

Info-Box

- Modul 1: Erstellung von Wachstumskurven; mit und ohne Antibiotika
- Wachstum bzw. Vermehrung von Bakterien
 - Antibiotika
 - Versuchsansatz
 - Photometer
 - Grafische Auswertung
 - Aufgaben
- Modul 2: Zellzahlbestimmung in einer Zählkammer
- Modul 3: Auswertung eines Antibiogramms
- Modul 4: Praktischer Versuch zur Zellzahlbestimmung in einer Zählkammer (mit Trockenhefe)

Modul 1: Erstellung von Wachstumskurven; mit und ohne Antibiotika

1.1 Wachstum bzw. Vermehrung von Bakterien

Bakterien vermehren sich ungeschlechtlich durch Zweiteilung. Ein einzelnes Bakterium kann so auf einem festen Medium unter günstigen Bedingungen durch wiederholte Teilungen eine Kolonie von Nachkommen bilden. Erfolgt das Wachstum in flüssigem Nährmedium, kommt es zur zunehmenden Eintrübung. In diesem Modul wird das Wachstumsverhalten des Darmbakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*) untersucht. Die Bedingungen für optimales Wachstum wie z.B. Salzgehalt, pH-Wert, Nährstoffe oder Temperatur unterscheiden sich von Art zu Art und müssen berücksichtigt werden. In einer Umgebung mit optimalen Bedingungen und unbegrenzten Ressourcen wächst eine Bakterienkultur exponentiell. Ein Bakterium teilt sich und bildet zwei Zellen, diese teilen sich wieder und bilden vier Zellen, dann entstehen acht Zellen usw. Die Zellzahl verdoppelt sich unter diesen Bedingungen mit jeder Generation. Die Zeit, die für eine Verdopplung der Zellzahl während des exponentiellen Wachstums benötigt wird, heißt Generationszeit (g); daraus kann die Teilungsrate (n , Zahl der Teilungen pro Stunde) bestimmt werden ($n=1/g$). In der Realität ist das Wachstum der Bakterien begrenzt. Das Wachstum einer frisch angesetzten Bakterienkultur lässt sich in einem Diagramm darstellen, bei dem der Logarithmus der Zellzahl gegen die Zeit aufgetragen wird (siehe Abb. 1a). Bakterien, die in eine frische Kulturlösung gegeben werden, beginnen nach einer kurzen Anlaufphase (lag-Phase) sich mit maximaler Teilungsrate zu vermehren (log-Phase). Wird der

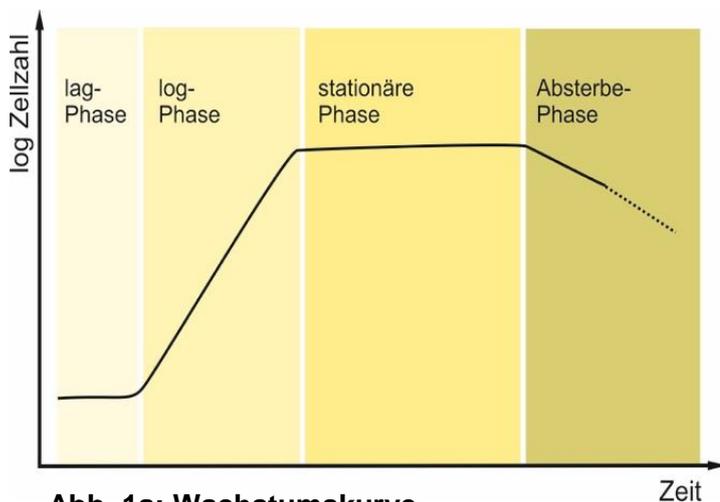


Abb. 1a: Wachstumskurve

Logarithmus der Zellzahl gegen die Zeit aufgetragen, stellt sich hier die Wachstumskurve als eine Gerade dar. Mangelnde Nährstoffe und Anreicherung von Stoffwechselprodukten führen dann zum verlangsamten Wachstum und später zum Absterben der Bakterien. In der stationären Phase sind Teilung und Absterben im Gleichgewicht und in der Absterbe-Phase verringert sich dann die Anzahl der Bakterien in der Kultur.

1.2 Antibiotika

Antibiotika im klassischen Sinn sind niedermolekulare Stoffwechselprodukte, die von Bakterien oder niederen Pilzen gebildet werden und das Wachstum anderer Mikroorganismen hemmen oder diese abtöten. Als Antibiotika im weiteren Sinn gelten auch antimikrobiell wirkende Substanzen, die teilsynthetisch, vollsynthetisch oder gentechnisch hergestellt werden.

