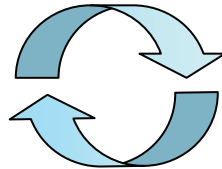


Projekt

Messung der Wachstumskurve von E.coli

Betrieb
Ausbildungsrahmenplan WQ 14
[Biotechnologische
Wirkstoffgewinnung](#)



Berufsschule
Rahmenlehrplan
Wahlpflichtlernfeld 4
[Wirkstoffe mit biotechnischen
Methoden gewinnen](#)

Inhalt

I.	Aufgabenblatt für Auszubildende.....	2
I.1	Aufgabenstellung	2
I.2	Theoretische Grundlagen	2
I.2.1	Wachstum in einer statischen Kultur = Batch Kultur.....	2
I.2.2	Wachstum in einer kontinuierlichen Kultur	3
I.2.3	Messung von Wachstum und Vermehrung	3
I.3	Durchführung des Projektes	4
I.3.1	Zur Arbeit im Team	4
I.3.2	Materialien	4
I.3.3	Zu erfassende Messwerte und technische Vorbereitung der Messungen	5
I.3.4	Auswertung	6
I.4	Bewertung der Projektdurchführung	6
II.	Anmerkungen für Ausbilder/innen.....	7

I. Aufgabenblatt für Auszubildende

I.1 Aufgabenstellung

Wachstum und Vermehrung eines E.coli-Keims in einer Zellkultur sind durch Trübungsmessung zu erfassen und quantitativ zu bestimmen.

Das Projekt ist im Team durchzuführen und umfasst die Planung, Durchführung, Kontrolle, Dokumentation sowie Präsentation der Ergebnisse.

I.2 Theoretische Grundlagen

Unter Wachstum versteht man allgemein die Zunahme der lebenden Substanz über eine Vergrößerung und/oder Teilung der Zellen. Bei Mikroorganismen wird vereinfachend meist nur die Zunahme der Zellzahl berücksichtigt. Grundsätzlich ist aber auch bei Einzellern die Zunahme der Zellzahl von derjenigen der Zellmasse zu unterscheiden.

I.2.1 Wachstum in einer statischen Kultur = Batch - Kultur

Die Batch - Kultur spielt in der biologischen Verfahrenstechnik eine größere Rolle als das kontinuierliche Verfahren. Man beimpft ein festes oder flüssiges Kulturmedium mit Mikroorganismen und bebrütet, ohne die im Verlauf der Kultur durch Wachstum und/oder Vermehrung der Organismen verbrauchten Bestandteile zu ersetzen, ohne sich bildende Stoffwechselendprodukte zu entfernen und ohne den Zuwachs an Mikroorganismen zu entnehmen. Ausgenommen sind kleine Mengen an Säure/Lauge zur pH-Wert-Regelung oder Mittel zur Schaumbekämpfung sowie die notwendige Entnahme von Kontrollproben.

Eine statische Kultur in einem flüssigen Medium durchläuft mehrere Phasen. Trägt man nach dem Beimpfen die Zellzahl n/ml in logarithmischen Maßstab gegen die Zeit auf, so erhält man die bekannten Wachstumskurven mit ihrem typischen sigmoiden (s-förmigen) Verlauf.

