Peressigsäure | Achtung explosiv ! |
| -Ethanol | Arbeitsflächendesinfektion, 70%iger ,vergällter Alkohol, 60%iger Isopropanol |
| -(β -Propiolacton) | Nicht mehr gebräuchlich, kanzerogen |

Schematische Darstellung einer Ethylenoxid-Sterilisations-Anlage

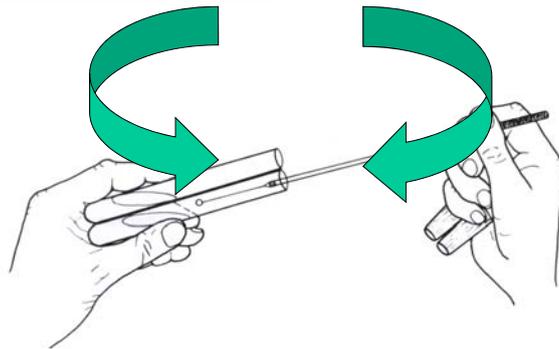


Block, 1991

Laborsicherheit

Eingeschleppte Keime
(Mensch, Luft, unsterile
Geräte)

Raumluft
(ca. 500 - 2000 K/m³)



Wichtige Regeln für das mikrobiologische Arbeiten

- Alle Gegenstände sind so zu behandeln, als ob sie pathogenes Material (Mikroorganismen u.o. deren Stoffwechselprodukte) enthielten
- Tragen von Schutzkleidung
- Schmuckverbot
- Essen, Trinken, Rauchen im Labor verboten
- Beschriften von Behältnissen
- Kontaminierte Gegenstände dekontaminieren
- Achtung auf Luftkontamination / Aerosolbildung

Historische Darstellung
eines Pestwächters
um 1720



Personen- und Produktschutz im Labor



Umgang mit Mikroorganismen

- Schutz von Personal und Umwelt
- Genehmigung der Behörde für Arbeiten mit human- u. tierpathogenen Erregern
- Einstufung der „**biolog. Arbeitsstoffe**“ in Risikoklassen (1 - 4)

Gruppierung nach Risikoklassen

- Gruppe 1:** kein oder sehr geringes Risiko für Mensch und Wirbeltiere, als Krankheitserreger für Gesunde ohne Bedeutung
- Gruppe 2:** Geringes bis mäßiges Risiko für Mensch und Wirbeltiere, potenzielle Krankheitserreger beim Menschen, wirksame Vorbeugung und Behandlung normalerweise möglich
- Gruppe 3:** Mäßiges bis hohes Risiko für Mensch und Wirbeltiere, Erreger schwerer Erkrankungen, wirksame Vorbeugung oder Behandlung normalerweise möglich
- Gruppe 4:** Hohes Risiko für Mensch und Wirbeltiere (best. Viren)

Beispiele für die einzelnen Risikoklassen

- Gruppe 1:** Acetobacter, die meisten Lactobacillen, die meisten E.coli, Saccharomyces
- Gruppe 2:** Pathogene E.coli, Shigella dysenteriae, Clostridium tetani, Klebsiella pneumoniae
- Gruppe 3:** Chlamydia psittaci, Salmonella typhi, Yersinia pestis, Francisella tularensis
- Gruppe 4:** nur bestimmte Viren (Ebola,...)

Räumliche Voraussetzungen

Allgemein:

- Lage des Labors (...nicht Erdgeschoß)
- Vorräume
- Arbeitsflächen und Fußböden
- wenig Mobiliar
- Fenster und Türen geschlossen
- Desinfektionsmöglichkeit für Raumluft
- Regelmäßige Kontrolle auf Ungeziefer
- Keine Verwechslungen von Gerätschaften
- Vermeidung von Verletzungen (Nadeln etc.)



Arbeiten unter **Schutzstufe 2**

- Arbeitsraum mit **Label** kennzeichnen
- tägliche Desinfektion der Flächen
- **Schutzkleidung** nie außerhalb tragen
- Verwendung von starken Latexhandschuhen
- Arbeiten in **Sicherheitswerkbänken**
- Bunsenbrenner mit Spritzschutzglocke
- Verwenden von **Einwegartikeln**
- Kontaminierte Geräte in **Desinfektionsbad** einlegen
- Sofern Kontamination eintritt, Bereich sperren u. desinfizieren
- **Abfallsammlung** und **-entsorgung** (Dekontamination)

Arbeiten mit einer Reinraumwerkbank

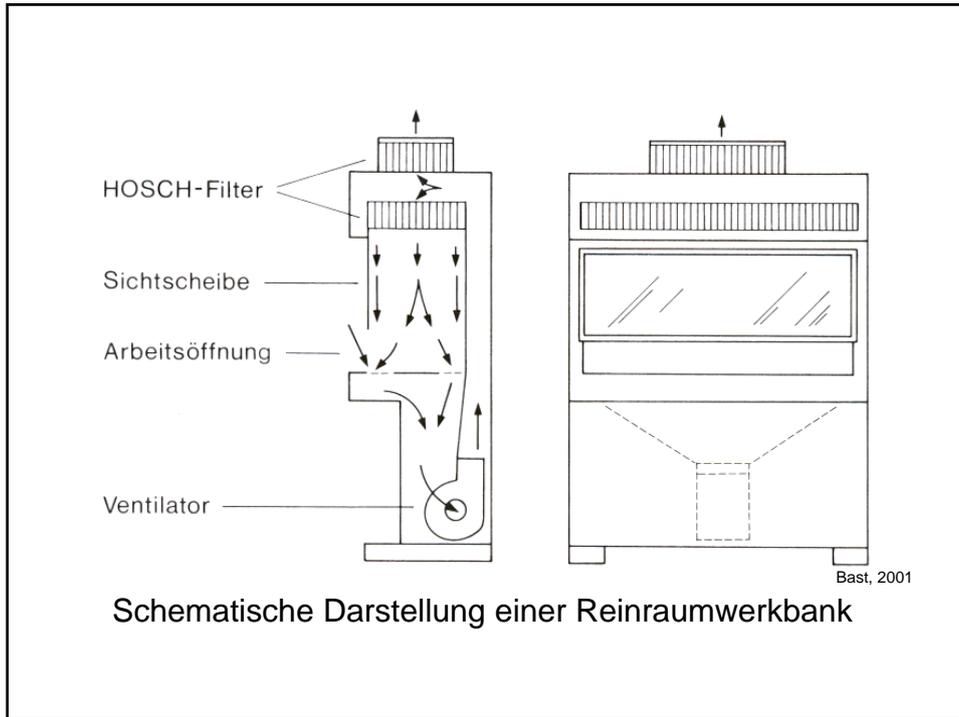
„Laminar Flow“

- Durchführung aller aseptischen Arbeitsschritte
- Schutz der Umgebung, Schutz des Experimentators
- UV-Bestrahlung im Inneren der Werkbank
- Umluftsystem mit **HOSCH**-Filtern (engl.: HEPA filters)

High Efficiency Particulate Air Filter
mit definierten Abscheidegraden

- 3 Arten von Werkbänken:

1. Schutz des Arbeitenden und der Umgebung (Kl. 1)
2. Schutz der Arbeitsobjekte und -prozesse
3. Schutz des Arbeitenden und der Prozesse (Kl. 2 u. 3)





Geräte und Utensilien für das mikrobiologische Arbeiten



Schraubverschluß-
flasche



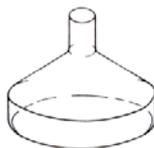
Erlenmeyer-
kolben



Schikanen-
kolben



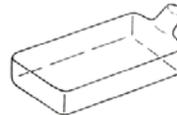
Kultur-
röhrchen



Fernbachkolben



Kollerschale



Penicillinkolben



Petrischale

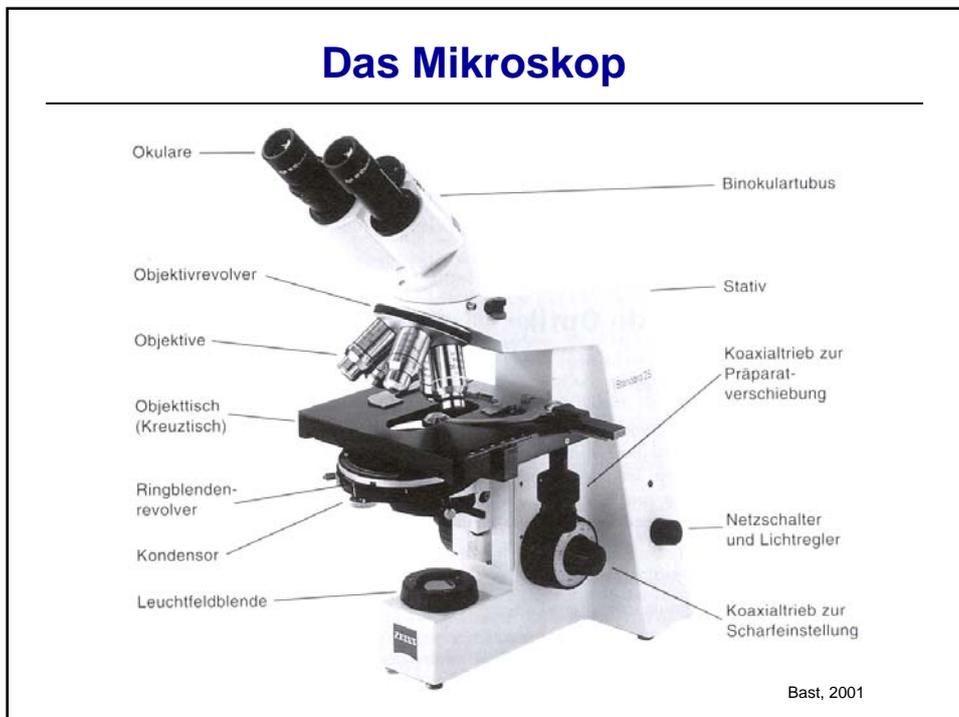
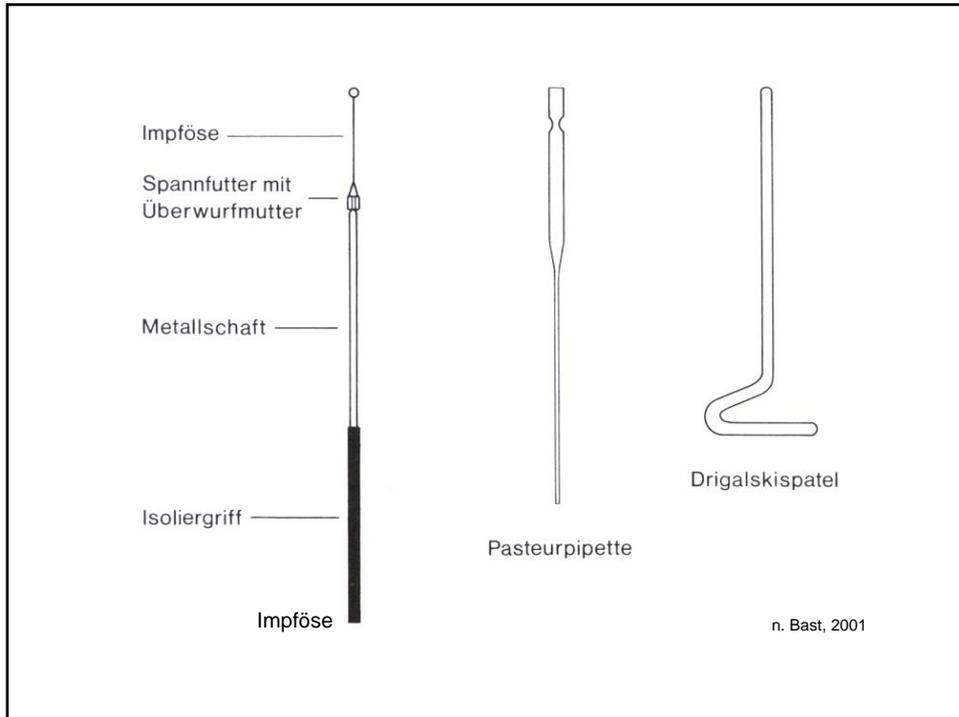
Bast, 2001

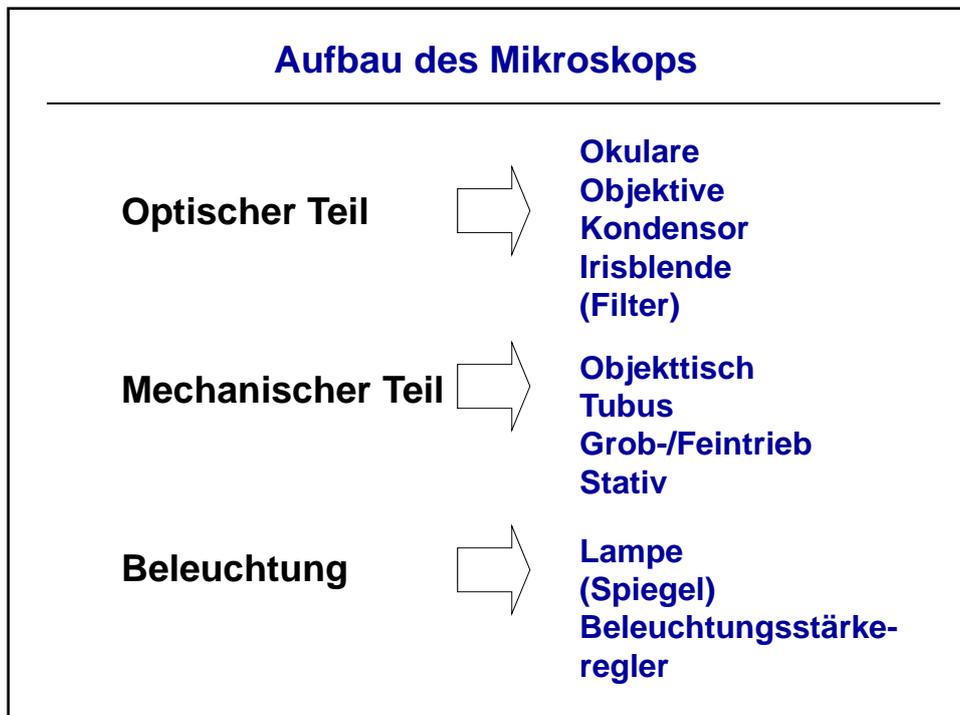
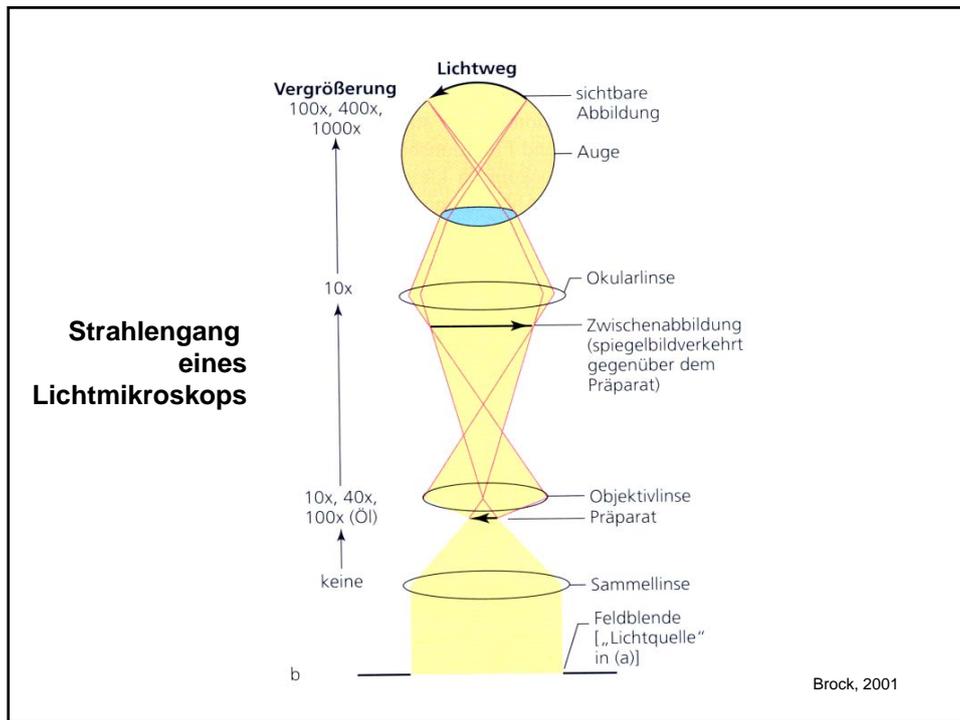
Laborausstattung

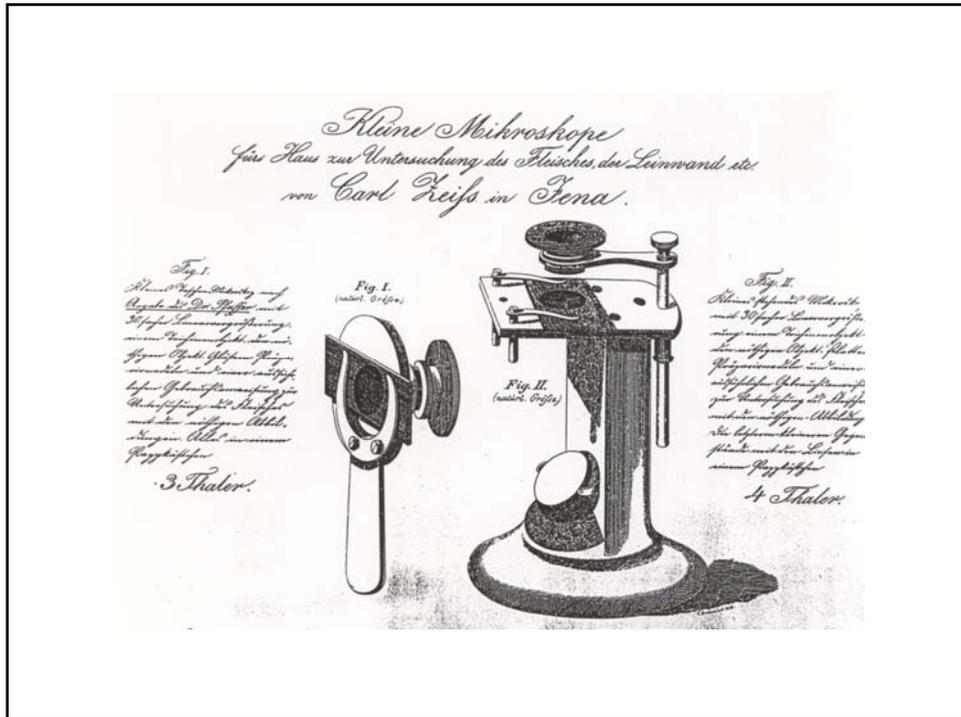
- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Bunsenbrenner • Wasserbäder • Inkubationsschränke <ul style="list-style-type: none"> – (aerob, anaerob) – 6°C, 10°C
(Kühlbrutschränke) – 25°C, 30°C, 37°C, 45°C • Photometer • Autoklav • Heißluftsterilisator • Dampfschrank • Markierungsstift • Schüttelinkubator • Anaerobiertopf | <ul style="list-style-type: none"> • Petrischalen • Pipetten • Pipettierhilfe • Röhrchen/Eprouvetten • Eprouvettenverschlüsse • Impfösen • Impfnadel • Drigalskispateln • Skalpell, Schere, Stanleymesser • Einwegartikel (Impfbesteck, Pipetten, Probenbehälter,...) • ... |
|--|--|

Laborausstattung

- Petrischalen
- Pipetten
- Pipettierhilfe
- Röhrchen/Eprouvetten
- Eprouvettenverschlüsse
- Impfösen
- Impfnadel
- Drigalskispateln
- Schere, Stanleymesser
-
-







Qualitätskriterien für Mikroskope

Vergrößerungsvermögen

Gesamtvergrößerung:
Okularvergrößerung x Objektivvergrößerung

Auflösungsvermögen

Numerische Apertur

Zeichungsvermögen

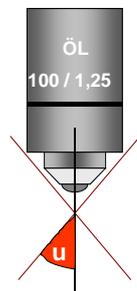
Korrektur von Linsenfehlern

Numerische Apertur

- Maß für die Qualität eines Objektivs
- je höher \Rightarrow desto besser/empfindlicher

$$A = n \times \sin u$$

n....Brechungsindex
u....halber Öffnungswinkel der
Objektivfrontlinse



Wo liegt die Grenze der Auflösung ?

Bei welchem Minimalabstand zwischen zwei Objekten kann ich diese beiden noch als getrennt erkennen ?

Auflösungsformel nach Abbé:

$$e = \lambda / 2A$$

λ Wellenlänge der Lichtquelle
ANumerische Apertur

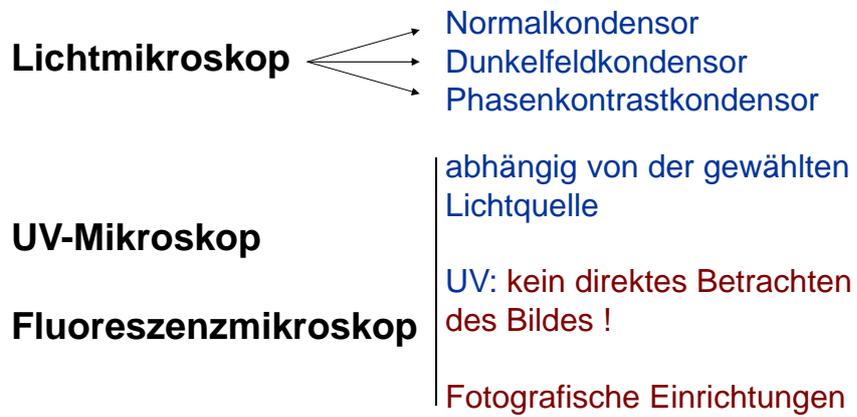


Verwendung von Immersionsöl:

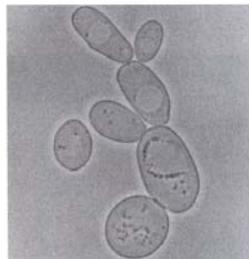
- Lichtbrechung
- Schärfere Abbildung
- $n = 1.515$

Trockene Objektive ↔ **Ölimmersionsobjektive**

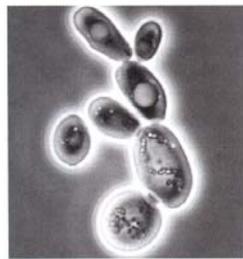
Mikroskoparten



Saccharomyces cerevisiae



Normales Hellfeldmikroskop



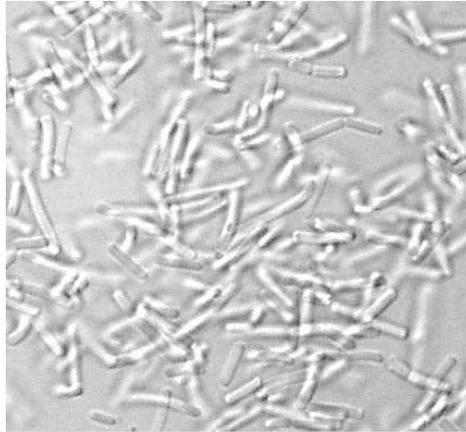
Phasenkontrastmikroskop



Dunkelfeldmikroskop

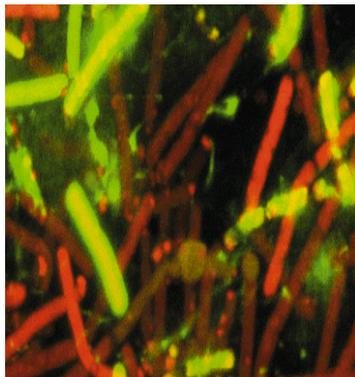
Brock, 2001

Lactobacillus acidophilus

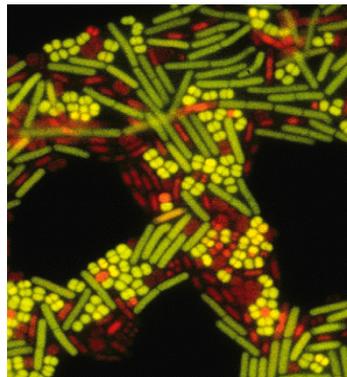


Interferenzphasenkontrast-
Mikroskopie

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen



Bacillus cereus



Micrococcus luteus
und Bacillus cereus

BacLight Inc.

Elektronenmikroskopie

- Sehr hohe Auflösung (bis ca. 0,1 nm)
- Untersuchung von Zellstrukturen und Molekülen
- Elektronen anstelle von Lichtstrahlen
- Magnete anstelle von Linsen
- Arbeitet unter Vakuum
- Spezielle Techniken zur Vorbereitung der Proben („Dünnschnitte“)
- Erhöhung des Kontrasts durch spezielle Färbungen (Osmiumtetroxid etc.)