Grundsätzlich gibt es zwei unterschiedliche Wirkmechanismen; Antibiotika können bakteriozid oder bakteriostatisch wirken. Bakteriozide Antibiotika blockieren einen Stoffwechselvorgang in den Bakterien, der lebensnotwendig ist, so dass die Bakterien unmittelbar abgetötet werden. Bakteriostatische Antibiotika hindern die Bakterien daran sich zu vermehren. In dieser Situation hat das Immunsystem des Patienten die Chance, den Erreger erfolgreich zu bekämpfen. Ein Beispiel für bakteriostatisch wirkende Antibiotika ist Tetracyclin, das die Proteinbiosynthese (Translation) bei gram-negativen Bakterien hemmt. Medizinisch relevante Antibiotika dürfen nur den bakteriellen Erreger schädigen, nicht jedoch den eukaryonten Wirtsorganismus (Mensch oder Tier). Als Zielstrukturen für Antibiotika kommen somit nur solche Moleküle in Betracht, die sich in Prokaryonten und Eukaryonten unterscheiden.

1.3 Versuchsansatz

Für den Versuch werden drei Reagenzgläser jeweils mit 3 ml flüssigem LB-Nährmedium (engl. LB = **L**ysogeny **B**roth, ein komplexes Nährmedium zur Anzucht von Bakterien) gefüllt und anschließend je 1ml einer frischen *E. coli* - Bakterienkultur hinzugefügt (hierbei handelt es sich um den apathogenen Sicherheitsstamm *E. coli* K12).

Bevor die Reagenzgläser in das Wasserbad gestellt und bei 37°C inkubiert werden, wird eine photometrische Messung durchgeführt. Es wird ein Dr. Lange Photometer verwendet, dabei wird das Reagenzglas direkt als Küvette genutzt. Die optische Dichte bei 560nm (OD_{560}) wird zusammen mit der Uhrzeit als Wert t_0 in das Messprotokoll eintragen (siehe unten). Nach 30 Minuten erfolgt die Zugabe des Antibiotikums (Tetracyclin). Die Reagenzgläser werden entsprechend markiert:

- grün:** Kein Antibiotikum (Kontrollwert)
- gelb:** Niedrige Antibiotikum-Konzentration
- rot:** Hohe Antibiotikum-Konzentration

Tetracyclin-Konzentrationen in den drei Versuchsansätzen:

	RG grün	RG gelb	RG rot
LB	3 ml	3 ml	3 ml
<i>E. coli</i>- Kultur	1 ml	1 ml	1 ml
Antibiotikum in LB	0,25 ml (ohne Tet)	0,25 ml (mit 51 µgTet/ml)	0,25 ml (mit 510 µgTet/ml)
Gesamtvolumen	4,25 ml	4,25 ml	4,25 ml
Endkonz. Tet.	0 µg / ml	3 µg / ml	30 µg / ml

Die optischen Dichten der Kulturen in den Reagenzgläsern wird erneut gemessen (t_1) und danach werden die Reagenzgläser halbstündig in das Photometer gestellt und die Werte zusammen mit der aktuellen Uhrzeit protokolliert. Zwischen den Messungen werden die Kulturen in den Reagenzgläsern bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. (Messprotokoll siehe Tabelle nächste Seite).

Messprotokoll zum Wachstum einer Bakterienkultur, bei verschiedenen Tetracyclinkonzentrationen:

Messpunkt	Uhrzeit	Δt (Zeit seit t_0) in min	Optische Dichte bei 560 nm (OD ₅₆₀)		
			grün (ohne Tet.)	gelb (3 μ g Tet./ml)	rot (30 μ g Tet./ml)
t_0	10:00	0	0,17	0,19	0,18
t_1 Zugabe des Antibiotikums	10:30	30	0,21	0,22	0,21
	11:00	60	0,33	0,26	0,24
	11:30	90	0,46	0,32	0,25
	12:00	120	0,62	0,36	0,27
	12:30	150	0,74	0,43	0,27
	13:00	180	0,86	0,47	0,28
	13:30	210	0,94	0,53	0,29
	14:00	240	1,00	0,53	0,29
	14:30	270	1,02	0,57	0,29
	15:00	300	1,04	0,58	0,29

