

## **Biotechnologie der Antibiotika – Mikrobiologische Versuche**

In dem Modul Biotechnologie der Antibiotika – Mikrobiologische Versuche sollen grundlegende mikrobiologische Arbeitsmethoden vermittelt werden und die Wirkungsweise und Produktion von Antibiotika aufgezeigt werden. Die Versuche des Moduls beschäftigen sich zunächst mit der Herstellung von geeigneten Nährböden (**Agarplatten**). Mit diesen können dann Bakterien und andere Mikroorganismen aus Umweltproben und Lebensmitteln nachgewiesen werden. Als nächstes sollen Methoden zur Quantifizierung von Bakterien (**Verdünnungsreihe**), zur Herstellung einer Reinkultur (**3-Strich Methode**) und zur Charakterisierung dieser Reinkultur (**Gram-Färbung**) vorgestellt werden. Die Wirkungsweise von Antibiotika auf die verschiedenen Gruppen von Mikroorganismen wird in einem weiteren Versuch gezeigt (**Plattentest**).

Grundsätzlich kann hier nicht den Inhalt einschlägiger Lehrbücher ersetzen, er soll nur eine Orientierung geben, welche Fachbegriffe für dieses Modul wichtig sind.

### **INHALT**

- 1. Was sind Mikroorganismen und Bakterien? Überblick über die Mikroorganismen**
- 2. Natürliche Standorte der Mikroorganismen in der Umwelt**
- 3. Wachstums- und Nährstoffansprüche von Mikroorganismen**
- 4. Nachweis und Quantifizierung von Mikroorganismen**
- 5. Herstellung einer Reinkultur**
- 6. Charakterisieren von Mikroorganismen (Gram-Färbung, Antibiotika)**
- 7. Biotechnologische Herstellung von Antibiotika**
- 8. Literaturvorschläge zur Vertiefung**

## 1. Was sind Mikroorganismen und Bakterien? Überblick über die Mikroorganismen

Mikroorganismen, manchmal umgangssprachlich auch "Mikroben" genannt, sind mikroskopisch kleine Organismen mit eigenem Stoffwechsel, die als einzelne Individuen mit bloßem Auge in der Regel nicht zu erkennen sind. Erst in Massen, etwa in einer Kolonie, wie sie beispielsweise auf einem Nährboden entsteht, werden sie für das bloße Auge sichtbar. Ansonsten sind sie nur mit Hilfe eines Vergrößerungsinstruments, zum Beispiel eines Mikroskops, zu erkennen und zu beobachten.

Die meisten Mikroorganismen sind Einzeller.

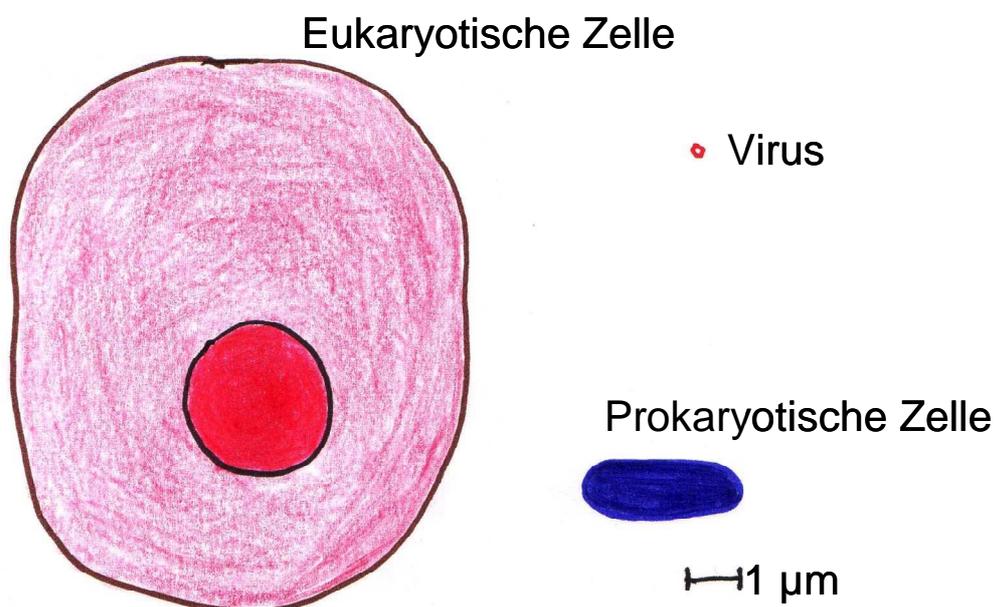


Abb. 1: Größenvergleich zwischen einer eukaryotischen und einer prokaryotischen Zelle und einem Virus.