Bauarten von Elektronenmikroskopen

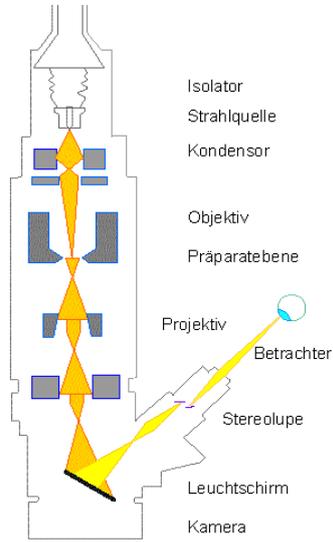
Transmissions –EM (TEM)

Keine Dünnschnitte erforderlich,
Negativfärbung, weniger
aufwändig

Raster- EM (REM, auch Scanning Electron Microcopy)

Präparat mit dünnem Schwer-
metallfilm (z.B. Gold) überzogen,
Elektronenstrahl tastet Oberfläche
ab, reflektierte, gestreute Elektronen
gesammelt, →Bild

System eines Elektronenmikroskops

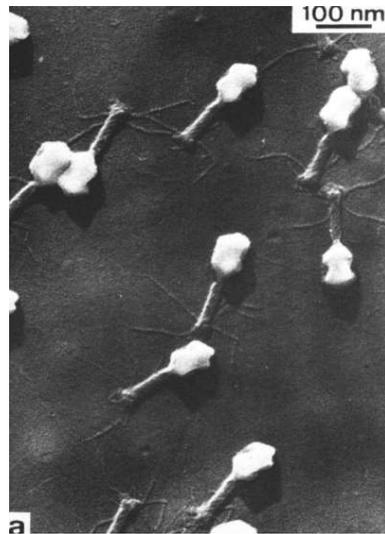


Elektronen-
mikroskop





Elektronenmikroskopische Aufnahme von Fliegenköpfen



Bakteriophagen

Herstellung mikroskopischer Präparate

- | | |
|------------------------------|---|
| Lebendpräparate | <ul style="list-style-type: none">- Deckglaspräparat- Hängender Tropfen- Zählkammerpräparat |
| Färbepreparate | <ul style="list-style-type: none">- Direkte Färbung- Indirekte Färbung- Gramfärbung- Endosporenfärbung- Kapselfärbung- Geißelfärbung- Säurefestigkeitsfärbung |
| Feuchtkammerpräparate | <ul style="list-style-type: none">- Darstellung von Schimmelpilzen |

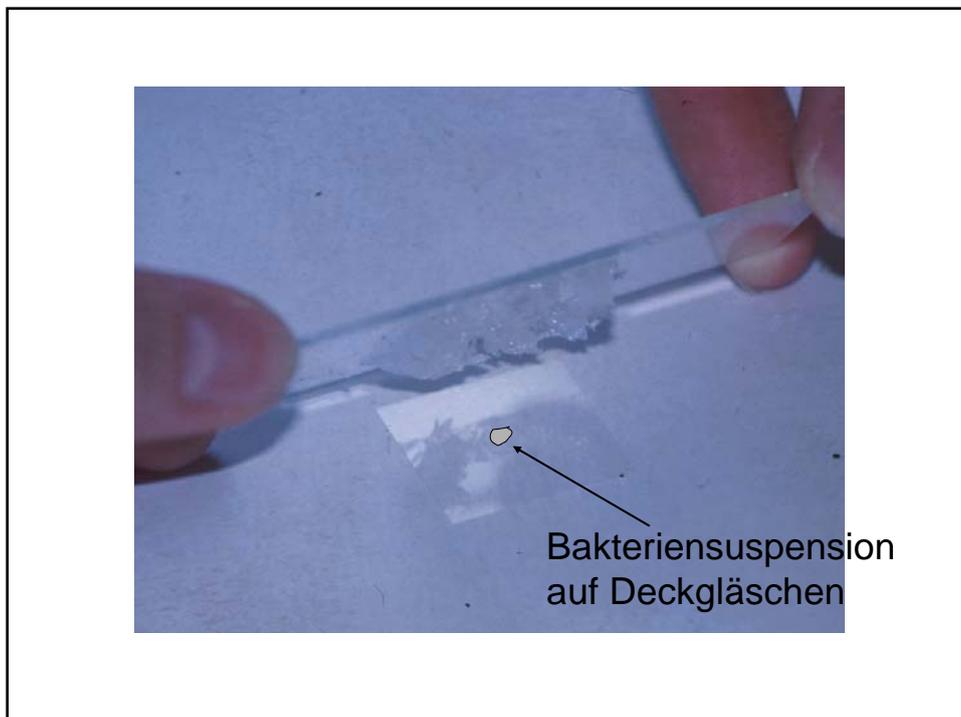
Mikroskopierutensilien

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> - Mikroskop - Objektträger - Deckgläser - Pinzetten - Impföse/-nadel - Immersionsöl - Wundbenzin - Watte - Filterpapier - beständiger Filzstift - Vaseline - Bunsenbrenner | <p><u>Färbelösungen:</u>
z.B.: Gramfärbekit
Methylenblau-Lösung
etc.</p> |
|---|--|

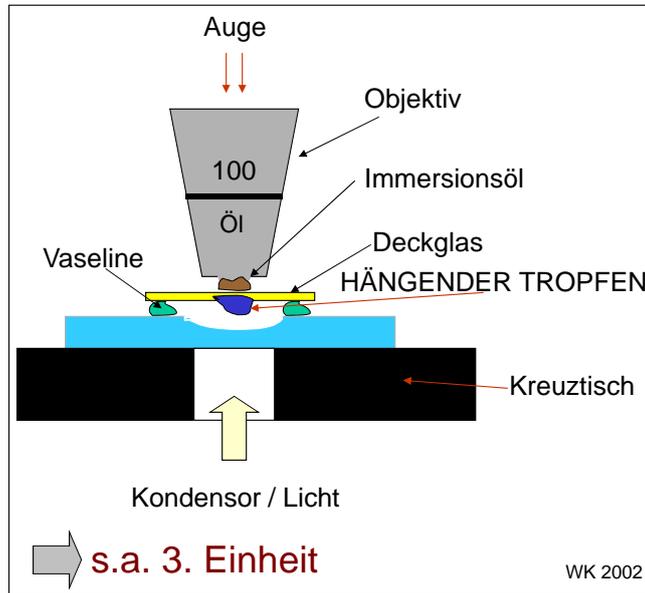
Lebendpräparat

- Orientierende Schnelltest
- natürliche Zellform, -verbände
- Beweglichkeit erkennbar
- spezielle mikroskop. Techniken anwendbar
(z.B. Phasenkontrastmikroskopie)

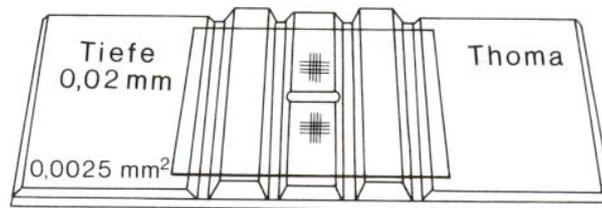
Normales Deckglaspräparat  Hängender Tropfen



Mikroskopieren des Hängenden Tropfens

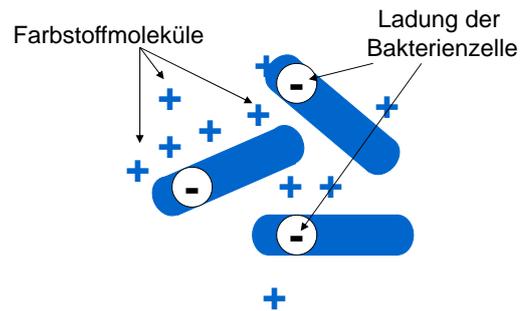


Skizze eines Zählkammerpräparats

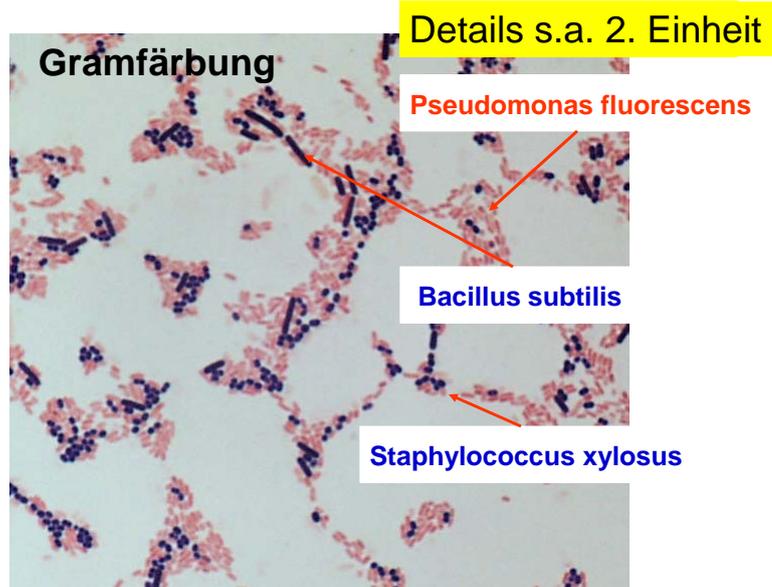


Methylenblau-Färbepreparat

- Rasche und einfache Durchführung
- Erkennen morphologischer Kriterien (Zellform, Zellverband)

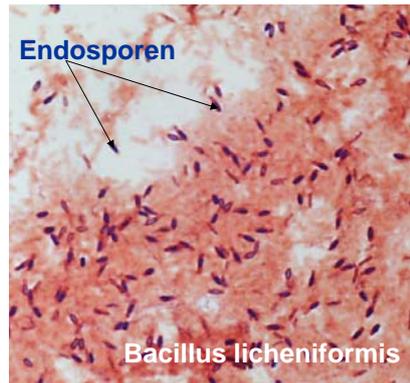


Gramfärbung



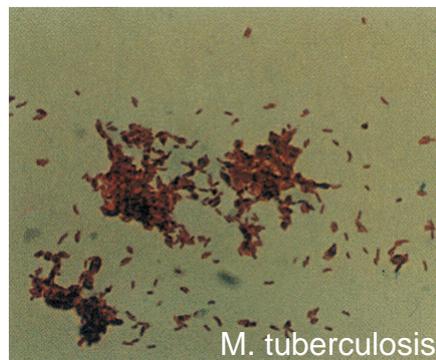
Endosporenfärbung

- Nachweis bakterieller Sporen
- Erkennen der Lage der Endospore
- Beschaffenheit des Sporangiums
- verschiedene Rezepturen



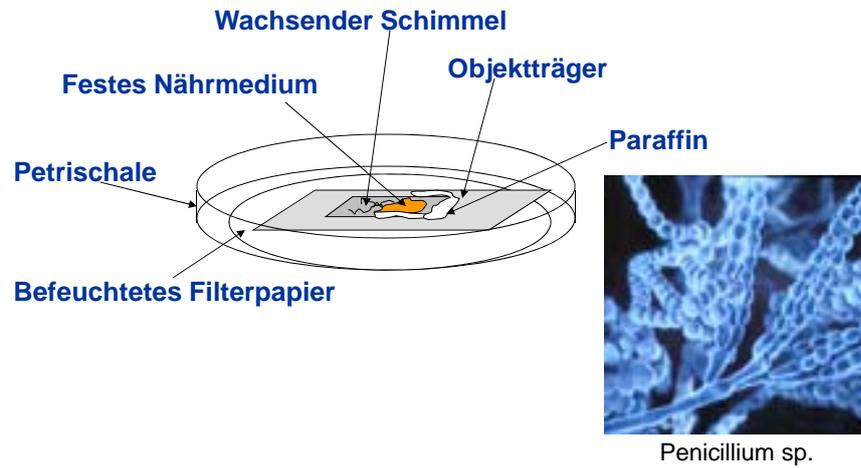
Säurefestigkeitsfärbung

- Carbofuchsinfärbung
- Ziehl-Neelsen-Färbung
- TBC/Mycobakterien-Diagnostik



Feuchtkammerpräparat

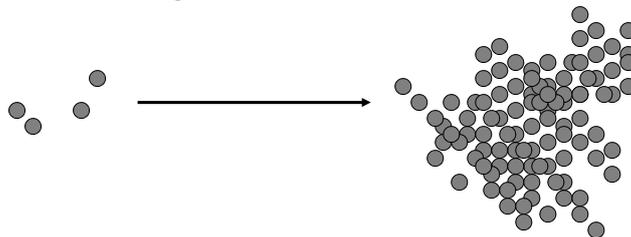
- Kultivierung von Schimmelpilzen
in feuchtem Milieu



9. ARBEITEN IM MIKROBIOLOGISCHEN LABOR - TEIL 2

Kultivierung und Reinzucht von Mikroorganismen

Mikroorganismen **anreichern**:



- Erhöhung der Keimzahl bzw. Zellmasse
- **kollektiv** oder **selektiv** anreichern
- Zweck:
Nachweis - Identifizierung - Gewinnung von Zellmasse

Kollektiv anreichern bzw. züchten



Möglichst **viele/alle Keime** zum Wachsen bringen:
Kollektivmedien.....optimale Wachstumsbedingungen

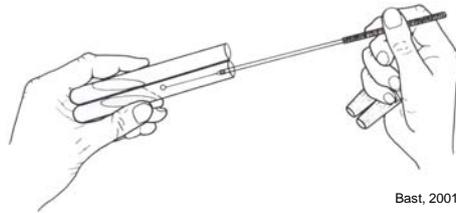
Selektiv anreichern bzw. züchten



Nur **bestimmte Keime** zum Wachsen bringen:
Selektivmedien, spezifisch optimierte Wachstumsbedingungen:
Selektive Agenzien: - pH-Wert
- Antibiotica u.a. Hemmstoffe
- Verhalten gegenüber Sauerstoff
- Indikatoren im Nährsubstrat

Aerobes Wachstum - aerobe Kultivierung von Mikroorganismen

Utensilien



Bast, 2001

- Kulturgefäße
- Kultivierungsmedium
- Inokulum
- „Werkzeug“ (Öse, Nadel, Pipette)
- Brutschrank oder Wasserbad



Inkubationsschrank:
am häufigsten verwendete
Temperaturen:

25 °C

30 °C

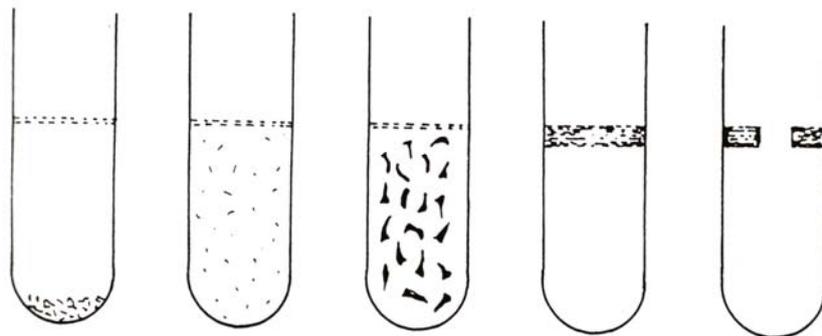
37 °C

45 °C

6 °C *) *) Kühlbrutschrank

10 °C *)

(Aerobes) mikrobielles Wachstum in Bouillon



Bodensatz

Trübung

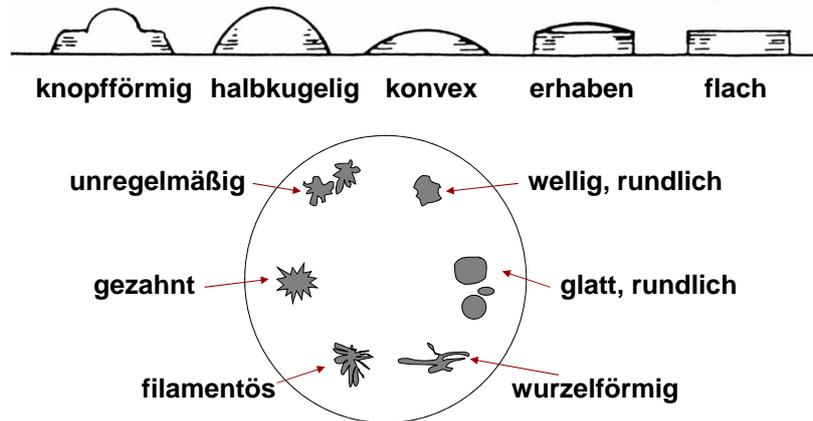
Flockenbildung

Hautbildung

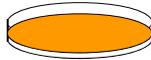
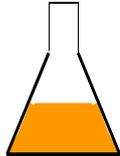
Ringbildung

(Aerobes) mikrobielles Wachstum auf festem Nährboden

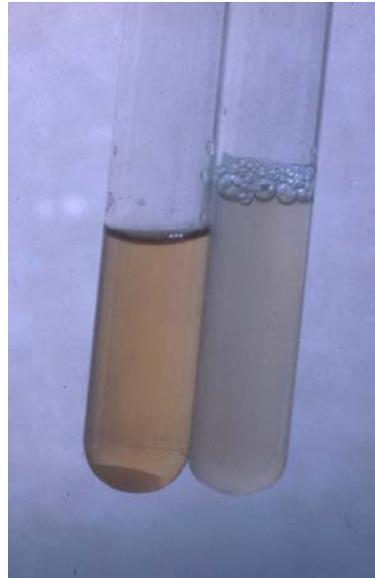
Oberflächenbeschaffenheit der Kolonien



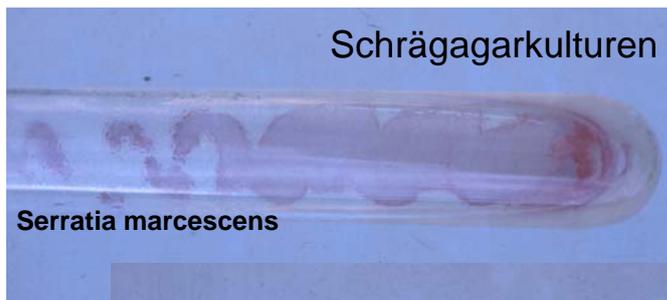
Formen der aeroben Kultivierung

- Bouillonkultur 
- Oberflächenkultur 
- Submerskultur  Eintrag von O_2 zur Versorgung der Mikroorganismen mit gelöstem O_2
- Mikroaerobe Kultur  benötigen niedrigen Sauerstoffpartialdruck (z.B.: halbfeste Nährmedien, Zusatz von best. Substanzen)

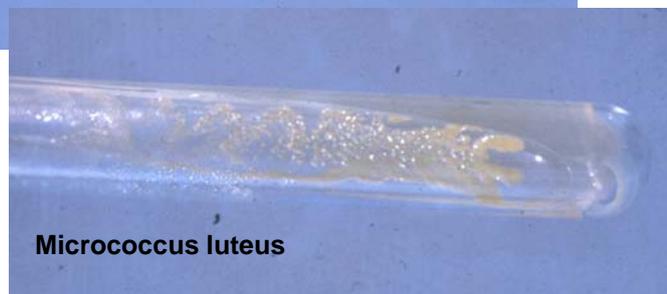
Bakterienwachstum in Nährbouillon



Schrägagarkulturen



Serratia marcescens

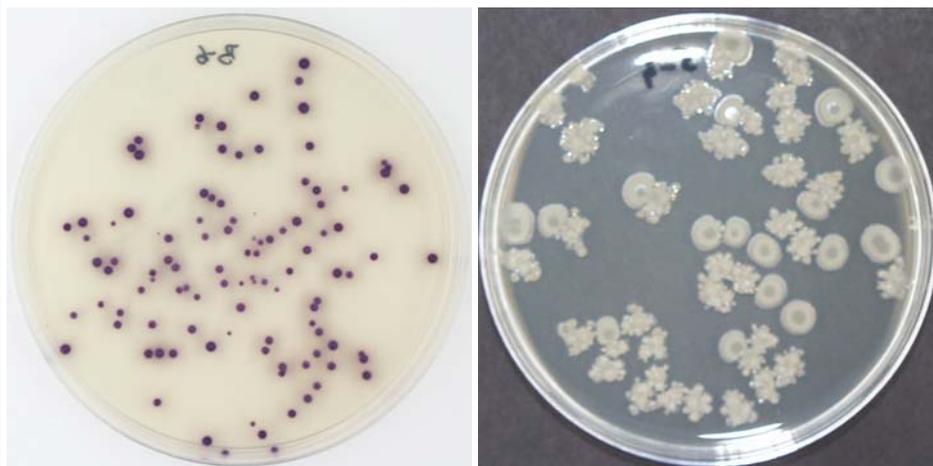


Micrococcus luteus

Kolonien auf Agarplatten

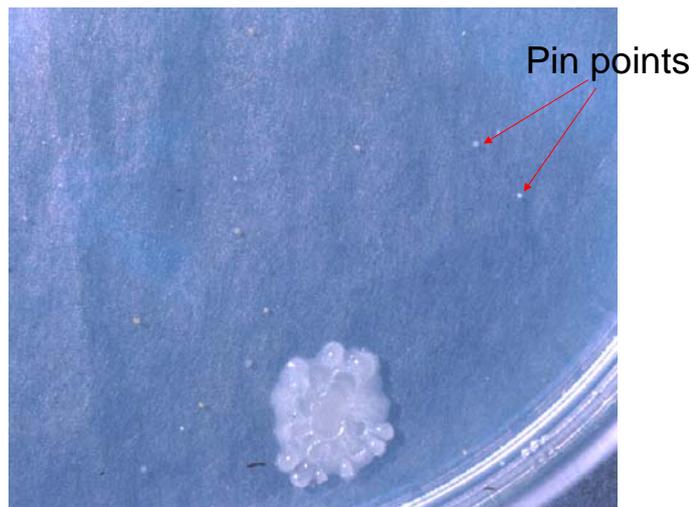
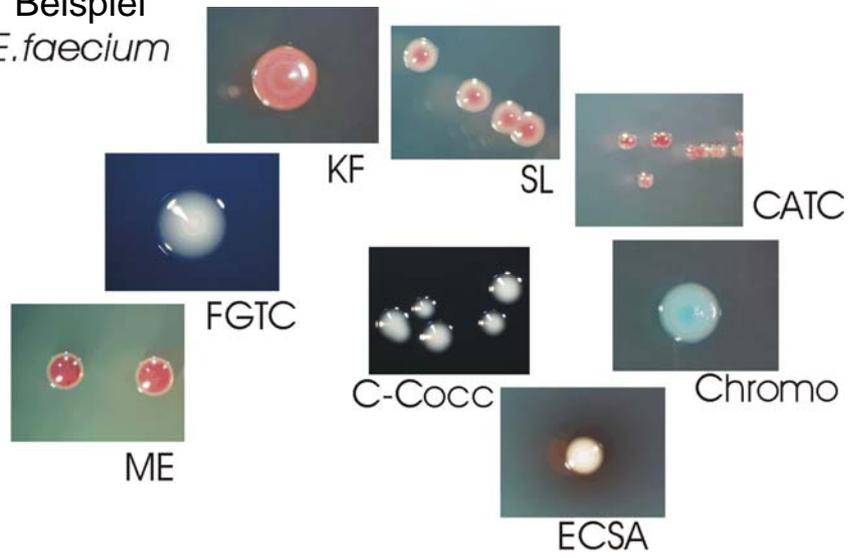


Ausprägung von Kolonien auf Nährmedien



Kolonien eines Stammes auf verschiedenen Medien

Beispiel
E. faecium





Schüttelinkubator

Anaerobe Kultivierung von Mikroorganismen

- betr. Mikroorganismen, die unter Anwesenheit von Sauerstoff nicht wachsen können
 ➔ obligate Anaerobier
- Absenkung des Redoxpotenzials
- Verbrauch des Sauerstoffs im Inkubationsmilieu durch spezielle Hilfsmittel

Toxische Wirkung von Sauerstoff

- „normale“ Form des Sauerstoffs: Triplett-O₂ ³O₂

- hochenergetische Form des O₂: Singulett-O₂ ¹O₂

- weitere hochtoxische Formen von O₂ :

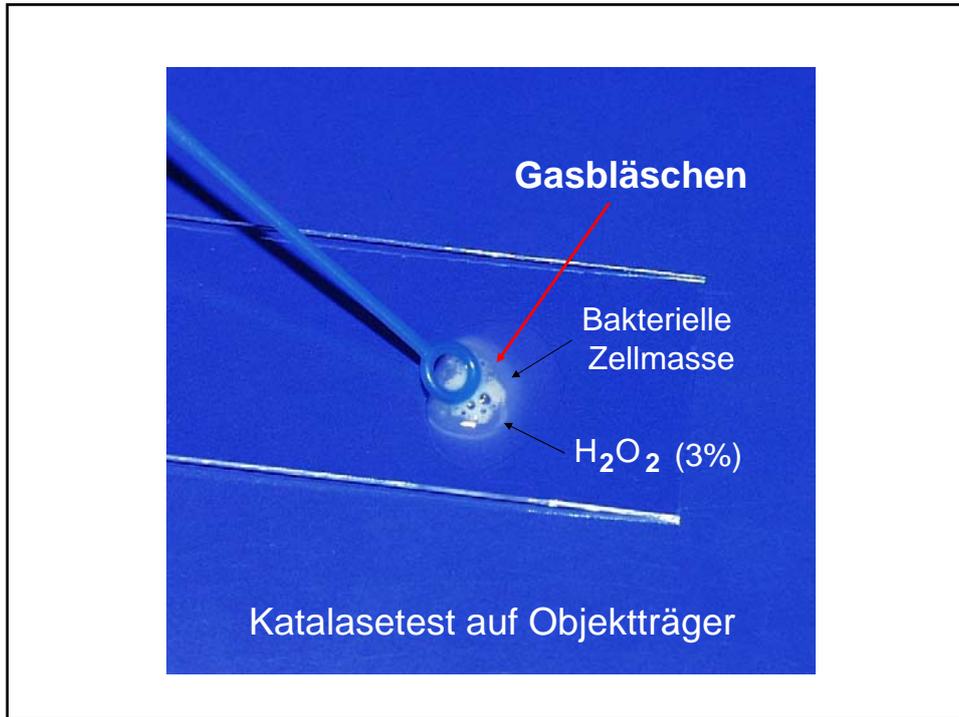
* O_2^- Superoxidanion ← **Superoxiddismutase** **Carotinoide**

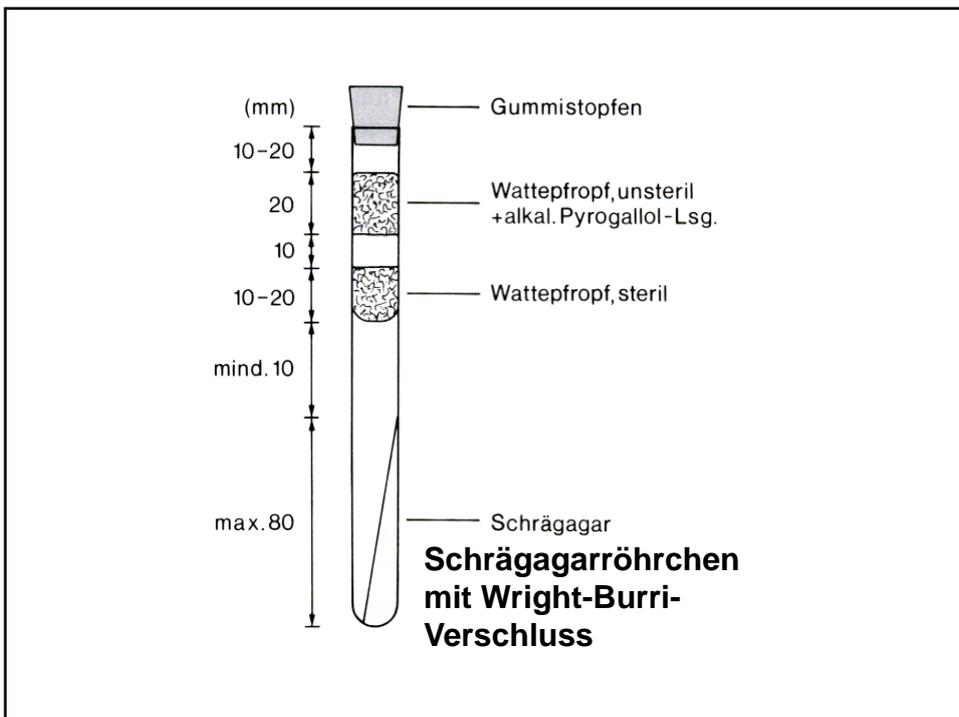
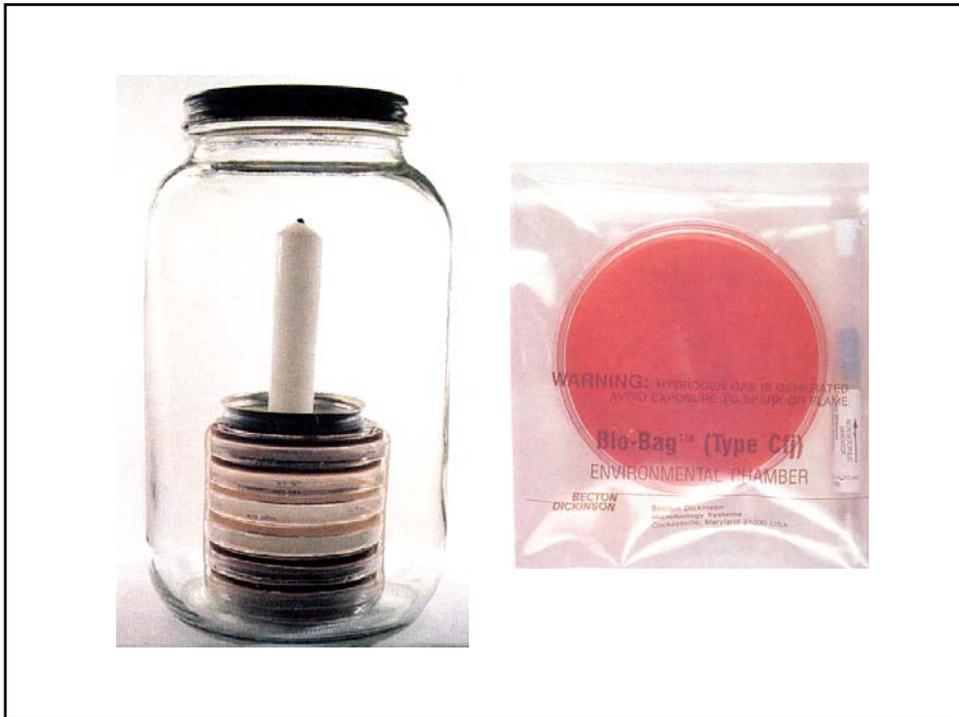
* H_2O_2 Wasserstoffperoxid ← **Katalase, Peroxidase**