1.4 Photometer

Theoretische Grundlagen: Bei der Photometrie wird die Eigenschaft von Suspensionen genutzt, Licht zu streuen und zu absorbieren - je mehr Zellen sich in der Suspension befinden, desto trüber wird das Medium. Daher spricht man auch von Trübungsmessung (Turbidimetrie). Beim Dr. Lange Einstrahl-Filter-Photometer sendet eine Lichtquelle Licht aus; ein Filter sorgt dafür, dass nur Licht mit einer definierten Wellenlänge (560nm) durch die Kulturlösung geschickt wird. Das Reagenzglas dient bei diesem Photometer als Küvette. Anschließend wird in einer Photozelle gemessen, wieviel der ursprünglichen Lichtintensität noch vorhanden ist (siehe Abb. 1b). Ausgegeben wird der Wert als optische Dichte (OD) oder als Extinktion, wobei beides ein Maß für die Absorption ist. Photometrische Methoden eignen sich gut für Untersuchungen lebender Bakterien- oder Hefekulturen und deren Wachstum.

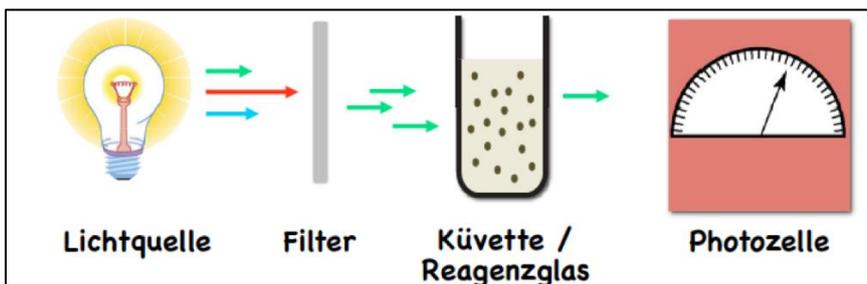


Abb. 1b: Einstrahl-Filter-Photometer

Quelle: Praktikum „Allgemeine Biologie“, Inst. f. Biologie, Universität zu Lübeck, 2018

Grundlage der Trübungsmessung ist das Lambert-Beer'sche Gesetz, welches besagt, dass die Absorption von durch Flüssigkeiten fallendem Licht der Konzentration der Partikel in der Flüssigkeit und der Schichtdicke des durchstrahlten Mediums proportional ist. Die Trübung einer Kulturlösung, die mit Bakterien beimpft wurde, ist somit ein Maß für die Konzentration der Bakterien. Mit der photometrischen Methode wird die Gesamtzellzahl ermittelt, also sowohl lebende als auch tote Zellen.

Aufgaben:

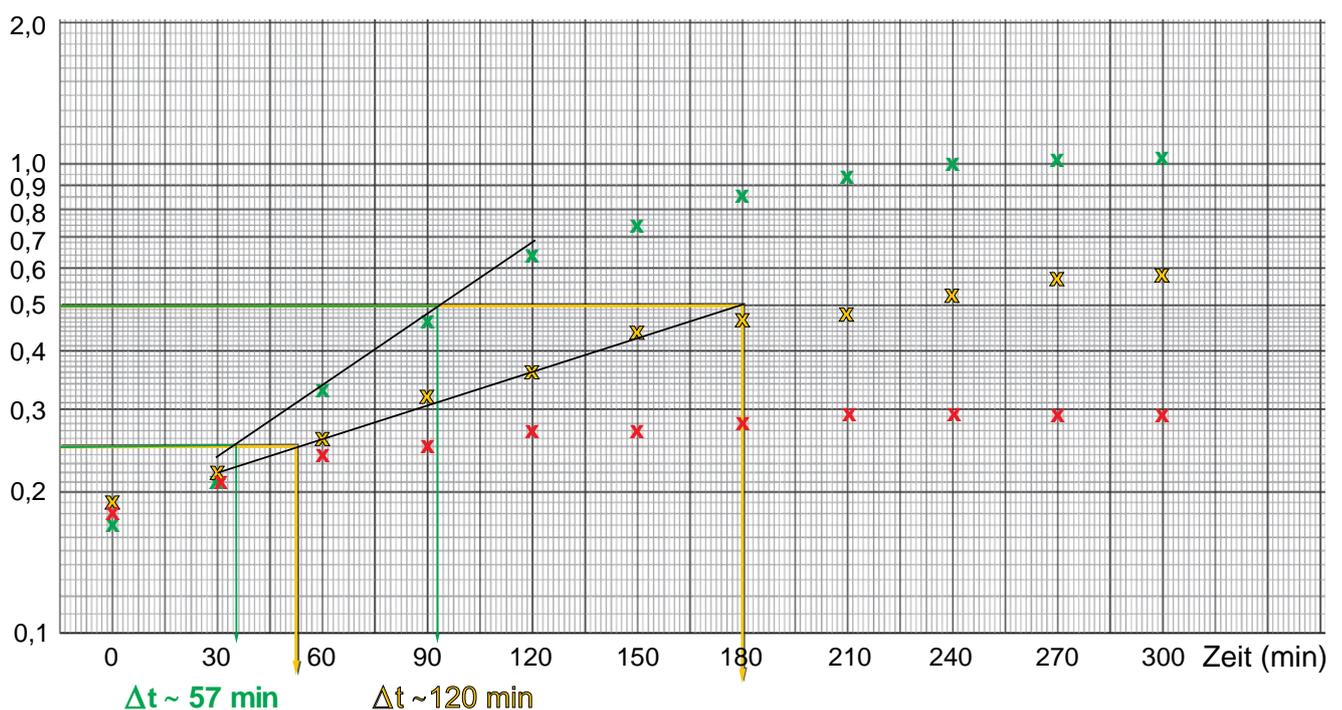
1.1: Erstellen Sie aufgrund der Daten im „Messprotokoll zum Wachstum einer Bakterienkultur“ Wachstumskurven für *E. coli* und bestimmen Sie die Generationszeit (g). Verwenden Sie unterschiedliche Farben für die drei Kurven.

