

Stephanie [REDACTED]  
BTA-OH  
Gruppe A, Arbeitsplatz 7  
Partner: Martin [REDACTED]

Einzelprotokoll  
über den Versuch vom  
17./18.09.2002

## **„Antibiotika“**

(Konzentrationsbestimmung)

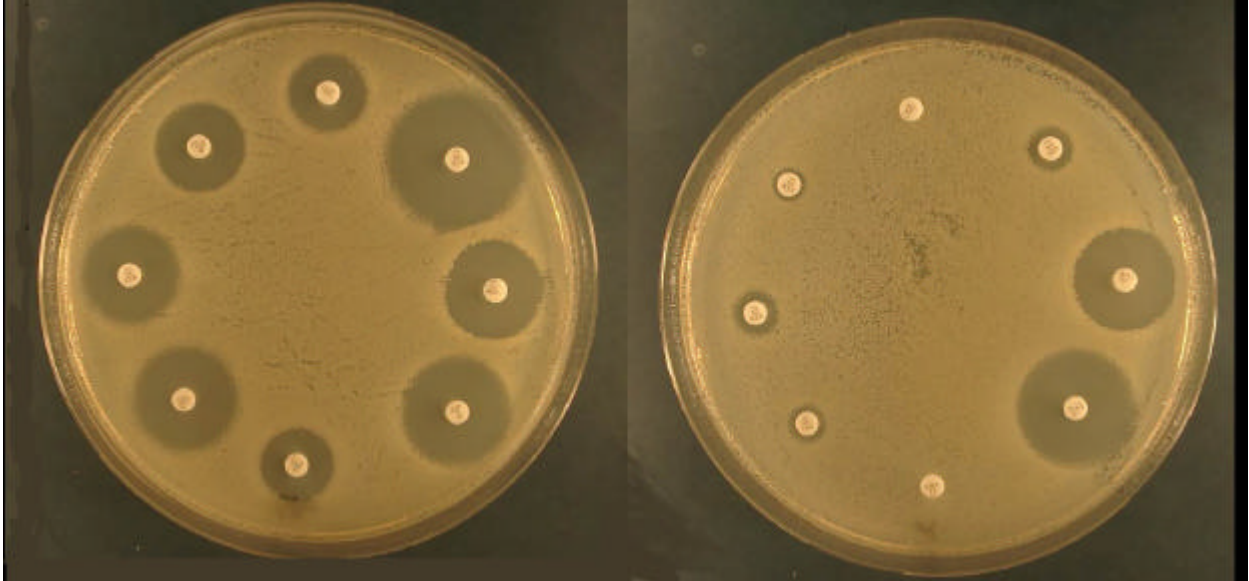
**Mikrobiologisches Praktikum**  
Berufskolleg Kartäuserwall  
Kartäuserwall 30, Köln

Hr. Cichos / Fr. Hankemann

## Bestimmung der Streptomycinkonzentration einer unbekannt Probe durch Agardiffusionstest

### Aufgabe / Prinzip

Mit Hilfe von Bakterien des Stammes *Bacillus subtilis* soll die Konzentration einer unbekannt Streptomycinlösung bestimmt werden. Hierzu verwendet man das Prinzip des Agardiffusionstests: man beimpft zwei Platten mit einem Mikroorganismus, der genügend sensibel auf die zu untersuchende Substanz reagiert. Die eine Platte wird mit unterschiedlichen Proben bekannter Konzentration behandelt (= in vorgebohrte Löcher im Agar gegeben), die andere Platte wird mit der unbekannt Probe behandelt. Die Testsubstanz diffundiert aus den Löchern in den Agar und hemmt so das Wachstum der Mikroorganismen in unterschiedlichem Maße, je nach Konzentration. Durch die Wirkung des Antibiotikums entstehen um die Löcher Höfe ohne Wachstum:



Man kann nun diese Höfe ausmessen und die Werte des Standards mit denen der unbekannt Probe vergleichen. Durch Erstellen einer Eichgerade kann man die Konzentration der Probe ermitteln.