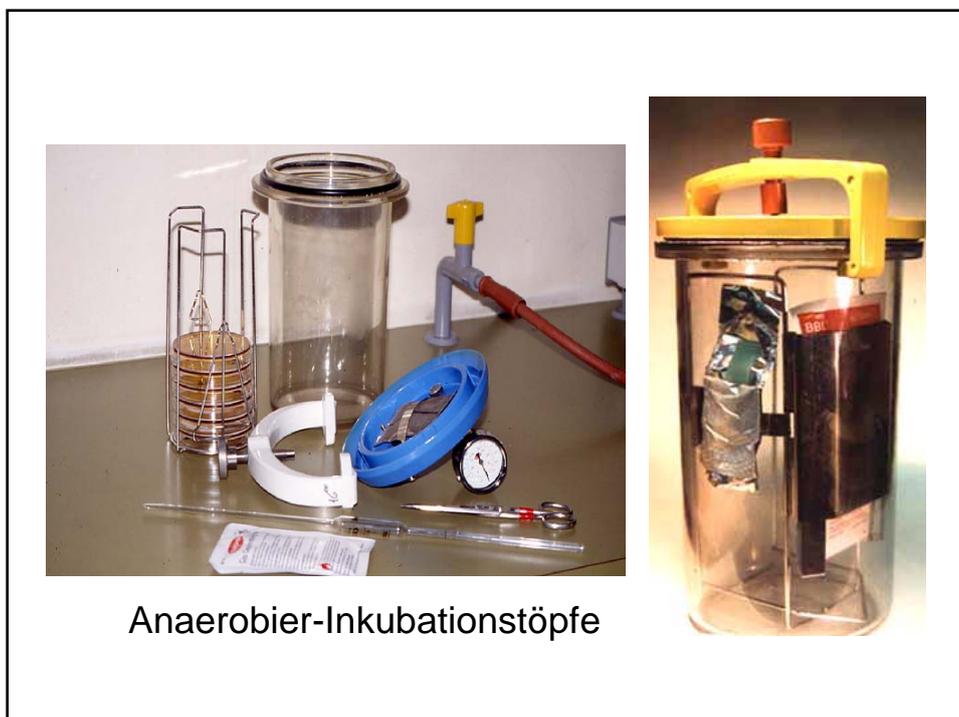
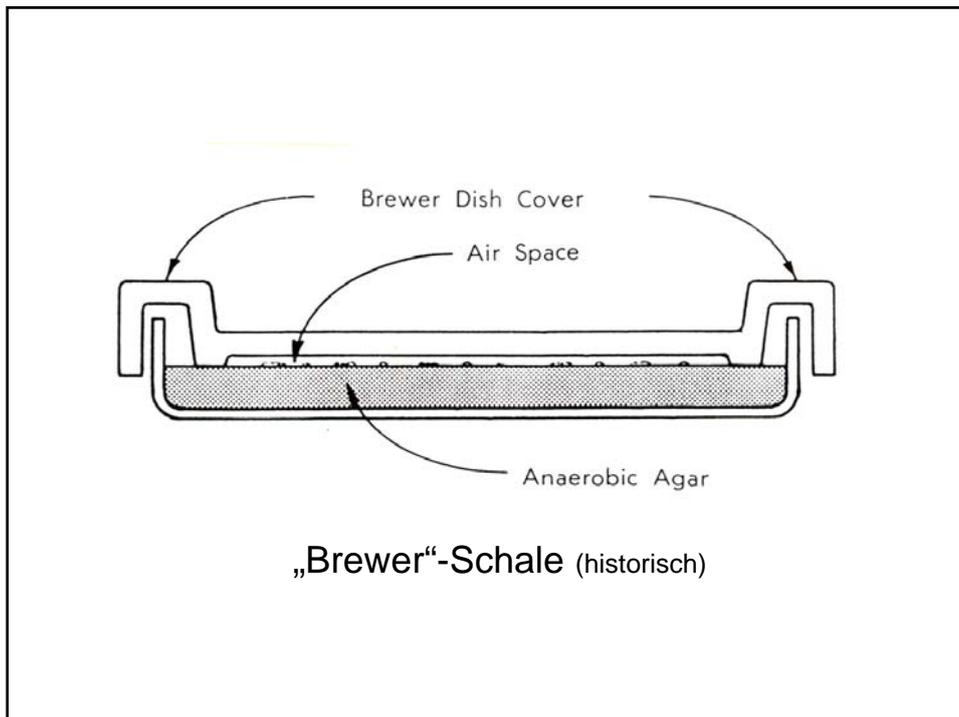
* OH^\bullet Hydroxylradikal
(...reaktivste Sauerstoffform)

Reaktion der Katalase











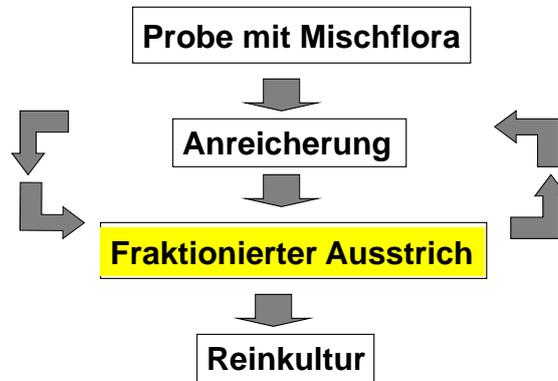
Anaerobier-Inkubationsschrank

Kultivierung und Reinzucht von Mikroorganismen

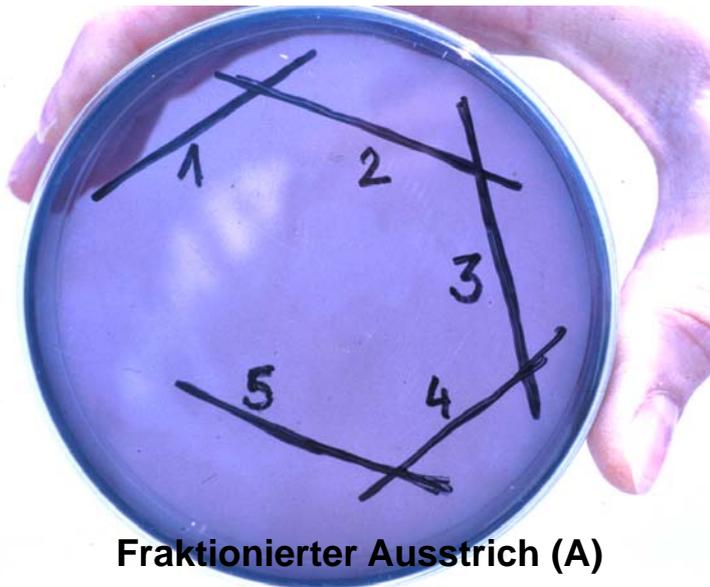
Mikroorganismen **reinzüchten**:

- Maßnahmen, die zu einer Kultur führen, die nur **aus einer Art bzw. einem Stamm** besteht
- Grundlage für eine Identifizierung

Fließschema der Reinzüchtung



- einzelne Kolonien auf Nährsubstrat
- gleiches Aussehen und Größe
- gleiche Eigenschaften

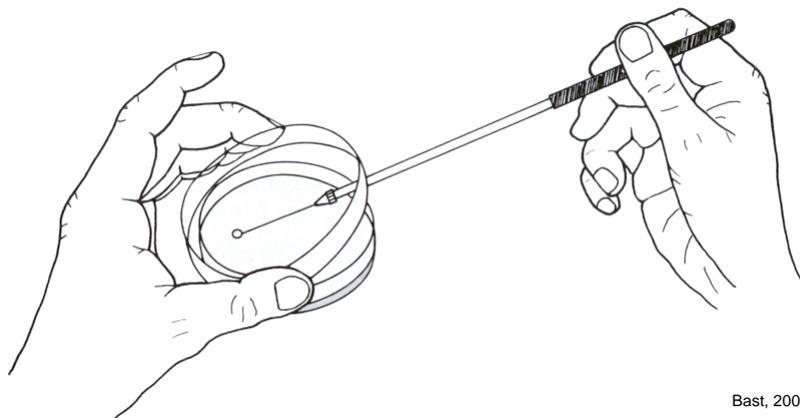


Fraktionierter Ausstrich (A)

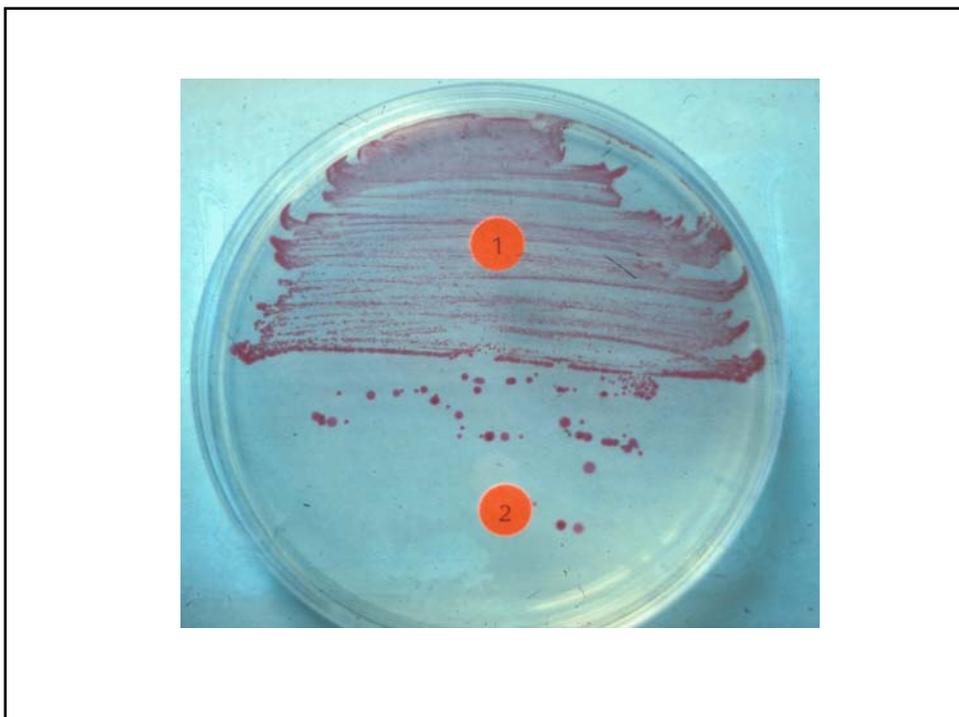
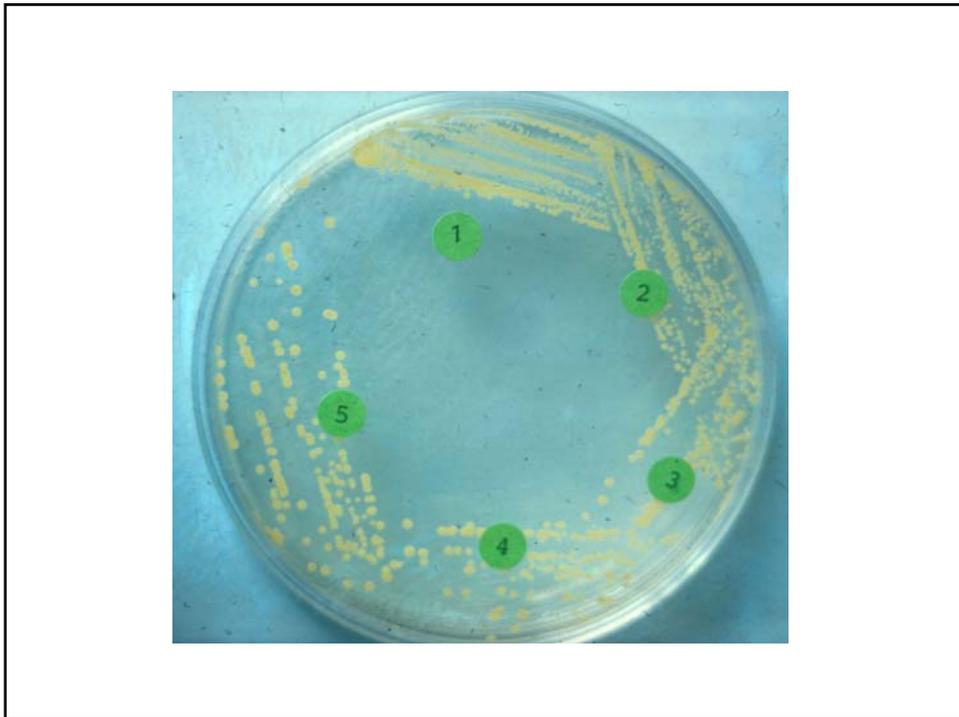


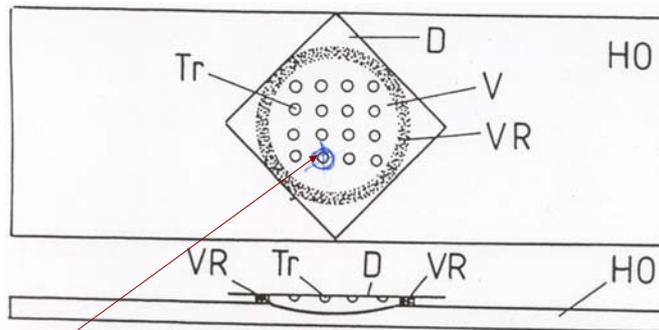
Fraktionierter Ausstrich (B)

Fraktionierter Ausstrich - Sterile Impftechnik



Bast, 2001





z.B. diesen Tropfen gewinnen und weiterkultivieren

Tröpfchenverfahren (Hefe-Reinzucht)

HO = hohler Objektträger

V = Vertiefung

VR = Vaseline-Ring

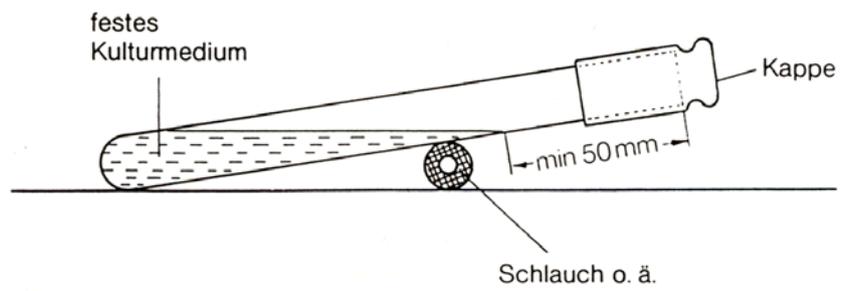
D = Deckglas

Tr = Tröpfchen

Aufbewahrung von Reinkulturen

- Periodisches Überimpfen
(Stammhaltung, Gebauchskulturen,Kontaminationsgefahr etc.)
- Schrägagarrröhrchen
- Lagerung unter Paraffinöl
- Gefriertrocknung (Lyophilisation)
- Vakuumtrocknung mit Schutzstoffen
konz. Magermilch
Myo-Inosit
Raffinose
- Tiefgefrieren (mit Glycerin), -80°C
- Tiefgefrieren in flüssigem Stickstoff

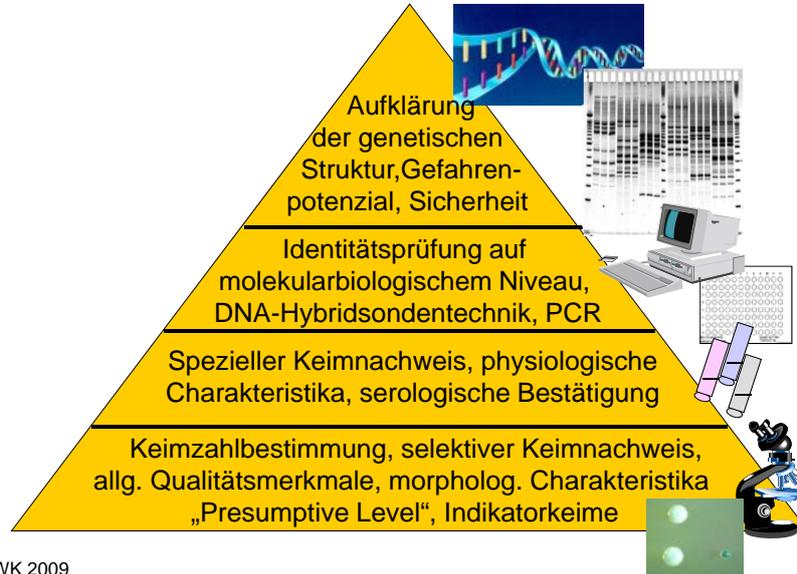
Schrägagarrröhrchen



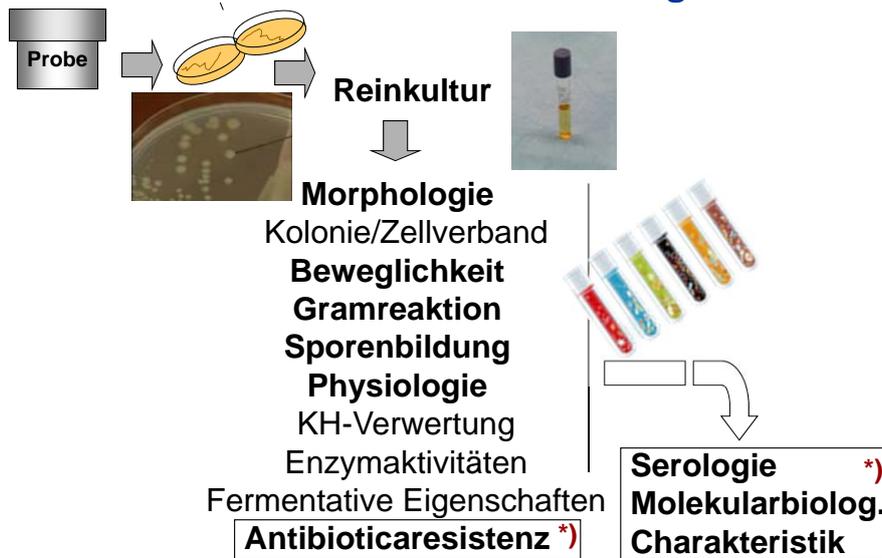
**10. MIKROORGANISMEN-
NACHWEIS
UND KEIMZAHL**



Strategie der Identifizierung von Mikroorganismen



Schritte der Identifizierung



*) Details später

Physiologische/phänotypische Charakterisierung von Mikroorganismen

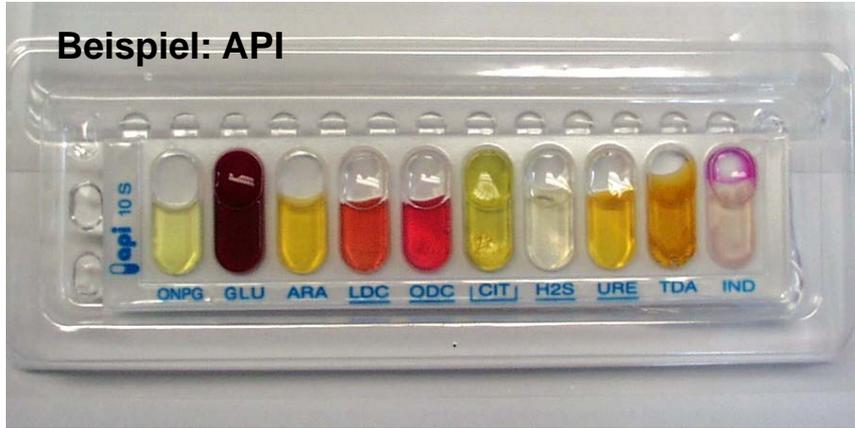
- Tests mit Röhren („manuell“)
- **Miniaturisierte Testkits**
(API, BIOLOG, OXI-FERM etc.)
- Farbveränderungen (KH-Verwertung)
- Enzymatische Aktivitäten
- „Schnelltests“
- PC-Datenbank-Auswertung

- „Begleitende Tests“

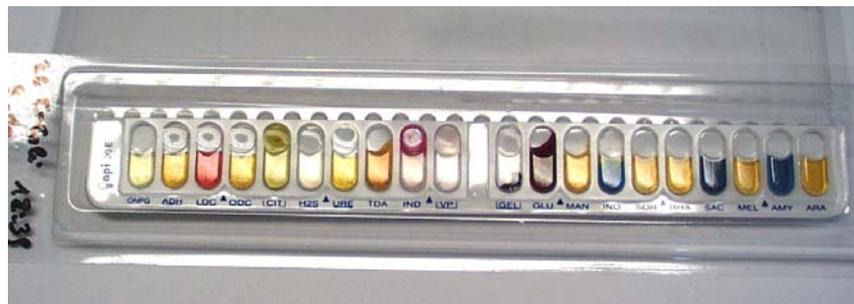
Beispiel: API



Beispiel: API



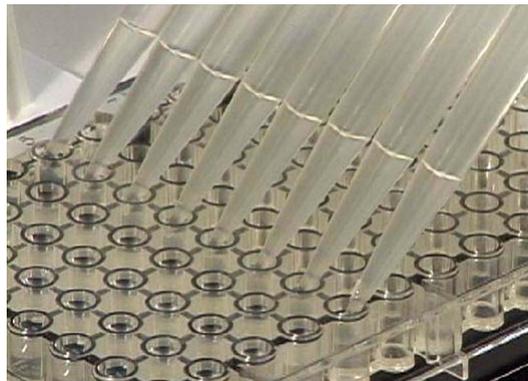
API 20E



Beispiel: Miniaturisierte Identifizierungstests



Mikrotiterplatten für Biolog-Identifizierung



Begleitende/Ergänzende Tests

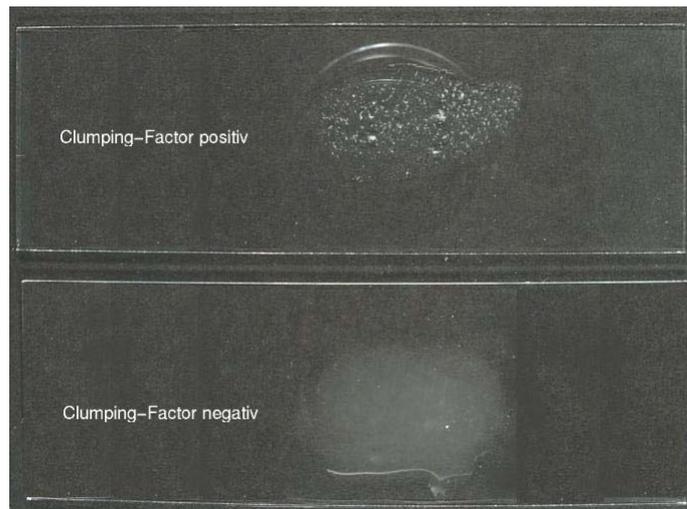
- | | |
|-------------------------------|---|
| - Oxidase-Test | Tropf-Test, Streifentest |
| - Katalase-Test | Wasserstoffperoxid.....Gasbläschenbildung |
| - Nitratreduktion | Diazotierungs-/Kupplungsreaktion
(Farbtest) |
| - β -Hämolyse-Aktivität | Hämolysehof auf Blutagar |
| - Koagulase-Test | Agglutinationstests |
| - Proteolytische Aktivität | Hydrolyse auf Casein-Agar, Gelatine-
verflüssigung, Peptonisierung von
Lackmusmilch |
| - Lipolytische Aktivität | Tributylin-Agar-Hydrolyse |
| - Fäkalindikator-Nachweis | Coliforme Keime VRB-Agar |



β -Hämolyse von Staphylococcus aureus



Koagulase-Aktivität



Gelatineverflüssigung (Beispiel Proteus vulgaris)

Nachweis der
proteolytischen Aktivität



KEIMZAHL / KEIMGEHALT

—> liefert quantitative Aussage

- wichtiger Parameter
zur Beurteilung:

- der mikrobiologischen Qualität
- der Haltbarkeit bzw. des Verderbsstatus
- der Sterilität (ja/nein)
- des Mindestkeimgehalts von bestimmten Produkten

Bestimmung der Keimzahl

- Direkte Methoden

- * Zählkammer
- * Mikroskopischer Ausstrich
- * Elektronische Verfahren
- * Mikroskopische Verfahren kombiniert mit Membranfiltertechnik

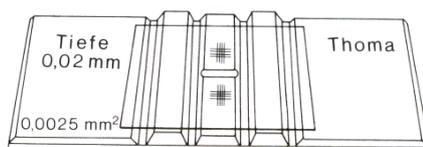
- Indirekte Methoden

- * Trübungsmessung
- * Erfassung mikrobieller Stoffwechselprodukte (Pyruvat, Lactat etc.)

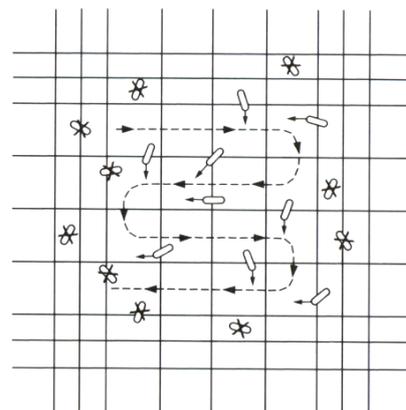
- Kulturelle Methoden

- Koch'sches Plattenverfahren

Zählkammer nach Thoma



A



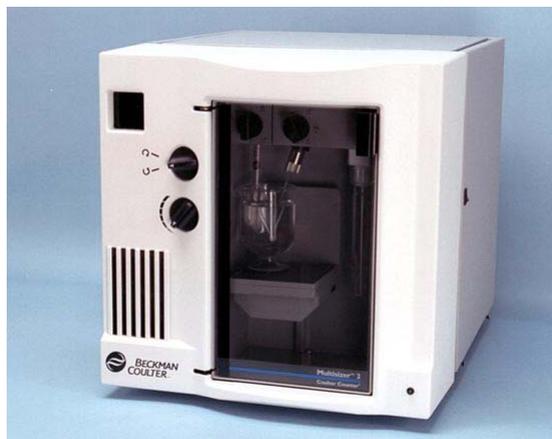
B

Abb. 26:

Zählkammer nach Thoma. **A** Gesamtansicht. **B** Ausschnitt aus dem Liniennetz mit einem Großquadrat, bestehend aus 16 Kleinquadraten. Die gestrichelte Linie zeigt den Weg der Durchmusterung des Großquadrats; zur Behandlung der auf den Grenzen liegenden Zellen siehe Text.