1.2: Wie unterscheiden sich die drei Kurven?

1.3: Beschreiben Sie Nachteile der Messung der Bakterienkonzentration mit dem Photometer.

1.4: In der Literatur findet man für *E.coli* Angaben zur Generationszeit von 20-30 Minuten. Nennen Sie mögliche Gründe, warum die Bakterien in dem Kontrollansatz langsamer wachsen.

Darstellung und grafische Auswertung der Wachstumskurven von *E.coli*:



Antworten:

Die Generationszeit beträgt:

Die Generationszeit wird im exponentiellen Bereich der Kurve ermittelt, in dem sich die Wachstumskurve als eine Gerade darstellt. Man ermittelt grafisch die Zeitspanne, die vergeht, bis sich die OD_{560} verdoppelt hat. (Die Generationszeit für die Bakterienkultur ohne Antibiotika beträgt etwa **57 Minuten** (Δt) für die Bakterienkultur mit $3\mu\text{g Tet./ml}$ Antibiotika etwa **120 Minuten** (Δt). In dieser Zeit ist die OD von 0,25 auf 0,5 angestiegen. Die Generationszeit für die Bakterienkultur mit $30\mu\text{g Tet./ml}$ lässt sich so nicht ermitteln)

Wie unterscheiden sich die drei Kurven?

Die Wachstumskurve für die Bakterienkultur ohne Antibiotika zeigt nach einer kurzen Anlaufphase (lag-Phase) die maximale Vermehrungsrate. Nach ca. 120 Minuten beginnt die stationäre Phase. Die Absterbe-Phase wird innerhalb des Experiments nicht erreicht. Das Antibiotikum Tetracyclin wirkt bakteriostatisch; bereits in niedriger Konzentration ($3\mu\text{g Tet./ml}$) wird das Bakterium an der Vermehrung gehindert, die Wachstumskurve ist deutlich flacher als die Kontrollkurve. Die Bakterienkultur mit $30\mu\text{g Tet./ml}$ zeigt diesen bakteriostatischen Effekt noch stärker.

Beschreiben Sie Nachteile der Messung der Bakterienkonzentration mit dem Photometer:

Die Trübung einer Bakterienkultur ist nur ein relatives Maß für die Konzentration der Bakterien. Um diesen Wert in absolute Zellzahlen pro Milliliter umrechnen zu können, ist eine exemplarische Bestimmung der Zellzahl in der Zählkammer erforderlich.

Ein weiterer Nachteil dieser photometrischen Zellzahlbestimmung ist die Tatsache, dass die Methode nicht zwischen lebenden und toten Zellen unterscheiden kann. Erst wenn tote Bakterien sich auflösen, tragen sie nicht mehr, oder in veränderter Weise, zur Trübung des Mediums bei.

In der Literatur findet man für E.coli Angaben zur Generationszeit von 20-30 Minuten.

