



Hochschule Neubrandenburg
University of Applied Sciences

Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften

Bachelorarbeit

im Studiengang „Bioprodukttechnologie“

**Aufbau eines Sporulationsnachweises als In- Prozess-
kontrolle für die Herstellung rekombinanter Proteine in
*Bacillus subtilis***

Erstgutachter:
Zweitgutachter:

Prof. Dr. Karl Steffens
Dipl. Ing. Tanno Hübel

vorgelegt von:

Madlen Konietzke

Neubrandenburg, 27.02.2009

urn:nbn:de:gbv:519-thesis2009-0006-1

Abstract

Bacillus subtilis is an attractive host for the production of recombinant proteins. It is capable of secreting functional extracellular proteins directly to the culture medium; it is non-pathogenic; it does not produce any endotoxins; and a great deal of vital information has now been acquired. However, in a position to external stress agents, for example nutrient shortage, *Bacillus subtilis* is able to develop resistant survival forms, the spores. Spore formation is an unwanted effect while production processes. Aim of this work is to develop a procedure to detect spores as an in- process- control. While spores are resistant to high temperatures, vegetative cells are not. Thus, a detection method for spores based on inactivation of vegetative cells by heating was developed. To determine required conditions to inactivate *Bacillus subtilis* cells, a *Bacillus subtilis* strain deficient in spore formation was used. It was shown that cells were efficiently inactivated at 80 °C for 30 minutes whereas spores survived these conditions. Spore formation in a culture of *Bacillus subtilis* WB800 was determined after 8 h.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 5 |
| 1.1 | Ziel dieser Arbeit | 5 |
| 1.2 | <i>Bacillus subtilis</i> als biologischer Organismus | 6 |
| 1.3 | <i>Bacillus subtilis</i> als Wirt für biotechnologische Prozesse | 6 |
| 1.4 | Sporulation | 7 |
| 2 | Material und Methoden | 10 |
| 2.1 | Verwendete Materialien und Geräte | 10 |
| 2.2 | Kultivierungen | 13 |
| 2.3 | Bestimmung der Zelldichte | 13 |
| 2.4 | Gesamtkeimzahlbestimmung | 14 |
| 2.5 | Sporenfärbung nach Wirtz | 15 |
| 2.6 | Sporulationsnachweis durch Erhitzung | 16 |
| 3 | Ergebnisse | 17 |
| 3.1 | Bestimmung der Zelldichte | 17 |
| 3.2 | Gesamtkeimzahlbestimmung | 19 |
| 3.3 | Sporenfärbung | 21 |
| 3.4 | Sporulationsnachweis durch Erhitzung | 25 |
| 4 | Diskussion | 27 |
| 4.1 | Bestimmung der Zelldichte/ Gesamtkeimzahlbestimmung | 27 |
| 4.2 | Sporenfärbung | 29 |
| 4.3 | Sporulationsnachweis durch Erhitzung | 30 |
| 5 | Zusammenfassung | 33 |
| 6 | Referenzen | 34 |
| | Abbildungsverzeichnis | 35 |
| | Tabellenverzeichnis | 36 |
| | Erklärung über die selbstständige Anfertigung der Arbeit | 37 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|--|
| <i>B. subtilis</i> | <i>Bacillus subtilis</i> |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| LAF | engl.: Laminar Air Flow, deutsch: laminare Luftströmung |
| rpm | engl.: revolutions per minute, deutsch: Umdrehungen pro Minute |

verwendete Formelzeichen, Symbole

| | |
|------------------------------------|--|
| °C | Grad Celsius |
| g | Gramm |
| h | Stunde |
| μL | Mikroliter, $1\mu\text{L} = 10^{-6}\text{L}$ |
| μm | Mikrometer, $1\mu\text{m} = 10^{-6}\text{m}$ |
| M | Molar $1\text{M} = 1\text{mol L}^{-1}$ |
| mL | Milliliter $1\text{mL} = 10^{-3}\text{L}$ |
| D- Wert | Dezimale Reduktionszeit, entspricht der Zeit in Minuten, die bei einer definierten Temperatur notwendig ist, um die Ausgangskeimzahl um 90% bzw. auf ein Zehntel zu reduzieren |
| $\text{KbE} \times \text{mL}^{-1}$ | Keimbildende Einheiten pro Milliliter |
| OD_{600} | optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm |

1 Einleitung

1.1 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die Sporulation des Bodenbakteriums *Bacillus subtilis* zu charakterisieren und einen Test zu entwickeln, der es ermöglicht, Sporen in Fermentationsprozessen nachweisen zu können.

Bacillus subtilis wird bei der Miltenyi Biotec GmbH eingesetzt, um rekombinante humane Proteine zu exprimieren. Die Verwendung von *Bacillus subtilis* als Wirtsorganismus ist von Vorteil, da er ungefährlich für Menschen und Tiere, einfach zu handhaben und manipulierbar ist und die Fähigkeit besitzt, große Mengen Protein in das umgebende Medium zu sekretieren. Jedoch ist *Bacillus subtilis* in der Lage bei schlechten Umweltbedingungen wie z.B. Nährstoffmangel oder zu hohen Zelldichten in eine resistente Überlebensform überzugehen, den Sporen. In Produktionsprozessen für rekombinante Proteine ist die Sporenbildung unerwünscht und sollte vermieden werden, da die Sporen die Räumlichkeiten der Produktion kontaminieren könnten. Durch die Resistenz der Sporen gegenüber Hitze und Chemikalien, wie z.B. Ethanol, sind Sporen in Gerätschaften und Räumlichkeiten nur schwer zu inaktivieren. Bei der Produktion muss aber gewährleistet sein, dass eine Kontamination von Produkten und nachfolgenden Prozessen ausgeschlossen ist. Aufgabe der Prozessentwicklung ist es die Bildung resistenter Sporen in den Produktionsprozessen zu vermeiden. Daher soll ein Verfahren etabliert werden, mit dem zuverlässig und möglichst einfach der Zeitpunkt der Sporenbildung in Prozessen erkannt wird.

In dieser Arbeit soll zunächst der Zeitpunkt der Sporulation in *Bacillus subtilis* Kulturen bestimmt und des weiteren eine Methode erarbeitet werden, die Sporen in Bioreaktor-Kulturen nachweisen kann. Mit Hilfe der Angaben kann dann der Prozess der Fermentation für die Produktion rekombinanter Proteine verändert und verbessert werden.

1.2 *Bacillus subtilis* als biologischer Organismus

Bacillus subtilis, auch Heubazillus genannt, ist ein ca. 2 µm langes grampositives, stäbchenförmiges Bakterium, welches sich durch die peritriche Begeißelung schnell fortbewegen kann. Es ernährt sich chemoorganoheterotroph und lässt sich sowohl aus der Luft, dem Wasser als auch aus dem Boden isolieren (Bernhard, 2000). Verändern sich die äußeren Bedingungen, d.h. kommt es z.B. zu Hungererscheinungen, bildet *Bacillus subtilis* stark lichtbrechende Dauerformen, die Endosporen genannt werden und äußerst resistent gegenüber Hitze und Austrocknung sind (Wöstemeyer, 2008). Bevor es jedoch dazu kommt, versucht es Alternativen zur Sporulation zu verfolgen, denn beginnt der Organismus einmal mit der Bildung von Sporen, ist dieser Prozess nicht mehr aufzuhalten bzw. rückgängig zu machen, auch wenn sich die Bedingungen für vegetatives Wachstum wieder verbessern. Zu den vorher genutzten Alternativen gehört zum Beispiel die Ausscheidung von Antibiotika zur Hemmung von Konkurrenten. Diese sterben dann eventuell ab und stellen ihre Ressourcen somit *Bacillus subtilis* zur Verfügung (Bernhard, 2000). Stellt auch das keine Verbesserung der Umweltbedingungen dar, geht die Zelle in die sichere Überlebensform über und bildet Sporen aus.