Beispiele für Mikroorganismen sind Bakterien (Beispiel: zur Herstellung von Sauermilchprodukten verwendete Milchsäurebakterien), viele Pilze (Beispiel: für Gärungen und zum Backen verwendete Hefen), mikroskopische Algen (Beispiel: die zur Ergänzung der Nahrung verwendeten Chlorellen) und Protozoen (Beispiel: Pantoffeltierchen *Paramecium* und die Malaria-Erreger *Plasmodium*).

Die Mikroorganismen lassen sich in drei großen Gruppen der Organismen, den Eukarya (oder auch Eukaryonten), den Bacteria und den Archaea einteilen. Bacteria und Archaea sind Einzeller ohne Zellkern und werden auch als Prokaryonten zusammengefasst während die Eukaryonten, zu denen auch alle Tiere, Pflanzen und Pilze gehören, immer einen Zellkern haben. Allerdings stehen sich stammesgeschichtlich die Archaea und die Eukarya etwas näher als die Bacteria und die Eukarya.

Bacteria und einzellige Eukarya können leicht aufgrund des unterschiedlichen Zellaufbaus, der Größe und des Stoffwechsels voneinander unterschieden werden.

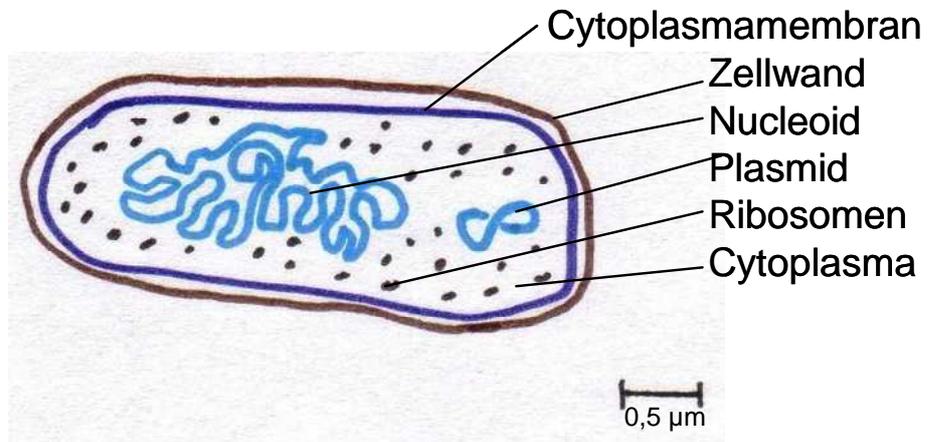


Abb. 2: Aufbau einer prokaryotischen Zellen

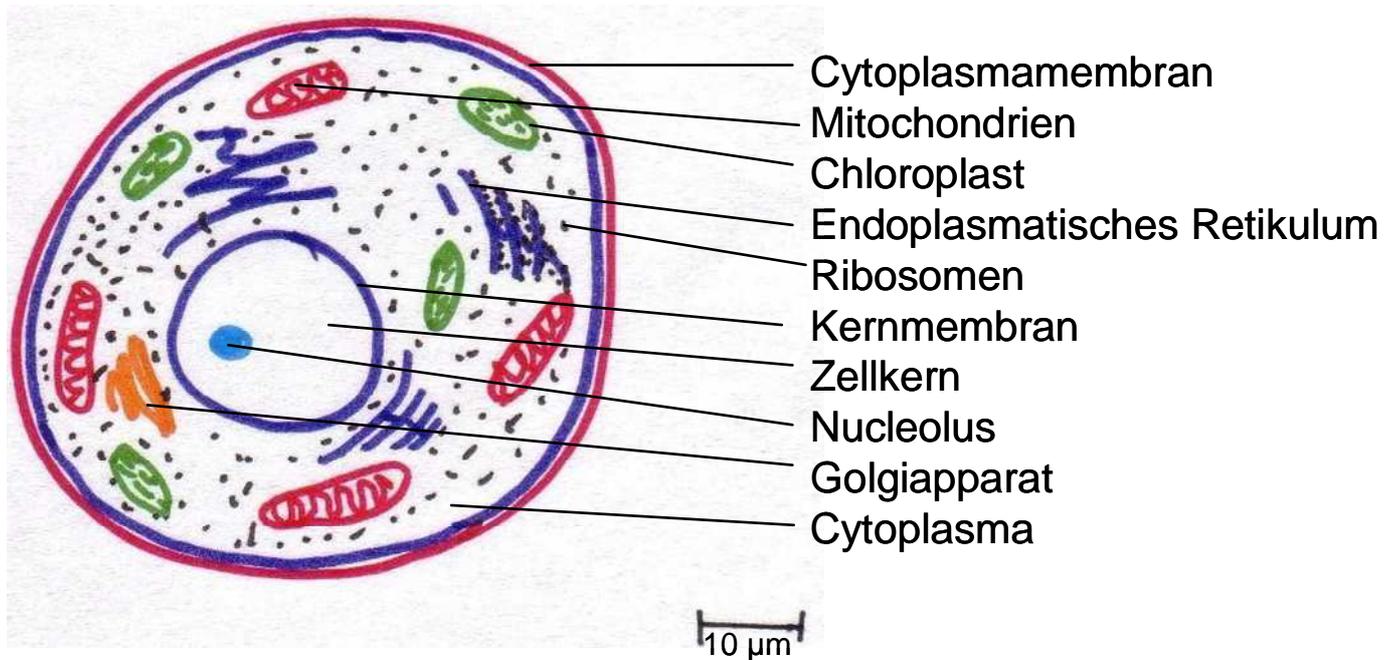


Abb. 3: Aufbau einer eukaryotischen Zelle

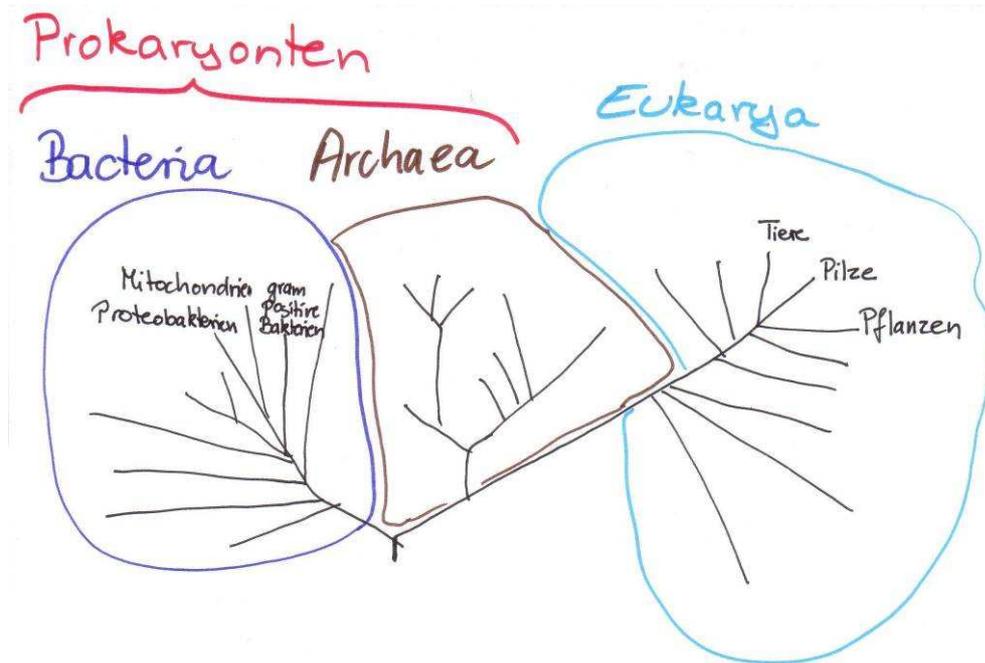


