

## **Wirkung von Hemmstoffen auf das Wachstum von Mikroorganismen**

### **1. Einleitung**

Bei diesem Versuch wird die Wirkung von Hemmstoffen auf das Wachstum von Mikroorganismen (MO) untersucht.

Bei den Hemmstoffen unterscheidet man zwei verschiedene Wirkungen, die bakteriostatische und die bakterizide Wirkung. Bei der bakteriostatischen Wirkung stagniert das Wachstum der Bakterien und setzt wieder ein, wenn der Hemmstoff entfernt wird. Die bakterizide Wirkung ist allerdings nicht wieder aufzuheben. Die Bakterien sterben ab. Beide Effekte sind von der eingesetzten Konzentration des Hemmstoffs abhängig, wobei eine logarithmische Beziehung zwischen der eingesetzten Menge an Hemmstoff und dem Wachstum der Bakterien besteht.

Die Wirkungen von Hemmstoffen können auf unterschiedliche Bereiche der Zelle wirken. So wirken einige Substanzen (Phenol, Lysozym) auf die Zerstörung oder Veränderung der Zellstruktur, indem sie durch ihren polaren Charakter die Semipermeabilität der Cytoplasmamembran aufheben. Andere wiederum (Schwermetalle, Kohlenmonoxid, Cyanide) stören den Energiestoffwechsel, in dem sie sich an die Schwefelgruppen von schwefelhaltigen Aminosäuren (AS) binden und die Tertiär- und Quatärstruktur der Proteine zerstören. Die Störung der Biosynthese und das Wachstum durch Strukturanaloga bzw. Zellwandsynthesehemmer (Penicillin) ist ein weiteres Beispiel der Wirkung von Hemmstoffen. Die Strukturanaloga führen zu einer „falschen“ Synthese von AS oder Proteinen und wirken somit negativ auf den Metabolismus der Zellen. Auf die Wirkungen der hier verwendeten Hemmstoffe wird bei der Diskussion eingegangen.

Auch Antibiotika wirken hemmend auf MO, in dem sie auf die Nucleinsäure- und Proteinbiosynthese stören. (Bsp.: Mitomycin (hemmt DNA-Synthese), Actomycin (hemmt RNA-Synthese), Neomycin und Streptomycin (hemmt Verknüpfung von AS), Erythromycin (hemmt 50S Untereinheit von Ribosomen).

Bei dem Versuch werden zwei Techniken angewandt, um die Hemmwirkung qualitativ und quantitativ zu bestimmen. Für die qualitative Untersuchung wird die auxanographische Methode, zur quantitativen Untersuchung die eine Verdünnungsreihe von Penizillin genutzt.

Bei der auxanographischen Methode wird als MO die Hefe, für die qualitative Untersuchung Bacillus sp. genutzt.

### **2. Material und Methode**

Die Materialien und angewandten Methoden sind im Skript unter „Nachweis der Wirkung von Hemmstoffen auf das Wachstum von Mikroorganismen“ detailliert beschrieben.

Bei der auxanographischen Methode wird die Hefesuspension auf einem Grundmedium kultiviert und mit den im Skript genannten Substanzen behandelt. Nach Bebrütung im Brutschrank (2 Tage bei 30°C) kann bei den hemmenden Substanzen ein Hemmhof festgestellt werden.

Bei der Hemmsstoff-Verdünnungsreihe wird die Minimale-Hemmstoff-Konzentration (MHK) bestimmt. Die Bakterien werden dazu mit unterschiedlichen Konzentrationen an Penizillin behandelt. Tritt nach der Inkubation von 24 Stunden kein Wachstum ein (Medium ist klar), so wirkt die Konzentration hemmend auf das Zellwachstum. Diese Proben werden dann in Form einer Subkultur in ein Medium ohne Penizillin überführt und somit die Wirkung von Penzillin auf bakteriostatische bzw. bakterizide Hemmung überprüft.

Die eingesetzte Konzentration der Stammlösung des Pencillins betrug 40µg/ml.

### 3. Ergebnisse

**Tabelle 1: Ergebnisse der Auxanographie**

| <b>Substanzen</b>  | <b>Hemmung</b>                   |
|--------------------|----------------------------------|
| NaCl               | Nein, in hoher Konzentration ja! |
| CuSO <sub>4</sub>  | Ja                               |
| Benzoessäure       | Ja                               |
| Kaliumsulfat       | nein                             |
| HgCl <sub>2</sub>  | ja, mit abgegrenztem Hof         |
| Kaliumsorbit       | geringe                          |
| Na – Acetat        | Nein                             |
| Phenol             | Starke                           |
| Acetylsalicylsäure | Nein                             |