1.3 *Bacillus subtilis* als Wirt für biotechnologische Prozesse

B. subtilis gewinnt in der Industrie zur Herstellung rekombinanter Proteine im Vergleich zu dem am meisten genutzten Mikroorganismus *E. coli* immer mehr an Bedeutung, nicht zuletzt durch die wesentlichen Vorteile von *B. subtilis*. Ein wichtiger Vorteil ist, dass *B. subtilis* im Gegensatz zu *E. coli* über keine äußere Zellmembran verfügt und Proteine daher ins Medium sekretieren kann (Brock, 2002). Dadurch wird die Aufreinigung vereinfacht, da es sich bei 70 – 80 % der Proteine im Überstand bereits um die Zielproteine handelt. Zusätzlich ist durch die Sekretion kein Zellaufschluß mehr nötig, wodurch die Gefahr einer möglichen DNA- Kontamination minimiert wird. *B. subtilis* ist grampositiv, d.h. er verfügt über keine äußere Zellmembran und bildet daher keine Endotoxine. Der Organismus ist zudem als GRAS- Organismus („generally regarded as safe“) eingestuft.

Jedoch birgt die Nutzung von *B. subtilis* auch Nachteile. Ein großer Nachteil ist zum einen die in Punkt 1.4 beschriebene Sporulation, die der Organismus als Überlebensform bei schlechten Umgebungsbedingungen ausbildet und zum anderen, dass *B. subtilis* über 8 extrazelluläre und 6 zellwandgebundene Proteasen verfügt, die mit ins Medium abgegeben werden und dort Zielproteine abbauen können.

Daraus resultierend erfolgte die Entwicklung proteasenegativer Mutanten. Als Ausgangstyp diente dabei *B. subtilis* 168 (Spizizen, 1959) von dem dann der in dieser Arbeit verwendete Stamm *B. subtilis* WB 800 als proteasedefizienter Stamm entwickelt wurde. Der Unterschied zum Ausgangstyp liegt darin, dass WB 800 nur noch über 1 von ursprünglich 8 extrazellulären und 5 von ehemals 6 zellwandgebundene Proteasen verfügt sowie chloramphenicol-resistent und tryptophanauxotroph ist (Wu et al., 2002). Des Weiteren sind die Expressionsraten von heterologen (z.B. humane) Proteinen im Vergleich zu *E. coli* geringer. Im großindustriellen Maßstab wird *B. subtilis* daher hauptsächlich zur Produktion von homologen Proteinen (z.B. Waschmittelenzyme) eingesetzt.

1.4 Sporulation

Bacillus subtilis kann zwei alternative Stadien annehmen, vegetatives Wachstum und Sporulation. Auf dem Weg der Sporulation durchläuft es mehrere Stadien, welche in Abb.1 auch schematisch dargestellt sind. Am Anfang wird die Entscheidung getroffen zwischen Wachstum und Sporulation. Diese Entscheidung wird gegen Ende des exponentiellen Wachstums getroffen, wenn die Zelldichte zunimmt und einzelne Komponenten der erforderlichen Nährstoffe knapp werden und ist morphologisch noch nicht sichtbar. Das Sporulationsprogramm kann nur dann effizient ablaufen, wenn die Zelldichte in der Kultur einen gewissen Wert überschreitet. Es wird angenommen, dass die Zellen eine Substanz ausscheiden, deren Konzentration als Maß für die Zelldichte von den Bakterien ausgewertet wird. Mindestens sieben Gene und deren Produkte sind an der Entscheidung über den Start der Sporulation verantwortlich, welche *spo0*-Gene genannt werden. Der Prozess von der Entscheidung der Mutterzelle für die Bildung einer Spore bis zur vollständig entwickelten Spore kann acht bis zehn Stunden in Anspruch nehmen.

In den Stadien zwei und drei erfolgt die asymmetrische Teilung der Zellen. Dieses Stadium ist als erstes morphologisch sichtbar. Jedes der beiden ungleichen Teilungsprodukte der Sporenmutterzelle durchläuft einen spezifischen Differenzierungsweg, der für den kleineren Teil in der Bildung der fertigen Spore und für den größeren Teil in der Lyse endet. In diesem Stadium ist die Spore (hier noch Vorspore genannt) noch vollkommen von der Versorgung der Mutterzelle abhängig, da sie vor allem für den Aufbau der mehrschichtigen Sporenwand viele Ressourcen benötigt.

In den Stadien vier und fünf findet die differentielle Morphogenese statt. Die Wand der Spore besteht aus zwei Schichten, dem Cortex, welcher sich innen befindet und dem Coat welcher außen liegt. Der Cortex besteht aus Peptidoglycan wie auch bei der vegetativen Zelle. Die Sporenhülle besitzt eine vielschichtige Struktur, die durch Ablagerung von rund 12 verschiedenen Proteinen in zeitlich festgelegter Folge entsteht. In den letzten Stadien findet die Lyse der Mutterzelle statt. Ist diese sehr weit fortgeschritten, tritt die Spore aus und führt nun keinen messbaren Stoffwechsel mehr aus. Zu ihren Aufgaben zählt in erster Priorität lebensfeindliche Bedingungen zu überstehen wozu z.B. Hitze, Austrocknung, UV- und Röntgenstrahlen zählen. Wird aber das Nährstoffangebot besser, keimt die Spore wieder zu einer vegetativen Zelle aus und durchläuft den normalen Zellteilungszyklus (Wöstemeyer, 2008). Die Resistenz der Sporen gegenüber höheren Temperaturen im Vergleich zu den vegetativen Zellen kann man sich zunutze machen, um Sporen in einer Suspension von den vegetativen Zellen zu trennen und gleichzeitig ihre Anzahl in der Kultur zu bestimmen.

Die vegetativen Zellen von *Bacillus subtilis* werden nach 10 min Erhitzung bei 80 °C im Wasserbad abgetötet. Um die Endosporen abzutöten ist ein D_{95} - Wert von 450 min bei Erhitzung mit trockener Hitze angegeben. Das bedeutet, dass nach 450 min Erhitzung bei 95 °C die Sporenpopulation um 90 % abgetötet ist (Holzapfel, Baumgart, Frank, 2004).

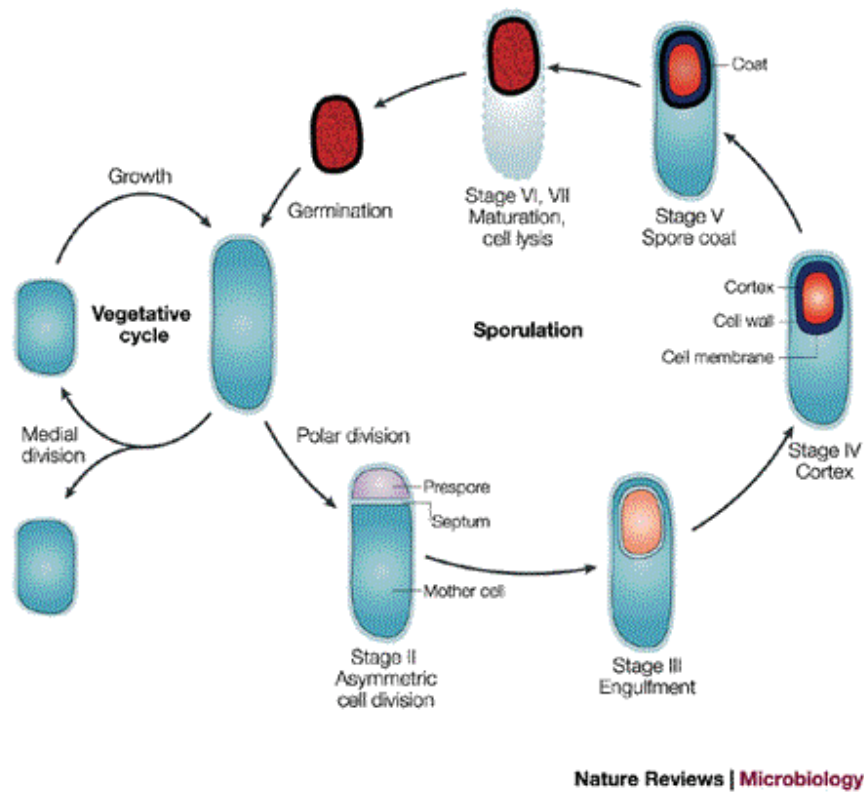


Abb.1: Verlauf der Sporulation bei *Bacillus subtilis* in den verschiedenen Stadien (Errington, J., 2003)