Nennen Sie mögliche Gründe, die die Abweichungen für den Kontrollansatz erklären:

Eine Generationszeit für E. coli von 20-30 Minuten wird nur unter optimalen Bedingungen erreicht. Die Messreihe kann nicht unter optimalen Bedingungen durchgeführt werden, da die Sauerstoffversorgung im Reagenzglas nicht optimal ist und die Kulturen halbstündlich nach Raumtemperatur überführt werden, um die photometrische Messung durchzuführen. Die Summe der „nicht optimalen Faktoren“ führten dazu, dass die ermittelte Generationszeit deutlich länger ist und dass die in der Literatur für E. coli angegebenen Generationszeiten von 20-30 Minuten in der Praxis nicht erreicht werden konnten.

Modul 2: Zellzahlbestimmung in einer Zählkammer

In diesem Modul wird die Zellzahlbestimmung in der Zählkammer beschrieben. (Modul 4 beschreibt das Experiment mit Trockenhefe, so dass es auch im Unterricht durchgeführt werden kann) Zusammen mit der am Photometer gemessenen OD_{560} zum Zeitpunkt der Probenentnahme kann so eine Zuordnung von optischer Dichte (OD_{560}) zur ermittelten Zellzahl pro ml vorgenommen werden. Dazu wird während des logarithmischen Wachstums der Bakterienkultur, parallel zur photometrischen Messung, eine Zellzahlbestimmung in einer Zählkammer (z. B. Einmalzählkammer C-Chip, Fa. Digital Bio) vorgenommen. Die fixierte Objektträger-Deckglas-Kombination (s. Abb. 2a), wird mit der Bakterienzellsuspension befüllt. Auf dem Objektträger ist ein Präzisionszählgitter eingraviert (s. Abb. 2b). Es werden die Bakterienzellen gezählt, die sich jeweils in zehn Kleinstquadraten, grün markiert, befinden und daraus der Mittelwert gebildet.

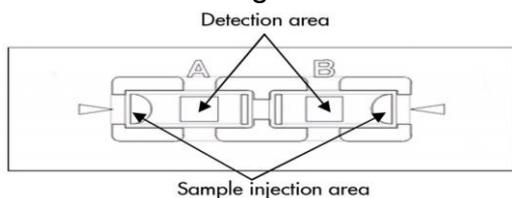


Abb. 2a: Zählkammer (www.digital-bio.com)

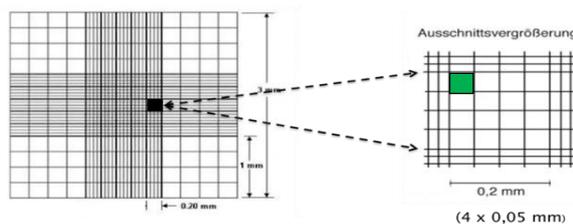


Abb. 2b: Zählgitter (verändert, www.digital-bio.com)

Berechnung der Zellzahl pro ml im Kulturmedium:

Abmessung eines Kleinstquadrats:

Länge = 0,05 mm

Breite = 0,05 mm

Höhe = 0,1 mm

Ergebnis der Bakterienzählung in der Zählkammer:

Bakterienzahl pro Kleinstquadrat: **17, 18, 16, 20, 19, 17, 17, 18, 20, 17**

OD_{560} unmittelbar vor der Probenentnahme: **0,6**

Aufgaben:

2.1: Begründen Sie, warum 10 Kleinstquadrate ausgezählt werden

2.2: Bestimmen Sie den Mittelwert der Zellzahl für die 10 Kleinstquadrate

2.3: Berechnen Sie die Zahl der Zellen pro ml für $OD_{560} = 0,6$

2.4: Berechnen Sie die Zahl der Zellen pro ml für $OD_{560} = 1$

Antworten:

2.1: Begründen Sie, warum 10 Kleinstquadrate ausgezählt werden: *Um mögliche Inhomogenität der Probe auszugleichen, müssen möglichst viele Kleinstquadrate ausgezählt werden.*

2.2: Bestimmen sie den Mittelwert der Zellzahl für die 10 Kleinstquadrate: $179 : 10 = 17,9$

2.3: Berechnen sie die Zahl der Zellen pro ml für $OD_{560} = 0,6$: *Das Volumen über einem Kleinstquadrat beträgt: $0,05\text{mm} \times 0,05\text{mm} \times 0,1\text{mm} = 0,00025\text{ mm}^3$*

$$\frac{1\text{ ml}}{0,00025\mu\text{l}} \Rightarrow \frac{10^3\mu\text{l}}{2,5 \times 10^{-4}\mu\text{l}} \quad \text{daraus ergibt sich:} \quad 17,9 \times 4 \times 10^6 \text{ Zellen/ml} \Rightarrow 7,16 \times 10^7 \text{ Zellen/ml}$$

