

Arbeitsgruppe D 6

Clara Dees  
 Susanne Duncker  
 Anja Hartmann  
 Kristin Hofmann

## Protokoll

*Einleitung*

Im heutigen Kurs sollen die Bakterienwuchskurven zweier E.coli-Kulturen, von denen eine mit einem Antibiotikum versetzt ist, bestimmt werden. In einem zweiten Versuch wird die Wirkung verschiedener Antibiotika auf Kulturen von E.coli C 600 und E.coli pFT240 überprüft.

*Material und Methoden*

Im ersten Versuchsteil werden, wie in der Versuchsanleitung angegeben, in regelmäßigen Abständen Proben der zwei Kulturen entnommen - deren optische Dichte im Photometer gemessen wird - und in unterschiedlichen Verdünnungen auf Nährböden aufgebracht (getitert). Entgegen der Kursanleitung wurde nur mit zwei und nicht drei Kulturen (d.h. mit nur einem Antibiotikum statt zwei) gearbeitet. Das verwendete Antibiotikum ist Tetracyclin.

Für den zweiten Versuch werden die zwei o.g. E.coli-Stämme in Weichagar gegossen und anschließend mit den Antibiotika Ampicillin, Erythromycin, Chloramphenicol, Streptomycin, Tetrazyklin und Penicillin bestempelt. Danach werden sie 24 Stunden bebrütet.

*Auswertung Versuch 1*

Die gemessenen bzw. bestimmten Werte für die optische Dichte und die Zellzahl sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt und im Diagramm 1 und 2 graphisch dargestellt.

Zeit (in min)	Kultur A							
	oD	N bei $10^{-4}$	Titer*	N bei $10^{-5}$	Titer	N bei $10^{-6}$	Titer	$\bar{\Omega}$ Titer
30	0,115	353	$3,5 \cdot 10^7$	55	$5,5 \cdot 10^7$	5	$5,0 \cdot 10^7$	$4,7 \cdot 10^7$
60	0,176	468	$4,7 \cdot 10^7$	61	$6,1 \cdot 10^7$	6	$6,0 \cdot 10^7$	$5,7 \cdot 10^7$
90	0,268	796	$8,0 \cdot 10^7$	69	$5,9 \cdot 10^7$	8	$8,0 \cdot 10^7$	$7,6 \cdot 10^7$
120	0,36	849	$8,5 \cdot 10^7$	96	$9,6 \cdot 10^7$	5	$5,0 \cdot 10^7$	$7,7 \cdot 10^7$
150	0,49	936	$9,4 \cdot 10^7$	223	$2,2 \cdot 10^8$	25	$2,5 \cdot 10^8$	$1,9 \cdot 10^8$
180	0,674	858	$8,6 \cdot 10^7$	337	$3,4 \cdot 10^8$	42	$4,2 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^8$
210	0,83	3027	$3,0 \cdot 10^8$	527	$5,3 \cdot 10^8$	65	$6,5 \cdot 10^8$	$4,9 \cdot 10^8$
Kultur B								
150	0,42	1076	$1,1 \cdot 10^8$	139	$1,4 \cdot 10^8$	10	$1,0 \cdot 10^8$	$1,15 \cdot 10^8$
180	0,46	986	$9,9 \cdot 10^7$	192	$1,9 \cdot 10^8$	25	$2,5 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$
210	0,47	957	$9,6 \cdot 10^7$	199	$2,0 \cdot 10^8$	32	$3,2 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$

\* Der Titer wird folgendermaßen bestimmt: Zellzahl N dividiert durch die Verdünnungsstufe. Die resultierende Zahl wird durch 0,1 ml dividiert, da auf die Platten 100 $\mu$ l aufgebracht wurde, der Titer aber pro 1ml angegeben wird.

Die Titerkurve der ungeimpften E.coli verhält sich erwartungsgemäß und zeigt am Anfang, etwa bis zur vierten Messung, eine Phase noch-nicht-exponentiellen Wachstums (rote Trendlinie), die man als lag-Phase deuten könnte. In der nachfolgenden Phase zeigt die Kultur ein annähernd exponentielles Wachstum. Die schwarze Trendlinie zeigt den theoretischen Verlauf der log-Phase mit exponentiellem Wachstum. Bei weiteren Messungen hätten sich auch die Stationär- und die Sterbephase gezeigt.