- (1) Lag-Phase = Anlaufphase: Die eingeimpften Mikroorganismen stellen sich durch Bildung von Enzymen und Aktivierung anderer Stoffwechselforgänge auf ihre neue Umgebung, das Kulturmedium ein. Die Zellkonzentration der Kultur bleibt anfangs konstant, manchmal nimmt sie sogar ab. Am Ende dieser Phase teilen sich die Zellen mit höchster Teilungsrage. Die Dauer der Anlaufphase hängt ab vom physiologischen Zustand der zum Beimpfen verwendeten Mikroorganismen, u.a. davon, in welcher Phase sich die "Starterkultur" befindet, mit der man den Bioreaktor animpft. Je größer der Unterschied zwischen der neuen Umgebung und der alten Nährlösung ist, desto länger dauert die Anlaufphase. Für einen optimalen Übergang gelten folgende Bedingungen:
 - (a) Die Vorkultur sollte so aktiv wie möglich sein, und der Impfvorgang sollte vorzugsweise aus der exponentiellen Phase der Vorkultur erfolgen.
 - (b) Das Kulturmedium der Vorkultur sollte der zu beimpfenden Nährlösung möglichst ähnlich sein.
 - (c) Die Impfmenge soll ca. 5% des zu beimpfenden Volumens betragen.
- (2) Log-Phase = Exponentielle Wachstumsphase. Die Mikroorganismen vermehren sich mit konstanter, minimaler Generationsdauer = Zeitintervall einer Zellverdoppelung. Die Mikroorganismenkonzentration nimmt exponentiell zu. Die Organismen befinden sich in höchster stoffwechselphysiologischer Aktivität; ihr Wachstum pro Zeiteinheit hängt vom Gehalt an Zellen je cm^3 , dem Nährstoffangebot, von der Temperatur, dem pH-Wert, der Durchmischung des Mediums, dem Alter der Kultur und der

Eigenart des Stammes ab. Schnellwachsende Bakterienarten teilen sich unter den günstigsten Verhältnissen alle 15 Minuten: Die Generationsdauer von E.coli. dauert in der Regel 21 Minuten. Für die meisten mikrobiologischen Untersuchungen benötigt man Mikroorganismen in diesem Stadium. Die Dauer der exponentiellen Phase hängt davon ab, wann ein zum Wachstum unbedingt erforderlicher Kulturmediumbestandteil aufgebraucht ist bzw. wann ausgeschiedene Stoffwechselprodukte wachstumshemmende Konzentrationen erreichen.

- (3) Stationäre Phase: Durch Mangel an Energiequellen, Nährstoffen, Sauerstoff (bei Aerobiern) oder durch Anhäufung wachstumshemmender Stoffwechselprodukte können sich die Organismen nicht weiter vermehren, die Mikroorganismen – Konzentration der Kultur bleibt konstant. Einige Zellen teilen sich trotzdem weiter, andere sterben ab und können auch lysieren. Die Masse der Organismen bleibt vorerst am Leben und betreibt einen Erhaltungsstoffwechsel auf Kosten von Reservestoffen.
- (4) Absterbe-Phase: Immer mehr Individuen sterben ab und lysieren. Die Ursachen sind verschiedener Art, z.B. als Stoffwechselprodukte ausgeschiedene Säuren. Die Mikroorganismen - Konzentration der Kultur nimmt wieder ab.

1.2.2 Wachstum in einer kontinuierlichen Kultur

Man kann Mikroorganismen ständig in der logarithmischen Wachstumsphase kultivieren, wenn man durch ständige Zufuhr neuer Nährlösung und konstanter Verdünnung der Zellsuspension (Entnahme von Reaktorinhalt) die Bedingungen konstant hält. Die Konzentration an Mikroorganismen bleibt konstant, wenn die Verdünnungsrate der Wachstumsrate entspricht.

Jede kontinuierliche Kultur startet als statische Kultur. Ist während der logarithmischen Phase eine gewünschte Zelldichte erreicht, kann diese durch Regulierung des Zu- und Abflusses konstant gehalten werden. Wird dies mit Hilfe einer Trübungsmessung durchgeführt, spricht man von einem Turbidostat. Im Chemostat dagegen erfolgt die Kontrolle durch einen wachstumslimitierenden Stoff, während alle anderen Stoffe im Überschuss vorhanden sind.

Kontinuierliche Prozesse, die wochen- oder monatelang ohne Unterbrechung laufen, sind vorläufig noch meist auf den Labormaßstab beschränkt. Der Grund hierfür liegt darin, dass der Batch-Betrieb seit Jahrzehnten eingespielt und die Regelung sehr einfach ist. Auch sind Störanfälligkeiten, die durch die Anlage, durch Infektionen oder durch Mutationen der Organismen bedingt sind, geringer. Trotzdem haben kontinuierliche Verfahren erhebliche Vorteile: Größere Produktivität, zeitlich konstante Produktqualität, kleinere Reaktorvolumina und weniger arbeitsaufwendige Bedingungen (Automatisierung).