Bast, 2001

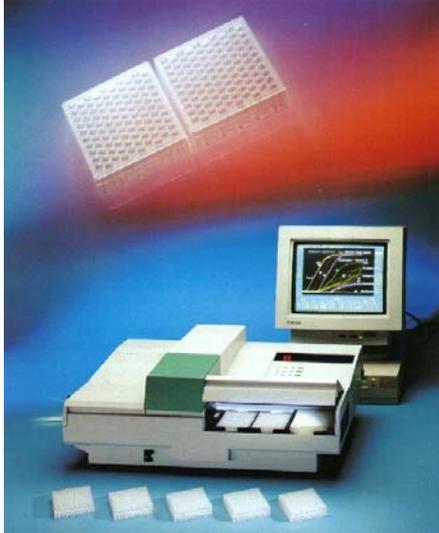
Elektronisches Mikropartikel-Zählgerät (Coulter Counter)



BactoScan-Gerät



Trübungsmessung mit dem BioScreen C Analyzer

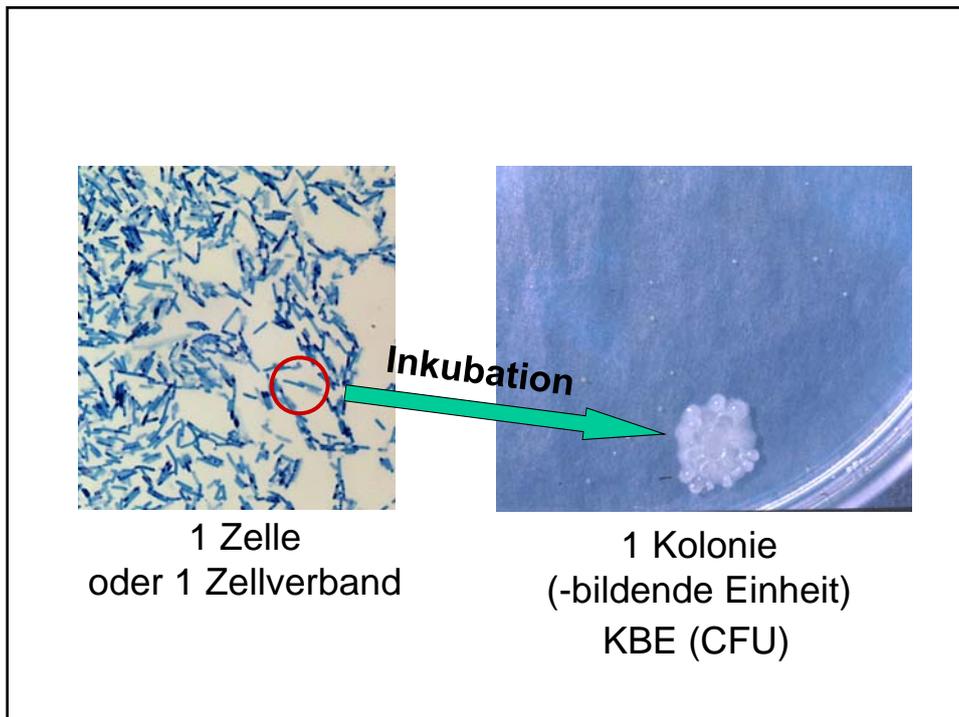


Anwendungsmöglichkeiten:

- Monitoring der Wachstumskinetik
- Hemmstoffprüfung
- Nährmedienoptimierung
- Sterilitätstests

Koch'sches Plattenverfahren

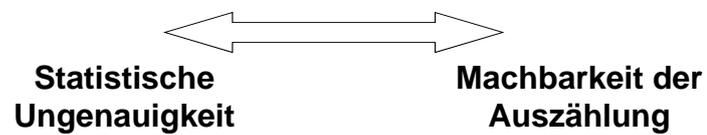
- Methode, mit der **Kolonien** auf/in einer Nährbodenplatte (Petrischale) gezählt werden
- Prinzip: aus Mikroorganismenzelle(n) wachsen **Kolonien** (während einer Inkubationsperiode)
.....KBE (CFU)
- **1 ml (g)** Probe(nverdünnung, -homogenat) pro Platte.....KBE (CFU)
- zu berücksichtigen: **wann ist eine Platte auszählbar (auswertbar) ?**



Koch'sches Plattenverfahren – Forts.

Ziel:

Platte mit mind. 10 bis max. 300 KBE

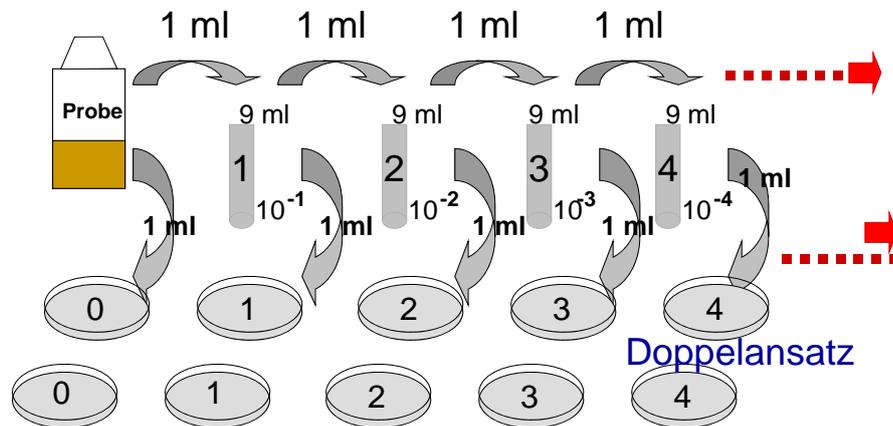


bei Proben mit KZ > 300/ml (g)

Dezimale Verdünnungsreihe

Die Verdünnungsreihe des Koch'schen Plattenverfahrens

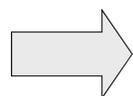
Konventionelles Schema



Koch'sches Plattenverfahren -3

Prinzip der Auswertung:

- Zählung der KBE
- Multiplizieren des Zählwerts mit dem Verdünnungsfaktor



(Kulturelle) Lebendkeimzahl
(viable count)

Auswertung: Gewogenes arithmetisches Mittel

$$\bar{c} = \frac{\sum c}{n_1 \cdot 1 + n_2 \cdot 0,1} \cdot d$$

\bar{c} Gewogenes arithmet. Mittel d. KBE

$\sum c$ Summe der KBE aller Petrischalen, die zur Berechnung herangezogen werden (niedrigste u. nächst höhere Verd.stufe)

n_1 Anzahl d. Petrischalen der niedrigsten auswertbaren Verd.stufe

n_2 Anzahl d. Petrischalen der nächst höheren Verd.stufe

d Faktor der niedrigsten ausgewerteten Verd.stufe (die n_1 entspricht)

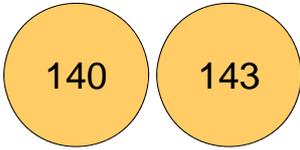
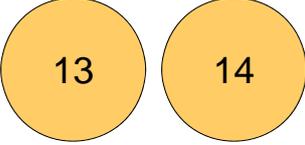
Zählwert zu hoch

10^{-2}	275	(325)	Beispiel 1
10^{-3}	21	18	

$$\bar{C} = \frac{275 + 21 + 18}{1 \cdot 1 + 2 \cdot 0,1}$$

$$= \frac{314}{1,2} \cdot 10^2 = \underline{\underline{2,6 \cdot 10^4}}$$
 (KBE/ml)

Beispiel 2

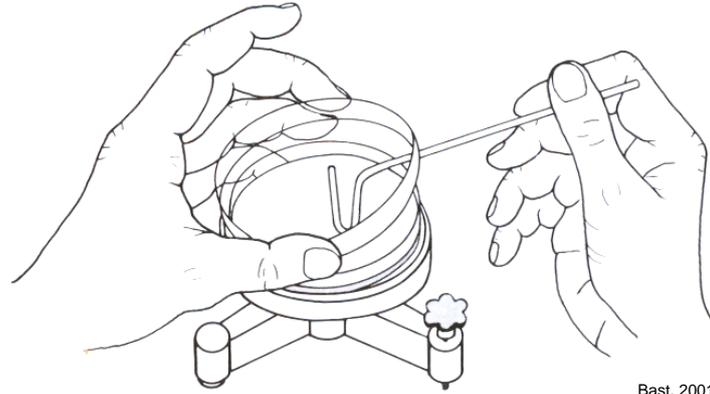
10^{-3}		
10^{-4}		$\bar{C} = \frac{140 + 143 + 13 + 14}{2 \cdot 1 + 2 \cdot 0,1}$ $= \frac{310}{2,2} \cdot 10^3 = \underline{\underline{1,4 \cdot 10^5}}$ <p style="text-align: center;">(KBE/ml)</p>

Varianten des Koch'schen Plattenverfahrens

- Gussplattenverfahren
- Oberflächenausstrichverfahren
- Spiral Plater-Technik
- Petrifilm-Methode
- Membranfilter-Methode



Spatelvorgang mit einer Drigalskispatel



Bast, 2001



Automation des Koch'schen Plattenverfahrens

Spiral Plater-Technik



Petrifilm-Methode (3M)

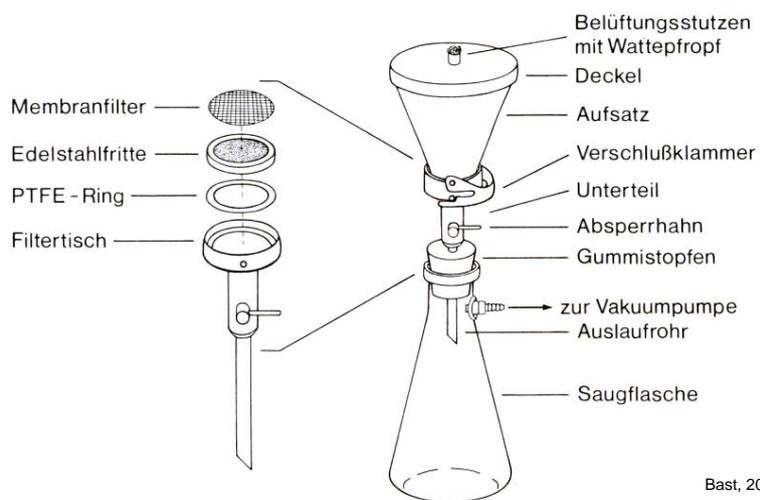


1- Inoculate

2-Incubate

3-Interpret

Klassische Vorrichtung zur Membranfiltration



Bast, 2001



Gebäuchliche Medien für die kulturelle Keimzahlbestimmung

Verdünnungslösung(en): NaCl-Pepton-Puffer
Ringerlösung
physiolog. NaCl-Lösung

Agarmedien: Casein-Sojapepton-Agar
Sabouraud-Agar
Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Lactose-
Agar
McConkey-Agar
Baird-Parker-Agar
.....

Mikrobiologische Untersuchungsmethoden - Einteilung

➤ - **Klassische Methoden**

- Kulturelle Verfahren
- Membranfilter-Verfahren
- MPN-Methoden

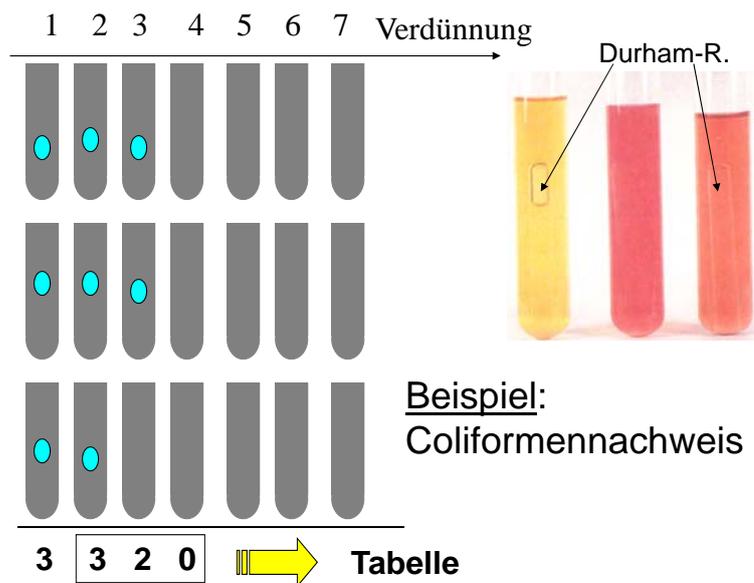
➤ - **„Moderne“ Methoden / „Schnell“-Verfahren**

- Schnelle kulturelle Techniken
- Mikroskopische Verfahren
- Elektrometrische Verfahren
- Biolumineszenzmethoden
- Serologische Methoden
- Molekularbiologische Methoden

MPN (most probable number) Methode

- Keimgehalt nach statistischen Gesichtspunkten geschätzt
- Basis: Veränderung im Nährmedium.....
 - Gasbildung** → Durham-Röhrchen
 - Enzymatische Reaktion.....Farbe/Fluoreszenz**
- Geeignet für relativ geringe Keimzahlen (< 100)
- Geeignet für größere Probenansatzmengen
- Anwendungsbeispiele:
 - Coliformennachweis in Trinkwasser**
 - Nachweis von E.coli in Lebensmitteln**
 - Keimzahl von Clostridien**

MPN (most probable number) Methode



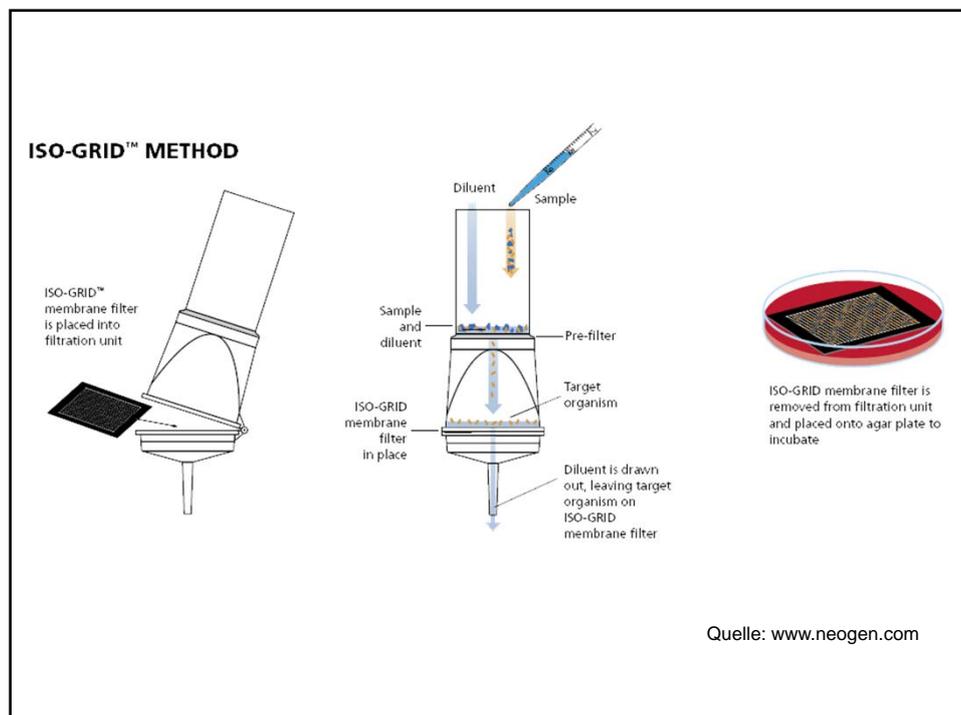
MPN-AUSWERTE-TABELLE						
Zahl der positiven Röhren			MPN pro ml der Verdünnung 10^{-x}	Kategorie ²⁾	≥ 95%-Konfidenzgrenzen ³⁾	
Verdünnungsstufe					μ_u	μ_o
10^{-x}	$10^{-(x+1)}$	$10^{-(x+2)}$				
3	3	3	> 110			
3	3	2	110	1	20	400
3	3	1	46	1	9	198
3	3	0	24	1	4	99
3	2	2	21	2	3	40
3	2	1	15	1	3	38
3	2	0	9,3	1	1,8	36,0
3	1	1	7,5	1	1,7	19,9
3	1	0	4,3	1	0,9	18,1
3	0	1	3,8	1	0,9	10,4
3	0	0	2,3	1	0,5	9,4
2	2	0	2,1	1	0,5	4,0
2	1	1	2,0	2	0,5	3,8
2	1	0	1,5	1	0,4	3,8
2	0	1	1,4	2	0,4	3,5
2	0	0	0,9	1	0,2	3,5
1	2	0	1,1	2	0,4	3,5
1	1	0	0,74	1	0,13	2,00
1	0	1	0,72	2	0,12	1,70
1	0	0	0,36	1	0,02	1,70
0	1	0	0,30	2	0,01	1,00
0	0	0	< 0,30		0,00	0,94

Besonderheiten und Anforderungen „moderner“ Methoden

- Höhere Empfindlichkeit im Vergleich zu den konventionellen Methoden
- individueller Anwendungsbereich
- Falsch-positive und -negative Befunde < 10%
- Raschere Durchführbarkeit
- Weniger Vorbereitungsarbeit
- Schneller
- Preiswerter (?)

Schnelle mikroskopische Techniken

- Membranfilter-Mikrokolonie-Fluoreszenz-Methode
- DEFT (Direkte Epifluoreszenzfilter-Technik)
- HGMF-Technik (Hydrophobic Grid Membrane Filter Technique, ISO-Grid-System)



ISO-GRID-Methode (Forts.)



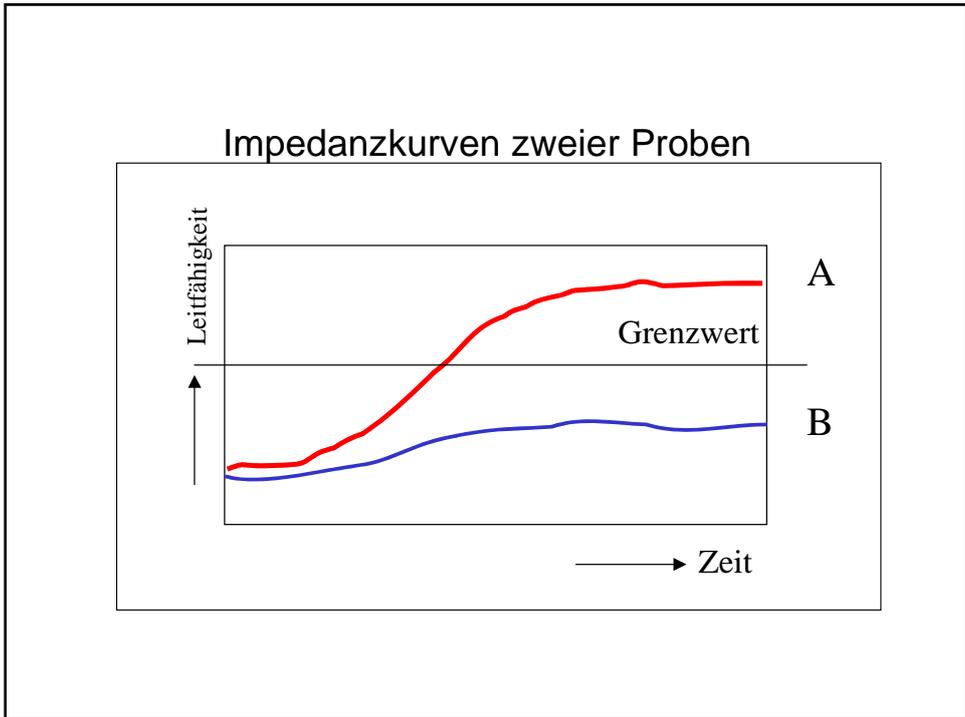
Elektrometrische Verfahren

- Impedanzmessung
- elektrische Leitfähigkeit / Widerstand
- direkte/indirekte Messung
- Verschiedene Systeme/Geräte:

BacTrac
Bactometer
Maltus System
RABIT

- Mikroorganismen produzieren Stoffwechselprodukte, die den elektrischen Widerstand reduzieren (die Leitfähigkeit erhöhen)





Anwendungsbereiche der Impedanzmessung

- schneller Nachweis von Mikroorganismen bzw. Keimgruppen
- Sterilitätstests
- Messung der Wachstumsaktivität
- Hemmstofftests
- Nährmedienoptimierung u. -entwicklung

Biolumineszenzmethoden

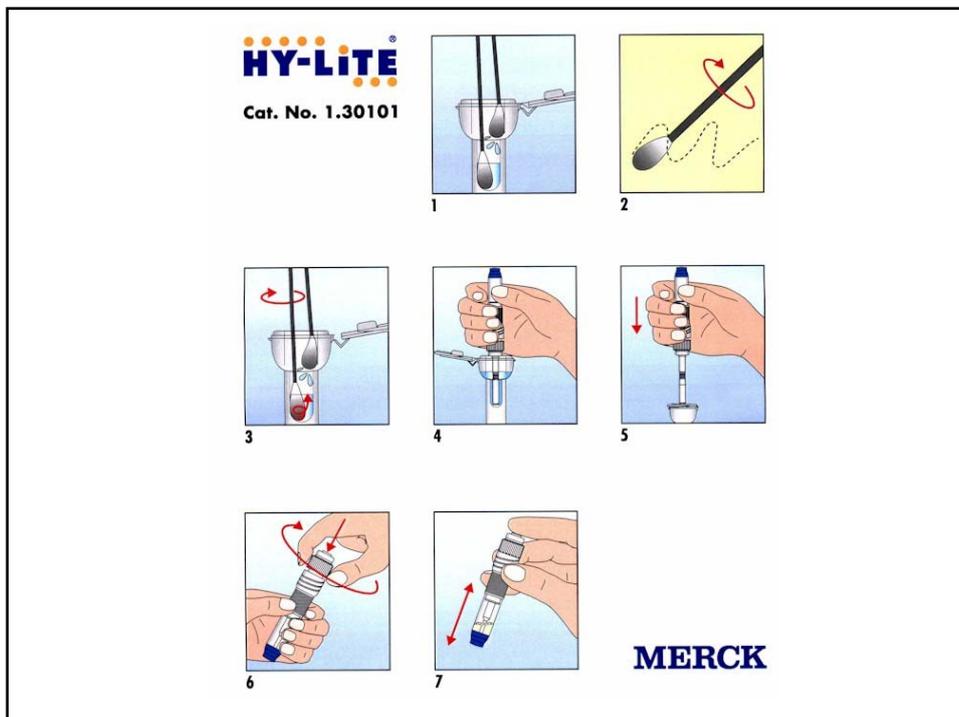
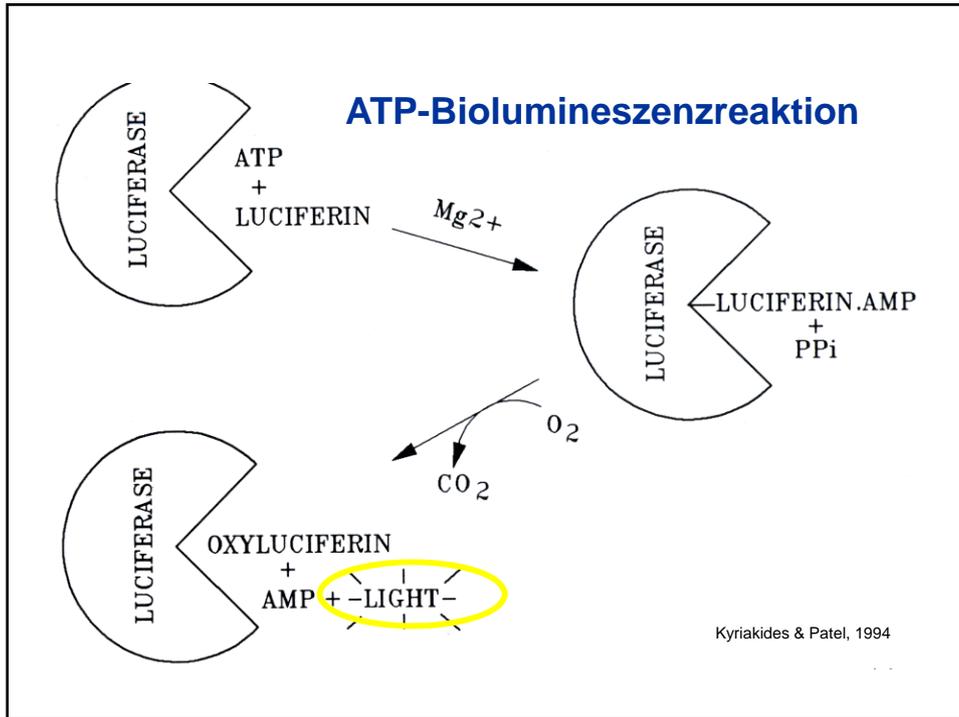
- ATP-Biolumineszenz-Technik



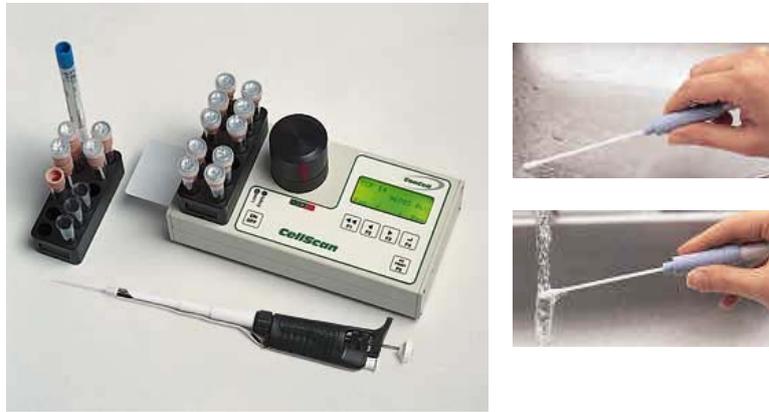
- Prinzip des Leuchtkäfers
- Reaktion mit ATP/Luciferin/Luciferase

- Anwendung von Luxgensonden

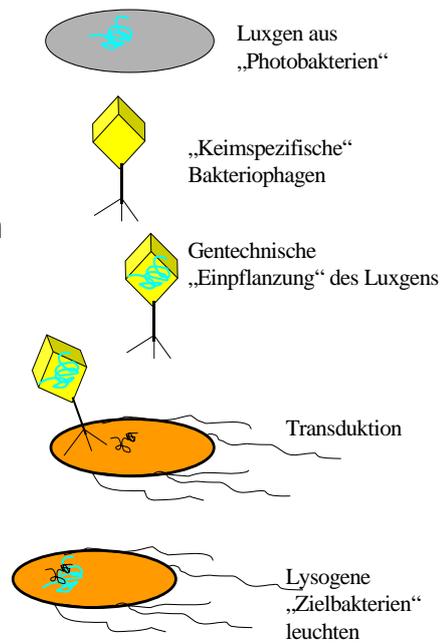
- Luxgene mariner Bakterien in Bakteriophagen eingepflanzt



ATP-Biolumineszenz-Messung



Prinzip der Luxgentransduktion für bakteriologische Nachweiszwecke

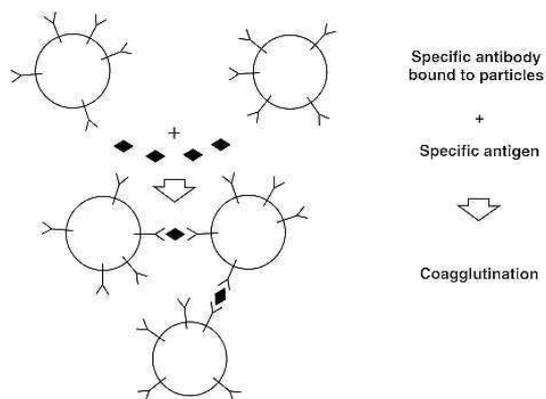


Serologische Methoden

- Latex-(Co-)Agglutinationstests
- ELISA Methoden
- Immunomagnetic Separation Technique
- Limulus-Test