### Durchführung

- Schüttelbad auf 45°C vorheizen
- 250 ml Antibioticaagar Nr. 5 herstellen = 6,375 g / 250 ml
- autoklavieren: 20 min bei 128°C
- Agar im Schüttelbad auf etwa 45°C herunterkühlen, sodass er nicht ausflockt
- eine Ampulle *Bacillus subtilis* steril in den Agar überführen
- Agar im Schüttelbad nochmals gründlich durchmischen
- mit dem beimpften Agar zwei große Platten gießen und im Kühlschrank vollständig erstarren lassen
- Streptomycin-Stammlösung herstellen: 32mg / l
- Stammlösung mit einer 2er-Reihe in 6 Schritten verdünnen (16, 8, 4, 2, 1 und 0,5 mg/l)
- unbekannte Probelösung in einer 3er-Reihe in 5 Schritten verdünnen (1:3, 1:9, 1:27, 1:81, 1:243)
- in beide Platten mit einem Korkbohrer 6 Löcher bohren und den losen Agar entfernen

- Volumen der Löcher berechnen ( $V=\pi \cdot r^2 \cdot h$ ), um das zu pipettierende Volumen der Streptomycinlösung zu bestimmen:
  - $r^2 = (4 \text{ mm})^2 = 16 \text{ mm}^2$
  - $h = 6 \text{ mm}$
  - $V = 16 \text{ mm}^2 \cdot 6 \text{ mm} \cdot \pi$
  - $= 301,59 \text{ mm}^3$
- in alle Löcher vorsichtig etwas weniger als das berechnete Volumen pipettieren: 250  $\mu\text{l}$
- die Platten bei 37°C über Nacht im Brutschrank bebrüten
- zur Auswertung werden die entstandenen Hemmhöfe mit einer Schieblehre gemessen
- die Konzentration der unbekanntes Probe wird graphisch und rechnerisch ermittelt

### Materialien

Medium: Antibiotica-Agar Nr.5  
6,375g auf 250 ml  
pH 7,9

Untersuchungsmaterial: Streptomycinlösung VIII, unbekanntes Konzentration

Mikroorganismen: 2 ml-Ampulle Bacillus subtilis ( $10^7$  KBE/ml), BGA-Sporensuspension von Merck

Geräte: 2 große, sterile Petrischalen  
Meßkolben, 250 ml  
Erlenmeyerkolben, 250 ml  
Korkbohrer, Durchmesser 8 mm  
Schieblehre  
Eppendorfpipette