1.2.3 Messung von Wachstum und Vermehrung

Für die Messung und die quantitative Auswertung des Wachstums stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Für den folgenden Versuch wurde die Trübungsmessung gewählt; sie ist eine der ersten Methoden, die eine sofortige Aussage über den Verlauf des Wachstums erlaubt. Das Prinzip der Messung beruht darauf, dass sichtbares Licht einer bestimmten Wellenlänge - meist zwischen 500 und 600 nm - beim Durchtritt durch die Messprobe zum Teil absorbiert und zum Teil gestreut wird.

In der Praxis hat sich die Absorptionsmessung bewährt, da sie in der Durchführung einfacher und weniger störanfällig ist, falls die folgenden Einschränkungen berücksichtigt werden:

- (1) Die sichtbare Trübung beginnt erst bei einer Zellkonzentration von etwa 1×10^6 Zellen/mL.
- (2) Die Trübung ist nur bis etwa 0,300 optische Dichte linear proportional der Zellzahl bzw. Zellmasse. Bei höheren Konzentrationen muss man verdünnen, eine

Manipulation, die mit einem systematischen Fehler verbunden ist (diese Werte sind im Protokoll zu kennzeichnen!).

- (3) Substanzen, die in das Nährmedium abgegeben werden, können einen zusätzlichen Absorptionseffekt haben.
- (4) Die Trübung ist nicht nur von der Zahl der Partikel, sondern auch von ihrer Größe und Form abhängig. Man muss deshalb auch für jede Mikroorganismenart eine Kalibrierkurve mit Hilfe einer direkten Methode wie z.B. der Zählkammer aufstellen.

I.3 Durchführung des Projektes

I.3.1 Zur Arbeit im Team

- Listen Sie die Mitglieder Ihrer Arbeitsgruppe auf und vereinbaren Sie die Zuständigkeiten und Ansprechpartner/innen.
- Klären Sie, welche Personen Sie während der Durchführung der Projektarbeit unterstützen bzw. beraten.
- Legen Sie den Zeitraum für die Durchführung des Projektes fest (x Tage / Stunden).
- Entwickeln Sie ein Zeit-Ablauf-Schema.
- Vereinbaren Sie Meilensteine, die sie nach Erreichen auch selbst kontrollieren können.
- Fertigen Sie eine Aufstellung der benötigten Materialien und Medien (Gebrauchsanweisungen, Herstellungsanweisungen, weitere Literatur) an, und beschaffen Sie diese.
- Dokumentieren Sie Ihre Arbeitsschritte und alle Ergebnisse.
- Bereiten Sie eine Präsentation/einen Workshop vor.

I.3.2 Materialien

- z.B.: Laborfermenter BIOSTAT mit Mess- und Regeltechnik
- Photometer mit Mikroküvetten
- Wärmeschrank (37°C) für Vorkulturen
- N₂-Gasflasche (Nullpunktkalibrierung der O₂-Elektrode);
- Bypass-Probennehmer mit Schlauchpumpe, Sterile Einmalspritzen (5 mL) für die Probenentnahme
- Stopp Uhr, Glasgeräte, Silikon-Schläuche, Klemmen
- Standardpuffer: pH = 4,0; 6,9; 9,0 (Kalibrieren der pH-Elektrode)
- 200 ml 1 molare H₂SO₄ im Korrekturmittelgefäß (pH-Regelung)
- 200 ml 1molare NaOH im Korrekturmittelgefäß (pH-Regelung)
- Silikonöl im Korrekturmittelgefäß (Antischaum)
- 70% Ethanol oder Chlorkalk zur Desinfektion; Vernichten der Bakterien.
- 100 ml E.coli-24-Stunden-Vorkultur in Standard-Medium
- 1,5L Nährmedium
- 1,0 l Aqua dest. autoklaviert; zum Reinigen der nicht-autoklavierten Elektroden

I.3.3 Zu erfassende Messwerte und technische Vorbereitung der Messungen

Messwerte

- Zeit
- O₂-Sättigung
- Luftdurchströmung
- Temperatur
- pH-Wert
- Säure bzw. Laugenzugabe
- Rührgeschwindigkeit
- Bakterienkonzentration/mL (Die Zelldichte einer E.coli -Kultur wird photometrisch bestimmt: E (578 nm) = 0,100 entspricht 1x10⁸ Bakterien/mL.