Antigen + Antikörper \rightleftharpoons Antigen-Antikörper-Komplex

Latex Coagglutination



Specific antibody
bound to particles

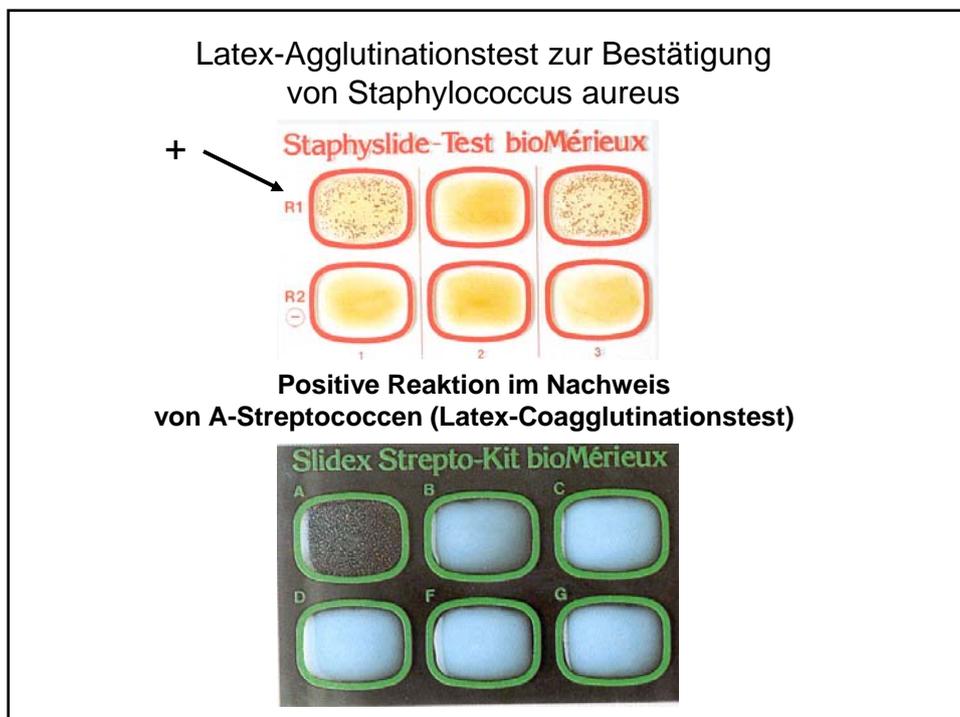
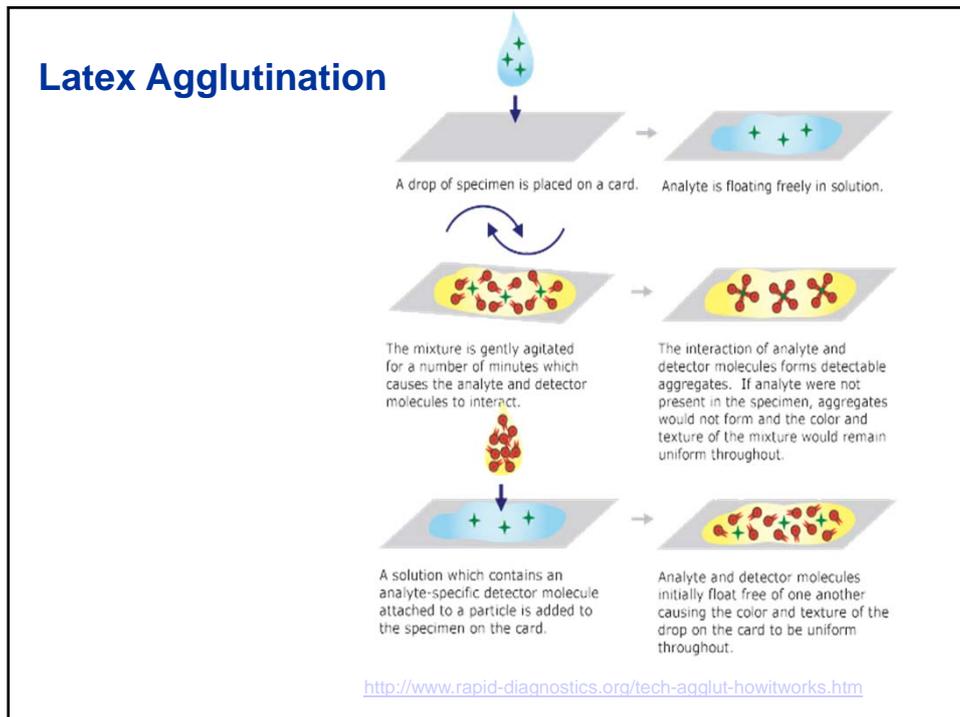
+

Specific antigen



Coagglutination

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8014/>
Baron S (ed): Medical Microbiology, 4th edition.; Galveston (TX):
University of Texas Medical Branch at Galveston; (1996)



ELISA:

.....Enzyme Linked Immunosorbent Assay

- Antikörper oder Antigen mit kovalent gebundenen Enzymen (z.B. Peroxidase, Phosphatase etc.)
- Auswertung mittels Farbreaktion (Fluoreszenz)
- direkter oder indirekter ELISA-Test

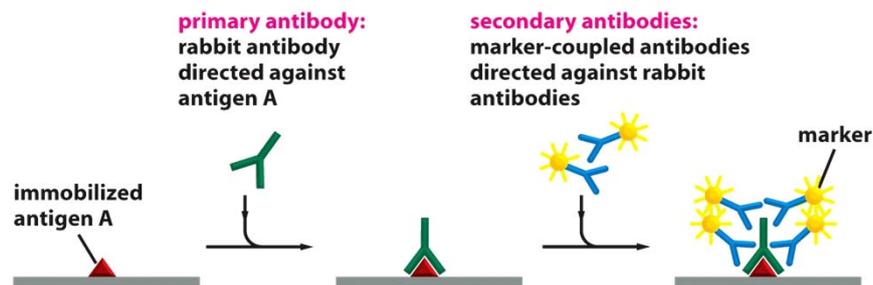


Nachweis **Nachweis**
 von Antigenen von Antikörpern

- Mikrotiterplatten
 - Streifen
 - Reagenzröhrchen

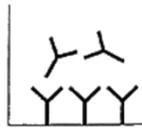
- Sandwich-ELISA: Antigen zw. 2 Lagen von Antikörpern „gefangen“

Prinzip des indirekten ELISA-Tests



B. Alberts et al.: Molecular biology of the cell, 5. ed., reference ed.
 New York, NY: Garland Science (2008)

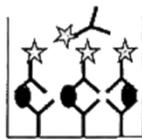
Prinzip des Sandwich-ELISA-Tests



Step 1: coat first antibody onto solid support; wash away unbound antibody.



Step 2: add antigen, which binds to first antibody; wash away unbound antigen.

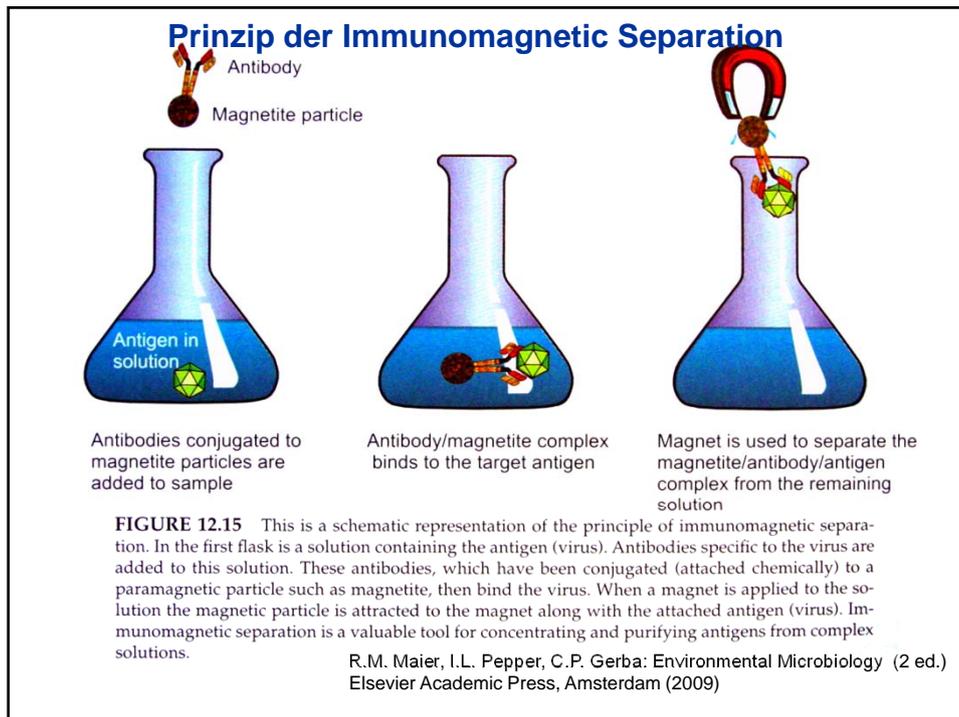


Step 3: add an excess of labelled second antibody; wash away unbound second antibody. Detect activity of bound second antibody.

P. Shepherd & C. Dean (ed.): Monoclonal antibodies- A practical approach; Oxford Univ. Press , (2000)

Immunomagnetic Separation Technique

- Detektion von Keimen bereits während der Anreicherung
- Prinzip der „Immunoaffinitätsreaktion“ mit magnetischer Abscheidung
- große Zeitersparnis
- hohe Selektivität



Beispiel: TECRA IMS-Kit



Limulus-Test

- Pfeilschwanzkrabbe
(*Limulus polyphemus*)
- besitzt als Blutzellen so genannte Amöbozyten
- **Agglutination mit Lipopolysacchariden** der gramnegativen Bakterienzellwand
- Testkits mit Amöbozyten-Lysat (LAL)
- Nachweis gramnegativer Keime
- Nachweis der Rekontamination
- Qualitätskontrolle in Großbetrieben
- Mikrotiterformat, teilautomatisierbar



Molekularbiologische Methoden

- basieren auf den genetisch festgelegten Eigenschaften
- hohe Spezifität
- zumeist spezialisierte Ausrüstung erforderlich

- **DNA-Sequenzierung** → „Automaten“
- **Hybridsondentechnik** → „Schlüssel-Schloss-Prinzip“

- **PCR** {
 - Qualitative
 - Multiplex
 - Quantitative

Arbeitsschritte der molekular- biologischen Techniken

DNA extrahieren

DNA aufreinigen

DNA „schneiden“

Restriktionsenzyme

Agarosegel-
Elektrophorese

DNA detektieren und auftrennen

DNA hybridisieren

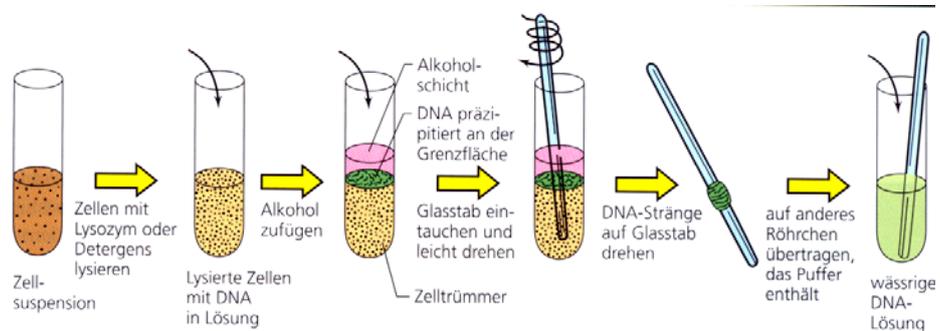
z.B. Filterhybridisations-
techniken

DNA vervielfältigen

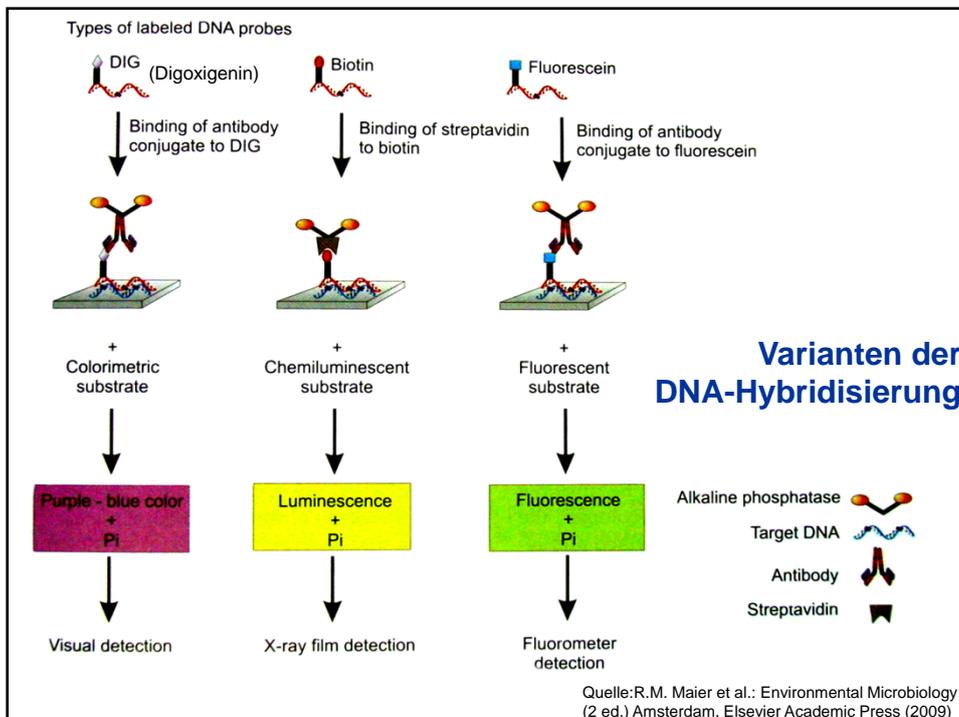
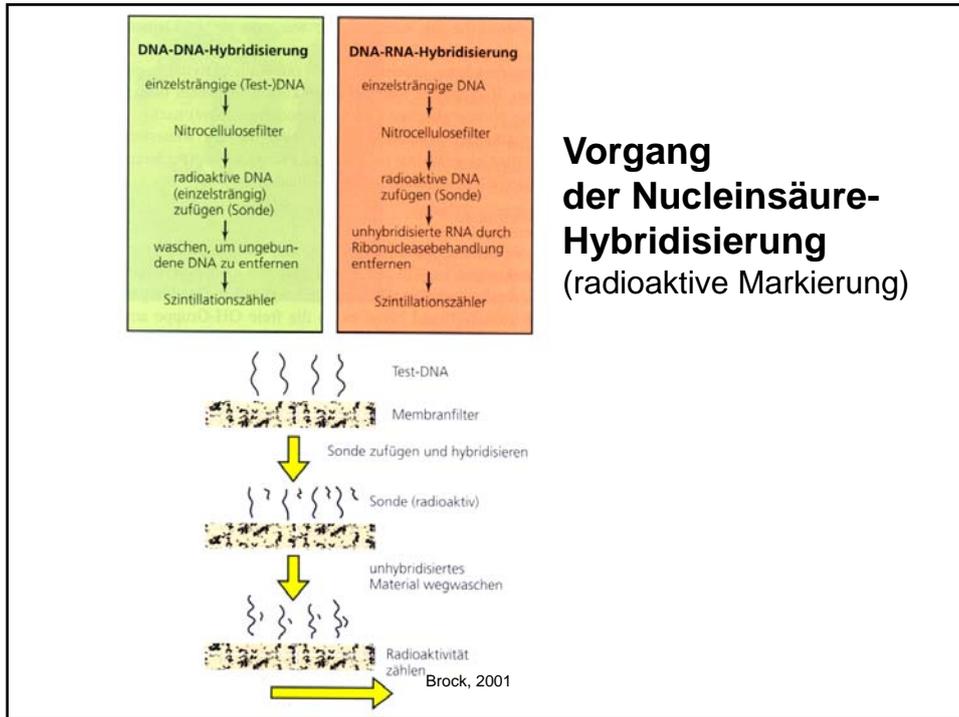
PCR

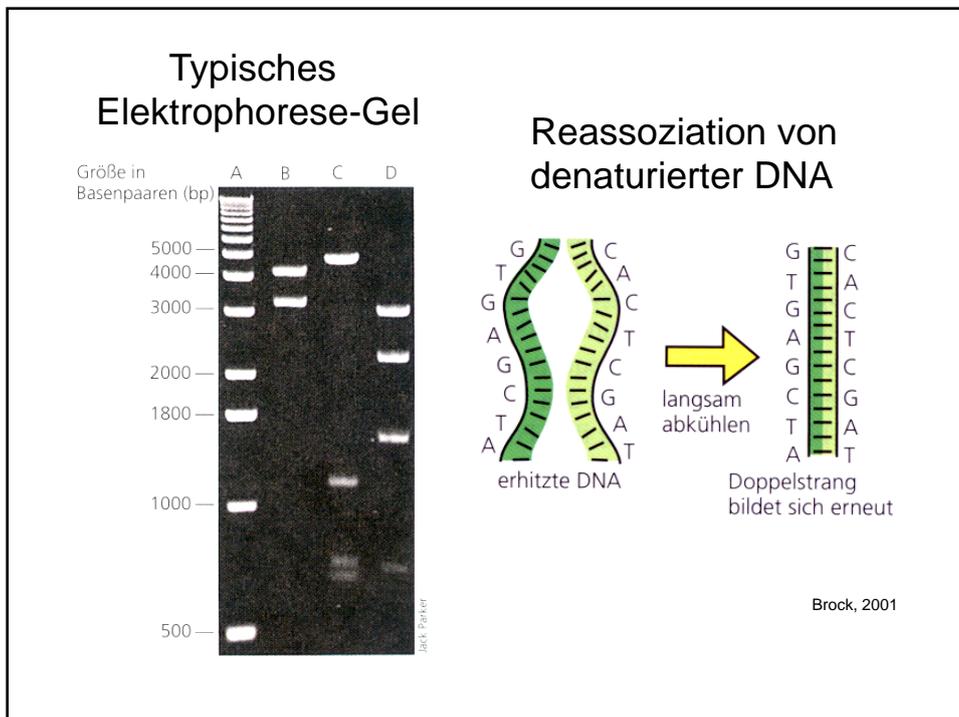
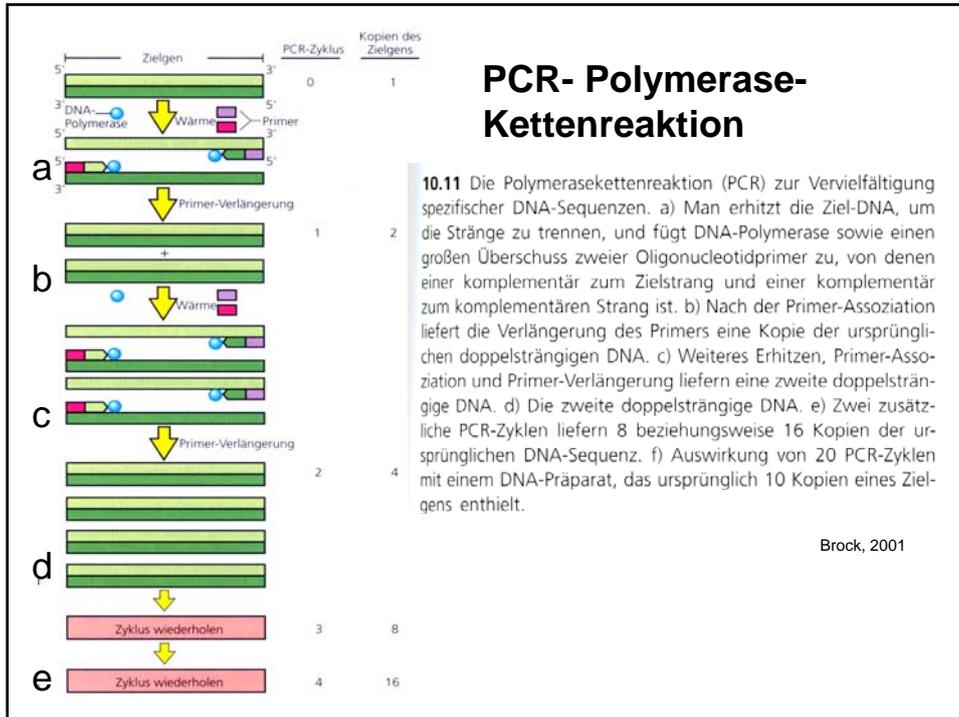
Grundlegende Arbeitstechniken der Molekularbiologie

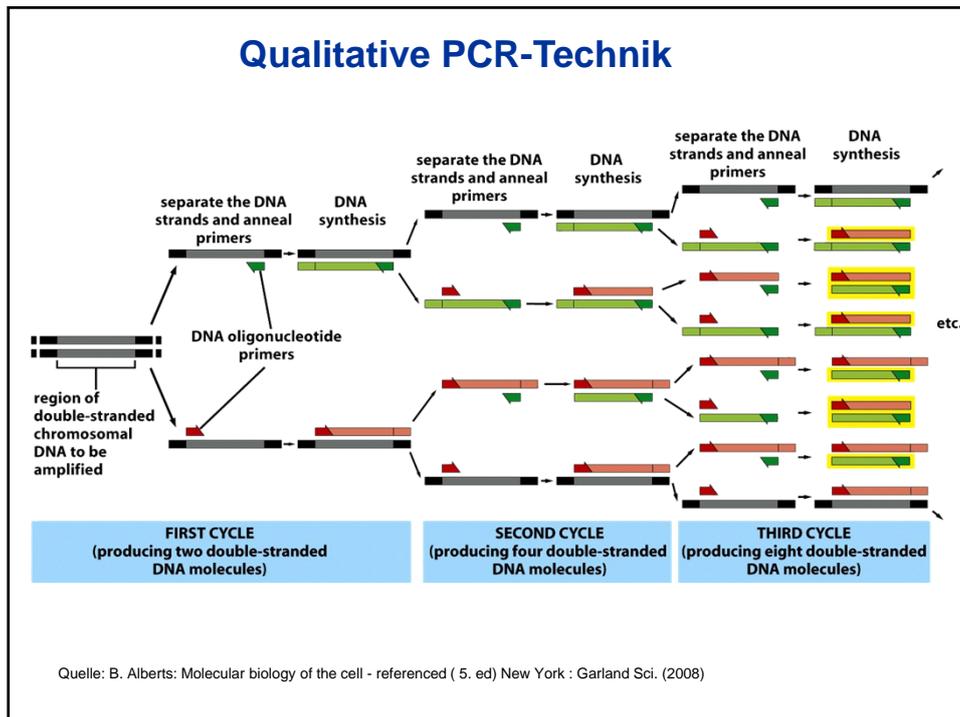
DNA-Extraktion und -Aufreinigung



Brock, 2001



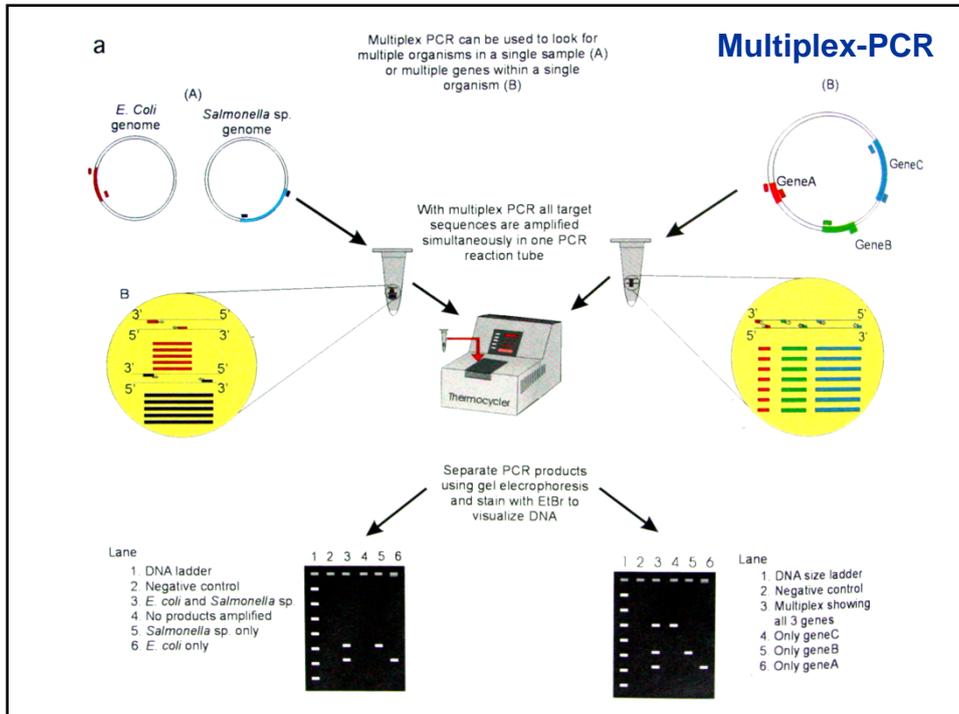






Kary Banks Mullis

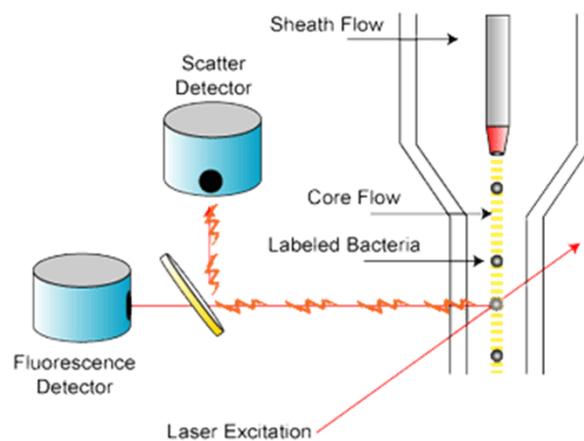
Kary Mullis entwickelte 1983 die Polymerase-Chain-Reaction (PCR) und erhielt 1993 gemeinsam mit Michael Smith den Nobelpreis für Chemie für die Entwicklung von herausragenden Methoden der DNS-Chemie. Die PCR-Methode hat die DNS-Technologien revolutioniert. Kleinste Mengen von DNS-Sequenzen können damit so stark vervielfältigt werden, dass ausreichend DNS-Material für die Analyse verfügbar ist. Damit ist das Screening von genetisch bedingten und infektiösen Krankheiten möglich. Selbst die Analyse der DNS verschiedener Populationen, auch ausgestorbener Arten, ist möglich und erlaubt die Rekonstruktion des phylogenetischen Stammbaumes beispielsweise von Primaten und Menschen.



Analysenautomaten

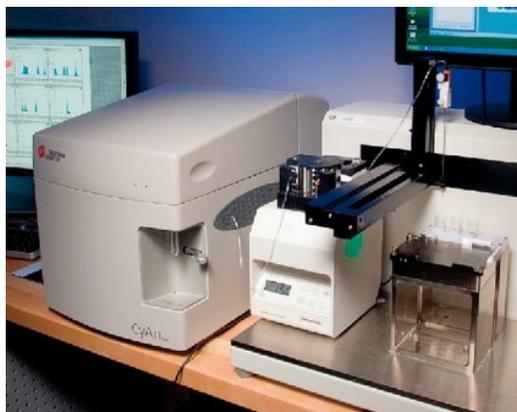
- vorwiegend in großtechnischer Produktion oder in größeren Laboratorien
- Bactoscan (Keimzahl von Rohmilch) ...quantitativ
- Durchfluss-Zytometrie ...quantitativ
- Impedanzmessgeräte ...qualitativ/semiquantitativ
- Bakteriologische Diagnostik (VIDAS, VITEK) ...qualitativ

Prinzip der Durchfluss-Zytometrie



Quelle: <http://missinglink.ucsf.edu/lm/molecularmethods/flow.htm>

Flow-Zytometer-Anlage (Durchflusszytometrie)



Quelle: labo-online.de

11. MIKROBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG VON PRODUKTEN

Kernbereiche

- **Probenahme**
- **Strategien des Keimnachweises
und der Ergebnisbeurteilung**
- **Mikrobiologische Normen**
- **Mikrobiolog. Methoden des Europäischen
Arzneibuches**

Probenahme

Anforderungen:

- repräsentativ
 - zufällig
 - steril bzw. kontaminationsfrei
 - dokumentiert
-
- Masse / Volumen
 - Transportbedingungen

Repräsentanz der Probe(nahme) hängt ab von folgenden Faktoren:

- physikalischer Zustand der Probe (fest, flüssig,.....)
- Größe (Umfang) der Charge
- Größe der Packungen/Behälter
- Größe der Stichprobe
- erforderliche Einwaage
- individuelle Verteilung der Mikroorganismen in der Probe/Charge

Leitsatz

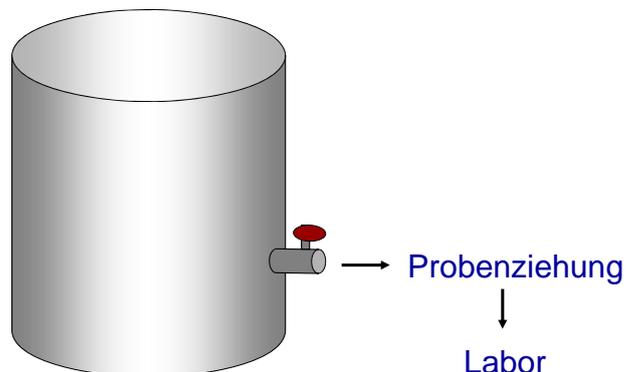
**Je risikoreicher das Produkt -
desto umfangreicher die Stichprobe -
desto strenger die Anforderungen -
desto größer die untersuchte Produkt-
masse (das Produktvolumen)**



Mindestanzahl der zu prüfenden Einheiten
hängt von der Größe der Charge ab !