Abb. 4: Phylogenetischer Stammbaum der Lebewesen

## 2. Natürliche Standorte der Mikroorganismen in der Umwelt

Mikroorganismen kommen fast überall in der Umwelt und im Lebensbereich des Menschen vor. Etwa 60 % der Biomasse unserer Erde besteht aus Mikroorganismen. Mikroorganismen gedeihen in einer erstaunlichen Vielfalt sehr unterschiedlicher Habitate, sowohl in extremer Hitze, Kälte, Strahlung, Druck, Dunkelheit, als auch in salziger, saurer und alkalischer Umgebung. Oft leben sie da, wo keine anderen Lebewesen existieren können, und beziehen ihre Nährstoffe ausschließlich aus anorganischem Material. Am zahlreichsten kommen sie natürlich in feuchten und nährstoffreichen Standorten wie z.B. im Boden, in Gewässern und in Sedimenten vor. Mikroorganismen besiedeln auch andere Lebewesen und leben dort als gutartige Symbionten wie z.B. auf der Haut des Menschen oder im Pansen der Kuh. Viele Lebensmittel könnte man nicht ohne die Hilfe der Mikroorganismen herstellen (Brot, Käse, Bier, Wein Salami, Sauerkraut, Joghurt.....). In der Biotechnologie nutzt man die Mikroorganismen zur Herstellung von zahlreichen Medikamenten, chemischen Grundbausteinen und zum Abbau von Schadstoffen. Nur die wenigsten Mikroorganismen sind Krankheitserreger.