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien und Geräte

Tab. 1: Verwendete Medien und Lösungen

| Bezeichnung | Zusammensetzung | Zusatz |
|--|--|--|
| Solution 1 für SB- Medium | 32,0 g Peptone 20,0 g Yeast Extract 5,0 g NaCl 0,5 mL 10M NaOH ad 1 L entionisiertes Wasser (für 3L angesetzt) | gelöst je 1 L in Glasflasche füllen und autoklavieren |
| Solution 2 für SB- Medium | 30,0 g Na ₂ HPO ₄ 15,0 g KH ₂ PO ₄ 5,0 g NH ₄ Cl 15,0 mg CaCl ₂ ad 250 mL entionisiertes Wasser | 0,2 µm filtrieren |
| SB-Medium für <i>B. subtilis</i> WB 800 | 47,5 mL Solution 1 2,5 mL Solution 2 50 µL Chloramphenicol 500 µL 50%-ige Glucose | |
| Glucoselösung (50%) | 2,5 g α-D(+)-Glucose Mo- nohydrat ad 125 mL entionisiertes Wasser | Gemisch erwärmen, damit Glucose sich löst, anschlie- ßend 0,2 µm filtrieren Lagerung bei + 4 °C |
| 10 M NaOH | 100 g NaOH ad 250 mL Milli Q | |
| LB Veggie Medium | 10 g NaCl 10 g Veggie Peptone 5 g Yeast Extract | |

| | | |
|----------------|--|---|
| | ad 1 L entionisiertes Wasser | |
| LB Veggie Agar | LB Veggie Medium 1 L 15 g NO1 Oxid Agar ad 1 L entionisiertes Wasser | lösen, auf 4 × 250 ml aufteilen und autoklavieren |

Tab. 2: Verwendete Stämme

| Stamm | Herkunft |
|--------------------------------|--|
| <i>Bacillus subtilis</i> WB800 | Institut für Pharmazie, Universität Greifswald |
| <i>Bacillus subtilis</i> DE101 | American Type Culture Collection, Manassas |

Tab. 3: Verwendete Chemikalien

| Chemikalie | Hersteller | Artikel-Nummer | Lot-Nummer |
|---|------------|----------------|---------------------------|
| Ammoniumchlorid NH ₄ Cl | Merck | 1.01145.0500 | A655345537 |
| Calciumchlorid CaCl ₂ | Merck | 1.02378.0500 | K35417578547 |
| Chloramphenicol Stammlösung [5 mg/ml] | Roth | 3886.1 | |
| Kaliumhydrogenphosphat KH ₂ PO ₄ | Roth | PO18.2 | 18785766 |
| Malachitgrün | FLUKA | 90903 | 1357998 |
| Natriumchlorid NaCl | Merck | 1.6224.5000 | K28549224 K35018524533 |
| Natriumhydrogenphosphat Na ₂ HPO ₄ | Merck | 1.06585.5000 | K91235685424 |
| Natronlauge NaOH | Merck | 1.06482.1000 | B602282527 |
| NO1 Oxid Agar | NO1 Oxid | LP0011 | |
| SafraninO | FLUKA | 39955 | 1336545 |
| Veggie Peptone | Novagen | 71280 | M00035543 |
| Yeast Extract | Novagen | 71279 | M00050552 |
| α- D (+)- Glucose Monohydrat | Roth | 6780.1 | 30788216 |

Tab. 4: Verwendete Geräte

| Name | Hersteller | Artikel-/ In- ventar- Nr. | Lot- Nr. |
|---|--------------------------------|--------------------------------------|-------------------|
| Autoklav 5075 ELV | Tuttnauer Systec | 10746 | - |
| Einmalküvetten | Ratiolab | 2712010 | - |
| Erlenmeyerkolben, 500 mL | Corning | 431145 | 18408006 |
| Ethanoltücher | Prostat | - | - |
| Zentrifugenröhren,15 ml | Sarstedt | 62.554.002 | 8113801 |
| Zentrifugenröhren, 50 ml | Sarstedt | 62.547.004 | 8113401 |
| Heizblock | HLC | 12463 | - |
| Inkubator/ Schüttler | E. Bühler | - | - |
| Laminar Air Flow | Holten | 11010 | - |
| Mikrowelle | SHARP | 13732 | - |
| Objektträger | Marienfeld | 1000200 | 13938233 |
| Parafilm | Pechiny Plas- tic Packaging | 291-1212 | - |
| Petrischalen (steril, 90 × 14 mm ohne Nocken) | VWR | 3910880 | 248283 |
| Photometer | Genesys 10uv | 10389 | - |
| Pipette 0,5-10 µL | Eppendorf | - | - |
| Pipette 100-1000 µL | Eppendorf | - | - |
| Pipette 10–100 µL | Eppendorf | - | - |
| Pipette 200 µL | Eppendorf | - | - |
| Pipette 25 mL | Costar | - | - |
| Pipettenspitzen 1000 µL | Eppendorf | 0030075064 | W130638R- 3147 |

| | | | |
|---------------------------------------|-----------|------------|---------------|
| Pipettenspitzen 200 μ L | Eppendorf | 0030075021 | W129475N-2631 |
| Pipettespitzen Dual-filter 10 μ L | Eppendorf | 0030077520 | W128628K-2130 |
| Thermomixer compact | Eppendorf | 10423 | - |
| Waage ACCULAB VICON | Sartorius | 11132 | - |
| Waage BP 61 | Sartorius | 2320 | - |

2.2 Kultivierungen

Für die Kultivierung wird ein steril verpackter 500-mL-Erlenmeyerkolben verwendet, in den 47,5 mL Solution 1, 2,5 mL Solution 2, 50 μ L Chloramphenicol und 500 μ L 50 %-ige Glucose pipettiert werden. Anschließend wird mit *B. subtilis* WB800-Veggie-BPS080407.01 aus Glycerin-Stock angeimpft, die bei < -20 °C gelagert wurden. Die Kultur wird in einem Inkubator mit integriertem Schüttler bei 37 °C und 250 rpm inkubiert.

2.3 Bestimmung der Zelldichte

Um die Menge der Zellen abschätzen zu können, wird die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm photometrisch gemessen.

Dazu wird 1,0 mL der zu untersuchenden Suspension in eine Halbmikro Einmalküvette pipettiert und im Photometer gemessen. Als Leerwert dient 1,0 mL des verwendeten Mediums. Erreicht die OD_{600} einen Wert größer 1,0 wird die Probe mit dem Medium verdünnt, je nach Höhe des gemessenen Wertes 1:10 (100 μ L der Zellsuspension mit 900 μ L des Mediums) oder 1:100 (10 μ L der Zellsuspension mit 990 μ L des Mediums).

2.4 Gesamtkeimzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Gesamtkeimzahl wird wie in Punkt 2.2 beschrieben, eine Kultur angesetzt und zu jeder Stunde ausgehend von Stunde 0 eine Probe genommen. Von dieser wird dann mit Hilfe einer Verdünnungsreihe die Gesamtkeimzahl bestimmt. Für die Bestimmung werden folgende Verdünnungen benutzt:

Tab. 5: Herstellung Verdünnungsreihe für Gesamtkeimzahlbestimmung

| Zellsuspension | Verdünnungsmittel | Verdünnung | Verdünnungsfaktor gesamt |
|----------------------|-------------------|------------|-----------------------------|
| 10µL Probe Kultur | 990 µL Solution 1 | 1: 100 | 10^2 |
| 10 µL 10^2 | 990 µL Solution 1 | 1: 100 | 10^4 |
| 100 µL 10^4 | 900 µL Solution 1 | 1: 10 | 10^5 |
| 100 µL 10^5 | 900 µL Solution 1 | 1: 10 | 10^6 |
| 100 µL 10^6 | 900 µL Solution 1 | 1: 10 | 10^7 |
| 100 µL 10^7 | 900 µL Solution 1 | 1: 10 | 10^8 |

Von den Verdünnungen werden jeweils 100 µL auf LB- Veggie- Agar ausgestrichen, bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und anschließend ausgezählt. Von den einzelnen Verdünnungen einer Stunde wird die durchschnittliche Keimzahl pro mL berechnet. Diese wird an folgendem Beispiel gezeigt:

Tab. 6: Beispieldaten zur Berechnung der $\text{KbE} \times \text{mL}^{-1}$ ausgehend von einer Verdünnungsreihe

| | | | |
|--------------------|--------|--------|--------|
| Verdünnung | 10^5 | 10^6 | 10^7 |
| KbE/ 100 µL | 267 | 38 | 5 |

Berechnung: $[(267 \times 10^5) + (38 \times 10^6) + (5 \times 10^7)] / 3 \times 10 = 382 \times 10^6 \text{ KbE} \times \text{mL}^{-1}$

Dabei werden die gezählten Keime mit der jeweiligen Verdünnung multipliziert und die einzelnen Ergebnisse addiert. Je nach Anzahl der auswertbaren Verdünnungen wird an-

schließlich der Mittelwert gebildet. Da nur 100 μL ausplattiert werden, das Ergebnis aber in mL angegeben wird, wird am Ende noch mit 10 multipliziert. So erhält man die Gesamtkeimzahl der Ausgangsprobe zu einem bestimmten Zeitpunkt des Wachstums.