Chemikalien: Streptomycin

### Ergebnisse

Hemmhöfe Standard / Stammlösung

Konzentration	Durchmesser	Radius
16 mg/l	1,92 cm	0,56 cm
8 mg/l	1,43 cm	0,32 cm

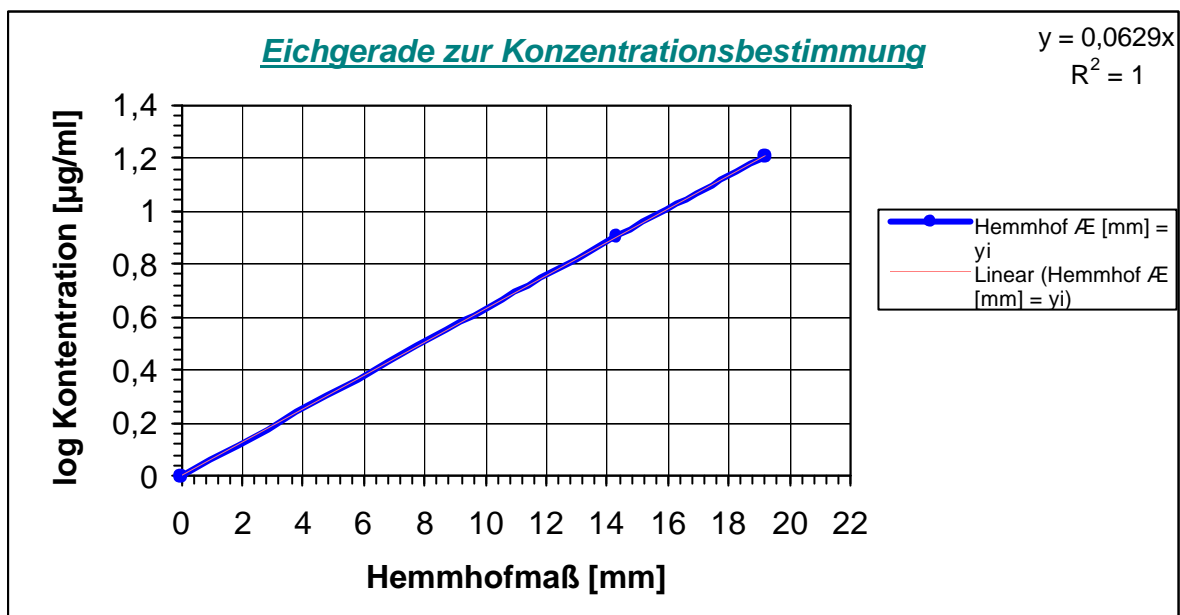
Hemmhöfe Testlösung

Verdünnung	Durchmesser	Radius
pur	3,75 cm	1,48 cm
1:3	3,23 cm	1,22 cm
1:9	2,85 cm	1,03 cm
1:27	2,52 cm	0,86 cm
1:81	2,16 cm	0,68 cm
1:243	1,88 cm	0,54 cm

## Auswertung

Es können nur die Probenwerte ausgewertet werden, die sich innerhalb der Standardwerte befinden, also in unserem Fall zwischen 14,3 und 19,2 mm. Leider ist das bei uns nur ein Wert: 18,8 mm bei einer Verdünnung von 1:243. Mit den Standardwerten wird nun eine Eichgerade erstellt = Hemmhofdurchmesser [mm] gegen log Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]:

Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ] = c	$\log c = x_i$	Hemmhof $\varnothing$ [mm] = $y_i$
16	1,204119983	19,2
8	0,903089987	14,3
0	0	0



1. zeichnerische Auswertung

In die Eichgerade wird der gemessene Wert auf der x-Achse eingetragen und zum Graphen verlängert, damit man ihn auf der y-Achse ablesen kann. Der abgelesene Wert muss nun noch entlogarithmiert werden, und der Verdünnungsfaktor muss herausgerechnet werden:

log Konzentration = 1,16  $\mu\text{g/ml}$

### Rechnung:

$e^{1,18} = 3,254 \mu\text{g/ml}$  bei einer Verdünnung von 1:243 bzw. VF  $3^5$

$3,25 \mu\text{g/ml} * 3^5 = \mathbf{790,81 \mu\text{g/ml}}$

Zeichnerisch bestimmt enthält die Ausgangsprobe Nr. VIII 775,2  $\mu\text{g/ml}$  Streptomycin.

2. rechnerische Auswertung

Man berechnet die Steigung der Geraden (in Excel Regressionsgerade über die Eichgerade legen und mit Geradengleichung und Formel angeben lassen) und setzt die ermittelten Werte in die Geradengleichung  $y=bx+a$  ein:

$b = 0,0629$  (Steigung der Geraden)  
 $a = 0$  (Verschiebung auf der y-Achse)  
 $x = 18,8$

$y = 0,0629 \cdot 18,8 = 1,183$   
 $e^{1,183} = 3,264$  bei einer Verdünnung von 1 :243 bzw. VF  $3^5$   
 $3,26 \mu\text{g/ml} \cdot 3^5 = \mathbf{792,18 \mu\text{g/ml}}$

### **Fehlerdiskussion**

Hemmhöfe sind im Standard nur bei den ersten beiden Verdünnungen entstanden. Bereits ab einer Konzentration von  $4 \mu\text{g/ml}$  sind keine Höfe mehr erkennbar. Dadurch hat man keine richtige Standardreihe. Die Konzentration der Stammlösung müsste erhöht werden.

Die rechnerisch und zeichnerisch ermittelten Werte liegen relativ nah aneinander. Man kann also davon ausgehen, dass das Ergebnis repräsentativ ist. Dennoch konnte die Eichgerade mit lediglich 2 Werten aufgestellt werden und von der Probe stand nur ein Wert zur Verfügung. Hieraus resultiert eine gewisse Ungenauigkeit. Es konnten nicht mehrere Werte miteinander verglichen werden.

### **Literaturangaben**

Internet