Link:

Jede Menge Bilder von Mikroorganismen an unterschiedlichsten Standorten  
zusammengetragen von Heribert Cypionka:

<http://www.icbm.de/pmbio/mikrobiologischer-garten/de/index.php3>

### 3. Wachstums- und Nährstoffansprüche von Mikroorganismen

*Wasser, Luft, Zucker Proteine, Vitamine, Spurenelemente*

*Feste und flüssige Nährmedien*

*pH und Temperatur*

Das Wachstum von Mikroorganismen ist an das Vorhandensein von Wasser gebunden. Bakterienzellen bestehen zu mehr als 80 % aus Wasser. Die im Wasser gelösten Substanzen, aus denen die Mikroorganismen ihr Zellmaterial aufbauen und Energie gewinnen, sind die Nährstoffe.

Die Ansprüche verschiedener Mikroorganismen an die Zusammensetzung der Nährlösung und an sonstige Milieubedingungen sind recht verschiedenartig. Es sind daher sehr viele Rezepte für Nährböden von Mikroorganismen entwickelt worden.

Alle Nährböden müssen aber alle Elemente, die am Aufbau der Zellesubstanz beteiligt sind, in Form verwertbarer Verbindungen zur Verfügung stellen. Nach chemischen Elementen geordnet besteht Biomasse hauptsächlich aus Kohlenstoff, Sauerstoff, Wasserstoff, Stickstoff, Schwefel, Kalium, Calcium, Phosphor, Magnesium und Eisen, den so genannten Makroelementen. Daneben gibt es noch die Mikro bzw. Spurenelemente. Die meisten Elemente werden den Nährböden in Form ihrer Salze zugesetzt.

Organismen die ihre Energie durch Photosynthese oder durch Oxidation anorganischer Verbindungen beziehen, sind in der Lage Kohlendioxid als Hauptkohlenstoffquelle zu nutzen. Die C-autotrophen Organismen reduzieren CO<sub>2</sub>. Alle anderen Organismen beziehen den Zellkohlenstoff hauptsächlich aus organischen Nährstoffen. Energie können die Mikroorganismen entweder durch Oxidation organischer Stoffe wie z. B. Glucose mit dem Luftsauerstoff oder durch eine ganze Reihe an anderen Reduktions-Oxidations-Reaktionen gewinnen. Je nach Art der Substrate und Reaktion kann man die Organismen in aerobe oder anaerobe, in organotrophe oder litotrophe Mikroorganismen einteilen.

Die im Praktikum verwendeten Mikroorganismen (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* und *Saccharomyces cerevisiae*) sind aerob und organotroph, d.h. sie benötigen eine organische Kohlenstoffquelle und Luftsauerstoff.

Grundsätzlich könnte man diese Organismen auf einem Medium, das nur aus Salzen die alle Nährstoffansprüche abdecken kultivieren. Solche Nährmedien sind jedoch sehr schwierig herzustellen, da man alle Einzelkomponenten extra einwiegen muss. Einfacher ist es so genannte Komplexmedien oder Vollmedien zu verwenden. Diese bestehen meistens aus Hydrolysaten von Fleisch oder Hefe und enthalten daher alle notwendigen Nährstoffe im richtigen Verhältnis.

Neben den flüssigen Nährmedien kann man Mikroorganismen auch der Oberfläche von feuchten, aber festen Nährmedien kultivieren. Hierzu gibt man Agar, ein stark vernetztes, komplexe zusammengesetztes Polysaccharid das aus Meeresalgen gewonnen wird, zu dem flüssigen Medium. Der Agar schmilzt bei 100°C und verfestigt beim abkühlen unter 45°C das gesamte Medium.

Im Praktikum wird ein einfach herzustellendes Komplexmedium aus Trypton, Hefeextrakt und NaCl verwendet.

<b>Medium LB:</b>	
NaCl	10g
Hefeextrakt	5g
Trypton	10g
Agar (falls gewünscht)	15g
Dionisiertes Wasser	1000ml

Außer dem Nährstoffangebot ist das Wachstum der Mikroorganismen auch noch vom pH-Wert und der Temperatur abhängig.

Link:

Eine Liste verschiedenster Medien für Mikroorganismen. Bei der DSMZ, der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen kann man auch Stämme für den Unterricht bestellen.

[http://www.dsmz.de/microorganisms/media\\_list.php](http://www.dsmz.de/microorganisms/media_list.php)

#### 4. Nachweis und Quantifizierung von Mikroorganismen

*Nachweis durch Stoffwechselaktivität oder durch Sichtbarmachung*

*Mikroskopie-Auszählen*

*Vermehrung durch Teilung*

*Lebendzellzahlbestimmung*

Mikroorganismen sind klein und mit bloßem Auge nicht zu erkennen. Eine ganze Reihe der mikrobiologischen Methoden dient daher der Sichtbarmachung der Organismen, denn erst dadurch können diese direkt oder indirekt nachgewiesen und charakterisiert werden. Die direkteste Methode ist die Mikroskopie, wobei man meistens eine 400 bis 1000 fache Vergrößerung benutzt. Eine weitere sehr häufige Methode ist nicht die Sichtbarmachung eines einzelnen Mikroorganismus sondern einer Population wie z.B. auf festen Nährböden (Agarplatten) wenn aus einer einzelnen Zelle durch Vermehrung eine Kolonie mit einer Größe von über 1 mm wird, oder indem man flüssige Nährmedien beimpft und eine Vermehrung durch Eintrübung nachweist.