Technische Vorbereitungen:

Während des gesamten Projektes gilt: Sie arbeiten mit E.coli.
Alle Sicherheitsvorschriften müssen peinlichst genau eingehalten werden!

2 Tage vor dem Versuch

- Nährmedium (15g/l) in 100 mL H₂O lösen und autoklavieren. Achtung: Autoklavieren dauert sehr lange!
- E.coli-Kultur auf Agar Platte ausstreichen und bei 37°C bebrüten.

1 Tag vor dem Versuch

- Nährmedium (in Schüttelflasche) mit E.coli von Agar-Platte beimpfen und im Brutschrank bei 37°C bebrüten.
- Nährmedium (15g/l) in 1,5 l H₂O lösen und im Kulturgefäß autoklavieren. Achtung: Autoklavieren dauert sehr lange!

Technische Vorbereitung und Versuchsdurchführung am Versuchstag

- Arbeiten Sie zügig, da Sie das Wachstum der Bakterien mindestens 4 Stunden messen sollen.
- Bioreaktor mit dem mit Medium autoklavierten Kulturgefäß aufbauen
- pH-Elektrode kalibrieren und Regelung einstellen
- O₂-Elektrode kalibrieren (Nullpunkt/Steilheit), sobald die Temperatur im Medium erreicht ist.
- Kulturgefäß beimpfen

I.3.4 Auswertung

- Tabellarische und graphische Darstellung aller Messwerte.
- Diskussion der Ergebnisse
- Graphische Ermittlung der Generationszeit; es muss erkennbar sein, welche Daten hierfür verwendet werden.
- Beschreibung der Ergebnisse (Wie lange dauern die verschiedenen Wachstumsphasen?)
- Welche Messwerte korrelieren miteinander, d.h. stehen in einem logischen Zusammenhang? Dies lässt sich u.a. dadurch erkennen, dass man die Messwerte in einer gemeinsamen Graphik zusammenfasst.

I.4 Bewertung der Projektdurchführung

Hier finden Sie die Bewertungskriterien mit beispielhafter Nennung von Punkten, auf die Ihr/e Ausbilder/in Wert legt.

- | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 1. Vorbereitungen | 10% |
| <ul style="list-style-type: none"> - Sind alle Arbeiten rechtzeitig erledigt worden? - Ist der Arbeitsplatz sauber hergerichtet? | |
| 2. Aufbau der Fermenter | 15% |
| <ul style="list-style-type: none"> - Sind die Fermenter betriebsbereit? - Ist die Sterilisation richtig durchgeführt worden? | |
| 3. Fermentation | 20% |
| <ul style="list-style-type: none"> - Hat das Team den Prozess „im Griff“? - Ist jedem Teammitglied die Bedienung des Fermenters klar? - Sind die Sicherheitsrichtlinien alle eingehalten worden? | |
| 4. Dokumentation | 10% |
| <ul style="list-style-type: none"> - Liegen alle erforderlichen Dokumente vor? - Werden die Dokumente GMP gerecht geführt? - Sind alle Messwerte erfasst? | |
| 5. Qualität der Ergebnisse | 10% |
| <ul style="list-style-type: none"> - Richtigkeit der Schlussfolgerungen - Aussagekraft der Graphiken | |
| 6. Organisation des Teams | 20% |
| <ul style="list-style-type: none"> - Sind alle Mitglieder in die Prozesse eingebunden? - Halten sich alle an die Regeln? | |
| 7. Präsentation/Workshop | 15% |
| <ul style="list-style-type: none"> - Form - Verständlichkeit - Zielgruppenorientierung | |

II. Anmerkungen für Ausbilder/innen

Folgende Vorarbeiten (Aufgabe 1 bis 4) können durchgeführt werden, um die Azubis an das Equipment heranzuführen.