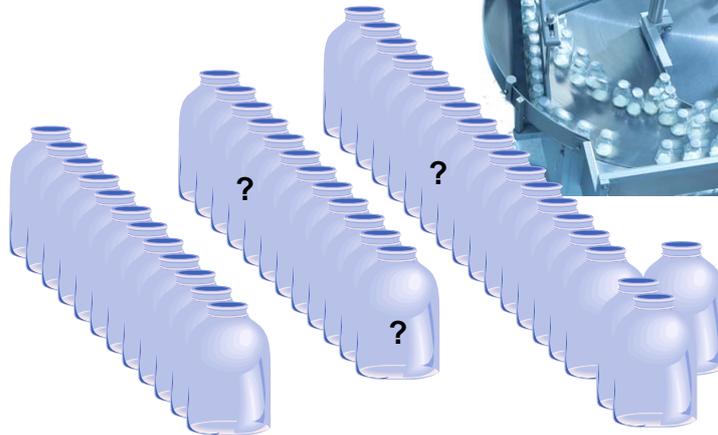
Beispiel:

Probenahme aus einem Vorratstank



Beispiel:

Probenahme aus einer größeren Charge von Fläschchen



Auswahl der Stichproben mittels Zufallszahlentabelle

Zufallszahlen									
81	14	95	49	22	57	12	26	33	73
74	35	42	41	88	6	77	94	79	82
34	63	59	47	90	65	86	32	78	2
38	97	39	96	69	56	31	8	54	80
17	61	5	76	43	93	68	20	72	19
52	3	18	37	92	28	24	40	85	23
70	50	91	99	64	48	4	62	10	16
7	67	9	27	1	21	15	60	83	66
100	29	75	71	51	36	87	84	55	13
98	89	46	44	30	45	58	53	11	25

z.B.: Ziehen von 3 Proben einer Charge aus einer Grundgesamtheit von 50 Proben:

1. Proben durchnummerieren von 1 - 50
2. Zuhilfenahme einer Zufallszahlentabelle
3. Antippen einer Zahl (....43).....gehe in die 4. Spalte, 3. Zeile...47
4. Von dort weitere Proben diagonal auswählen (sofern sie in 1 - 50 vertreten sind)
5. Alternative: PC-Zufallszahlgenerator

Dokumentation der Probenahme - Probenahmeprotokoll

- Beschreibung der Ware
- Chargen-Code
- Ort, Datum, Zeit
- Probenzieher
- Beschreibung der Probenahmemethode
- ggf. sonstige Angaben (Konservierung, Sicherheitshinweise)



Utensilien der Probenahme

- Sterilgefäße (Flaschen, Becher, Säckchen etc.)
- Löffel, Spateln, Messer, Schere, Pinzette
- Ethanol (75 vol %) zum Abflammen
- Lötlampe, Eimer
- Zellstoff
- Kühltasche mit Akkus
- ggf. Transportmedium



**Mikrobiologische Normen
sollen auch exakte Methodenvorschriften
enthalten !**



Probenahmeplan / Prüfplan

**Methodenprotokoll
(„Standards“)**

Prüfpläne



definieren,

- wie viele Proben gezogen werden sollen
- wie die Ergebnisse beurteilt werden sollen
- was als Konsequenz mit der untersuchten Charge passieren soll



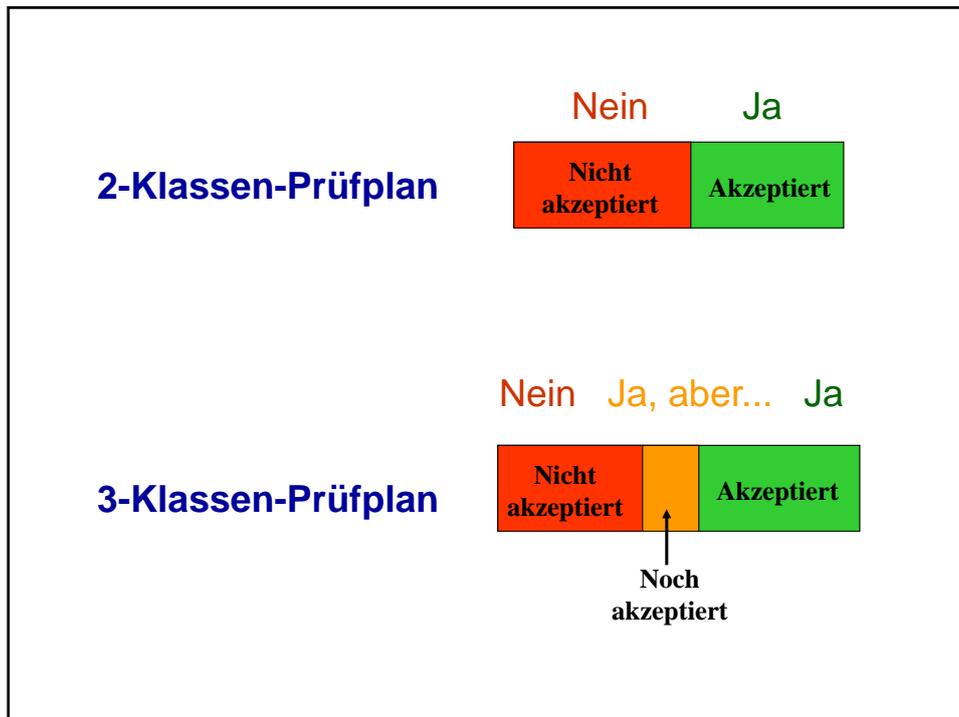
→ **Freigabe**

→ **Sperre**

→ **Korrekturmaßnahmen**



HACCP, GMP



Beispiele

2-Klassen-Prüfplan

Nachweis pathogener Keime
(z.B. in 25 g oder 10 g negativ)

→ Risiko, Sicherheit

3-Klassen-Prüfplan

Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl:

$n = 5$, $m = 10^5$, $c = 2$, $M = 10^6$

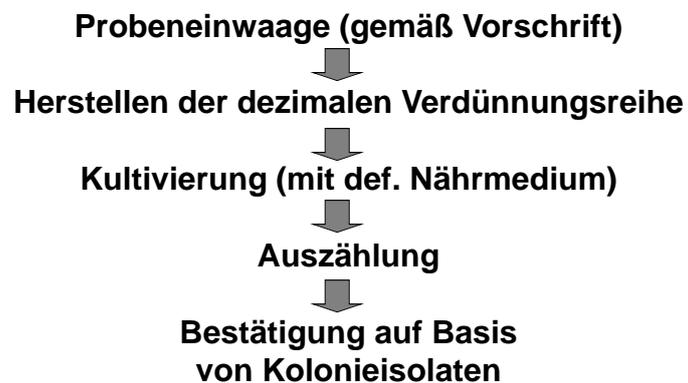
→ Qualität, Haltbarkeit...

Allgemeine Schritte des Nachweises pathogener Keime

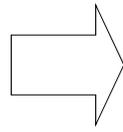
Beispiel: Salmonellen-Nachweis



Allgemeine Schritte der kulturellen Keimzahlbestimmung



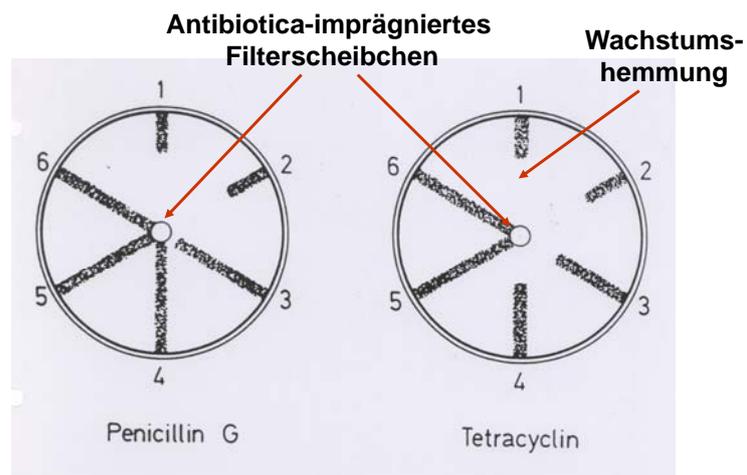
Prüfung hemmwirksamer Substanzen



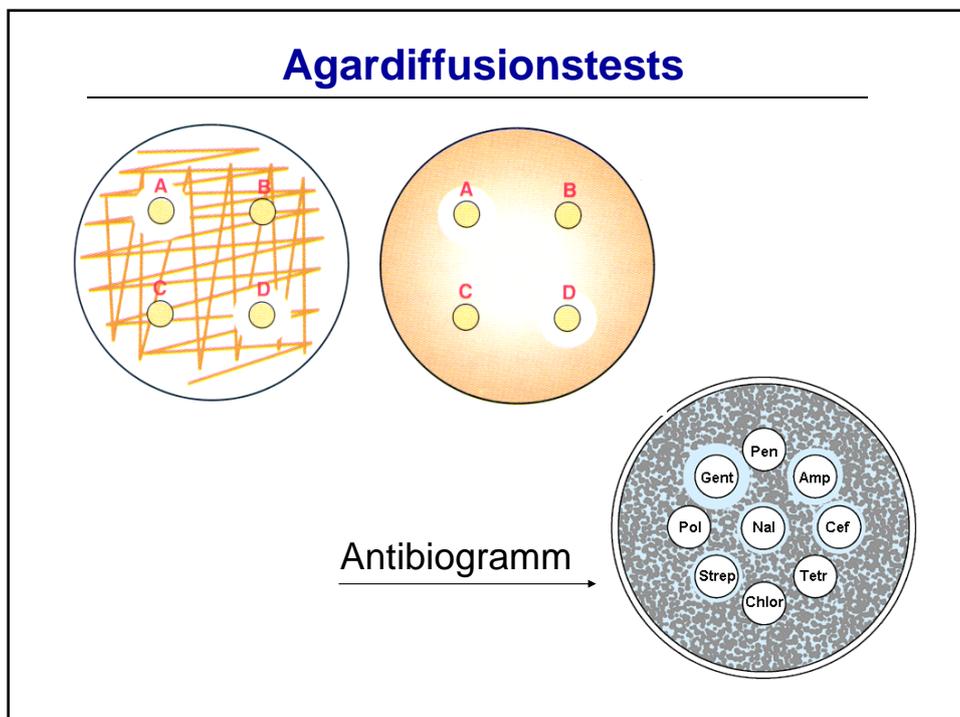
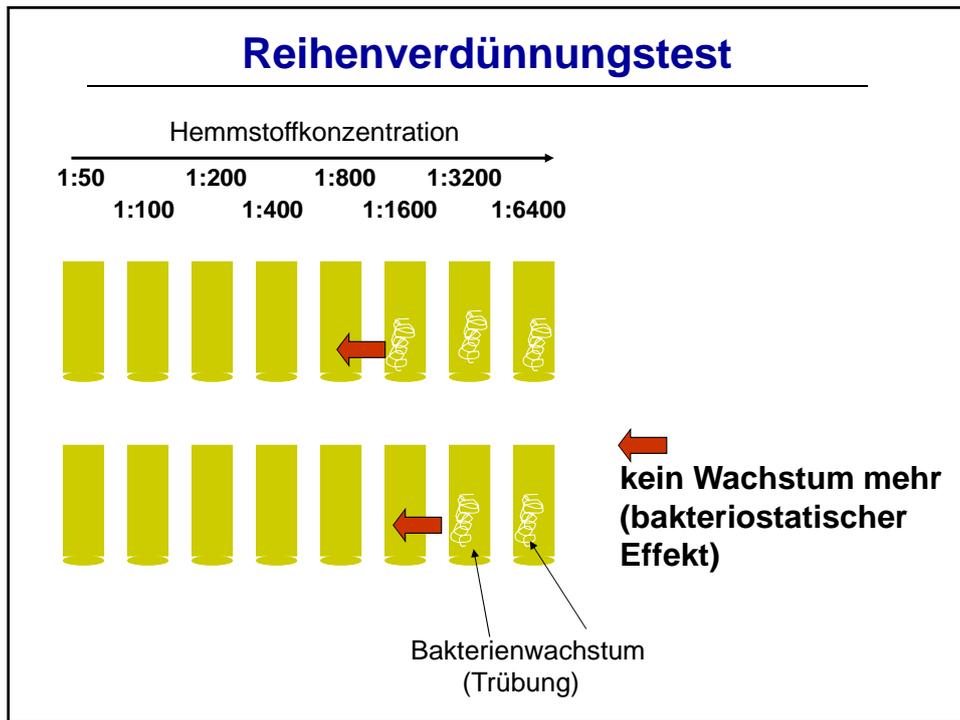
- Antibiotica
- Chemotherapeutica
- (Desinfektionsmittel)

- „Strichtest“
- Reihenverdünnungstest
- Agardiffusionstest
- Mikrotiterplatten-Tests
- Teststreifenmethoden

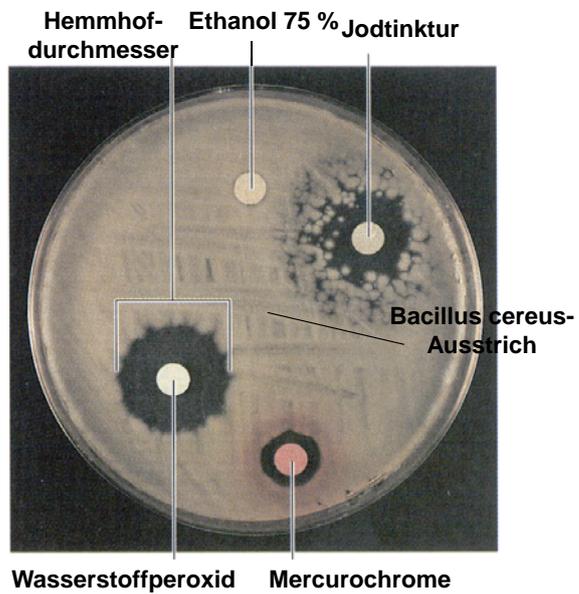
Strichtest



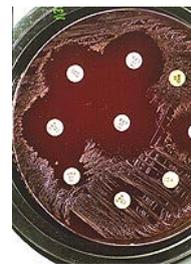
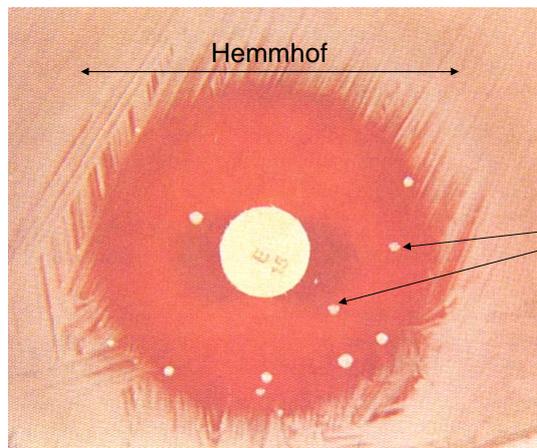
1 - 6.....Bakterien-Teststämme
auf Agarplatten ausgestrichen
und inkubiert



Agardiffusionstest:
Ergebnis nach
Inkubation



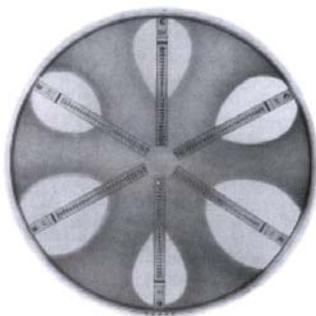
Prüfung von Erythromycin
gegenüber Staph. aureus



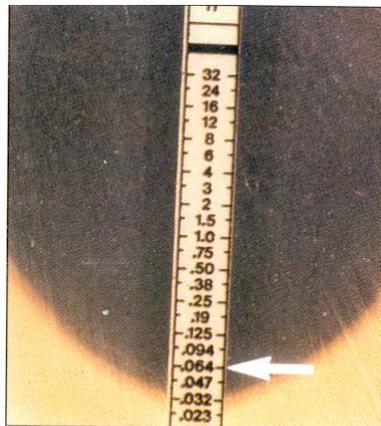
n. Alexander & Streete, 2000

Anwendung des „Etests“ (Konz. Gradienten)

Etest[®]



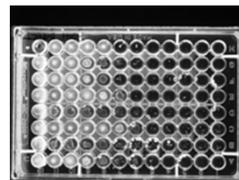
Predefined Gradient for MIC Determinations



Hazy zone edge. Read the MIC at complete inhibition. MIC 0.064 µg/ml.

AB Biodisk, Sweden

Microdilution assay



Beispiel:
VITEK-Antibiotica-
Prüfsystem



Biomérieux, France

Achtung Unterschied !

↪ keine Keimvermehrung

- **Beurteilung eines bakterio-statischen Effekts**

- **Beurteilung eines bakteriziden Effekts**

↪ drastische Keimreduktion

→ fungistatisch
fungizid
virustatisch
viruzid.....

Mikrobiologische Prüfmethode gemäß Europäischem Arzneibuch

Auszug aus 7. Ausgabe

**EUROPÄISCHES
ARZNEIBUCH**

- Prüfung auf Sterilität
- Prüfung auf Mykobakterien
- Prüfung auf Mykoplasmen
- Prüfung auf Pyrogene
- Prüfung auf Bakterien-Endotoxine
- Mikrobiolog. Prüfung nicht steriler Produkte
- Mikrobiologische Kontrolle zellulärer Produkte
- Mikrobiologische Qualität pflanzlicher Arzneimittel zum Einnehmen
- Mikrobiologische Wertbestimmung von Antibiotika

→ **2.6 Methoden der Biologie**
2.7 Biologische Wertbestimmung

Mikrobiologische Prüfmethode gemäß Europäischem Arzneibuch

Auszug aus 7. Ausgabe

**EUROPÄISCHES
ARZNEIBUCH**

- Methoden zur Herstellung steriler Zubereitungen
- Bioindikatoren zur Überprüfung von Sterilisationsmethoden
- Prüfung auf ausreichende Konservierung
- Mikrobiolog. Qualität von nicht sterilen pharm. Zubereitungen und Substanzen zur pharm. Verwendung
- Anwendung der F_0 -Konzepts auf die Dampfsterilisation von wässrigen Zubereitungen
- Alternative Methoden zur Kontrolle der mikrobiologischen Qualität
- Virussicherheit
- Mikrobiologische Qualität pflanzl. Arzneimittel zum Einnehmen
- Hinweise zur Anwendung der Prüfung auf Sterilität
- Empfehlungen zur Durchführung der Prüfung auf Bakterien-Endotoxine



**5.1 Allgemeine Texte zur Sterilität
und mikrobiolog. Qualität**

Prüfung auf Sterilität

**EUROPÄISCHES
ARZNEIBUCH**

Kapitel 5.1.1

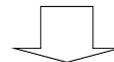
Methoden zur Sterilisation:

- Dampfsterilisation
 - Strahlensterilisation
 - Entkeimungsfiltration
- bzw. Herstellung unter asept. Bedingungen

z.B.: SAL = 10^{-6}

→ 1 unsterile Einheit
unter 1 Mio. Einheiten

Begriff „Sterilitätssicherheit“
**Sterility Assurance Level
(SAL)**



**Wahrscheinlichkeit, mit der eine
Sterilisationsmethode eine best.
Menge von Zubereitungen in sterile
überführt**

bzw.

**die Wahrscheinlichkeit, unter einer
bestimmten Menge von Zubereitungen
eine nichtsterile Einheit zu finden**

Prüfung auf Sterilität	EUROPÄISCHES ARZNEIBUCH
Medien: Thioglycolat-Medium Sojapepton-Caseinpepton-Medium	
Validierung: Test mit spezifizierten Testkeimen (S. aureus, Ps. aeruginosa etc.) → 10 - 100 KBE	
Methode: - Membranfilter-Methode - Direktbeschickungsmethode	

Prüfung auf Sterilität	EUROPÄISCHES ARZNEIBUCH
Kapitel 5	
Membranfilter- Methode	Filtrierbare, wässrige Lösungen, ölige Zubereitungen oder Produkte, die in öligen Lösungsmitteln löslich bzw. damit mischbar sind; Lösungsmittel dürfen keine anti- mikrobielle Wirkung besitzen *)
Direktbeschickungs- Methode	Direkte Übertragung der zu prüfenden Zubereitung in das Medium, maximaler Anteil der Prüfsubstanz im Medium: 10 Vol.%; ggf. Inaktivierung antimikrobieller Komponenten
*) Verdünnungslösung: steriles, neutrales Peptonwasser	

Prüfung auf Freiheit von Endotoxinen

**EUROPÄISCHES
ARZNEIBUCH**

→ **Pyrogenfreiheit** (Kaninchentest)

- **Limulus-Amöbozytenlysat-Test**
- **6 Methoden zur Wahl:**
 - Gelbildungstest - Grenzwertprüfung
 - Gelbildungstest - Halbquantitative Methode
 - Turbidimetrisch-kinetische Methode
 - Kinetische Methode mit chromogenem Peptid
 - Endpunktmethode mit chromogenem Peptid
 - Turbidimetrische Endpunktmethode

Endotoxin-Stammlösung mit def. Endotoxin-Einheiten
alle Geräte müssen pyrogenfrei sein (...250 °C/ 30 min)

Prüfung auf ausreichende Konservierung

**EUROPÄISCHES
ARZNEIBUCH**

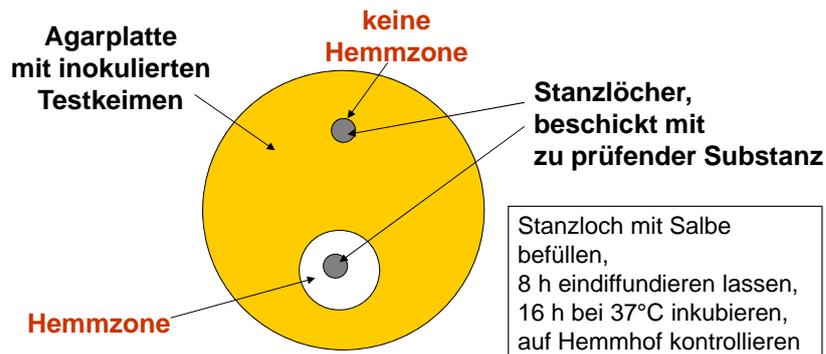
Kapitel 5.1.3

- Prüfung, ob Mikroorganismen in der Zubereitung wachsen können bzw. nach Zugabe nachweisbar sind
- Testorganismen: Ps. aeruginosa
S. aureus
Candida albicans
Aspergillus niger
→ vorzüchten,
- „Kontaminationssuspension“ mit ca. 10^8 KbE/ml bereiten
- Probe inokulieren (Ziel: 10^5 bis 10^6 je ml bzw. g)
- Lagertest bei 20-25 °C, laufend KZ-Bestimmungen

Prüfung auf ausreichende Konservierung

**EUROPÄISCHES
ARZNEIBUCH**

Untersuchung von Salben und Cremes nach dem Agarplatten-Lochtestest:



Mikrobiolog. Wertbestimmung von Antibiotica

**EUROPÄISCHES
ARZNEIBUCH**

→ Kapitel 2.7.2

- Vergleich der Wachstumshemmung empfindlicher Mikroorganismen durch bestimmte Konzentrationen von Antibiotica
- 2 Methoden:
 - Diffusionsmethode (...Hemmhof)
 - Turbidimetrische Methode (Trübung/keine Tr.)
- definierte Testmikroorganismen
- definierte Vorzuchtbedingungen
- definierte Lösungen für Antibiotika

Prüfung nicht steriler Produkte

**EUROPÄISCHES
ARZNEIBUCH**

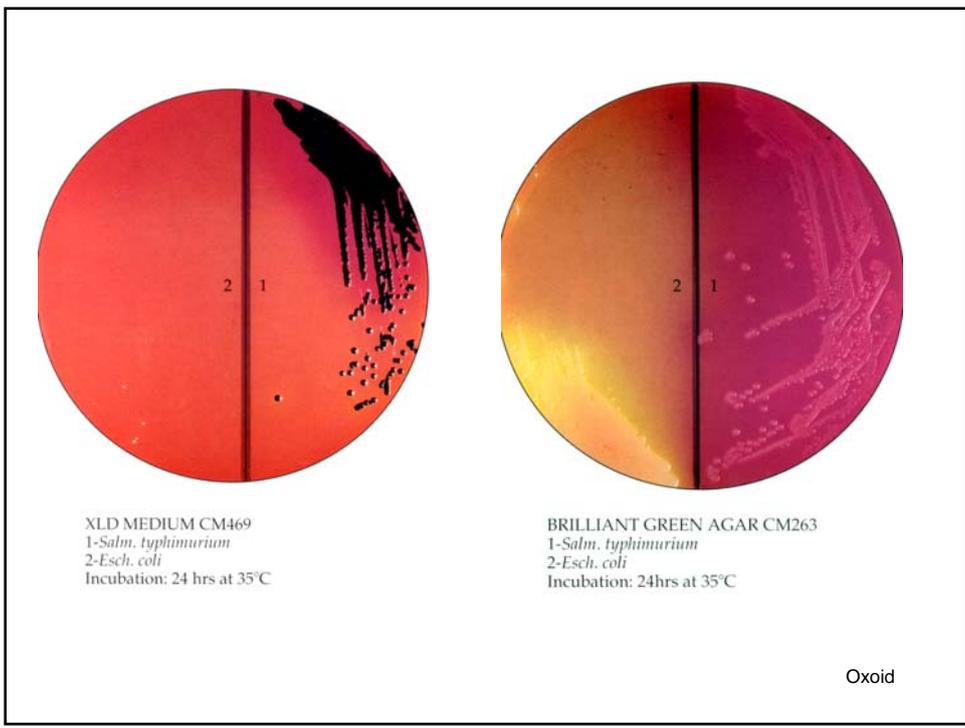
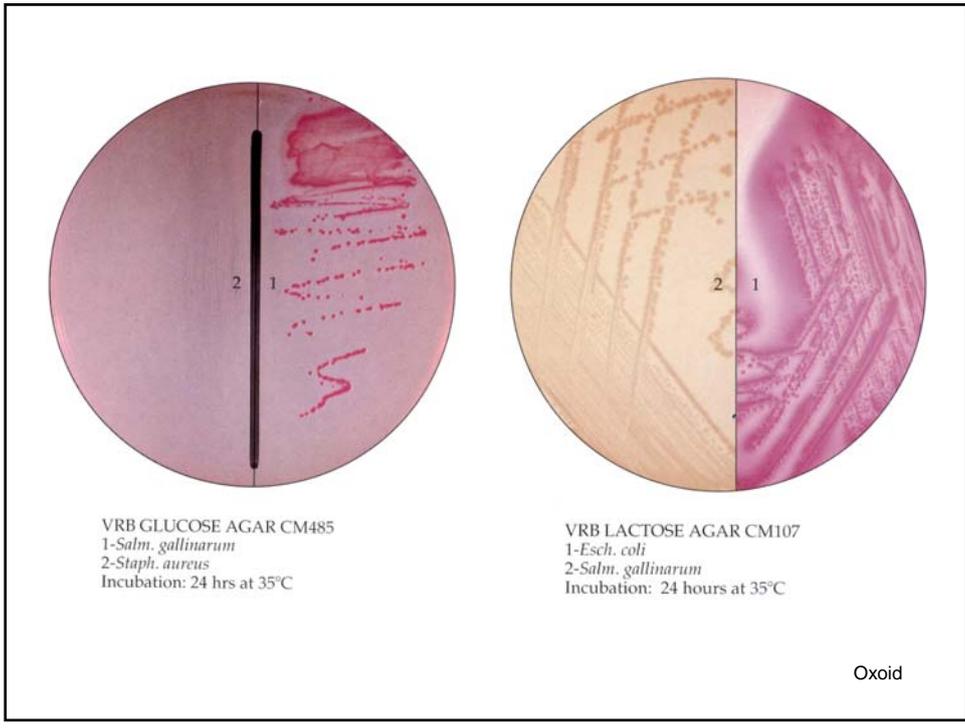
- Kulturelle Keimzahlbestimmungsmethoden
- Probenahmeplan-konforme Vorgangsweise
- üblicherweise 10 g bzw. 10 ml Produkt
- ggf. Zusatz von Polysorbat als Suspensionshilfe
- Hautpflaster: Abschwemmsuspension herstellen
- Methodik:
 - Membranfiltration
 - Gussplattenmethode
 - Ausstrichmethode
 - MPN-Verfahren
- Validierung der Nährmedien (chargenweise) mit Testkeimen