Die Standardabweichung wird nach folgender Formel berechnet:

$$s_X := \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

mit \bar{x} ... Mittelwert

x_i ... gezählte Kolonien je Verdünnung auf Nähragar

N ... Anzahl der ausgezählten Verdünnungen

s_X ... Standardabweichung

2.5 Sporenfärbung nach Wirtz

Die Sporenfärbung wird durchgeführt, um die mögliche Sporulation von *Bacillus subtilis* ersichtlich zu machen und damit einen Vergleich zur in Punkt 2.5 aufgeführten Hitzebehandlung zu bekommen.

Sporen sind schwer anfärbbar, da die Farbstoffe aufgrund der festen Sporenwand nur sehr langsam eindringen, sodass sie nach Einfachfärbungen z.T. als ungefärbte Stellen in den Zellen erkennbar bleiben. Die spezifische Sporenfärbung erfordert deshalb das Aufkochen des Farbstoffes (hier Malachitgrün) mit den hitzefixierten Zellen und anschließender Gegenfärbung (SafraninO) (Küsel, Schramm, 2002). Vegetative Zellen erscheinen unter dem Mikroskop rot eingefärbt und Sporen grün eingefärbt.

Dabei werden unter der LAF auf einen vorher mit Ethanol gereinigten Objektträger zuerst 4,5 μL NaCl mit einer Pipettenspitze aufgetragen und anschließend 0,5 μL der Zellsuspension auf die gleiche Stelle. Das Gemisch wird dann mit einer Pipettenspitze auf dem Objektträger verteilt und unter der LAF für mindestens 30 Minuten trocknen gelassen. Anschließend wird die Probe außerhalb der LAF hitzefixiert, indem der Objektträger dreimal zügig durch die Bunsenbrennerflamme gezogen wird. Im Anschluss erfolgt die Sporenfärbung mit Malachitgrün, wobei die fixierte Probe mit ausreichend Malachitgrün

überschichtet (200 µL sind meist ausreichend) und fünfmal durch die Flamme gezogen wird. Dabei ist zu beachten, dass das Malachitgrün nicht verdampfen bzw. eintrocknen darf, da dies eine zu hohe Temperatur bedeuten würde. Das Malachitgrün wird nun mit entionisiertem Wasser gründlich abgespült, anschließend wird die Probe für 30 Sekunden in ein SafraninO Bad gestellt und dann wieder gründlich mit entionisiertem Wasser abgespült. Den Objektträger nun an der Luft trocknen lassen und unter dem Mikroskop bei 1000-facher Vergrößerung ansehen. Um den Ablauf der Sporenbildung nachvollziehen zu können, wird zu jeder Stunde (Stunde 0-9, 24, 32, 49) eine Probe der Kultur WB800 genommen und gefärbt.

2.6 Sporulationsnachweis durch Hitzeresistenz

Sporen besitzen im Gegensatz zu den vegetativen Zellen die Eigenschaft hohe Temperaturen zu überleben, d.h. sie sind bestimmte Zeiträume hohen Temperaturen gegenüber resistent. Diese Eigenschaft kann man sich zunutze machen, um die Sporen in einer Suspension von den vegetativen Zellen zu trennen und gleichzeitig ihre Anzahl in der Kultur zu bestimmen. Für die Ermittlung der Erhitzungstemperatur und -dauer wird ein sporulationsdefizienter Stamm verwendet. Hierbei handelt es sich um den Stamm *Bacillus subtilis* DE101, der das Gen *spo0A*Δ677 nicht synthetisieren kann, welches für den Beginn der Sporulation verantwortlich ist. Daher ist die Wahrscheinlichkeit der Sporenbildung bei diesem Stamm sehr gering. Für die Ermittlung der Parameter Temperatur und Zeit wird von der Kultur jeweils 1,0 mL entnommen, in ein steriles Eppendorfgefäß gegeben und bei 70 °C 20 und 30 min und bei 80 °C 10, 20 und 30 min lang mit trockener Hitze erhitzt. Nach Ablauf der Zeit werden von der Probe 100 µL auf LB- Veggies- Agar ausplattiert und bei 37 °C im Brutschrank über Nacht inkubiert. Die Erhitzung der Kultur von *B. subtilis* wird nach dem gleichen Ablauf von 0 bis 8 Stunden stündlich und nach 24, 32 und 49 Stunden Kultur durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Bestimmung der Zelldichte

Bei der Messung der Optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) wurden die in Tab.7 zusammengefassten Messwerte ermittelt.

Tab. 7: OD_{600} von *B. subtilis* WB800 in SB- Medium während 49- stündigem Wachstum

| Zeit [h] | OD_{600} |
|----------|------------|
| 0 | 0,067 |
| 1 | 0,069 |
| 2 | 0,121 |
| 3 | 0,400 |
| 4 | 1,56 |
| 5 | 3,80 |
| 6 | 5,30 |
| 7 | 6,60 |
| 8 | 7,95 |
| 9 | 7,19 |
| 24 | 9,32 |
| 32 | 9,64 |
| 49 | 9,80 |

Anhand der Werte ist erkennbar, dass nach 8 Stunden Wachstum im Kolben die stationäre Phase einsetzt, da sich die OD_{600} nicht mehr erhöht. Für eine deutlichere Darstellung ist in Abb. 2 die Wachstumskurve graphisch dargestellt.

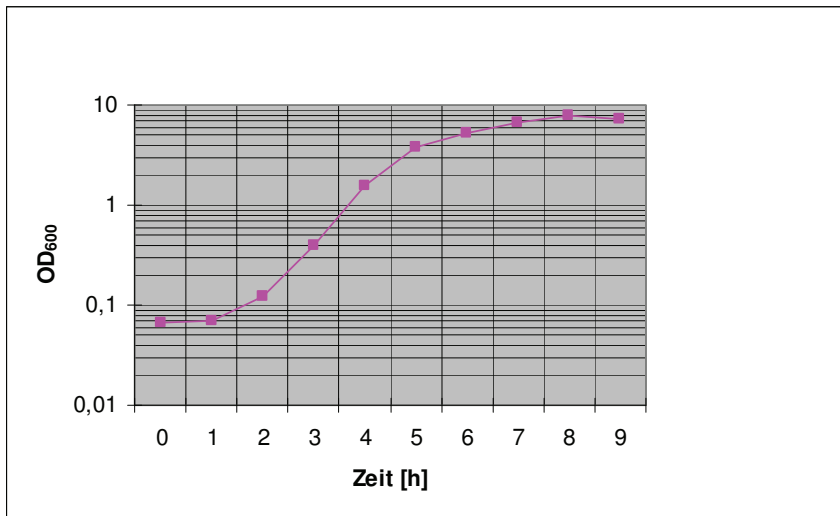


Abb. 2: OD₆₀₀ von *B. subtilis* WB800 von 0 bis 9 Stunden

Anhand der graphischen Darstellung sind die verschiedenen Stationen innerhalb der Wachstumskurve gut erkennbar. Von der Animpfzeit Stunde 0 mit einer OD₆₀₀ von ca. 0,1 bis Stunde 1 findet die Lag-Phase statt, in der sich die Zellen an die Umgebungsbedingungen anpassen und sich Wachstum und Vermehrung daher verzögern. Diese Phase ist daran erkennbar, dass sich die OD₆₀₀ kaum ändert und somit die Zellmasse in der Suspension nicht zugenommen hat. Ab Stunde 2 befinden sich die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase, in der eine gleichmäßige Zellverdopplung stattfindet. Diese Phase hält bis Stunde 8 an und ist daran zu erkennen, dass die optische Dichte von 0,2 in Stunde 2 bis auf 7,9 in Stunde 8 ansteigt. Danach schließt sich die stationäre Phase an. In dieser Phase wird das Bakterienwachstum reduziert bis zur Einstellung jeglicher Vermehrung. Ursache hierfür ist z.B. Nahrungsmangel. Ab Stunde 8 steigt die optische Dichte nicht mehr exponentiell an und stellt sich bei ca. 7,5 ein.