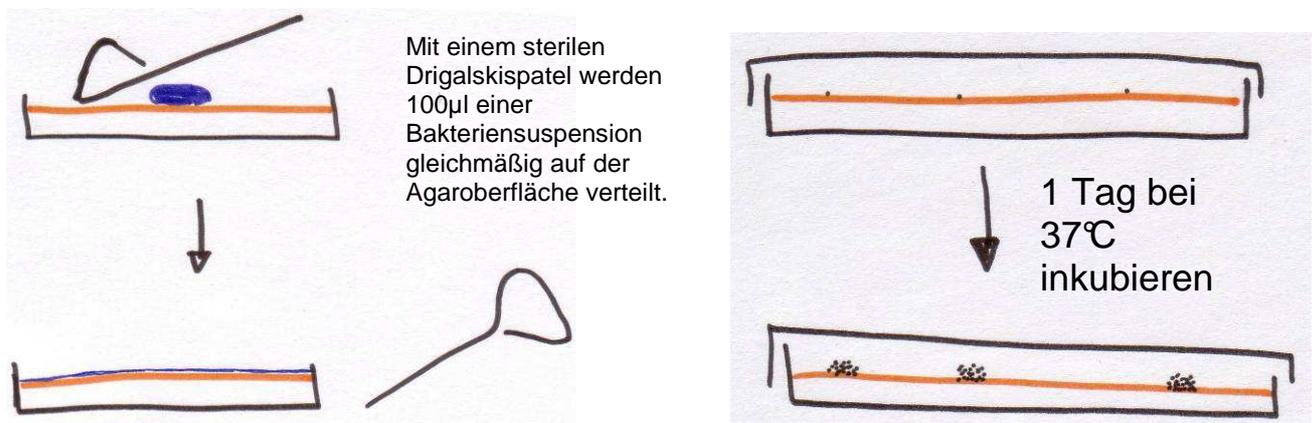


Abb. 5: Ausplattieren einer Zellsuspension und Bildung von Kolonien von Mikroorganismen auf einer Agaroberfläche

Indirekt kann man die Mikroorganismen auch durch ihre Stoffwechselleistungen nachweisen, wenn sie z.B. beim Abbau von Zuckern Säuren bilden, die dann wiederum einen Farbwechsel eines pH-Indikators bewirken.

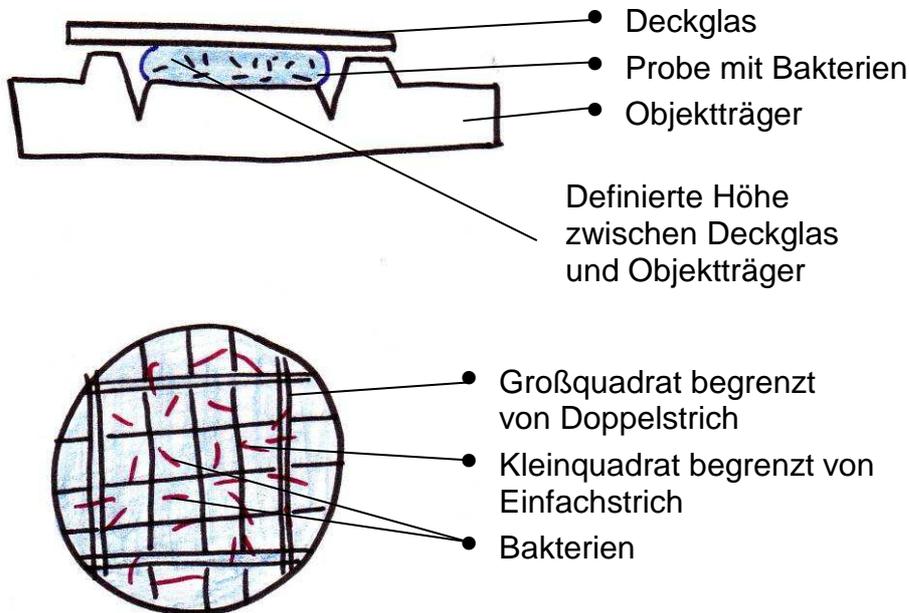


Abb. 6: Schnitt und Mikroskopisches Bild einer Zählkammer.

