

Einzelprotokoll

Schreiber: Dennis [REDACTED]
Partner: Stephanie [REDACTED]

Versuchsanfang: 11.06.2002
Versuchsende: 11.06.2002

Thema

Erstellen einer Wachstumskurve von E. coli und Bestimmung der Teilungsrate

Aufgabe

Im Fermenter werden E. coli Bakterien kultiviert, um nach bestimmten Zeiten die Konzentration durch Ermittlung der Extinktion im Photometer zu bestimmen. Mit diesen Werten und mit Hilfe der zuvor erstellten Eichgeraden lässt sich dann über die Wachstumskurve die Teilungsrate von E. coli bestimmen

Versuchsdurchführung

Herstellung von Nährbouillon

Originalrezept:

8 g Nährbouillon auf 1 Liter H₂O

Umrechnung:

$8 \text{ g} \times 250 \text{ ml} / 1000 \text{ ml} = 2 \text{ g}$ Nährbouillon werden für 250 ml Lösung benötigt

1. der Erlenmeyerkolben wird für 20 min bei 128°C mit Kappe autoklaviert
2. 2 g Nährbouillon werden auf der Analysenwaage eingewogen, quantitativ in den Kolben überführt und mit 250 ml H₂O dest (aus dem Messkolben) vermischt
3. mit Hilfe des Magnetrührers und des Rührfisches wird das Gemisch homogenisiert
4. der pH-Wert wird mittels pH-Meter auf ~7,0 eingestellt

Kultivierung der E. coli Bakterien

5. der Nährbouillon von allen Gruppen (~1000ml insg.) wird in den Fermenter gegeben
6. etwas Stammlösung (~20ml) E. coli K-12 kommt hinzu
7. die Anschlüsse am Fermenter werden kontrolliert und dieser wird eingeschaltet
8. Einstellungen am Fermenter:
Temp.: 37°C
pH: 7,2
Agitation: 90 rpm
Luftzufuhr: Eingeschaltet

Photometrische Messungen der Bakteriensuspension

9. das Photometer wird eingeschaltet und auf die Wellenlänge 560nm eingestellt (Absorptionsmaximum).
10. eine Küvette wird mit Nährbouillon zu $\frac{3}{4}$ gefüllt, in die erste Kammer des Photometers gegeben (=Referenzprobe) und der Nullabgleich durchgeführt
11. nun werden mit der Einwegspritze 4ml der Suspension im Fermenter über den Ablassschlauch abgenommen, in eine Küvette gegeben und diese (unverzüglich!) in die zweite Kammer des Photometers gegeben. Der Wert für die Extinktion und die Uhrzeit werden notiert
12. Schritt 7 in ca. 10-15 minütlichen Abständen wiederholen

13. liegt der Wert der Extinktion über 0,8 so sollte man eine Verdünnung von der Bakteriensuspension mit der Nährlösung in der Küvette durchführen (1:1) und dann den Wert der Extinktion entsprechend angleichen (x2).

14. mit Hilfe des PC's wird eine Wachstumskurve erstellt

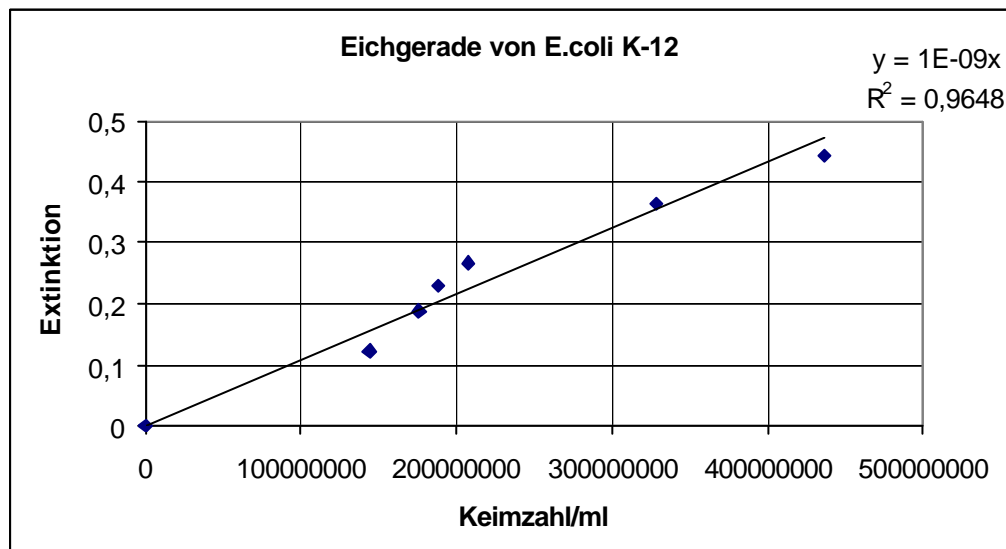
15. mit Hilfe der Regressionsgeraden wird der lineare Bereich des Graphen ausgewählt und mit einigen Wertepaaren aus diesem Abschnitt wird dann die Teilungsrate (und ggf. die Generationszeit) errechnet.