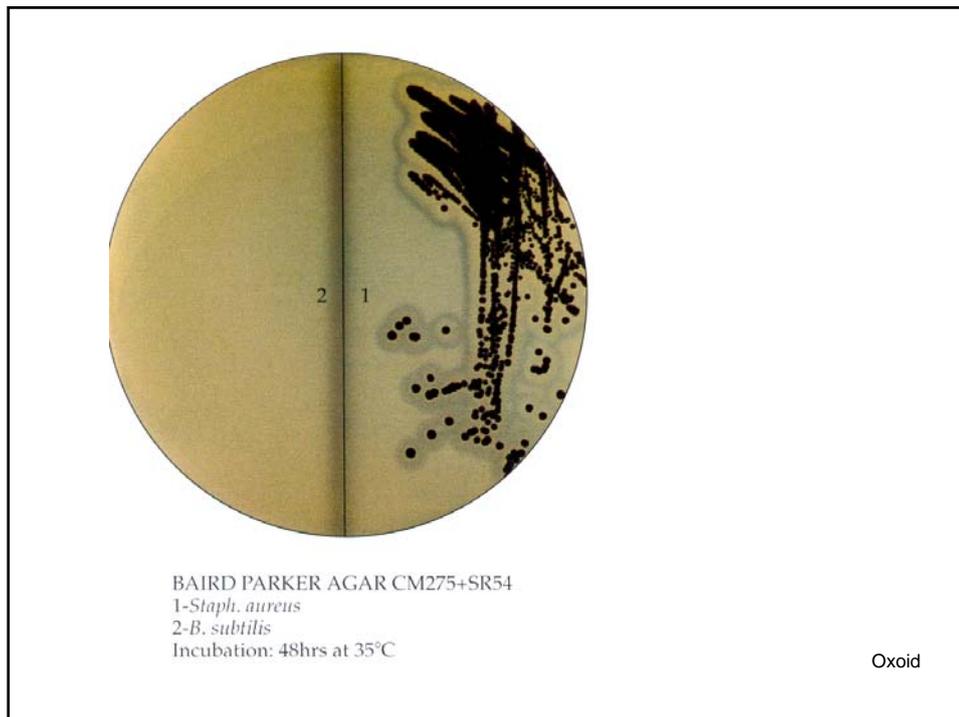
Prüfung nicht steriler Produkte

**EUROPÄISCHES
ARZNEIBUCH**

Nachweis spezieller Mikroorganismen(gruppen)

Enterobakterien	→	Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Dextrose-Agar, aerob
E.coli	→	McConkey-Agar, aerob
Salmonellen	→	Tetrathionat-B. Anreicherung, danach Desoxycholat-A., XLD-A., BPR-A., aerob
Pseudomonas aeruginosa	→	Cetrimid-Agar, aerob
Staphylococcus aureus	→	Baird-Parker-A., aerob
Clostridien	→	Columbia-Gentamicin-A. anaerob





Prüfung nicht steriler Produkte

**EUROPÄISCHES
ARZNEIBUCH**

Weitere Nachweis-/Kultivierungsmedien

- Sabouraud-Agar m. Chloramphenicol
(Hefen-Schimmelpilze)
- Anreicherungsmedium nach Mossel
(Enterobakterien)
- Clostridien-Anreicherungsbouillon

Prüfung pharmazeutischer Zubereitungen

**EUROPÄISCHES
ARZNEIBUCH**

Kapitel 5.1.4

- Gemäß Harmonisierung der Arzneibücher
- Akzeptanzkriterien für die mikrobiologische Qualität nicht steriler Darreichungsformen
- Tabellarische Übersicht

Methodenvalidierung

**EUROPÄISCHES
ARZNEIBUCH**

Kapitel 5.1.6, Punkt 3

- **Richtigkeit und Präzision** → Übereinstimmung des Messergebnisses mit dem wahren oder als wahr anerkannten Wert
- **Spezifität** → Fähigkeit der Methode, das erwartete Spektrum an Keimen nachzuweisen
- **Nachweisgrenze** → Niedrigste Anzahl an Keimen, die unter den gegebenen experimentellen Bedingungen nachgewiesen werden kann
- **Robustheit** → Maß für das Vermögen einer Methode, von kleineren Veränderungen der Parameter unbeeinflusst zu bleiben (...Zuverlässigkeit)

12. GRUNDLAGEN DER HYGIENE

Hygiene

Definition:

**Lehre von der Gesunderhaltung
des Menschen und seiner Umwelt**



Verschiedene Sub-Kategorien:

- Umwelthygiene
- Sozialhygiene
- Psychohygiene
-
- Anlagenhygiene
- Betriebshygiene
- Lebensmittelhygiene
-

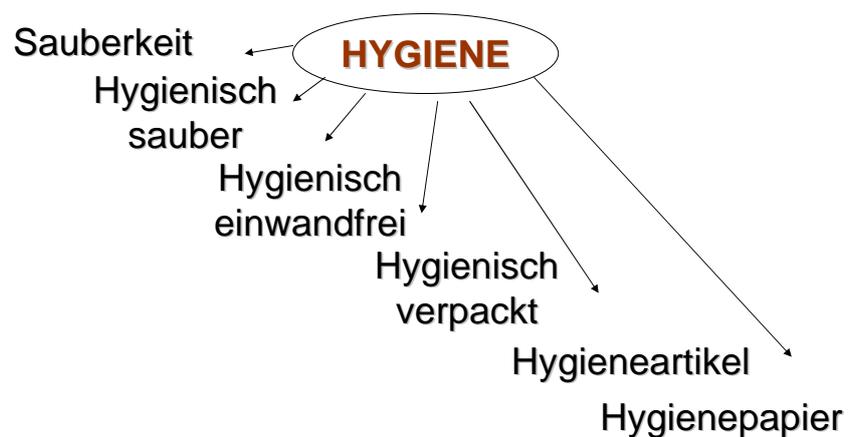
Hygieia: griech. Göttin der Gesundheit,
Tochter des Asklepios (Gott der Heilkunde)

Gärtner (1969):

„Hygiene ist die vorbeugende Arbeit für die Gesunderhaltung der einzelnen Menschen und Völker“



Begriffe, die im Zusammenhang mit „Hygiene“ verwendet werden



Geschichtliches:

- Altes Testament
- Talmud
- Koran

Pioniere im 19. Jhdt.:

Robert Koch
Louis Pasteur
Max v. Pettenkofer

.

.

Medizin/Gesundheit

Lebensmittel

Karl der Große (795 n.Chr.):



„Capitulare de villis et curtis imperialibus“ (Rechtsbuch)

Alles, was mit Händen verarbeitet und zubereitet wird wie Speck, Rauchfleisch, Sülze, Wein, Essig, Brombeerwein, Würzwein, Most, Senf, Käse, Butter, Malz, Malzbier, Met, Honig, Wachs, Mehl sollen mit größter Sauberkeit hergestellt werden.....
Niemand soll sich unterstehen, die Trauben etwa mit den Füßen zu keltern.....“

Reichs-Gesetzblatt.

Jahrgang 1912.

Nr. 19.

Inhalt: Berechnung, betreffend das Inkrafttreten des Viehschutzgesetzes vom 26. Juni 1909. S. 222. —
Verordnung, betreffend Wahlkreisbestimmungen zum Zweck der Befähigung von
Zuchtschweinen. S. 226. — Erlaubliche Verordnung, betreffend den Schutz von Schweinen, Mastpferden
und Mastschweinen auf der Viehschau in Leipzig 1912 für Deutschland, Österreich und Ungarn.
S. 231. — Verordnung. S. 231.

(Nr. 4047.) Berechnung, betreffend das Inkrafttreten des Viehschutzgesetzes vom 26. Juni 1909. Vom 29. März 1912.

Wir Wilhelm, von Gottes Gnaden Deutscher Kaiser, König von Preußen etc.

verordnen auf Grund des § 82 des Viehschutzgesetzes vom 26. Juni 1909 (Reichs-Gesetzbl. S. 519) im Namen des Reichs nach erfolgter Zustimmung des Bundesrats, was folgt:

Das Viehschutzgesetz vom 26. Juni 1909 (Reichs-Gesetzbl. S. 519) tritt am 1. Mai 1912 in Kraft.

Urkundlich unter Unserer Höchsteigenhändigen Unterschrift und beigedrucktem Kaiserlichen Insigne.

Gegeben St. Petersburg, den 29. März 1912.

(L. S.)

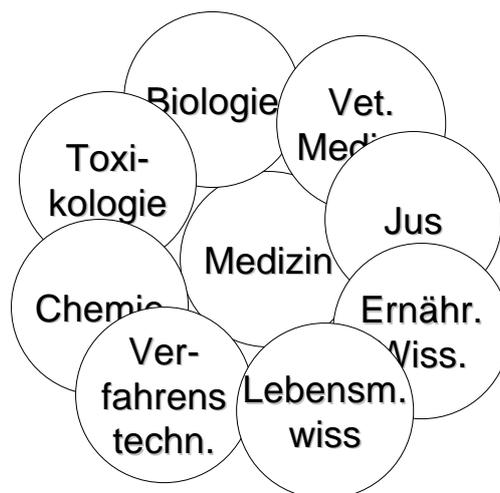
Wilhelm.
Deiters.

Reichs-Gesetzbl. 1912.

Herausgegeben zu Berlin den 6. April 1912.

42

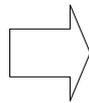
Interdisziplinäre Berührungspunkte im Bereich „Hygiene“



Hygiene aus pharmazeutischer Sicht

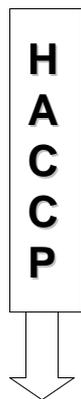
Angewandte Wissenschaft, die dazu dient,

1. eine nachteilige Beeinflussung aller pharmazeutischen Produkte zu verhindern
2. eine nachteilige Beeinflussung der Gesundheit der die pharmazeutischen Produkte nützenden Individuen zu verhindern



präventives und operatives Konzept

Pharmazeutisch relevante Teilbereiche der Hygiene



- Rohstoffhygiene
- Anlagen- und Produktionshygiene
- Produkthygiene
- Personalhygiene
- Umwelthygiene

INTERN



EXTERN

Das strategische Konzept



HACCP – Geschichtlicher Hintergrund

Lebensmittel: sichere Lebensmittel für den Verbraucher (i.d.R. gesund, aber auch fallweise exponierte Gruppen)

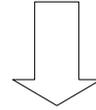
Arzneimittel: sichere pharm. Produkte für den Verbraucher (i.d.R. gesundheitlich beeinträchtigt)



GMP

Nichts darf dem Zufall überlassen werden

- Prozessparameter
- Rezepturen
- Hygieneregeln
- Umfeld
- Dokumentation
- .
- .



- Sorgfaltspflicht
- Sauberkeit
- bewährte u. anerkannte Verfahren
- „Stand der Technik“
- Qualitätsbewusstsein

Der strategische Ansatz

- **Prozess- und Risikoanalyse des gesamten Herstellungsprozesses**
- **Erkennen und Festlegen der kritischen Kontroll- (=Lenkungs-) Punkte (CCP´s)**
- **Festlegung kritischer Limits**
- **Etablierung eines Monitoring-Systems**
- **Definition von Korrekturmaßnahmen**
- **Dokumentation**
- **Überprüfung (des Konzepts)**

→ regelmäßige Überprüfung des Ist-Soll-Zustandes, laufende Schulungen

Der strategische Ansatz

**Gefahrenanalyse
Hazard Analysis**



Zusammensetzung
Herstellungsart
Herkunft
Mögliche Risiken u. Schäden
Woher, womit, wodurch???

**Definition der
CCPs**



Wo und wie kann ich
eventuelle Gefahren
beherrschen ?

...**“Gefahrenbeherrschungspunkt“**

Gefährdungspotenziale

Biologische

Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten

(Mikro)biolog. Kontrollanalysen,
Pyrogenfreiheit

Physikalische

Staub, Splitter, Fremdkörper

Einsatz von Detektoren

Chemische

Rückstände, Toxine,
falsche Konzentrationen

Chem. Kontrollanalysen,
Rückstandsanalytik

Kritische Kontrollpunkte



Nur quantifizierte Gefahren können beherrscht werden!

„normale“ Erwachsene
Senioren, Kinder, **Kranke**,...



**Ausgangspunkt/
-situation**



GEFAHR



PERSON

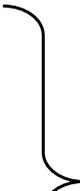
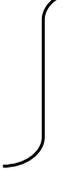
- Person aus einer Risikogruppe
- Produktdosierung
- Dosis-Wirkungs-Beziehung („dose response effects“)
- Wirkung von Gefahren
- Individuelle Gegebenheiten
- Produkt-Nebenwirkungen



Metalldetektoren



Rohstoffhygiene

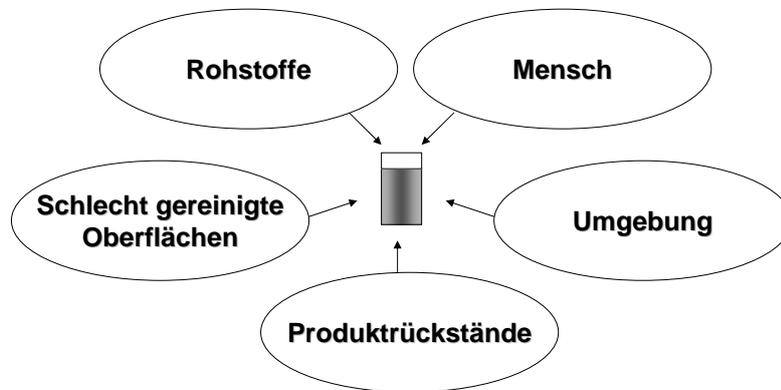
- Mikrobiologische
 - Biologische
 - Physikalische
 - Chemische
- 
- Qualität
- Standard-konforme
 - Richtwert-konforme
 - Spezifikations-konforme
- 

Anlagen- und Produktionshygiene

Kriterien:

- Mikrobielle Kontamination
- Anlagenmonitoring
- Mikrobielle Ökologie
- Hygienesdesign
- Reinigung
- Sanitation und Sterilisation

Mikrobielle Kontamination



- regelmäßige Kontrollen
- schnelle Methoden mit indikativem Aussagewert
- Vermeidung von Pannen
- effiziente Reinigung und Desinfektion

Anlagenmonitoring

dient zur

- Erkennung von Schwachstellen
- Überprüfung einer ordnungsgemäß durchgeführten Reinigung und Desinfektion
- Gewährleistung eines reibungslosen Produktionsablaufs
- Sicherung der Produktqualität
- Dokumentation

Anlagenmonitoring

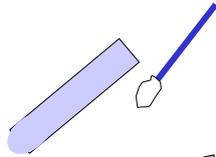
- **Besichtigung**
 - **Bauliche Aspekte**
 - **„eingebaute“ Fehlerquellen**

- **Mikrobiologische Überprüfung**

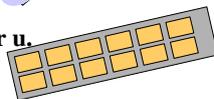
- **Oberflächenkeimbelastung**
- **Raumlufthbelastung**
- **Aufspüren von Nischen**
- **Überprüfung der Tanksterilität**
- **Überprüfung von Rohrleitungen**

Oberflächenkeimbelastung

- Swab-Tests



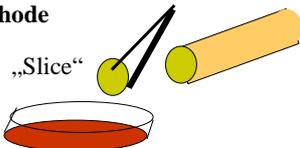
- **Oberflächentester u. Contact Slides**



- **Klebestreifen-Methode**



- **Agar-„Wurstscheiben“-methode**



- **ATP-Biolumineszenz-Methode**

RODAC-Platten

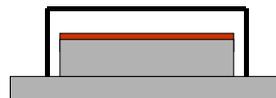
R eplicate

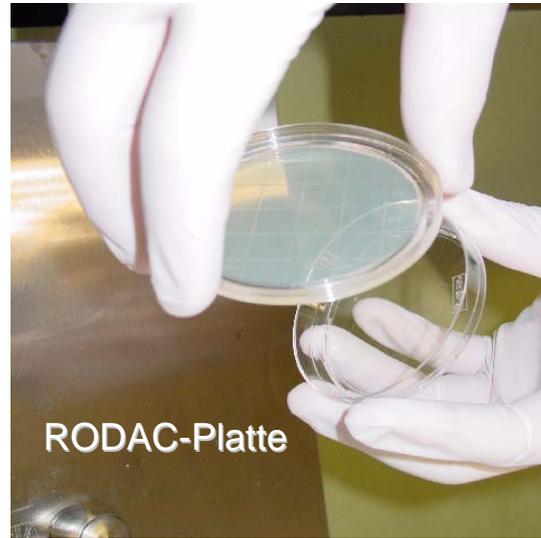
O rganism

D etection

A nd

C ounting







Inkubierte RODAC-Platten



Keimbelastung der Luft

- von Interesse im Produktions- und Abfüll-/Abpackbereich
- Laborbereich (.....Laminar Flow-Effektivitätsprüfung)
- vorwiegend Sporen (Endo-, Konidio-, Sporangiosporen)
- Staub als „Transportvektor“
- Messung mit Luftkeimzahl-Messgeräten
- Alternative: „Luftplatten“







**Beispiel: überwachsene
Luftkeimzahlplatte**

⇒ Aufspüren von Nischen

- Rohrleitungen (....Sumpfbildung,
„tote Leitungsabschnitte“)
- Ventile
- Fittings
- Dichtungen

- Kondenswasser
- Zugluft
- Manueller Kontakt
- Mangelnde Personalschulung

Überprüfung der Tanksterilität Untersuchung von Rohrleitungen

- Spülwasserproben (v.a. letzte Spülflüssigkeit)
- Untersuchung d. Oberflächenkeimbelastung (RODAC-Pl., ATP-Biolumineszenz etc.)
- Anlagen-Stufenkontrolle
- Placebo-Produktion mit anschl. Analyse



Hygienedesign:

Anlage soll so konzipiert sein, dass

1. keine Hygieneprobleme entstehen
2. die Hygienesituation gut überprüfbar ist
3. Die Anlage gut zur reinigen und desinfizieren ist

Produkthygiene

Kriterien und Kontrollen gemäß:

- Arzneibuch
- Spezifikation (...Handelsvereinbarungen)
- Gesetzlichen Vorgaben
- GMP

Personalhygiene



- Gesundheitskontrolle
- Allg. Sauberkeit
- Händereinigung u. -desinfektion
- Handschuhe und Schutzkleidung
- Haarschutz
- Schmuckverbot
- Problematik von Kosmetika
- Sanitäre Anlagen
- Speisebereich / Sozialbereich
- Personalschulung und -weiterbildung
- Mitarbeitermotivation

Keimzahlen am/im Menschen

Ohrenschmalz: 10^9 Keime/g

Nasensekret: 10^3 - 10^4 Keime/ml

Kopfhaut: 10^6 Keime/cm²

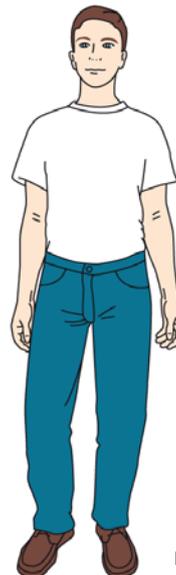
Speichel: 10^9 - 10^{10} Keime/ml

Achselhöhle: 10^6 - 10^7 Keime/cm²

Unterarm: 10^2 - 10^3 Keime/cm²

Handflächen: 10^2 - 10^3 Keime/cm²

Stuhl: 10^{11} Keime/g



Keweloh, 2006

**Inkubierte Petrischale
mit Fingerabdrücken**



Quelle: Behrs, 2000

**Inkubierte Petrischale
mit Abklatsch von Fingerringen**



Quelle: Behrs, 2000

Inkubierte Petrischale
mit Abklatsch von Haarbüscheln



Quelle: Behrs, 2000

Beispiel: Händereinigung

- Mikroflora der Hand
 - **Transiente Flora**
 - **Residente Flora**
- Technik des Händewaschens | **mind. 30 sec., bis zum Handgelenk, abtrocknen**
- Konzeption des Waschbeckens und der Armaturen | **Berührungslose Wasserhähne**
- Händetrocknungsvorgang | **Problem: Gemeinschafts-Handtuch, Heißlufttrockner**

Keimzahlreduktion durch Händewaschen und Händedesinfektion

1. Seifenwäsche: 1 min. waschen

⇒ **2 log-Einheiten (- 99%)**

2. Trocknen (**wichtig**)

3. Desinfektion (alkohol. Desinfektions-
mittel)

⇒ **weitere 2 log-Einheiten (- 99,99%)**

Umwelthygiene

- Entsorgungsproblematik

Abwasser

Boden

Luft

- Strahlung

- Lärm

- Stress

- Psychosoziale Faktoren



direkt und indirekt
involviert

13. REINIGUNG UND DESINFEKTION



Funktion der Reinigung

- Erfüllung ästhetischer Ansprüche
- Wiederherstellung der vollen Funktionsfähigkeit von Anlagen und Geräten
- Verlängerung der Lebensdauer von Anlagen und Geräten
- Erzielung und Sicherung optimaler Produktqualität sowie -standards

Funktion der Desinfektion

- Schutz des Verbrauchers vor Gesundheits-gefährdung
- Sicherung der Produkte vor mikrobiellem Verderb und einer hygienischen Beeinträchtigung
- Sicherstellung der vollen Funktion sowie Nutzbarkeit von Anlagen und Geräten
- Sicherstellung aseptischer Arbeitsbedingungen im medizinischen Bereich



"Wait, this one's a lawyer. We'd better wash our hands."

Definitionen

Reinigen

(Möglichst vollständiges) Abtrennen unerwünschter Substanzen, vor allem von Oberflächen und Geräten

Waschen/Spülen

Entfernen unerwünschter Substanzen mit Wasser

Desinfektion - Sterilisation - Sanitation

DESINFEKTION: Beseitigung von potenziell pathogenen Keimen

STERILISATION: Abtötung bzw. Beseitigung aller Keime einschl. ihrer Ruhestadien

SANITATION: Reduktion der Gesamtzahl an Mikroorganismen

Welche Methoden kommen bei der R & D zum Einsatz ?