Die quantitative Bestimmung der Mikroorganismen erfolgt dementsprechend entweder durch auszählen definierter Volumen unter dem Mikroskop mit Hilfe von Zählkammern, durch Messung der Trübung einer Nährlösung mit dem Photometer oder durch ausplattieren eines bestimmten Volumens auf einem festen Nährboden und auszählen der hier entstandenen Kolonien.

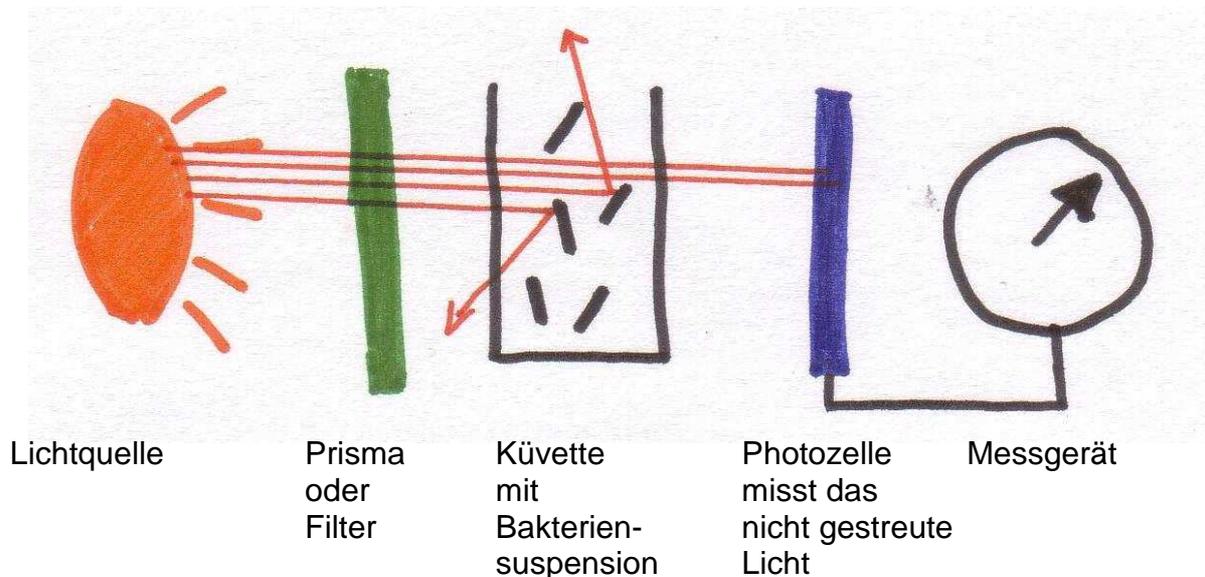


Abb. 7: Prinzip der Trübungsmessung mit dem Photometer.

## 5. Herstellung einer Reinkultur

### *Vereinzelung von Mikroorganismen*

Um einen Mikroorganismus genauer zu untersuchen ist es nötig eine Reinkultur von diesem herzustellen. Als Reinkultur bezeichnet man eine Kultur in der nur die Nachkommen einer einzigen Zelle vorkommen. Man benutzt hierzu Methoden, die es erlauben eine Mischpopulation soweit zu verdünnen bis es möglich ist, die entstehenden Einzelzellen räumlich voneinander zu trennen. Die gängigsten Methoden sind hier die Verdünnung in steriler Saline und ausplattieren auf Agarplatten (=Verdünnungsreihe) oder die 3-Strich-Methode, bei der die Mikroorganismen auf der Agaroberfläche immer weiter verdünnt und auseinander gerissen werden. Aus jeder einzeln liegenden Zelle kann dann wieder eine Kolonie werden. Unterstützen kann man beide Methoden durch Anwendung von Selektivmedien, auf denen nur die Gewünschte Sorte an Mikroorganismen wachsen kann. Beide Methoden sollen im Praktikum von den Schülern durchgeführt und ausgewertet werden.

## 6. Charakterisieren von Mikroorganismen (Gram-Färbung, Antibiotika)

### *Gram-Färbung zur schnellen Klassifizierung der Bakterien*

Die Gram-Färbung ist eine Methode zur differenzierenden Färbung von Bakterien. Sie ist nach dem dänischen Arzt und Bakteriologen Hans Christian Gram benannt, der sie am Ende des 19. Jahrhunderts entwickelte. Verschiedene Bakterien reagieren aufgrund des unterschiedlichen Aufbaus ihrer Zellwand auf diese Färbung unterschiedlich. Daraus folgt eine Einteilung in sog. grampositive Bakterien, die nach dem Färbegang violett/blau erscheinen, und gramnegative Bakterien, die rot erscheinen.

Dies ist ein wichtiges Kriterium für die Unterscheidung verschiedener Bakterien nach der Struktur ihrer Zellwand.

