

Wirksamkeit von Chemotherapeutika und Antibiotika

Einleitung und Prinzip:

Antibiotika können bakteriocid, bakteriolytisch und bakteriostatisch wirken, haben wir in den letzten Unterrichtsstunden erarbeitet.

Ein bakteriostatisches Antibiotikum hemmt nur das Wachstum der Bakterien und lässt die Zellen am leben, das heißt lässt die Wirkung des Antibiotika nach wachsen die Bakterien wieder.

Ein bakteriocides Antibiotikum tötet die Bakterien ab, wenn man die Keimzahl bestimmt, würde sich nichts ändern, aber wenn man die Lebendkeimzahl bestimmt, wäre diese kleiner.

Ein bakteriolytisches Antibiotikum löst die Bakterienzellen auf, bei diesen Antibiotika ändert sich auch die Gesamtkeimzahl.

Wie wollen jetzt in unserem Fall wissen wie das Streptomycin wirkt, mit dem wir schon im letzten Versuch gearbeitet haben. Da mussten wir die Konzentration einer unbekanntes Streptomycinlösung mit Hilfe des Agardiffusionstest herausbekommen. In diesem Versuch versuchen wir mit Hilfe der Transmission zu ergründen ob Streptomycin bakteriostatisch, bakteriocid oder bakteriolytisch wirkt.

Aus diesem Grund wird von Bacillus subtilis eine Übernachtskultur angesetzt, damit genügend Keime für den Versuch vorhanden sind. Am nächsten Tag wird diese Kultur in zwei Erlenmyerkolben mit 37°C wahren Nährmedium gegeben (1mL) und bei dieser Temperatur in den Schüttler mit 100U/min gestellt, damit sie wachsen. Wenn sich die Kulturen im logarithmischen Wachstum befinden gibt zur einer Kultur Streptomycin (400µg/mL) hinzu und beobachtet das Verhalten der Kulturen. Die eine Kultur mit Streptomycin muss in ihrem Wachstum gestört werden, während die andere ungestört wachsen kann. Nach dem Versuch werden die Transmissionswerte in einen Graphen aufgetragen, so dass zwei Kurven vorhanden sind. Eine Kurve muss das Wachstum deutlich zeigen und die andere das gestörte Wachstum. Aus dem Verlauf der Kurve lässt sich auf die Wirkungsweise des Antibiotikas schließen.

Material:

Geräte:

1. Schutzbrille
2. Schutzhandschuhe
3. Bunsenbrenner
4. Kleine Petrischale
5. Spritzflasche
6. Einwegpipette
7. Pinzette
8. Impföse

9. 3 300mL Erlenmyerkolben
10. 3 große Kulturkappen
11. Analysenwaage
12. Spatel
13. PH-Meter
14. 100 mL Becherglas
15. Autoklaven
16. Sterile Werkbank
17. Schüttler (auto shake/ Braun)
18. 2mL Küvetten
19. Photometer (Pharmacia)
20. 10mL Messkolben

Chemikalien:

1. 1 Ampulle Bacillus subtilis für die Übernachtskultur
2. Streptomycinsulfat für die eine Kultur
3. Nährbouillon Standart I
4. H₂O_{dest}

Berechnungen für den Versuch:

1. *Berechnung für die Einwaage der Nährbouillon*

Es sollen 250mL Nährbouillon erstellt werden:

1000mL enthalten 25g

250mL enthalten Xg

$$250\text{mL} * 25\text{g} / 1000\text{mL} = 6,25\text{g}$$

2. *Berechnung der Streptomycineinwaage:*

Wie viel Streptomycin muss in den 250mL enthalten sein?

$$250\text{mL} * 400\mu\text{g} = 100000 \mu\text{g} = 100\text{mg}$$

Wie viel Streptomycin muss ich einwiegen?

M_{St}: 1163,23g/mol M_{StS}: 1457,39g/mol

100mg entsprechen 1163,23g/mol

Xmg entsprechen 1457,39g/mol

$$X = 0,1\text{g} * 1457,39\text{g/mol} / 1163,23\text{g/mol} = 0,1252\text{g} = 125,2\text{mg}$$

Wie viel Streptomycin muss ich tatsächlich hinzugeben?

Das Volumen ändert sich während des Versuches, wenn die Kultur in die logarithmische Wachstumsphase gekommen ist. So nimmt man dieses Volumen und

teilt es durch das Ausgangsvolumen und erhält die mL – Angabe, die man hinzufügen muss.