**Tabelle 2: Ergebnisse der Hemmstoff-Verdünnungsreihe**

| Reagenzglas | Konzentrationen des Penicillines in der Nährlösung ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Trübung in Hauptkultur | Trübung in Subkultur |
|-------------|---|------------------------|----------------------|
| 1           | 4   | -                      | +                    |
| 2           | 2   | -                      | +                    |
| 3           | 1   | -                      | +                    |
| 4           | 0,5   | -                      | +                    |
| 5           | 0,25  | -                      | +                    |
| 6           | 0,125   | -                      | N                    |
| 7           | 0,0625  | +                      | N                    |
| 8           | 0,0313  | +                      | N                    |
| 9           | 0,0156  | +                      | N                    |
| 10          | 0,0078  | +                      | N                    |
| 11          | 0,0039  | +                      | N                    |

+: Hemmung

-: keine Hemmung

N: nicht durchgeführt

## 4. Diskussion

### 4.1. Natriumchlorid

Natriumchlorid zeigt bei geringer Konzentration keine Hemmung des Hefewachstums. In hoher Konzentration wirkt es hemmend, da den Organismen Wasser entzogen wird.

### 4.2. Kupfersulfat

Bei Kupfersulfat handelt es sich um ein Schwermetall, das das Wachstum der Hefe hemmt. Schwermetalle wirken auf die SH-Gruppen der Enzyme und verändern so ihre Tertiär- und Quartärstruktur. Es ist kein Metabolismus möglich und die Zellen sterben ab.

### 4.3. Benzoesäure

Die Benzoesäure ist ein Konservierungsmittel, das durch die Hemmung der Dehydrogenasen den Stoffwechsel stört und somit zum Absterben der Zellen führt. Deswegen ist hier auch ein Hemmhof zu erkennen.

### 4.4. Kaliumsulfat

Kaliumsulfat hat keine hemmende Wirkung auf die Hefe. Kalium ist ein Makroelement, das jeder MO für das Wachstum benötigt. Auch das Sulfat hat keine hemmende Wirkung.

#### **4.5. Quecksilberchlorid**

Bei Quecksilberchlorid tritt eine starke Hemmwirkung auf. Es bildet sich ein großer Hof um die Auftragstelle. Quecksilber ist ein Zellgift (Schwermetall), das auch die Katalyse von Enzymen hemmt, indem es sich an die SH-Gruppen der Enzyme bindet und somit deren Struktur zerstört und die katalytische Fähigkeit aufhebt.

#### **4.6. Kaliumsorbat**

Bei Kaliumsorbat entstehen nur geringe Hemmhöfe. Kaliumsorbat (Salz der Sorbinsäure, die selbst als Konservierungsstoff genutzt wird) wird auch als Konservierungsstoff eingesetzt. Die Wirkung zielt auf die Inhibierung von Enzymen (Dehydrogenasen, Katalasen, Proteasen) ab.

#### **4.7. Natriumacetat**

Natriumacetat zeigt keine Hemmung der Hefe. Beide Komponenten befinden sich auch in der Zelle. Von ihnen geht in normaler Konzentration keine Gefahr aus!

#### **4.8. Phenol**

Das Phenol zeigt eine große Hemmwirkung auf die Hefe. Phenol ist polar und weist einen lipophilen Teil auf und kann sich somit in die Membran einlagern. Dies führt zu einer größeren Permeabilität der Zellmembran und die Zellen sterben ab. Dies geschieht auch beim Einsatz von „Seifen“ oder Kresolen. Außerdem führt Phenol, wie auch Ethanol, zu einer Denaturierung von Proteinen, wodurch die Struktur der Proteine zerstört wird.

#### **4.9. Acetylsalicylsäure**

Die Acetylsalicylsäure (ASS) weist keine hemmende Wirkung auf. Allerdings hemmt ASS die Bildung von Panthotensäure, die zur Bildung von Coenzym A benötigt wird. Jedoch wurde beim Versuch für den Nachweis einer Hemmwirkung eine zu geringe Konzentration an ASS eingesetzt.

#### **4.10. Die Auswirkungen verschiedener Penizillinkonzentrationen auf Bacillus sp.**

Die Minimale Hemmstoff Konzentration (MHK) liegt bei einer Konzentration von  $0,125\mu\text{g/ml}$ , da bei dieser Konzentration gerade keine Trübung, somit kein Wachstum der Bakterien, stattgefunden hat.

Nach dem Bebrüten der angesetzten Subkulturen konnte man wieder eine Trübung feststellen. Dieses Ergebnis zeigt das Penicillin nur eine bakterio-statische Wirkung aufweist. Penizillin verhindert die Neusynthese von Bakterienzellwänden, in dem es die

24.01. – 26.01.2006

Versuch III: Wirkung von Hemmstoffen auf das Wachstum von MO korrigiert 02.02.

Transpeptidierung der parallelen Dissaccharide aus N-Acetylmuraminsäure- und N-Acetylglucosaminsäure-Ketten verhindert.

Ist kein Penicillin vorhanden können die Bakterien ohne Einschränkung wachsen und es kommt zur Trübung des Mediums.

## **5. Literatur**

Schlegel „Allgemeine Mikrobiologie“, 7. überarbeitete Auflage, Thieme Verlag, 1992

Skript „Übungen in Mikrobiologie F1-Teil1“