2.4: Berechnen sie die Zahl der Zellen pro ml für $OD_{560} = 1$

$$OD_{560} 0,6 \Rightarrow 7,16 \times 10^7 \text{ Zellen/ml}$$

$$OD_{560} 1,0 \Rightarrow 1,19 \times 10^8 \text{ Zellen/ml}$$

Modul 3: Auswertung eines Antibiotogramms (Agardiffusions-/ Plättchentest)

Das Antibiotogramm ist ein Labortest zur Bestimmung der Empfindlichkeit (Sensitivität) bzw. Resistenz von Bakterien gegenüber Antibiotika. In der medizinischen Diagnostik wird z. B. ein Wundabstrich des Patienten getestet. Im Experiment wird die Bakterienkultur gleichmäßig auf eine Petrischale mit festem Nährboden verteilt und kleine Filterplättchen, die mit unterschiedlichen Antibiotika getränkt sind, auf den Agar gelegt. Die Platte wird dann bei 37°C inkubiert; dabei diffundiert das Antibiotikum in den feuchten Agar. Sind die Bakterien empfindlich gegen das im Plättchen enthaltene Antibiotikum, entsteht eine mehr oder weniger ausgeprägte Zone ohne Bakterienwachstum (ein Hemmhof). Zur Bestimmung der Resistenz bzw. Sensitivität wird der Hemmhof-Durchmesser mit vorgegebenen Literaturangaben verglichen.

Ergebnis:

Testung der Empfindlichkeit von *E. coli* gegenüber vier verschiedenen Antibiotika

Abkürzungen:

C = Chloramphenicol

K = Kanamycin

Mz = Mezlocillin

Te = Tetracyclin

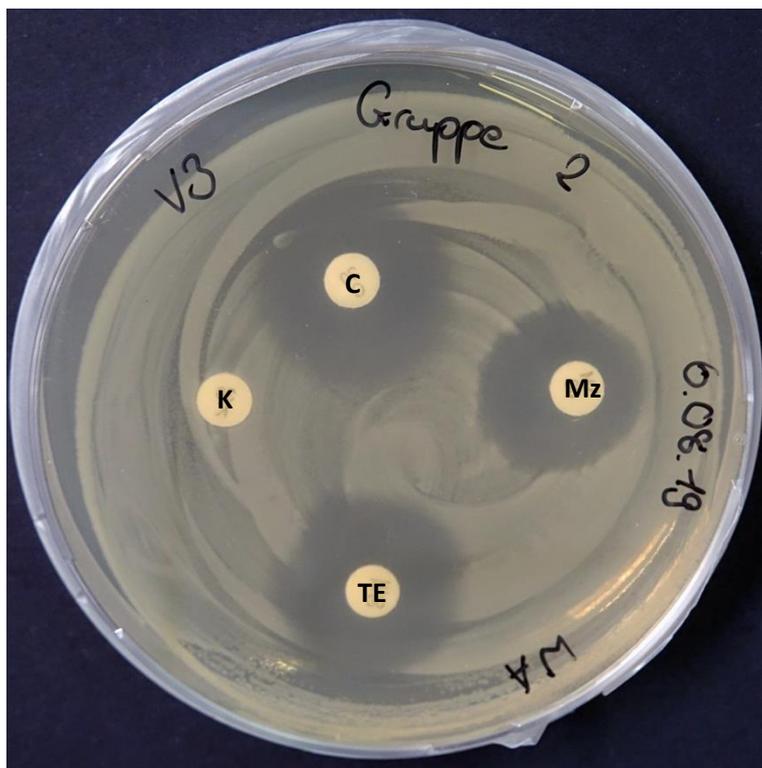


Abb. 3: Antibiotogramm

Aufgaben:

3.1: Bestimmen Sie anhand von Abb. 3 die Größe der Hemmhöfe und füllen sie die Tabelle aus.