- | | |
|----------------------|---|
| Physikalische | <ul style="list-style-type: none">- Erhitzen (mit/ohne Dampf)- Bestrahlung |
| Chemische | <ul style="list-style-type: none">- Reinigungs- u. Desinfektionsmittel- Begasung- Ozonisierung |
| Mechanische | <ul style="list-style-type: none">- Filtration- Abbürsten- Hochdrucksprühbehandlung- (Sedimentation) |

Einflussfaktoren auf den Reinigungseffekt

- Wasserqualität (Mikrobiologie, Härte, Rückstände)
- Effizienz und Wirkungsspektrum des Reinigungsmittels
- Wirkkonzentration des eingesetzten Mittels
- Schmutzart, -menge, -zustand (trocken etc.)
- Oberflächenbeschaffenheit (glatt, rau)
- Reinigungsmethode (maschinell, automatisch, manuell)
- Physikalische Bedingungen (Temp., Einwirkzeit, mechanischer Aufwand)

Schmutzart und Reinigungseffekt

FETT	→	Verseifen, emulgieren, schmelzen (Alkali, Tenside, Temp.)
PROTEIN	→	Dispergieren, quellen, denaturieren (Säure, Alkali)
ZUCKER	→	Lösen, quellen, abspülen (Temp., Säure)
SALZE / ANORGAN. SUBST.	→	Lösen, abspülen (Temp., Säure)

Kategorien von Reinigungsmitteln

Alkalische RM	NaOH, Na-ortho- bzw. meta-Silikate, Soda
Saure RM	Phosphorsäure, Salpetersäure
Komplexbildner	Na-Diphosphat, Nitrilotriessigsäure, Citronensäure
Tenside	Amphiphile Substanzen, grenzflächenaktive Stoffe

Kategorien von Desinfektionsmitteln

Halogene u. -verbindungen	Chlor, ClO ₂ , Aktivchlorverbindungen, Jod, Jodophore, Brom, Fluor	} oxidierend
Sauerstoff- abspaltende Oxidationsmittel	Wasserstoffperoxid, KMnO ₄ , organ. Perchlorsäuren, anorgan. Persäuren	
Aldehyde	Formaldehyd bzw. FA in Kombination mit anderen Desinfektionsmitteln	
Alkohole	Ethanol, Propanol, Isopropanol	
Oberflächenaktive Substanzen	QAVs	
Guanidine	Iminoharnstoffderivate	
Andere	Phenolische DM, Halogen-carbonsäuren, Schwermetallverbindungen, Laugen, Säuren, Kombinierte R+DM	

Wirkungsspektrum von Desinfektionsmitteln

KEIMSPEKTRUM	HALOGENE	PEROXIDE	ALDEHYDE	ALKOHOLE	PHENOLE	QAV bzw. GUANDE
GRAM + BAKT.						
GRAM - BAKT.						
MYCOBAKTERIEN						
BAKT. SPOREN						
HEFEN						
SCHIMMELPILZE						
VIREN						
TECHN. EIGENSCH.	Korrosiv, Eiweißfehler	Korrosiv, Eiweißfehler	Geruch	Entflammbarkeit	Geruch	Adsorptionsverhalten

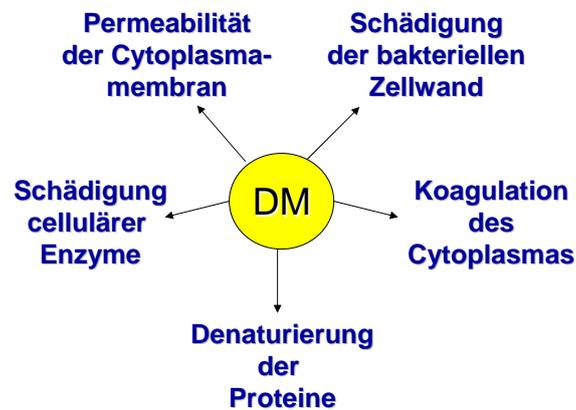
Gut
wirksam

Bedingt
wirksam

Nicht
wirksam

Quelle: Henkel

Wirkungsweise antimikrobieller Substanzen



Abtötungszeit (min.) ausgewählter Desinfektionsmittel bei 20°C

	Konz. (mg/l)	Staph. aureus	Pseud. aerug.	Bacillus cereus	Saccharo- myces
Na-Hypochlorit	200	1	1	> 120	2,5
Jodophore	25	1	1	> 120	2,5
Peressigsäure	200	1	1	30	1
Wasserstoffperoxid	3000	5	10	>120	>120
QAV	250	1	30	>>	25

Quelle: Mrozek (1982)

Anforderungen an Desinfektionsmittel

- Gute Dosierbarkeit, Löslichkeit, Mischbarkeit
- Hohe, temperaturunabhängige Wirksamkeit
- Gute Stabilität
- Kontrollierbare Wirkung
- Geringer Eiweißfehler
- Keine nachteilige Beeinflussung der Werkstoffe
- Geruchsneutralität und Anwendersicherheit
- Sensorische Unbedenklichkeit ↳ MAK!
- Gute Abspülbarkeit
- Unschädlichkeit für Mensch, Tier, Umwelt
- Abwasserneutrales Verhalten

Wichtige zu definierende Kriterien bei der Reinigung und Desinfektion

- R & D-Mittel
- Konzentration
- Temperatur
- Frequenz
- Personal

Arbeitsweise bei der Reinigung

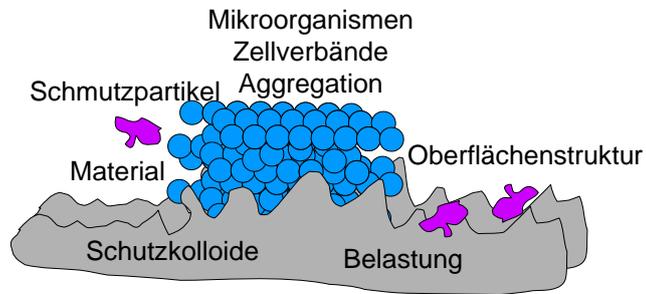
- keine Rückstände antrocknen lassen
- Vorspülvorgang mit temperiertem Wasser
- R & D
- Berücksichtigung der „Begleitfaktoren“



- **Temperatur**
- **Anwendungskonzentration**

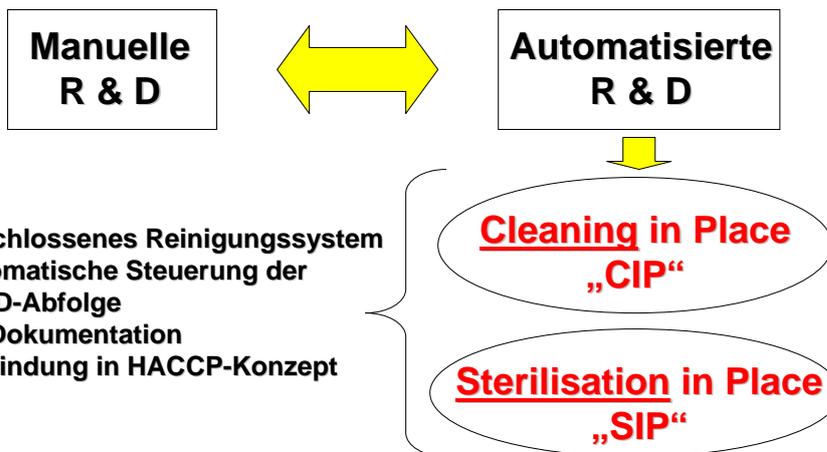
- Wirksamkeitskontrolle

Einflußfaktoren bei der Anwendung von Reinigungs- u. Desinfektionsmitteln



ART / ZUSAMMENSETZUNG KONZENTRATION
TEMPERATUR EINWIRKZEIT

Technische Bedingungen bei der Reinigung und Desinfektion



Mögliche Fehlerquellen bei der „CIP“ Reinigung

- falsche Positionierung des Sprüharms
- verstopfte Düsen
- Strömungswiderstand im Rohr (z.B. bei Ablagerungen)
- Schweißnähte an Rohrleitungen
- zu weite horizontale Leitungen
- Entstehung von „Produktsümpfen“
- Tank läuft nicht leer
- zu geringes Gefälle der Rohrleitung

Prüfung von Desinfektionsmitteln

Kontrolle des Abtötungseffekts an Hand von Testmikroorganismen:

3 Methoden:

**Endpunkt-
test**

Messen der **Zeitspanne**, bis alle Keime abgetötet sind

**Suspensions-
test**

Bestimmung der **Restkeimzahl** nach definierter Einwirkungsdauer einer best. Konzentration

**Kapazitäts-
test**

Messen der **Mindestkeimzahl**, die durch das DM nicht mehr beeinträchtigt wird

Begriffserklärungen

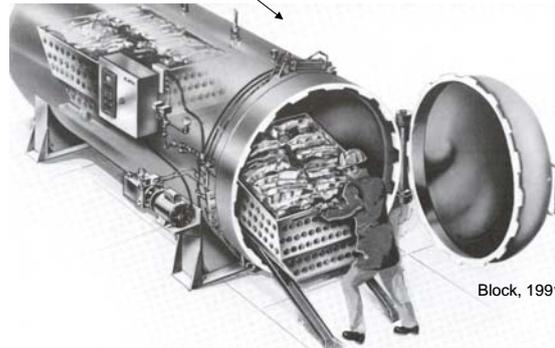
Mikrobizid	tötet Mikroorganismen ab
Bakterizid	tötet Bakterien ab
Fungizid	tötet Hefen und Schimmelpilze ab
Viruzid	tötet Viren ab
Sporizid	tötet mikrobielle Sporen (insbes. Endosporen) ab
Biozid	tötet lebende Organismen ab
Bakteriostatisch	hemmt das Bakterienwachstum
Fungitoxisch	toxisch für Fungi ↘ fungistatisch etc.....
Antibiotisch	wirkt gegen Organismen - Antibioticum: vorwiegend von eukaryontischen M.Org. gebildet, wirksam gegen Bakterien (u.a. M.Org.)
Antiseptisch	verhindert mikrobielles Wachstum, kann abtötend sein

Konzeption von aseptischen Arbeitsräumen

- höherer Luftdruck als in der Umgebung (z.B. OP)
- gezielte Steuerung durch eine raumluft-technische (RLT) Anlage
- Verhinderung, dass Keime von innen nach außen dringen (Unterdruck, z.B. septischer OP)
- Desinfektionsmöglichkeit der RLT-Anlagen (Ps. aeruginosa, Legionellen)

Dekontamination und biolog. Abfallentsorgung

- Mikrobiolog. Materialien (Labor) Laborautoklav
(in Kunststoffsäcken)
- Biologischer Abfall

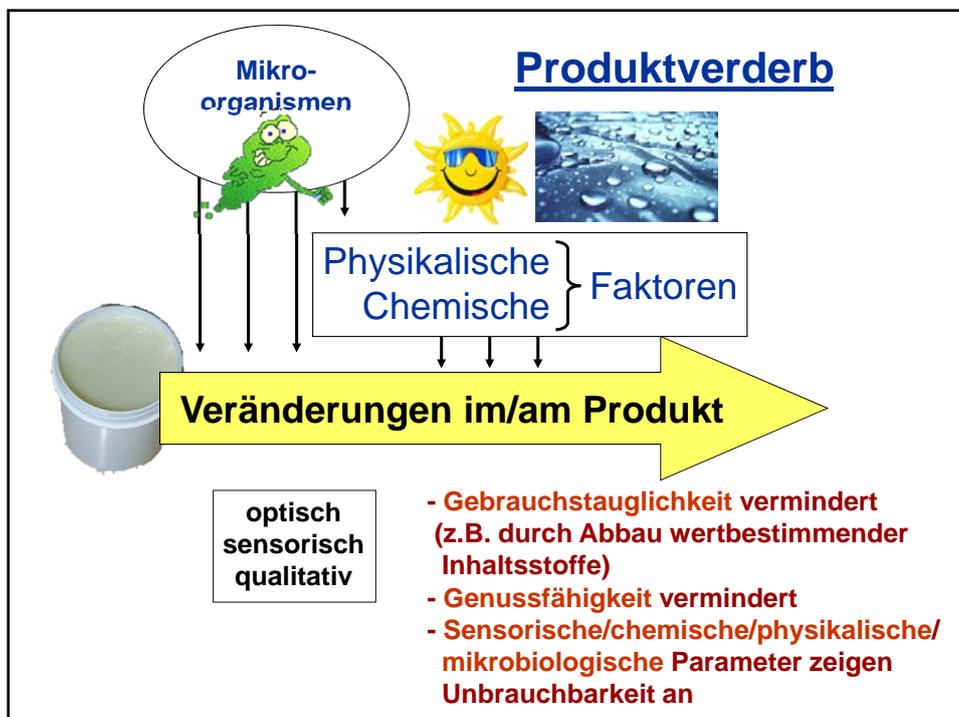


Tunnelautoklav (infektiöse Abfälle)

Desinfektion im Krankenhausbereich

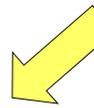
- Tauchbäder
- Wisch- bzw. Scheuerbehandlungen
- Besprühen
- Begasen
- Kombiniertes Einsatz von Hitze + Chemikalien (Wäschedesinfektion)
- Glatte Flächen (ohne Fugen etc.)
- Phenolische DM zur Desinfektion von Ausscheidungen
- Schädlingsbekämpfung (Entwesung, Gliedertiere, Nagetiere, Vögel)

14. PRODUKTVERDERB UND -HALTBARKEIT



Nachteilige Beeinflussung durch:

- mikrobielle Kontamination
- Grobverunreinigungen
- Feinverunreinigungen
- Temperatur- und Feuchtigkeitseinfluss
- Witterungseinflüsse
- Gase, Aerosole, Rauch, Dämpfe
- ungeeignete Behandlungs- oder Zubereitungsverfahren
- ungeeignete Lagerungsbedingungen
- ungenügenden hygienischen Umgang



Ausgangsprodukte
Produktionsumfeld
Mensch
Verpackung

Die 5 augenfälligsten Verderberserscheinungen

1. **Aussehen** verändert → Verfärbung/Verschimmelung/Trübung/
Phasentrennung/ Viskositätsänderung
2. **Oberfläche** verändert → Schleim/Pilzrasen/Hautbildung
3. **Festigkeit** verändert → „Matschigwerden“, Textur verändert
4. **Geruch** verändert → faulig, hefig, gärig, Gasbildung
5. **Geschmack** verändert → seifig, muffig, sauer etc.

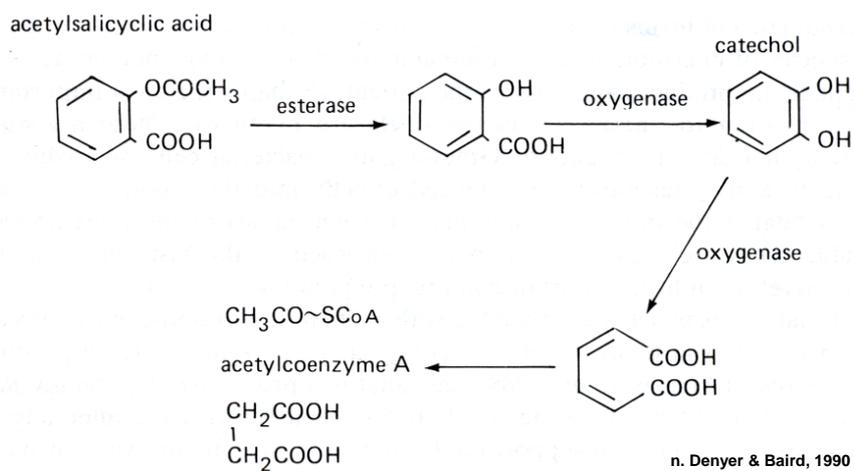
oder: nicht sensorisch erkennbar, jedoch analytisch nachweisbar

Beispiele für mikrobiell induzierten Abbau wertbestimmender Inhaltsstoffe

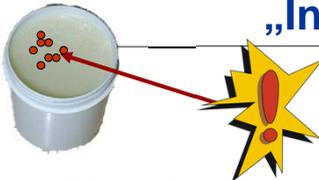
Produkt	Veränderung	Mikroorganismus
Penicillin	β -Lactamase	Micro-/Staphylococcen
Aspirin	Hydrolyse	Mischflora
Atropin	Abbau	Corynebacterium
Belladonna	Abbau	Mischflora
Hydrocortison	Transformation	Cladosporium

n. Denyer & Baird, 1990

Möglicher Abbauweg von Acetylsalicylsäure durch Acinetobacter



Kontaminations- quellen	ÖKOLOGISCHE VERDERBSFAKTOREN		
	Intrinsic factors Innere Faktoren	Extrinsic factors Äußere Faktoren	Processing factors Verarbeitungsfaktoren
Ubiquitäre Standorte Boden Staub, Luft, Wasser	Physikalische Faktoren Wasseraktivität Säuregrad, pH Pufferkapazität Redoxpotential	Temperatur Feuchtigkeit Atmosphäre	Veränderung der Struktur und Zus.setzung Mahlen, Zerkleinern, Mischen, Homogenisieren
Spezifische Nischen Produktionsräume, Werkzeuge, Geräte Maschinen	Chemische Faktoren Nährstoffe, antimikrobielle Substanzen		Haltb.machungs- verfahren Erhitzen, Kühlen, Trocknen, Konserv.Zusätze
Vektoren Personal, (Insekten, Nagetiere)	Biologische Faktoren Struktur Natürl. Barrieren		Verpacken Lagern Distribution Reinigen, Desinfizieren

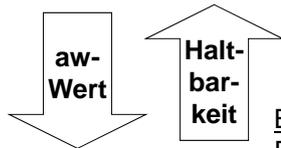


„Intrinsic Factors“

- **Physikalische Faktoren**
- **Chemische Faktoren**
- **Biologische Faktoren**

- Wasseraktivität
- Säuregehalt, pH-Wert
- Pufferkapazität
- Redoxpotenzial
-
- Nährstoffangebot
- antimikrobielle
Substanzen
-
- Struktur
- Natürliche Barrieren

MINDESTANFORDERUNGEN HINSICHTLICH aw-WERT:



die meisten Verderbsbakterien.....0.90
die meisten Verderbshefen.....0.88
die meisten Verderbsschimmel.....0.80

Beispiele:

Pseudomonas.....0.97
Enterobacter.....0.95
Vibrio.....0.94
Candida.....0.94
Staphylococcus aureus.. 0.86 !
Aspergillen.....0.70

Einteilung von Produktkategorien hinsichtlich ihrer Feuchte

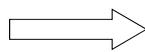
aw-Wert		
- sehr feucht	0.99 - 0.95	Lösungen, Suspensionen
- feucht	0.95 - 0.90	Sirupe, Brei, Cremen, Salben
- mittelfeucht	0.90 - 0.60	Sirupe, Pasten
- trocken	< 0.60	Pulver, Granulate, Tabletten, Dragees, Kapseln

Säuretoleranz von Mikroorganismen

gering pH > 5.0

durchschnittlich pH 5.0 - 4.0

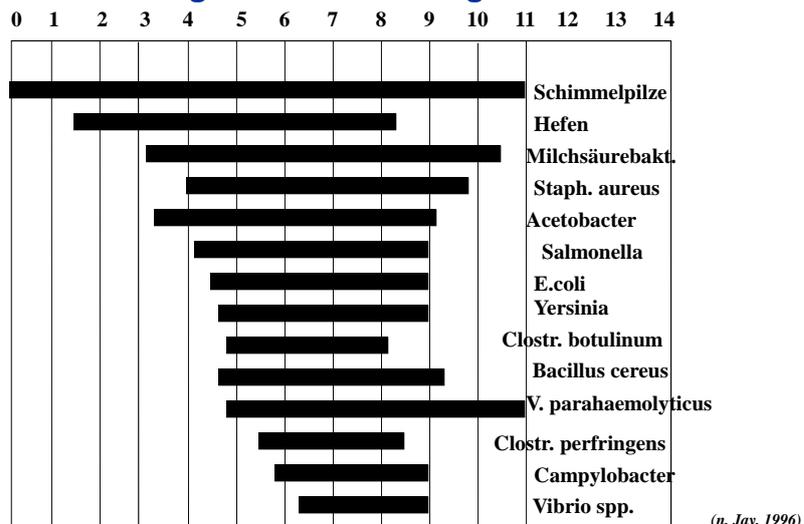
hoch pH < 4.0



zu berücksichtigen:

- pH-Wert
- potenzielle Azidität
- Pufferungskapazität
- pKa-Wert (organ. Säuren)

pH-abhängige Wachstumsbereiche ausgewählter Mikroorganismen



Eigenschaften verschiedener organischer Säuren

Organische Säure	pKa-Wert	Undissoziierter Anteil bei pH	
		4	6
Citronensäure	3,14	19	0,006
Ameisensäure	3,75	36	0,6
Milchsäure	3,86	39	0,64
Benzoesäure	4,18	61	1,5
Essigsäure	4,75	85	5,4
Sorbinsäure	4,76	85	5,5
Propionsäure	4,88	88	7,0

Einfluss des pH-Werts auf die sporizide Wirkung von Erhitzungsvorgängen

TEMP	pH-Wert				Zeit in Minuten
	6,1	5,3	5,0	4,7	
110 °C	190	160	40	35	
120 °C	18	13	7	7	

(n. Pichhardt, 1998)

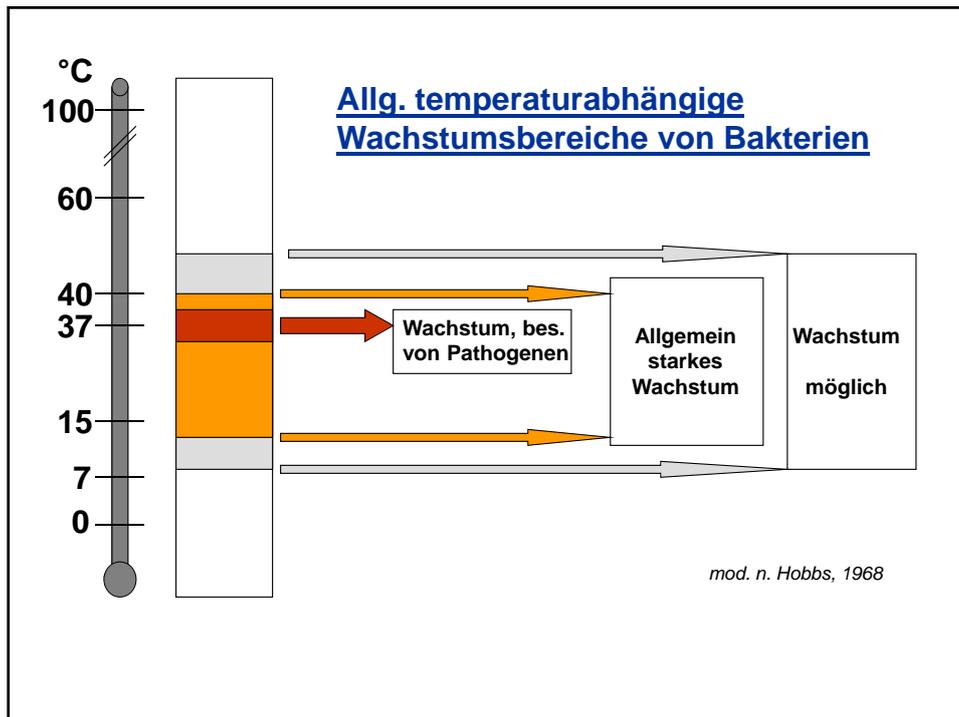
Nährstoffangebot

- Wasser  aw-Wert
- Energiequelle
- Stickstoffquelle
- Mineralstoffe u. Spurenelemente
- Vitamine u. Wachstumsfaktoren

„Extrinsic Factors“



- Temperatur
- Rel. Feuchtigkeit
- Atmosphärische Bedingungen



zu berücksichtigen:

- unter Kühlung Überlebensfähige
- Psychrotolerante
- Psychrotrophe
- Mesophile
- Thermophile
- Thermotolerante
- Thermoresistente

Relative Feuchtigkeit

Wesentliche Aspekte:

- Umgebungsluft
- Verpackung
- Kondenswasserbildung

Rel. Feuchte d. Umgebungsluft soll $<$ aw-Wert des Produktes

Atmosphärische Bedingungen

- „normale“ Bedingungen
- evakuierte/schutzbegaste Verpackung
- Kopfraum i.d. Packung
- gelöster Sauerstoff im Produkt
- (kontrollierte Atmosphäre)

„Processing factors“



Quelle: Wirtschaftswoche, 2011

Einflüsse durch:

- Veränderungen in der Struktur und Zusammensetzung
- Haltbarmachung
- Verpacken
- Lagern
- Transportieren
- Reinigen
- Desinfizieren

Vermahlen
Verreiben
Zerkleinern
Mischen
Homogenisieren

Erhitzen
Kühlen
Trocknen
Chemische Zusätze

Kernbereiche der mikrobiologischen Beeinflussung der Haltbarkeit

Verfahren zur Verhinderung des mikrobiellen Wachstums

Verfahren zur Reduktion der Mikroflora (Entkeimung)

Verfahren zur Verhinderung des mikrobiellen Wachstums

- Kühlen
- Gefrieren
- Trocknen
- Zuckern
- Salzen
- Schaffung spez. atmosphär. Bedingungen
- Konservierungsmittelzusatz

Konservierungsmittel am Beispiel Pharmazeutika

Preservative agent	Pharmaceutical products			
	Injectable	Ophthalmic	Topical	Oral
Benzalkonium chloride	+	+	+	
Benzoic acid (+ salts)			+	+
Benzyl alcohol	+		+	
Bronopol			+	+
Cetrimide		+	+	
Chlorbutanol	+	+		
Chlorhexidine		+	+	
Chlorocresol	+		+	
Cresol	+		+	
Ethanol				+
Parabens (methyl, ethyl, butyl, propyl, benzyl +salts)	(+)	(+)	+	+
Phenol	+		+	
Phenoxyethanol			+	
Phenylethanol	+			
Phenylmercuric salts		+		
Sorbic acid			+	+
Sulphites, inorganic	+			
Thiomersal	+	+		

(+); Martindale (1982) cautions against use in these products.

N. B. Germany and some other countries will not permit Bronopol to be used in pharmaceutical products, only in cosmetics.

Denyer & Wallhäuser, 1990

Antimikrobielles Wirkungsspektrum ausgewählter Konservierungsmittel

Preservative agent	Bacteria		Yeasts	Moulds
	Gram-positive	Gram-negative		
Benzalkonium chloride	++	(++)*	(++)	+
Benzoic acid (+ salts)	++	(++)	+	+
Benzyl alcohol	++	+	+	+
Bronopol	(++)	++	+	+
Cetrimide	++	(++)*	(++)	+
Chlorbutanol	++	++	(++)	+
Chlorhexidine	++	++*	(++)	+
Chlorocresol	++	(++)	+	+
Cresol	(++)	+	+	+
Ethanol	++	++	(++)	(++)
Parabens (methyl, ethyl, butyl, propyl, benzyl + salts)	(++)	+	(++)	(++)
Phenol	(++)	+	+	+
Phenoxyethanol	(++)	++	+	+
Phenylethanol	(++)	++	+	+
Phenylmercuric salts	++	++	(++)	(++)
Sorbic acid	(++)	(++)	++	(++)
Sulphites, inorganic	+	+	(++)	(++)
Thiomersal	++	(++)	(++)	+

++ , active; (++) , moderately active; + , weakly active; * poorly active against *Pseudomonas* spp.

Denyer & Wallhäuser, 1990

Konservierungsmittel am Beispiel Kosmetika

- Paraben-Ester-Verbindungen
(p-Hydroxybenzoat-Ester)
- Alkohole (Ethanol, Propylenglykol,
Phenylethylalkohol)
- Phenolderivate (ortho-Phenylphenol)
- organische Säuren
- Isothiazolinon-Verbindungen
- Formaldehyd-freisetzende Verbindungen
- Bromonitro-Verbindungen (Bronopol)
- Chelatbildner (EDTA)

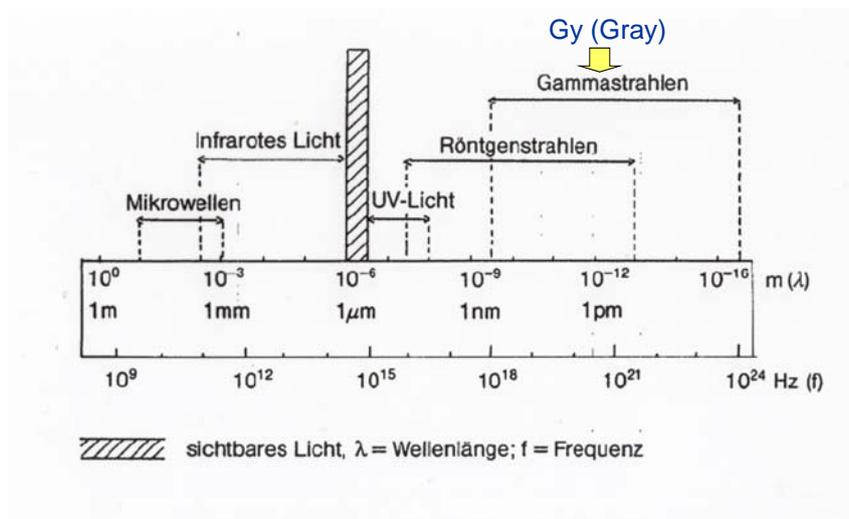
Anforderungen an Konservierungsmittel

- breites Spektrum antimikrobieller Aktivität
- rasches mikrobiolog. Inaktivierungspotenzial
- pH-stabil/kompatibel
- temperatur(un)abhängig
- Inhaltsstoff-kompatibel
- keine Beeinflussung des physikal. Zustandes
- gute Eignung bei „Öl-Wasser-Interaktionen“
- sichere Handhabbarkeit
- gesetzliche Zulassung
- gute Kosten/Nutzen-Relation

Verfahren zur Reduktion der Mikroflora (Entkeimung)

- **Erhitzen**
 - Pasteurisieren
 - Sterilisieren
- **Bestrahlen**
 - Ionisierende Strahlen
 - UV-Bestrahlung
- **Begasen**
- **Hochdruckbehandlung**
- **Mechanische Entkeimung**
 - Filtration
 - Zentrifugation
- **Kombinierte Verfahren**

Wellenlängen und elektromagnet. Strahlen - Übersicht



Prüfungstermine

unter:



Dept. f. Lebensmittelwiss. u. -technologie

<http://www.dlwt.boku.ac.at/9633.html>

1190, Muthgasse 18

Anmeldungen mittels **Online-Formular**



bei Fragen: Fr. Barbara Veit:

Tel. 01-47654-6291

barbara.veit@boku.ac.at

Hinweis zum Prüfungsmodus

Das Ergebnis der **schriftlichen Prüfung**, die insgesamt **6 Fragen** umfasst, die möglichst vollständig und in leserlicher Schrift zu beantworten sind, wird wie folgt ermittelt:

Für die Vollständigkeit der Beantwortung einer jeden Frage werden jeweils bis zu 5 Punkte vergeben. Das Prüfungsergebnis resultiert grundsätzlich aus der errechneten Gesamtpunkteanzahl, jedoch kann eine völlig falsch beantwortete Frage auch einen Punkteabzug zur Folge haben. Weiters werden Prüfungen auch dann negativ gewertet, wenn 2 Fragen überhaupt nicht beantwortet werden, weil davon ausgegangen werden kann, dass zumindest ein Drittel des Lernstoffes nicht beherrscht wird.



Auf Wiedersehen
und
viel Erfolg bei der
Prüfung!