3.2 Gesamtkeimzahlbestimmung

Die Gesamtkeimzahl wird in den Stunden 0 bis 9 bestimmt. Hierbei wurden die in Tabelle 8 aufgeführten Werte ermittelt.

Tab. 8: KbE \times mL⁻¹ der einzelnen Verdünnungsstufen (Stunde 0 bis Stunde 9) von *B. subtilis* in SB- Medium; 100 μ L ausgestrichen

| Zeit [h] | Verdünnungsstufe | | | | | KbE \times mL ⁻¹ | Standardabweichung | Variationskoeffizient (%) |
|----------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| | 10 ⁴ | 10 ⁵ | 10 ⁶ | 10 ⁷ | 10 ⁸ | | | |
| 0 | 33 | 5 | 1 | - | - | 6 \times 10 ⁶ | 3,48 \times 10 ⁶ | 54 |
| 1 | 48 | 10 | 0 | 0 | - | 7 \times 10 ⁶ | 3,67 \times 10 ⁶ | 50 |
| 2 | - | 24 | 2 | 0 | - | 22 \times 10 ⁶ | 2,83 \times 10 ⁶ | 13 |
| 3 | - | 18 | 4 | 0 | - | 25 \times 10 ⁶ | 15,56 \times 10 ⁶ | 62 |
| 4 | - | 267 | 38 | 5 | - | 382 \times 10 ⁶ | 116,52 \times 10 ⁶ | 31 |
| 5 | - | 575 | 75 | 7 | - | 675 \times 10 ⁶ | 90,14 \times 10 ⁶ | 13 |
| 6 | - | 730 | 103 | 10 | - | 920 \times 10 ⁶ | 165,23 \times 10 ⁶ | 18 |
| 7 | - | n.a. | 207 | 11 | - | 1590 \times 10 ⁶ | 685,89 \times 10 ⁶ | 43 |
| 8 | - | n.a. | 336 | 18 | - | 2580 \times 10 ⁶ | 1103,09 \times 10 ⁶ | 43 |
| 9 | - | n.a. | 226 | 20 | 2 | 2090 \times 10 ⁶ | 150,11 \times 10 ⁶ | 7 |
| 24 | - | - | 251 | 29 | 5 | 3470 \times 10 ⁶ | 1339,29 \times 10 ⁶ | 39 |
| 32 | - | - | 697 | 64 | 9 | 7457 \times 10 ⁶ | 2515,48 \times 10 ⁶ | 34 |

Für eine bessere Auswertung werden die Ergebnisse graphisch als Wachstumskurve dargestellt (Abb. 3).

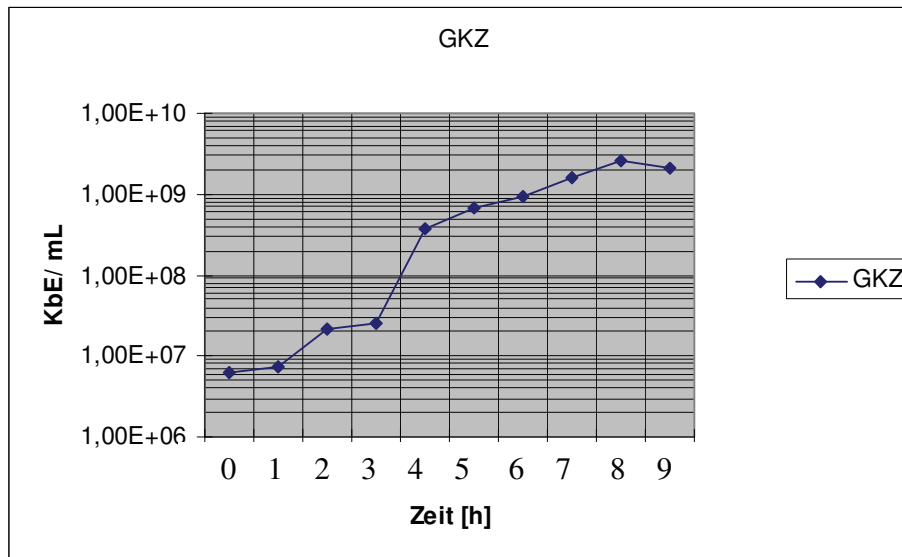


Abb. 3: Kbe \times mL⁻¹ von WB800 von Stunde 0 bis Stunde 9

Die Kultur hat nach dem Animpfen eine Gesamtkeimzahl von $6,1 \times 10^6$ Zellen pro mL. Nach der beginnenden Lag- Phase (Stunde 0 und 1) schließt sich das exponentielle Wachstum an (Stunde 2 bis Stunde 8). Ab Stunde 8 steigt der Wert der Kbe \times mL⁻¹ nicht weiter an und erreicht einen konstanten Wert.

3.3 Sporenfärbung

Von der Kultur *B. subtilis* WB800 in SB- Medium wird stündlich eine Probe genommen und die Sporenfärbung durchgeführt. Die im Folgenden aufgeführten Mikroskopbilder zeigen die Zellentwicklung bis hin zur Sporenbildung in den vegetativen Zellen und deren Freisetzung bei 1000- facher Vergrößerung.



Abb. 4: *B. subtilis* WB800 Sporenfärbung nach 0 h Wachstum, keine Sporenbildung sichtbar



Abb. 5: *B. subtilis* WB800 Sporenfärbung nach 1 h Wachstum, keine Sporenbildung sichtbar



Abb. 6: *B. subtilis* WB800 Sporenfärbung nach 2 h Wachstum, keine Sporenbildung sichtbar



Abb. 7: *B. subtilis* WB800 Sporenfärbung nach 3 h Wachstum, keine Sporenbildung sichtbar



Abb. 8: *B. subtilis* WB800 Sporenfärbung nach 4 h Wachstum, keine Sporenbildung sichtbar



Abb. 9: *B. subtilis* WB800 Sporenfärbung nach 5 h Wachstum, keine Sporenbildung sichtbar



Abb. 10: *B. subtilis* WB800 Sporenfärbung nach 6 h Wachstum, keine Sporenbildung sichtbar



Abb. 11: *B. subtilis* WB800 nach 7 h Wachstum, keine Sporenbildung aber Ausbuchtungen an Zellen sichtbar



Abb. 12: *B. subtilis* WB800 nach 8 h Wachstum, keine Sporenbildung aber Ausbuchtungen an Zellen sichtbar

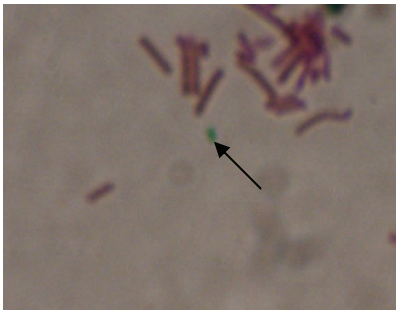


Abb. 13: *B. subtilis* WB800 nach 24 h Wachstum, grün gefärbte Spore erkennbar



Abb. 14: *B. subtilis* WB800 nach 32 h Wachstum, grün gefärbte Spore erkennbar und lysierte Zellen

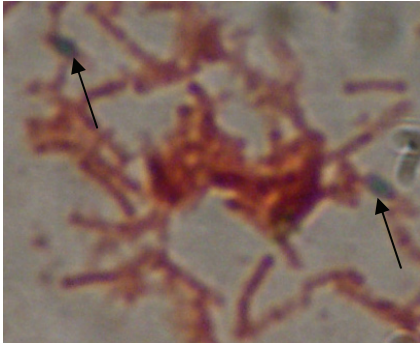


Abb. 15: *B. subtilis* WB800 nach 49 h Wachstum, grün gefärbte Sporen in Zellen liegend erkennbar

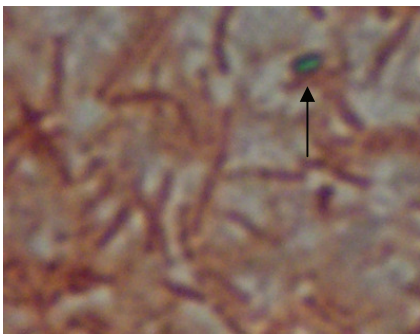


Abb. 16: *B. subtilis* WB 800 nach 49 h Wachstum, grün gefärbte Spore freiliegend erkennbar

3.4 Sporulationsnachweis durch Erhitzung

Bei der Ermittlung der optimalen Erhitzungstemperatur und –dauer mit Hilfe des Stammes *B. subtilis* DE101 wurden die in Tabelle 9 zusammengefassten Ergebnisse ermittelt.