Antibiotikum	resistent (Herstellerangabe) Durchmesser Hemmhof [mm]	Durchmesser Hemmhof [mm]	sensitiv	resistent
Chloramphenicol	< 21	ca. 25	x	
Kanamycin	< 14	0		x
Mezlocillin	< 13	ca. 22	x	
Tetracyclin	< 17	ca. 23	x	

3.2: Begründen Sie, welche Antibiotika der Arzt voraussichtlich erfolgreich zur Bekämpfung einer Infektion mit dem Erreger verordnen wird. Der getestete Erreger *E.coli* Stamm WA ist gegen Kanamycin resistent (kein Hemmhof, das Wachstum wird nicht beeinträchtigt) und sensibel für Tetracyclin, Mezlocillin und Chloramphenicol (jeweils ausreichend großer Hemmhof). Eines dieser drei Antibiotika (Tetracyclin, Mezlocillin und Chloramphenicol) wird der Arzt voraussichtlich verordnen. Dabei sind noch eventuelle Allergien des Patienten zu berücksichtigen.

Modul 4: Praktischer Versuch zur Zellzahlbestimmung in einer Zählkammer (mit Trockenhefe):

Anleitung zur Herstellung einer Trockenhefesuspension und Zählung in einer Einmal-Neubauer Zählkammer. *(Dieser Versuch ist in der Schule alternativ zum Versuch „Bestimmung der Zellzahl in einer Bakterienkultur“ durchführbar.)*

Bestimmung der Zellzahl in einer Flüssigkultur

In diesem Modul wird in einer Flüssigkultur die absolute Zellzahl pro ml ermittelt. Dazu wird eine Hefesuspension hergestellt und die Zellzahl dann in einer Neubauer-Zählkammer (Einmalzählkammer C-Chip, Fa. Digital Bio) bestimmt.

Dafür wird eine homogene Suspension aus 15 ml Wasser und ca. einer Spatelspitze Trockenbackhefe hergestellt und einige Minuten

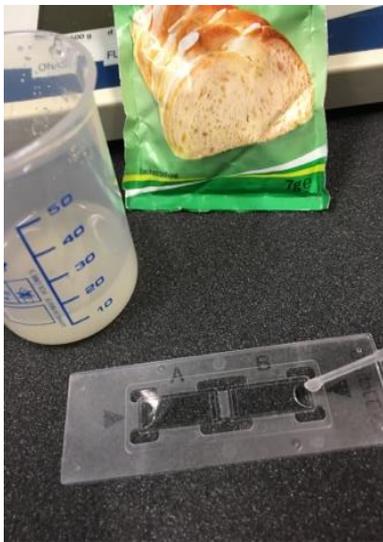


Abb. 4c: Füllen der Zählkammer

stehengelassen (s. Abb. 4a).

Im Anschluss wird die Suspension gemischt und vorsichtig mittels einer Plastiktransferpipette die Objektträger-Deckglas-Kombination der Zählkammer

(s. Abb. 4b) befüllt (s. Abb. 4c). Nach einigen Minuten haben sich die Zellen gesetzt.

Die Zählkammer wird auf dem Objektträgertisch des Mikroskops

eingespannt (s. Abb. 4d).

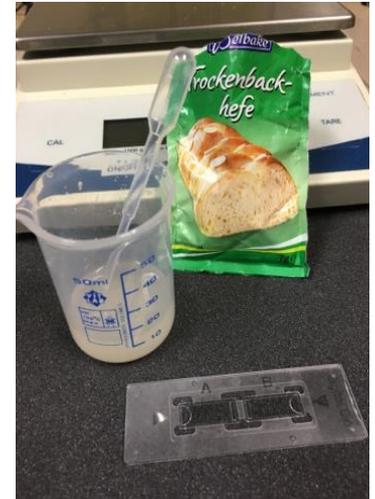


Abb. 4a: Versuchsaufbau

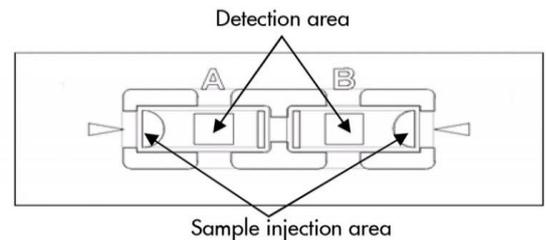


Abb. 4b: Zählkammer (www.digital-bio.com)

Auf dem Objektträger ist ein Präzisionszählraster (-gitter) eingraviert (s. Abb. 4e). Es werden die Hefezellen in jeweils 10 Kleinstquadraten gezählt (s. Abb. 4f) und daraus der Mittelwert gebildet.