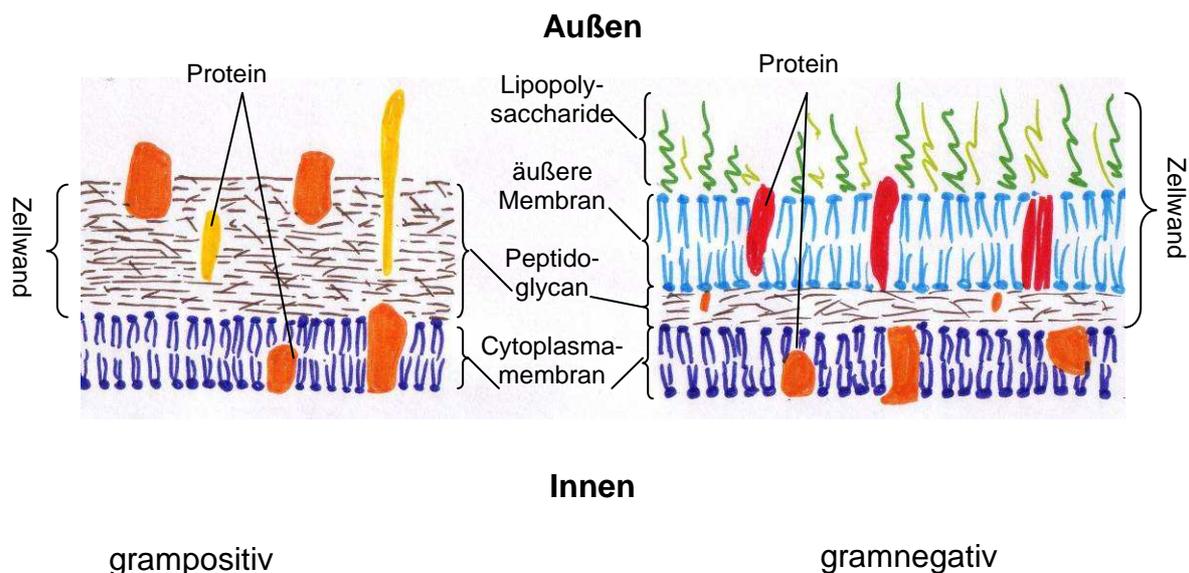


Abb. 8: Zellwandaufbau bei grampositiven und gramnegativen Bakterien

Bedeutend ist das Färbeverfahren z. B. bei der Diagnostik von Infektionskrankheiten. „Grampositive“ und „gramnegative“ Bakterien reagieren unterschiedlich auf verschiedene Antibiotika. Mit dieser schnellen diagnostischen Methode kann man in kurzer Zeit (etwa 5 Minuten) anhand eines Abstriches das „Gramverhalten“ der Bakterien bestimmen. Damit hat man die Möglichkeit, sofort mit einer antibiotischen Therapie zu beginnen, bevor das Ergebnis der oft mehrere Tage dauernden definitiven Keimbestimmung vorliegt.

Die Gramfärbung erfordert nur wenige Chemikalien und einfache Geräte und ist daher im Praktikum leicht durchzuführen.

## **7. Biotechnologische Herstellung von Antibiotika**

*Was sind Antibiotika*

*Pro und Eukaryonten reagieren unterschiedlich auf Antibiotika*

*Natürliches Vorkommen*

*Herstellung im Labor*

*Biotechnologische Produktion (Fermenter)*

Antibiotika werden von Pilzen und Bakterien gebildet um andere Pilze oder Bakterien abzutöten und dadurch einen Wachstumsvorteil für die eigene Art zu erreichen.

Der britische Bakteriologe Sir Alexander Fleming entdeckte im September 1928, dass ein Schimmelpilz eine keimtötende Wirkung hatte. Diese Erkenntnis führte später zum Antibiotikum Penicillin.

Antibiotika sind natürlich gebildete Stoffwechselprodukte von Pilzen oder Bakterien oder synthetische Substanzen, die schon in geringer Menge das Wachstum von anderen Mikroorganismen hemmen oder diese abtöten. Voraussetzung für den Einsatz von Antibiotika in der Medizin ist, dass die Antibiotika menschliche Zellen (oder allgemein eukaryontische Zellen) nicht schädigen. Stoffe die beide Organismengruppen schädigen würde man als Gifte oder Toxine bezeichnen. Die Grundlage für die unterschiedliche Wirkungsweise der Antibiotika auf die Bakterien und die Eukaryonten liegt im Aufbau der Zelle, der Zellwände und in unterschieden im Stoffwechsel wie z.B. der Proteinbiosynthese. Antibiotika wirken nicht gegen Viren, da diese ja den Stoffwechsel der menschlichen Zelle ausnutzen.