Tab. 9: Erhitzung *B. subtilis* DE101 bei unterschiedlichen Temperaturen und Erhitzungsdauer

| Erhitzungstemperatur (°C) | Erhitzungsdauer (min) | Wachstum auf Platte |
|---------------------------|-----------------------|---------------------------|
| 70 | 20 | Platte komplett bewachsen |
| 70 | 30 | Platte komplett bewachsen |
| 80 | 10 | kein Wachstum |
| 80 | 20 | kein Wachstum |
| 80 | 30 | kein Wachstum |

Nach der Durchführung der Probenerhitzung von *B. subtilis* WB800 wie in Punkt 2.6 beschrieben, liegen die in Tabelle 10 aufgeführten Ergebnisse vor.

Tab. 10: Anzahl der ausgekeimten Sporen von *B. subtilis* WB800 nach Erhitzung 80 °C, 30 min in 100 µL bzw. 1 mL Probenvolumen

| Stunde [h] | KbE / 100 µL nach 80 °C, 30 min | KbE × mL ⁻¹ |
|------------|------------------------------------|------------------------|
| 0 | 0 | 0 |
| 1 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 0 |
| 5 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 0 |
| 8 | 1 | 10 |
| 24 | 50 | 500 |
| 32 | 587 | 5870 |
| 49 | n.a. vollständig bewachsen | - |

Ab Stunde 8 sind vollständig entwickelte Sporen in der Kultur vorhanden. In Stunde 24 konnten 50 Sporen nach der Erhitzung gezählt werden. Die Anzahl der Sporen erhöht sich drastisch von Stunde 24 zu Stunde 32, wo bereits 587 ausgekeimte Sporen in 100 µL vorhanden sind. In Stunde 49 kann keine Aussage über die Anzahl der ausgekeimten Sporen getroffen werden, da der gesamte Nähragar stark bewachsen war und somit die Auszählung einzelner Kolonien nicht mehr möglich.

4 Diskussion

4.1 Bestimmung der Zelldichte/ Gesamtkeimzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zelldichte mittels Messung der OD_{600} und der Gesamtkeimzahl wird in einem Zeitraum von 0 bis 9 Stunden durchgeführt. Zum besseren Vergleich der beiden Messungen sind die Ergebnisse in Abb. 17 in einem Diagramm nochmals zusammengefasst.

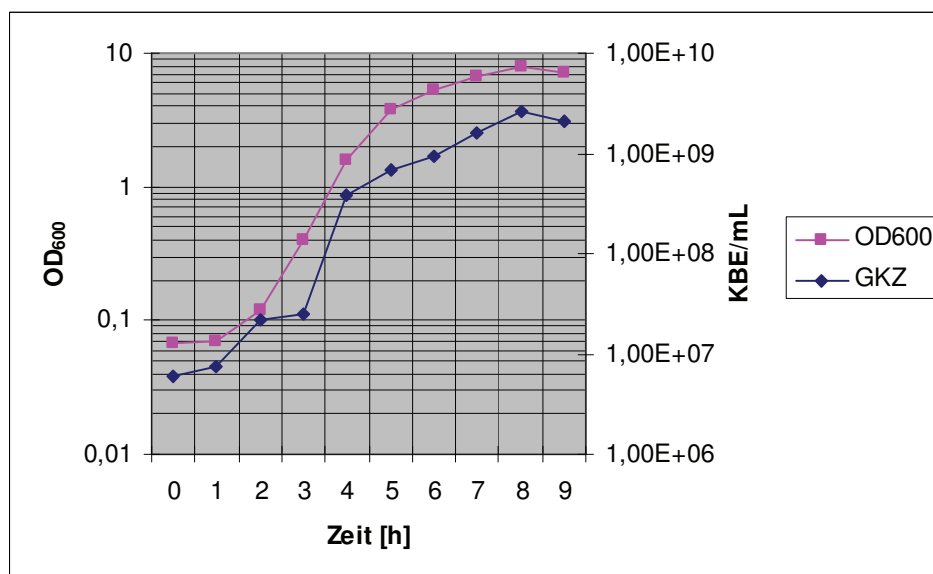


Abb. 17: OD_{600} und $KbE \times mL^{-1}$ von *B. subtilis* WB800 von 0 bis 9 Stunden

Die Wachstumskurve der OD_{600} - Messung spiegelt eine typische Wachstumskurve wieder. Nach der anfänglichen Lag- Phase in Stunde 0 bis 1, in der sich die Bakterien an das neue Medium anpassen, beginnt die Log- Phase, in der exponentielles Wachstum stattfindet. Diese Phase zieht sich bis zur Stunde 8 hin. Anschließend setzt die stationäre Phase ein. Ab diesem Zeitpunkt findet weder Wachstum noch Vermehrung mehr statt, da die Nährstoffe aufgebraucht sind und dadurch die letzten Reserven zur Erhaltung des Lebens genutzt werden. Die letzte Phase, die in diesem Diagramm nicht mehr mit aufgeführt ist, heißt Absterbephase. Ursachen für das Absterben können z.B. fehlende Nährstoffe im Medium sein oder Stoffwechselprodukte, die ins Medium sekretiert werden und somit eine Konzentration im Medium für die Bakterien erreichen, die toxisch wirkt. Spätere

Zunahmen der OD_{600} sind auf die Lyse der Zellen zurückzuführen und der damit verbundenen Freisetzung der Zersetzungsprodukte, die eine weitere Trübung der Suspension verursachen.

Die erstellte Wachstumskurve anhand der ermittelten Gesamtkeimzahlen stellt im Vergleich zur grafischen Darstellung der OD_{600} - Messwerte keine typische Wachstumskurve dar. Vor allem die Messwerte zu den Stunden 2, 6 und 7 liegen außerhalb der theoretischen Wachstumskurve. Zudem ist der Variationskoeffizient mit im Durchschnitt 33 % sehr hoch. In einigen Fällen werden sogar Werte über 50 % erreicht. Das bedeutet, dass die angegebenen Werte der $KbE \times mL^{-1}$ um +/- 50 % schwanken können. Damit erklärt sich auch der Verlauf der Gesamtkeimzahl in Abb. 17. Diese Abweichungen können ihre Ursachen in der Durchführung des Versuches zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl haben. Für den Versuch wurde zu jeder Stunde eine Verdünnungsreihe angefertigt. Abweichende Ergebnisse können zum einen daher aus Fehlern beim pipettieren stammen oder durch unzureichendes Mischen der Proben. Bei einigen Verdünnungsstufen kam es zu einer hohen Anzahl zu zählender Keime auf den Agarplatten. Dadurch wuchsen Kolonien dicht nebeneinander und es kam zur Bildung kleiner sogenannter Rasen, d.h. man konnte die Kolonien nur noch schwer voneinander getrennt betrachten. Trotz Zählung mit Zählrohr kann es dabei zu falschen Zählungen kommen, z.B. durch Auslassen einiger Kolonien. Daher kann es zu der abweichenden Wachstumskurve kommen, die aus den Ergebnissen der Gesamtkeimzahlbestimmung erstellt wurde. Da es sich bei der Bestimmung der OD_{600} um eine Bestimmung mit Hilfe eines Photometers handelt und bei der Gesamtkeimzahlbestimmung mit Hilfe des Ausstrichverfahrens um eine manuelle Bestimmung, kann das ein Grund für die abweichenden Ergebnisse bei der Gesamtkeimzahlbestimmung sein, da hier manuelle Fehler mit eingehen.