Bei uns war das neue Volumen 226mL und dadurch ergab sich folgende Rechnung:

$$226\text{mL} / 250\text{mL} = 0,904\text{mL} = 904\mu\text{L}$$

Methode:

1. Für den Versuch muss eine Übernachtskultur von bacillus subtilis (b. s.) angesetzt werden:

Um die Ampulle zu öffnen wird sie mit dem Bunsenbrenner an der Spitze erhitzt und anschließend wird mit Wasser das Glas an dieser Stelle zum Zerspringen gebracht. Dieser Teil wird nun mit der Pinzette vorsichtig entfernt und das Isoliermaterial aus der Ampulle entnommen.

Das inner Röhren lässt man vorsichtig auf eine leere Petrischale gleiten

Von dem inneren Röhren wird der Baumwollpfropfen entfernt und das Röhren wird abgeflammt und mit ein paar Tropfen des Nährmediums aufgefüllt. Das Pellet darin quellen lassen und anschließend verrühren mit einer Impföse oder ähnlichem. Dann ein paar Tropfen dieser Suspension in das vorbereitete Medium geben.

2. Am nächsten Tag zwei Erlenmyerkolben mit 250ml Nährbouillon Standart I ansetzen.

3. Beide Kulturen werden mit je 2mL von der Übernachtskultur b. s. angeimpft und in den Schüttler bei 37°C mit 100U/min gestellt, damit die Bakterien wachsen.

4. Das Wachstum der Bakterien wird mit dem Photometer anhand der Transmission überprüft. Gemessen wird gegen reines Nährmedium bei 546nm. Dazu wird einmal nach dem Beimpfen jeder Kultur 2mL entnommen, in entsprechende Küvetten getan und gemessen. Die nächste Messung findet nach einer Stunde statt. Alle weiteren Messungen werden von da ab im 15 Minuten Takt abgehalten.

5. Die Daten werden schriftlich fixiert und wenn sich die Kulturen im logarithmischen Wachstum befinden wird zu einer Kultur das Streptomycin hinzugegeben. Dabei ist zu beachten, dass sich das Volumen der Suspension geändert hat und es sollen nur 400µg Streptomycin pro mL enthalten sein. Aus diesem Grund wird obige Rechnung durchgeführt.

6. Nach der Streptomycinzugabe wird das Wachstum der b. s. Kulturen weiter auf die beschriebene Weise beobachtet bis ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Kulturen fest zu stellen ist und evtl. das Wachstum der Streptomycinkultur wieder ansteigt.

7. Die erhaltenen Werte werden graphisch ausgewertet.

Ergebnis:

Rohergebnisse:

Zeit in Minuten	Kontrollkultur	Streptomycinkultur
0	92,5	93,4
60	91,8	93,1
75	92,7	92,2
90	87,2	89,1
105	92,6	91,4
120	90,8	86,9
135	90,2	88,9
150	87,9	87,6
165	88,3	87

180	86,7	83,3
195	83,7	81,4
210	79,2	76,7
225	75	74,3
240	66,9	76
255	61,6	78

Die rote Zeile zeigt die erste Messung mit Streptomycin an.

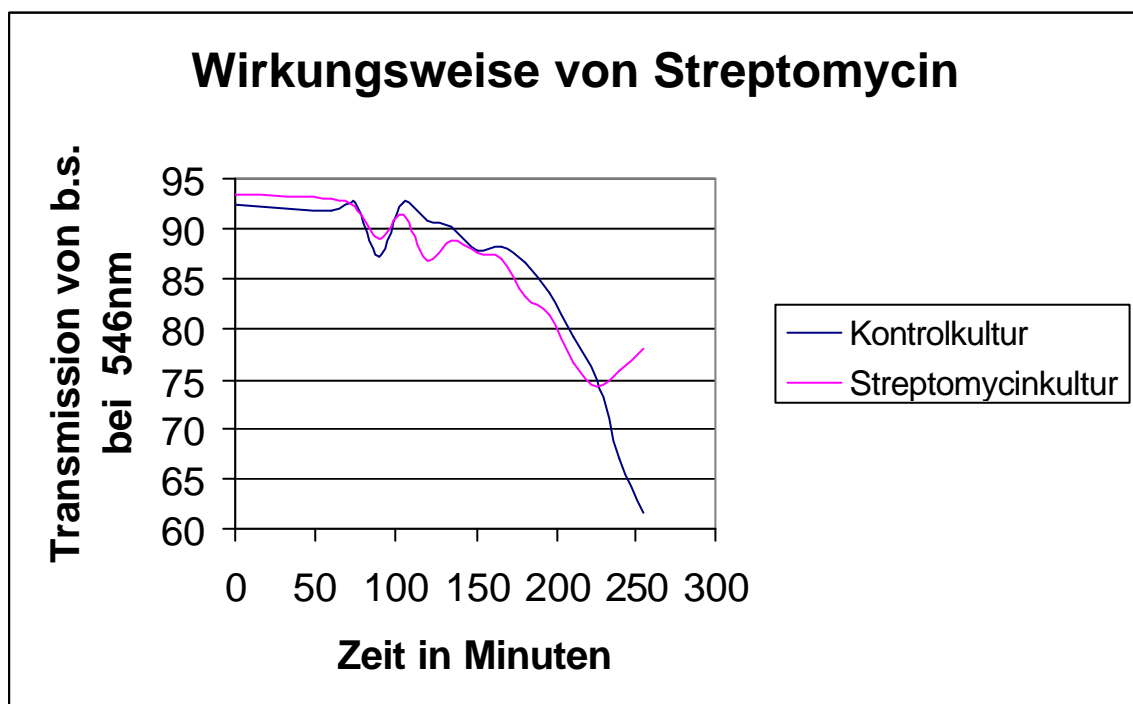
Auswertung:

In der markierten Zeile ist zwar keine Hemmung festzustellen, dies liegt aber an der Latenzzeit. Die Latenzzeit ist die Zeit, die ein Antibiotikum braucht um zu wirken.

Diese Ergebnisse werden graphisch ausgewertet, das heißt es wird ein Koordinatensystem erstellt, auf dessen x-Achse die Zeit angeführt wird und auf der y-Achse wird die Transmission von b. s. aufgetragen.

Für beide Kulturen wird ein Koordinatensystem benutzt, um einen besseren Vergleich von gehemmter und ungehemmter Kultur zu erhalten.

Den Graphen habe ich mit Hilfe des Programms Excel erstellt.



Die Transmission gibt die Durchlässigkeit eines Stoffes an, je mehr davon vorhanden ist desto lichtundurchlässiger muss er werden. Dies ist bei der Kultur der Fall, die kein Streptomycin (blaue Kurve) erhalten hat. Sie kann also ungehindert wachsen. Die Kurve für die Streptomycinkultur zeigt an, dass es sich bei Streptomycin um ein lytisches Antibiotikum handelt, da die Transmission wieder zunimmt. Eine Zunahme der Transmission bedeutet es sind weniger Zellen als vorher in der Suspension vorhanden, also müssen sich die Zellen unter dem Einfluss des Antibiotikums auflösen.

Diskussion:

Die Kurve von unserem Versuch gibt an Streptomycin sei ein lytisches Antibiotikum, dies ist aber nicht der Fall. Streptomycin ist bakteriocid, (Schulunterlagen) oder bakteriostatisch (Schlegel).

Aus zeitlichen Gründen konnten wir nicht ausreichend Messungen mit Streptomycin durchführen, dies ist daran zu erkennen dass wir nur zwei aussagekräftige Werte mit Streptomycin haben.

Wäre Streptomycin statische, müsste die Kurve nach der Zugabe des Antibiotikums gleich bleiben und dann wieder ansteigen, da ein statische Antibiotikum nur vorübergehend das Bakterium am Wachstum hindert.

Bei einem bakteriociden Antibiotikum, müsste die Kurve auch nach der Zugabe dessen gleich bleiben, aber nicht mehr ansteigen, da die Zellen getötet sind.

Wie es jetzt zu dieser fälschlichen Entwicklung kommt, kann ich ehrlich nicht genau sagen, denn anhand unsere Werte ist zu erkennen wir hatten ein Problem.

Es sind Schwankungen entstanden in der logarithmischen Wachstumsphase und ich kann mir nicht erklären woher diese kommen.

Wir haben vermutet, es könnte am Photometer liegen, bei einer Messung mit einem zweiten ergab sich dies war nicht der Fall.

Dann hätte es daran liegen können, dass die Erlenmyerkolben mit den Kulturen zu lange aus den Schüttler genommen werden und deswegen das Ergebnis verfälscht ist, aber wir haben zügig gearbeitet so das auch dies auszuschließen wäre.

Als letztes fällt mir nur noch ein Fehler beim erstellen der Nährbouillon ein, aber der könnte an jeder Stelle dieses Vorgangs passiert sein und zwar mir sowie meinem Gruppenpartner. Ich denke dies kommt auch nicht in Betracht, da auch andere Gruppen dieses Problem hatten und wir mittlerweile eine Routine im Ansetzten von Nährmedien erworben haben.

Quellen:

1. Schulunterlagen vom 9.10.02
2. Anleitung zum Versuch
3. Schlegel Kapitel 6.6.