Aufgabe 1:

Kennen lernen der verschiedenen Funktionseinheiten eines Bioreaktors

Methode: Die Auszubildenden machen sich anhand der Bedienungsanleitungen mit einem Fermenter vertraut.

Durchführung: Die Auszubildenden informieren sich an Hand der Bedienungsanleitungen über die Funktion der Fermenter und erklären diese beim anschließenden Zusammenbau. (Anmerkung: Da die Experimente zum Wachstum von E.coli eine sehr lange Vorbereitungszeit erfordern, muss der Zusammenbau während der Projektdurchführung ohne Verzögerung ablaufen.)

Literatur: Bedienungs- und Betriebsanleitungen

Aufgabe 2:

Zusammenbau des Laborfermenters

Die Auszubildenden sollen sich Notizen machen, um später die Fermenter mit Hilfe dieser Anleitung sicher und richtig zusammenbauen zu können. Dazu können Leitfragen ausgeteilt werden wie z.B.:

- Wie erkenne ich das Begasungsrohr und wie unterscheidet sich dieses vom Entnahmerohr?
- Wie kann unter sterilen Bedingungen Kulturmedium entnommen werden?
- Wann wird die pH-Elektrode kalibriert?
- Wann wird die -Elektrode kalibriert?

Aufgabe 3:

Versuche zur Funktion der O₂-Elektrode

Grundlagen: Bei Messungen des O₂-Partialdruckes mit Hilfe der O₂- Elektrode müssen Parameter wie Temperatur, Rührgeschwindigkeit, Begasung, Salzgehalt u.a. sorgfältig berücksichtigt werden. Die Mess- und Regeltechnik des Bioreaktors ermöglicht es, diese Angaben nachzuprüfen.

Versuche:

- Kalibrieren der O₂-Elektrode: Nullpunkt-Einstellung und Steilheit
- Konstanz der O₂-Sättigung bei konstanter Temperatur, konstanter Luftdurchströmung und konstanter Rührgeschwindigkeit überprüfen.
- Abhängigkeit der Messung der O₂-Sättigung des Wassers von der Rührgeschwindigkeit und der Begasung:
 - a. Begasung: maximal (Rührer auf 0 UpM zurückfahren);
 - b. Luftzufuhr abschalten
 - c. Rührgeschwindigkeit wieder erhöhen (Luftzufuhr ist weiterhin 0)
 - d. Luftzufuhr wieder einschalten;
- Messung der O₂-Sättigung in Abhängigkeit von der Temperatur.
- Erhöhung der Soll-Temperatur des Wasserbades auf 40°C.
- Ablesen der folgenden Messparameter: O₂-Sättigung; pH-Wert, Temperatur des Wasserbades, Temperatur im Bioreaktor. Leitfrage: Wie erklären Sie sich die Abweichungen der O₂-Sättigung des vom erwarteten Wert bzw. die Schwankungen?

Auswertung und Diskussion jeweils unmittelbar nach jeder Teilaufgabe!

1. Tabellarische und graphische Darstellung der Ergebnisse
2. Diskussion der Ergebnisse: Beschreibung des Kurvenverlaufs und Erklärung. Dabei können die bei den verschiedenen Teilaufgaben gestellten Fragen (siehe auch unten) helfen. Sie sollen nicht isoliert beantwortet werden:
 - Welche Wartezeiten muss man für die Erwärmung vom Nährmedium einplanen?
 - Wie lange dauert die Kalibrierung der O₂- Elektrode?
 - Bei welcher Temperatur sollte man die O₂-Elektrode kalibrieren?

Aufgabe 4: Sterilisieren

Nach Bedienungsanweisung verfahren.