Trotzdem kann man auch hier den gleichen Verlauf und die gleiche Phaseneinteilung erkennen wie bei der OD_{600} - Bestimmung. In Stunde 0 und 1 bleiben auch hier die $KbE \times mL^{-1}$ relativ gleich, d.h. es findet noch keine Vermehrung statt, da sich die Bakterien erst ans neue Medium anpassen müssen. Anschließend steigen die Werte der ermittelten $KbE \times mL^{-1}$ an, was ein Zeichen für das exponentielle Wachstum ist. In dieser Phase befindet sich *B. subtilis* bis ca. zur 8. Stunde, da die $KbE \times mL^{-1}$ in der Stunde 9 nicht mehr ansteigt. Spätere Zunahmen bzw. das gleichbleiben der $KbE \times mL^{-1}$ auch

während der Absterbephase lassen sich auf die Sporenbildung zurückführen, da diese durch den Ausstrich auf Nähragar wieder auskeimen und dadurch bei der Ermittlung der Gesamtkeimzahl mitgezählt werden.

Anhand der grafischen Darstellung in Abb. 17 lässt sich jedoch ein gewisser Zusammenhang zwischen OD_{600} und Gesamtkeimzahlbestimmung mittels Ausstrichverfahren erkennen. Beide Wachstumskurven haben über den gesamten Messzeitraum gesehen den gleichen Verlauf, d.h. die einzelnen Wachstumsphasen werden gleichzeitig erreicht. Zudem lässt sich ein vergleichbarer Verlauf der beiden Wachstumskurven erkennen, lässt man die einzelnen Abweichungen bei der Gesamtkeimzahlbestimmung mittels Ausstrichverfahren außer acht.

4.2 Sporenfärbung

Die Abb. 4 bis 16 zeigen die Sporenfärbung nach Wirtz. Dabei wurde stündlich von Stunde 0 bis 8 und zu den Stunden 24, 32 und 48 eine Färbung durchgeführt. Abb. 4 zeigt *B. subtilis* zum Zeitpunkt der Animpfung, d.h. in Stunde 0. Auf dem Bild sind vegetative Zellen zu erkennen, die nach der Färbung rot eingefärbt sind. Diese verändern sich bis zur Färbung nach 6 h Wachstum nicht. Ab Stunde 7 ist nach der Färbung die asymmetrische Teilung sichtbar, welche im Sporulationsablauf in den Stadien zwei und drei stattfindet und bei der Bildung einer Spore als erstes morphologisch sichtbar ist (Wöstemeyer, 2008). Das bedeutet, dass zu diesem Zeitpunkt schon die Sporenbildung begonnen hat. In Abb. 13 ist eine freiliegende vollständig entwickelte Spore nach 24 h Wachstum erkennbar. Abb. 14 zeigt die Sporenfärbung nach 32 h Wachstum. Auch hier ist eindeutig eine Spore grün angefärbt und umliegend sowohl rot gefärbte vegetative Zellen als auch bereits lysierte Zellen, welche durchsichtig erscheinen. Nach 49 h Wachstum erkennt man noch immer vegetative Zellen, die Sporen bilden als auch bereits freiliegende Sporen, was man auf den Abb. 15 und 16 sehr gut erkennen kann. Anhand der Abbildungen kann man sagen, dass mithilfe der Sporenfärbung nach Wirtz nach 24 h eindeutig Sporen nachgewiesen werden können. Zwischen Stunde 8 und 24 hat keine Auswertung der Sporulation stattgefunden. Um den genauen Sporulationszeitpunkt bestimmen zu können, müsste dies im Rahmen weiterer Untersuchungen durchgeführt werden.

4.3 Sporulationsnachweis durch Erhitzung

Für die Ermittlung der optimalen Erhitzungstemperatur und –dauer wird der Stamm *B. subtilis* DE101 verwendet. Wie schon in Punkt 2.6 beschrieben, handelt es sich hierbei um einen Stamm, der mit einer hohen Wahrscheinlichkeit nicht sporuliert. Dieser Stamm wird als Negativprobe verwendet um herauszubekommen, bei welcher Temperatur und Zeit die meisten vegetativen Zellen absterben.

Anhand der in Tabelle 9 zusammengefassten Ergebnisse sieht man, dass bei 70 °C nach 20 und 30 min die Agarplatte noch vollständig bewachsen ist, d.h. dass bei dieser Temperatur vegetative Zellen in großer Zahl nicht abgetötet werden. Bei 80 °C sind bei allen Temperaturen keine Kolonien gezählt worden, was bedeutet, dass bereits 80 °C 10 Minuten lang ausreicht, um vegetativen Zellen abzutöten. Dieses Ergebnis stimmt auch mit dem angegebenen Literaturwert überein (W.H. Holzapfel, J. Baumgart, H. K. Frank, 2004).

Da *B. subtilis* wie in Punkt 1.4 angegeben einen D_{95} - Wert von 450 min besitzt, werden sowohl bei 80 °C 10 min als auch 80 °C 30 min Sporen nicht vollständig abgetötet. Eine 30- minütige Erhitzung anstatt einer 10- minütigen Erhitzung, wie in der Literatur angegeben und durch Erhitzung mit dem sporulationsdefizienten Stamm bestätigt ist, soll sicher stellen, dass weitestgehend alle vegetativen Zellen abgestorben sind. Daher wird für den Sporulationsnachweis eine 30- minütige Erhitzung bei 80 °C mit trockener Hitze durchgeführt.

Die in Tabelle 10 aufgeführten Ergebnisse zeigen die Anzahl $\text{KbE} \times \text{mL}^{-1}$ in 100 μL und 1 mL ausgestrichenem Probenvolumen nach Erhitzung 10 min bei 80 °C. Da die vegetativen Zellen nach dieser Erhitzung weitestgehend abgestorben sind, handelt es sich hierbei um wieder ausgekeimte Sporen, d.h. die Werte geben die Sporenanzahl in der Ausgangskultur an.

Wie zu erkennen ist, sind nach 8 h bereits 10 Sporen pro mL in der Kultur vorhanden. Das bedeutet, dass $3,87 \times 10^{-7} \%$ der $\text{KbE} \times \text{mL}^{-1}$ auf Sporen zurück zu führen sind. Nach 24 h sind es bereits 500 Sporen pro mL, d.h. $144,09 \times 10^{-7} \%$ der $\text{KbE} \times \text{mL}^{-1}$ sind auf Sporen zurück zu führen, welche bei der Gesamtkeimzahlbestimmung wieder ausgekeimt sind. Nach 32 h ist die Anzahl der Sporen auf 5870 pro mL angestiegen, was $787,15 \times 10^{-7} \%$ der $\text{KbE} \times \text{mL}^{-1}$ ausmacht. Nach 49 h kann keine Aussage mehr über die Sporen-

anzahl getroffen werden, da die gesamte Platte von einem Rasen bewachsen ist.

Die Ergebnisse der Erhitzung und der Sporenfärbung stimmen in den Stunden 0 bis 7 überein, d.h. sowohl bei der Erhitzung als auch bei der Färbung wurden keine Sporen nachgewiesen. Nach 8 h Wachstum waren durch die Färbung auch keine Sporen sichtbar, jedoch ist nach der Erhitzung in 100 μ L Ausstrichprobe eine Kolonie auf der Agarplatte gewachsen, d.h. nach 8 h sind in der Kultur bereits 10 Sporen pro mL vorhanden. Hierbei handelt es sich um eine sehr geringe Menge an vorhandenen Sporen in der Kultur. Da für die Sporenfärbung nur 5 μ L an Probe gefärbt und mikroskopisch untersucht werden, kann es sein, dass in diesem Probevolumen keine Sporen sichtbar sind. Die nachfolgenden Ergebnisse beider Untersuchungsmethoden stimmen wieder überein. Nach 24 h sind bereits 500 Sporen in einem mL der Kultur enthalten und auch bei der Färbung konnten mehrere Sporen nachgewiesen werden.