Abb. 4d Mikroskop

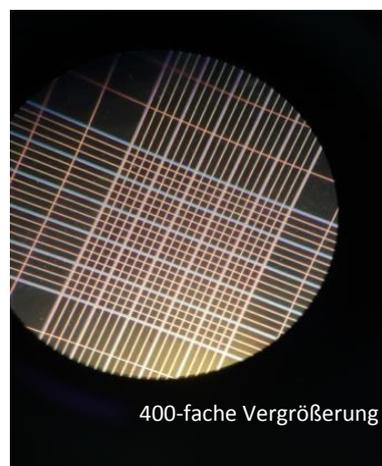


Abb. 4e: Zählgitter Übersicht

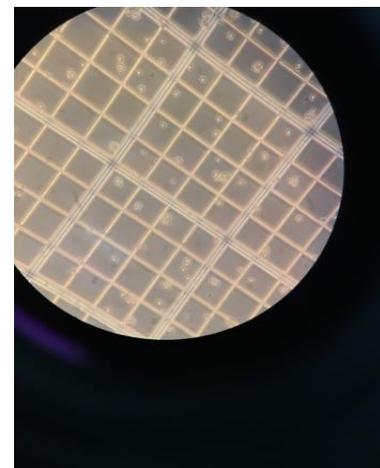


Abb. 4f: Zählgitter mit Hefezellen

Folgende 10 Kleinstquadrate werden gezählt (rot markiert):

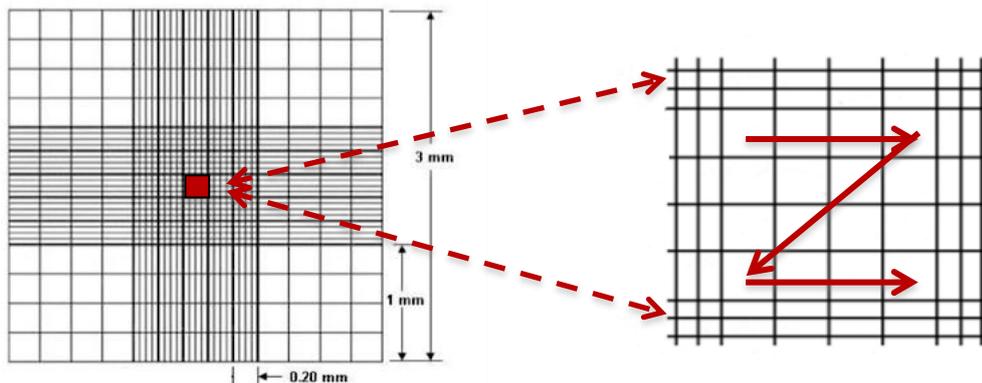


Abb. 4g: Zählgitter (verändert, www.digital-bio.com)

Beachten Sie, dass Zellen, die auf den Grenzlinien liegen, nicht doppelt gezählt werden; dies kann dadurch vermieden werden, dass nur solche Zellen mitgezählt werden, die z.B. oben und links auf den Linien liegen. Die 10 Einzelwerte der Kleinstquadrate (siehe Detail Abb. 4g) werden notiert:

Ergebnis der Hefezählung in der Zählkammer pro Kleinstquadrat:

2	3	2	1	3	2	1	3	2	2
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Abmessung eines Kleinstquadrats:

Länge = 0,05 mm

Breite = 0,05 mm

Höhe = 0,1 mm

Aufgaben:

4.1: Begründen Sie, warum 10 Kleinstquadrate ausgezählt werden:

Um mögliche Inhomogenität der Probe auszugleichen, müssen möglichst viele Kleinstquadrate ausgezählt werden.

4.2: Bestimmen Sie den Mittelwert der Zellzahl für die 10 Kleinstquadrate:

$$21 : 10 = 2,1$$

4.1: Berechnung der Hefezellzahl pro ml im Kulturmedium (Zellkonzentration):

Das Volumen über einem Kleinstquadrat beträgt:

$$0,05\text{mm} \times 0,05\text{mm} \times 0,1\text{mm} = 0,00025 \text{ mm}^3 \quad (1 \text{ mm}^3 = 1 \mu\text{l}; 1000 \mu\text{l} = 1\text{ml})$$

Berechnung der Zellzahl pro ml:

$$\text{Mittelwert Zellzahl pro Kleinstquadrat} \times 1000 : 0,00025 \text{ mm}^3 = \text{Zellen pro ml}$$

$$\text{Bsp.} \Rightarrow 2,1 \times 4 \times 10^6 \text{ Zellen/ml} \Rightarrow 8,4 \times 10^6 \text{ Zellen/ml.}$$