

Isolierung von Einzelkolonien

Prinzip

Aus Mischkulturen werden mittels Agarshakes und Agarplatten Einzelkolonien isoliert. Es kann gleichzeitig versucht werden, die Chromatiaceae als Reinkulturen zu erhalten und die Kontaminanten zu isolieren, um sie zu charakterisieren. Die Methode von Widdel (1980) wird etwas vereinfacht, indem die Agar-Röhrchen nach dem Animpfen nur mit einem Butylgummistopfen (ohne Pyrogallolwatte) verschlossen werden.

Reagenzien

- 3% (w/v) Agarlösung
- 0.3 M Natriumdithionitlösung: 25 ml destilliertes Wasser autoklavieren
- unter N₂ abkühlen lassen
- 1.25 g Na₂S₂O₄ steril zugeben.

A) Isolierung von Einzelkolonien mittels Agarshakes

- 3% (w/v) Agarlösung aus gewaschenem Agar herstellen.
- Je 3 ml Agar in grosse Reagenzgläser (zirka 20 ml) verteilen, mit Aludeckeln verschliessen.
- 10 Minuten bei 121°C autoklavieren, erkalten lassen, in Plastiksäcken (gegen Austrocknen) möglichst luftdicht im Kühlschrank aufbewahren.
- Agar in RG in siedendem Wasser oder im Mikrowellenofen verflüssigen und ins 80°C-Wasserbad stellen.
- In jedes RG 6 ml leicht vorgewärmtes Medium geben, dabei mit der Pipette in den Agar eintauchen.
- Aludeckel gegen Butylgummistopfen austauschen.
- RG in 40°C-Wasserbad stellen.
- 1 Tropfen der zu trennenden Mischkultur in RG 1 geben, dieses wieder schliessen und zweimal sanft schütteln.
- Jedem RG (mit RG 6 beginnen) 0.7 µl Dithionitlösung zugeben, direkt mit der Pipette mischen.
- RG in kaltes Wasserbad stellen.
- Die erkalteten RG auf den Kopf gestellt inkubieren (Kondenswasser!).

Auswertung

Nach 3 bis 6 Wochen werden die Agarshakes unter dem Binokular auf Kolonien untersucht. Möglichst weit auseinander liegende, leicht zugängliche Kolonien werden mit Hilfe einer sterilen, zur Kapillare ausgezogenen Pasteurpipette dem Agar entnommen. Um den Agarpfropfen wieder aus der Pipette austossen zu können, muss diese mit Medium gefüllt sein. Die Kolonie wird in einem kleinen Volumen Medium aseptisch resuspendiert und mikroskopisch kontrolliert. Sofern nötig, wird die Kultur noch einmal gereinigt, ansonsten wird sie in ein mit Medium gefülltes Glasröhrchen überführt, welches einige Glaskügelchen enthält (ca. 1 mm Durchmesser), die einen Mikrokosmos schaffen. Die Kultur wird unter normalen Bedingungen inkubiert und weiterhin mikroskopisch beobachtet.

B) Isolierung von Einzelkolonien auf Agarplatten

- Agarmenge für 1.5% Agarlösung (w/v) waschen.
- Konzentrierte Medienlösung aus Stammlösungen herstellen.
- Agar und konzentrierte Salzlösung zusammengiessen, auf die gewünschte Endkonzentration der Salzlösung verdünnen.
- Autoklavieren (20 Minuten, 121°C). Beachte: Im sauren Milieu wird der Agar beim Autoklavieren hydrolysiert. In Gegenwart von Ammonium-, Phosphat-, Eisen-, Carbonat und Magnesium-Salzen, können sich beim Autoklavieren Niederschläge bilden (schwerlösliche Mineralien). Um dies zu vermeiden, gibt man einzelne Salze aus sterilen Stammlösungen erst nach dem Autoklavieren zu.
- Im Wasserbad auf 45°C abkühlen lassen und Agarmedium mit den verlangten Zusätzen vervollständigen.
- In der Sterilbench je 20 ml Agarmedium in sterile Plastik-Petrischalen giessen und im sterilen Luftstrom verfestigen lassen.
- Platten mit den zu isolierenden Mischkulturen animpfen (Ausplattieren).
- Petrischalen inkubieren (in Anaerobentöpfen für anoxische Bedingungen).
- Sobald unter dem Binokular Einzelkolonien auf den Platten sichtbar werden wie bei den Agarshakes weiterfahren.

Literatur

- Widdel F. 1980. *Anaerober Abbau von Fettsäuren und Benzoesäure durch neu isolierte Arten sulfatreduzierender Bakterien*. Dissertation, Universität Göttingen
- Känel B, Mez K. 1992. *Vielfalt und Dynamik mikrobieller Stoffwechselaktivitäten in der Redoxtransitionszone des Lago di Cadagno*. Diplomarbeit Universität Zürich