Wie erwartet verhält sich die Kurve der mit Tetracyclin beimpften Bakterien anders als die Wuchskurve der ungeimpften Kultur. Hier setzt nach Zugabe des Antibiotikums nach 120 min eine Phase geringeren Wachstums ein, die eine Übergangsphase zwischen der Phase logarithmischen Wachstums und der Stationärphase darstellt. Tetracycline wirken als Translationshemmer in der Proteinbiosynthese, d.h. die Bakterien werden nur an der Vermehrung gehindert, nicht abgetötet. Tetrazyklin ist daher ein bakteriostatisches Antibiotikum.

Aus dem Graphen von N gegen t kann man die Generationszeit der Bakterien ablesen. Die Generationszeit ist diejenige Zeitspanne in der sich die Zahl der Bakterien verdoppelt. Mit Hilfe der schwarzen Trendlinie im Diagramm 2 kann man sehen, dass sie bei der E.coli-Kultur etwa 34 Minuten beträgt.

Für die Eichkurve (Diagramm 3) wird die Zellzahl N gegen die optische Dichte aufgetragen. Aus der Kurve (bzw. ihrer Trendlinie) kann man ablesen, wie hoch der Titer bei einer bestimmten optischen Dichte ist.

Hauptfehlerquelle bei diesem Versuch ist wahrscheinlich das Zählen der Kolonien, da man sich – besonders bei Ablenkung im Kurssaal – leicht verzählen kann. Zweite große Fehlerquelle ist das Anlegen der Verdünnungsreihe, wobei schon kleine Mengen im falschen Röhrchen das Versuchsergebnis beeinflussen können.

### Auswertung Versuch 2

Die Antibiotika-Konzentration pro Blättchen und die für die 2 E.coli-Stämme gemessenen Hemmhof-Durchmesser sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Auf den Seiten 14 und 15 im Skript gibt zeigt eine Tabelle für verschiedene Antibiotika an, bei welchem Hemmhof-Durchmesser der darauf getestete Mikroorganismus resistent bzw. sensitiv ist. Die Resistenzdurchmesser für die sechs getesteten Antibiotika sind ebenfalls in der Auswertungstabelle angegeben.

Antibiotikum	Konzentration / Blättchen	$\varnothing$ mm E.coli C 600*	$\varnothing$ mm E.coli pft 240*	Resistenzdurchmesser
Ampicillin	10 $\mu$ g	19	0	$\leq$ 11 (bez. auf 30 $\mu$ g)
Erythromycin	10 $\mu$ g	12	7	$\leq$ 13 (bez. auf 15 $\mu$ g)
Streptomycin	10 $\mu$ g	0	14	$\leq$ 11
Penicillin	10 Einheiten	7	0	$\leq$ 20
Chloramphenicol	10 $\mu$ g	18	0	$\leq$ 12 (bez. auf 30 $\mu$ g)
Tetrazyklin	10 $\mu$ g	27	24	$\leq$ 9 (bez. auf 30 $\mu$ g)

\* Die Blättchen haben einen Durchmesser von 0,6cm.

Für vier der sechs Antibiotika ist der angegebene Tabellenwert auf eine höhere als die im Versuch verwendete Konzentration bezogen. Das bedeutet, dass der für 10  $\mu$ g geltende Resistenzdurchmesser kleiner als der Tabellenwert sein muss, da bei geringerer Konzentration

## Kurs 1 - Bakterienwuchskurve

die „Reichweite“ des Antibiotikums geringer ist und auch die sensitiven Bakterien näher an das Blättchen heranwachsen können.

E.coli C 600 ist resistent gegen Streptomycin und Penicillin, da seine Hemmhöfe bei diesen Antibiotika kleiner als 20mm (Penicillin) bzw. kleiner als 11mm (Streptomycin) sind. Gegen die anderen vier Antibiotika ist E.coli C 600 sensitiv, da seine Hemmhöfe größer als die in der Tabelle angegebenen Resistenzdurchmesser sind.

E.coli pFT 240 ist resistent gegen Ampicillin, Polymyxin, Erythromycin und Chloramphenicol. Für diese vier Antibiotika sind seine Hemmhöfe kleiner als die „nötigen“ Resistenzdurchmesser. Gegen Tetrazyklin und Streptomycin besteht eine Sensitivität, da hier die Hemmhöfe größer als der jeweilige Resistenzdurchmesser sind.

Da dieser Versuch recht schnell durchzuführen ist, gibt es bis auf die Handhabung des Weichagars keine größeren Fehlerquellen.

### Bakterienwuchskurve

Titer