Ergebnis

Eichgerade von E. coli

Damit die gemessenen Wertepaare glaubwürdig erscheinen, haben wir vor diesem Versuch eine Eichgerade für E. coli bestimmt, indem wir für spezielle Keimzahldichten die Extinktion mittels Photometer ($\lambda = 560\text{nm}$) bestimmt haben. Die Keimzahldichten wurden mittels Thomakammer bestimmt:

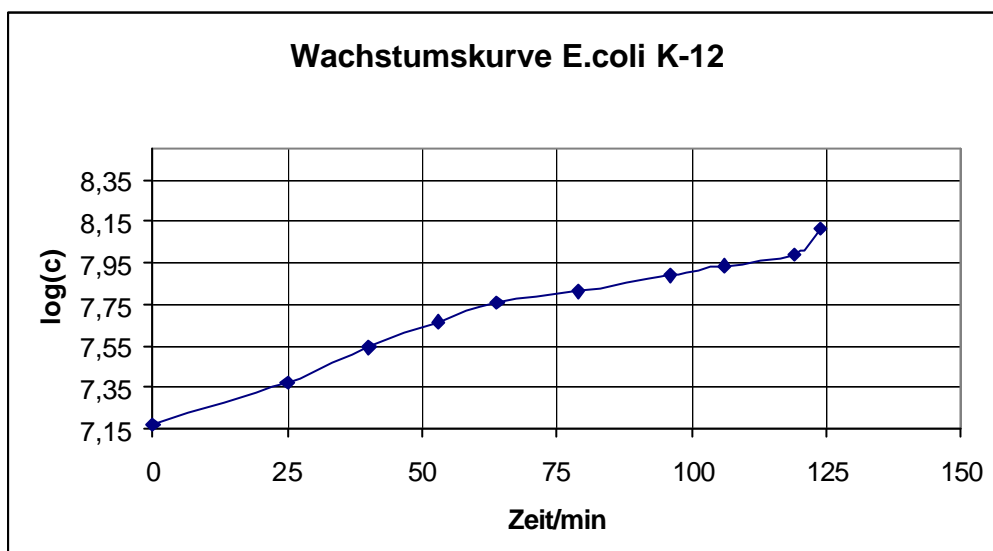
KEIMZAHL	EXTINKTION
0	0
4,36E+08	0,44
3,28E+08	0,365
2,08E+08	0,268
1,88E+08	0,231
1,76E+08	0,189
1,44E+08	0,123



Da sich hier ein relativer linearer Zusammenhang zwischen der Keimzahl pro ml und der Extinktion feststellen lässt, können wir auf die gleiche Weise eine Wachstumskurve erstellen:

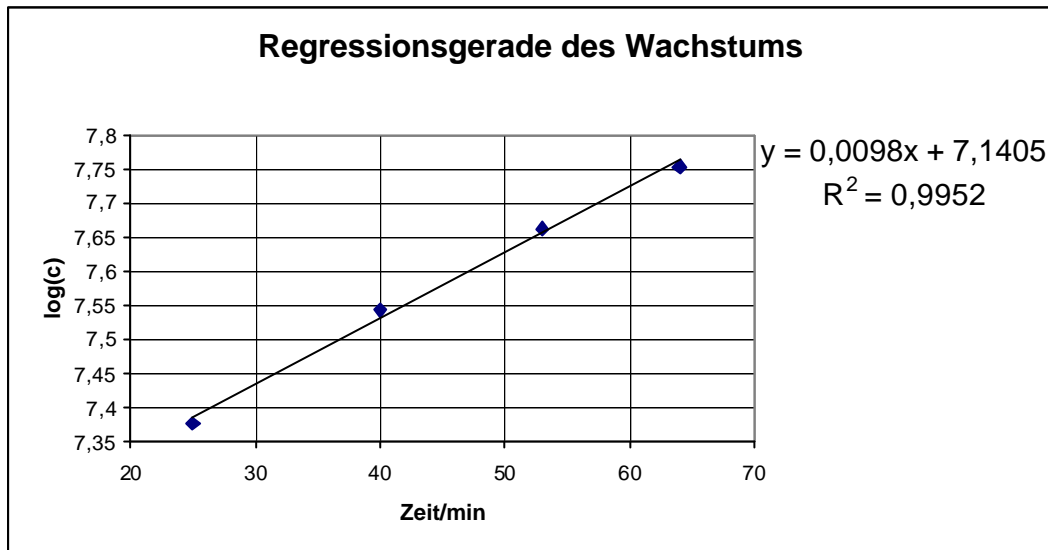
Wachstumskurve von *E. coli*

Uhrzeit	Zeit/min	Extinktion	c	log (c)
9:11	0	0,15	15000000	7,17609126
9:36	25	0,237	23700000	7,37474835
9:51	40	0,35	35000000	7,54406804
10:04	53	0,461	46100000	7,66370093
10:15	64	0,57	57000000	7,75587486
10:30	79	0,64	64000000	7,80617997
10:47	96	0,77	77000000	7,88649073
10:57	106	0,853	85300000	7,93094903
11:10	119	0,97	97000000	7,98677173
11:23	124	1,284	128400000	8,10856502



Um einen linearen Zusammenhang zu erstellen wurden die Werte der Zelldichte (= c) logarithmiert und gegen die Zeit in Minuten aufgetragen. Der letzte Wert (11:23 Uhr) wurde mit einer verdünnten Bakteriensuspension ermittelt (1:1 mit Nährbouillon, Extinktion x2).

Bei der Erstellung einer Regressionsgeraden wurden nun die Werte von 9:36 Uhr bis 10:15 Uhr verwendet, da mir der Graph bei diesen Wertepaaren am linearsten erschien:



Mit Hilfe der Formel für die Teilungsrate eines Bakteriums lässt sich selbige nun bestimmen:

$$v = \text{Lg}(N_2) - \text{Lg}(N_1) / \text{Lg}(2) * (t_2 - t_1)$$

bei Einsetzen von 2 Wertepaaren ergibt sich:

$$v = 7,75587486 - 7,37474835 / \text{Lg}(2) * (64 - 25) = 0,03246346 \text{ Teilungen pro Stunde für E. coli}$$

Dies entspricht einer Generationszeit ($g = 1 / v$) von ca. 30 Minuten, was mit dem Literaturwert übereinstimmt

Diskussion

Die Methode der Trübungsmessung mit Hilfe des Photometers stellt ein relativ einfaches Verfahren zur quantitativen Bestimmung einer Bakteriensuspension dar. Allerdings müssen einige Rahmenbedingungen eingehalten werden, damit diese Messungen Gültigkeit haben. So sollte die Extinktion in der Suspension unter 0,8 liegen, damit das Lambert-Beer'sche Gesetz angewendet werden kann. Bei zu hoher Konzentration könnten sich die Bakterien in der Suspension gegenseitig abdecken und es kommt zu einem verfälschten Extinktionswert, wodurch der lineare Zusammenhang von Extinktion und Zelldichte nicht mehr gegeben ist

Fehlerquellen

- da die Umweltbedingungen in der Stammlösung denen des Nährbouillons im Fermenter entsprachen, konnten die Bakterien ohne Anlaufphase (= Einstellung der Enzyme auf neue Nährstoffquellen) direkt in der Wachstumsphase bleiben, was eine relativ hohen Ausgangswert für die Extinktion zur Folge hatte.
- da der Fermenter nicht autoklaviert wurde konnten zusätzliche Keime das Ergebnis verfälschen