Die Empfänglichkeit von Mikroorganismen für die Wirkung einzelner Antibiotika schwankt erheblich. So unterscheiden sich z.B. grampositive und gramnegative Bakterien in ihrer Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Antibiotika. Ein einfacher Test für die Wirksamkeit eines Antibiotikas auf einen Mikroorganismus ist das Antibiogramm. Hierbei werden die zu untersuchenden Mikroorganismen auf Agarplatten ausgestrichen. Auf dem Agar werden anschließend Filterplättchen mit definierten Mengen eines Antibiotikas gegeben. Die Größe der Hemmhöfe, also der Bereiche um die Filterplättchen ohne Wachstum gibt dann Auskunft über die Wirksamkeit des Antibiotikas. Dieser Versuch soll im Praktikum durchgeführt werden, wobei als Negativkontrolle auch die (nicht-)Wirksamkeit eines Antibiotikas auf eine Hefe als Vertreter der Eukaryonten gezeigt werden soll.

Die Industrielle Produktion von Penicillin erfolgt durch eine Kombination biotechnologischer und chemischer Methoden. Penicillin G wird von dem Pilz *Penicillium chrysogenum* in Fermentern von 40.000 bis 200.000 l Fassungsvermögen gebildet. Die Penicillinproduktion ist ein stark sauerstoffabhängiger Prozess und daher ist eine ausreichende Belüftung notwendig die nur in entsprechenden Fermentern erreicht wird. Penicillin ist ein typischer Sekundärmetabolit.

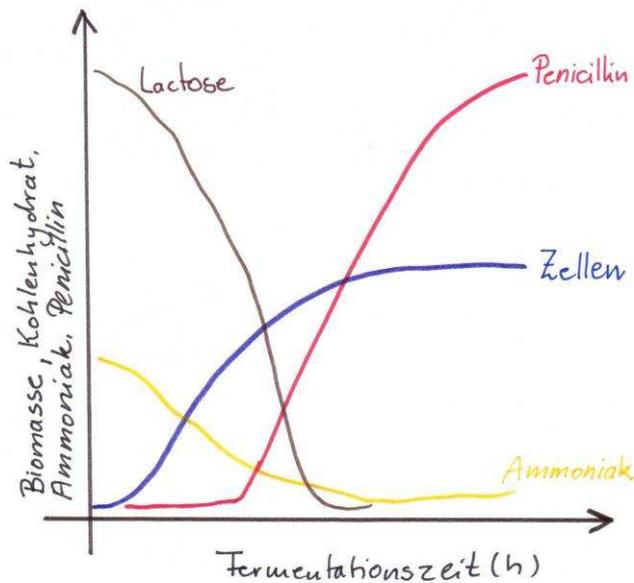


Abb. 9: Kinetik der Penicillinfermentation mit *Penicillium chrysogenum*. Kleiner Versuchsfertiger.

Während der Wachstumsphase wird sehr wenig Penicillin gebildet, wenn aber die Kohlenstoffquelle fast ganz erschöpft ist, dann setzt die Phase der Penicillinproduktion ein. Indem man eine zusätzliche Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zusetzt, kann die die Produktionsphase auf mehrere Tage ausgedehnt werden. Nachdem die Zellen durch Filtration entfernt worden sind, wird der pH-Wert des Mediums abgesenkt und das Antibiotikum mit einem Lösungsmittel extrahiert.

#### Links

- <http://de.wikipedia.org/wiki/Antibiotika>
- [http://de.wikipedia.org/wiki/Alexander\\_Fleming](http://de.wikipedia.org/wiki/Alexander_Fleming)
- <http://de.wikipedia.org/wiki/Penicillin>
- <http://de.wikipedia.org/wiki/Fermenter>

## 8. Literaturvorschläge und Links zur Vertiefung

Als Einstieg in die Mikrobiologie, alle wichtigen Grundlagen zu Eigenschaften und Stoffwechsel klar zusammengefasst, keine Bilder aber übersichtliche und klare Zeichnungen.

**Grundlagen der Mikrobiologie von Heribert Cypionka** ISBN 3-540-24084-5  
270 Seiten 24,95 €

Standardwerk der Mikrobiologie für Grund und Hauptstudium: Hier steht alles drin was man wissen sollte, umfassend aber trotzdem leicht lesbar. Zum Nachschlagen einzelner Kapitel gut geeignet, tolle Bilder und Zeichnungen.

**Brock Mikrobiologie.** Mit medizinischer Mikrobiologie und Immunologie von Michael T. Madigan, John M. Martinko, Thomas D. Brock  
1200 Seiten, 89,95 €

Jede Menge Bilder von Mikroorganismen an unterschiedlichsten Standorten von Heribert Cypionka: <http://www.icbm.de/pmbio/mikrobiologischer-garten/de/index.php3>