Jedoch zeigt der Vergleich beider Untersuchungen, dass durch die Durchführung der Erhitzung das Vorhandensein von Sporen zuverlässiger nachgewiesen werden kann. Ein Grund dafür ist, dass die Sporenfärbung mehr Fehler in ihrer Durchführung und Auswertung zulässt. Fehler in der Durchführung können z.B. sein, dass die Einwirkzeit der Färbemittel ungenügend ist oder das Färbemittel Malachitgrün nicht vollständig durch destilliertes Wasser entfernt wurde und dadurch in der die Zellen nicht mehr Lage sind, dass SafraninO aufzunehmen. Zudem kann es Schwierigkeiten bei der Auswertung der mikroskopischen Bilder geben, da in der Kultur neben vegetativen Zellen und Sporen auch noch andere Stoffe vorhanden sind, die durch die Färbung auch grün angefärbt sein können und daher eine eindeutige Aussage über vorhandene Sporen vor allem bei einer geringen Konzentration nur schwer möglich ist. Zudem wird ein kleineres Probevolumen untersucht, was bei einer geringen Konzentration an Sporen in der Kultur dazu führen kann, dass keine Sporen in der Probe enthalten sind. Bei der Erhitzung ist es dagegen möglich eine eindeutige Ja / Nein Entscheidung zu treffen, denn sind auf der Platte nach der Erhitzung Kolonien gewachsen, so sind Sporen in der Kultur vorhanden, ist nichts gewachsen so ist die Kultur sporenfrei. Auf der anderen Seite muss die ausgestrichene Probe auf der Agarplatte mehrere Stunden lang im Brutschrank inkubiert werden. Daher ist eine Aussage über die Sporulation nicht unmittelbar nach der Probenahme möglich. Die Durchführung der Erhitzung nimmt aber nur eine geringe Zeit in Anspruch und be-

steht nur aus wenigen Arbeitsschritten, während bei der Färbung die Probe vor der Färbung allein 30 min trocknen muss und während der Färbung mit offener Flamme gearbeitet werden muss, was ein erhöhtes Sicherheitsrisiko darstellt.

Die Erhitzung ist demzufolge sowohl in Anbetracht des eindeutigen Sporennachweises als auch im Bereich der Durchführung während des Prozesses besser geeignet als die Sporenfärbung und daher als In- Prozess- Kontrolle für den Sporennachweis in Fermentationsprozessen gut geeignet.

5 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, den Zeitpunkt der Sporulation von *B. subtilis* WB800 zu bestimmen und eine Methode zu erarbeiten, mit deren Hilfe zuverlässig die Sporulation in Bioreaktor- Kulturen nachgewiesen werden kann.

Dieser Nachweis soll mit Hilfe der Erhitzung der Probe und anschließender Ausstrich auf Nähragar erfolgen. Da nach der Erhitzung alle vegetativen Zellen absterben und nur die Sporen aufgrund ihrer hohen Hitzeresistenz überleben, keimen nur diese auf dem Nähragar aus. So lässt sich eindeutig sagen, ob Sporen in der Kultur vorhanden waren oder nicht. Die optimalen Versuchsparameter, d.h. die Erhitzungstemperatur und –dauer, wurde mit Hilfe des sporulationsdefizienten Stamm *B. subtilis* DE101 ermittelt. Die vegetativen Zellen waren bei 80 °C Erhitzung nach 10 min vollständig abgetötet, was auch mit den Literaturwerten übereinstimmt. Um während der Kontrolle zu gewährleisten, dass vegetativen Zellen abgetötet sind, wird die Erhitzung bei 80 °C 30 min lang durchgeführt und zur Kontrolle bei jeder Probenahme auch eine Sporenfärbung nach Wirtz. Stündlich wurde eine Probe der Kultur entnommen und die Versuche durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass die Erhitzung eine qualitativ und quantitativ bessere Aussage über die Sporulation einer Kultur macht als die Sporenfärbung. Zudem ist die Durchführung der Erhitzung schneller und die Wahrscheinlichkeit möglicher auftretender Fehler bei Durchführung und Auswertung geringer als bei der Sporenfärbung.

Daher ist diese Untersuchung für einen Nachweis enthaltender Sporen in Bioreaktor-Kulturen nutzbar.

6 Referenzen

Brock, T. D.: Mikrobiologie. 1. Nachdruck. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2002.

Bernhardt, J.: Microbial Physiology and Molecular Biology. Oktober 2000. Universität Greifswald, <http://microbio1.biologie.uni-greifswald.de:8080/institute/85>. 28.01.2008

Errington, J.: Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. Nature Reviews Microbiology, 1 (November 2003), 117- 126

Holzapfel, W.H. (Hrsg.), Baumgart, J.; Frank, H. K.: Lexikon Lebensmittel- Mikrobiologie und –Hygiene. 3. Auflage. Hamburg: Behr's, 2004

Küsel, K., Schramm, A.: Mikrobiologisches Praktikum für Geoökologen/ innen. Sommersemester 2002. Universität Bayreuth
http://www.bitoe.k.uni-bayreuth.de/mik/de/lehre/html/9802Skript_SS2002.pdf

Spizizen, J.: Genetic activity of deoxyribonucleic acid in reconstitution of biosynthetic pathways. Federation Proc. (Dezember 1959), Nr. 18, 957- 65

Wöstemeyer, J.: Sporulation bei *Bacillus subtilis*. 10.04.2007. <http://www2.uni-jena.de>. 19.11.2008; 08.05.2005

Wu, X., Lee, W., Tran, L., Wong, S.: Engineering a *Bacillus subtilis* expression- secretion system with a strain deficient in six extracellular proteases. Journal of Bacteriology, 173 (August 1991), Nr. 16, 4952- 4958

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Verlauf der Sporulation bei *Bacillus subtilis* in den verschiedenen Stadien (Errington, J., 2003)
- Abb. 2: OD₆₀₀ von *B. subtilis* WB800 von Stunde 0 bis 9
- Abb. 3: K_{bE}/ mL von *B. subtilis* WB800 von Stunde 0 bis 9
- Abb. 4: *B. subtilis* WB800 Sporenfärbung nach 0 h Wachstum, keine Sporenbildung sichtbar
- Abb. 5: *B. subtilis* WB800 Sporenfärbung nach 1 h Wachstum, keine Sporenbildung sichtbar
- Abb. 6: *B. subtilis* WB800 Sporenfärbung nach 2 h Wachstum, keine Sporenbildung sichtbar
- Abb. 7: *B. subtilis* WB800 Sporenfärbung nach 3 h Wachstum, keine Sporenbildung sichtbar
- Abb. 8: *B. subtilis* WB800 Sporenfärbung nach 4 h Wachstum, keine Sporenbildung sichtbar aber beginnende Ausbuchtungen am Ende der Zellen
- Abb. 9: *B. subtilis* WB800 Sporenfärbung nach 5 h Wachstum, keine Sporenbildung sichtbar aber Ausbuchtungen am Ende der Zelle
- Abb. 10: *B. subtilis* WB800 Sporenfärbung nach 6 h Wachstum, keine Sporenbildung sichtbar
- Abb. 11: *B. subtilis* WB800 nach 7 h Wachstum, keine Sporenbildung sichtbar
- Abb. 12: *B. subtilis* WB800 nach 8 h Wachstum, keine Sporenbildung sichtbar
- Abb. 13: *B. subtilis* WB800 nach 24 h Wachstum, grün gefärbte Spore
- Abb. 14: *B. subtilis* WB800 nach 32 h Wachstum, grün gefärbte Spore und lysierte Zellen
- Abb. 15: *B. subtilis* WB800 nach 49 h Wachstum, grün gefärbte Sporen in Zellen liegend
- Abb. 16: *B. subtilis* WB 800 nach 49 h Wachstum, grün gefärbte Spore freiliegend
- Abb. 17: OD₆₀₀ und K_{bE}/ mL von *B. subtilis* von 0 bis 9 Stunden

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Medien und Lösungen

Tab. 2: Verwendeter Stamm

Tab. 3: Verwendete Chemikalien

Tab. 4: Verwendete Geräte

Tab. 5: Herstellung Verdünnungsreihe für Gesamtkeimzahlbestimmung

Tab. 6: Beispieldaten zur Berechnung der KbE/ mL ausgehend von einer Verdünnungsreihe

Tab. 7: OD₆₀₀ von *B. subtilis* WB800 in SB- Medium während 49- stündigem Wachstum

Tab. 8: KbE/ mL der einzelnen Verdünnungsstufen (Stunde 0 bis Stunde 9) von *B. subtilis* in SB- Medium; 100µL ausgestrichen

Tab. 9: Erhitzung *B. subtilis* DE101 bei unterschiedlichen Temperaturen und Erhitzungsdauer

Tab. 10: Anzahl der ausgekeimten Sporen von *B. subtilis* WB800 nach Erhitzung 80 °C, 30 min in 100 µL bzw. 1 mL Probenvolumen

Erklärung über die selbstständige Anfertigung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ort, Datum

Unterschrift