

Bericht

BIO132 Praktikum in Mikrobiologie

Universität Zürich Irchel

Herbst 2011

Anita Schweizer

Nicolas Weyland

1 Versuch 1

1.1 Einleitung

Bakterienzellen sind in der Natur bei direktem Zellkontakt fähig, Teile ihres Genoms untereinander auszutauschen. Dabei wird über eine zeitweilige Verbindung zweier Zellen durch eine Plasmabrücke DNA von einem Donor in einen Rezipienten, einen Empfänger, transferiert. Diese übertragene Erbinformation kann ein Teil eines Bakterienchromosoms oder eine Kopie eines Plasmids sein. Solche konjugative Plasmide kodieren selbst für die Proteine, die zur Ausbildung des Zellkontaktes und der Verarbeitung der DNA von Bedeutung sind. Bei der Konjugation synthetisiert der Rezipient anhand der Plasmid-DNA-Vorlage des Donors selbst das neue Plasmid. Die zirkuläre Plasmid-DNA des Donors wird dabei aufgebrochen und der Rezipient erhält einen der zwei Parentalstränge zur Weiterverarbeitung. Diese sogenannte rolling circle-Replikation findet demnach im Donor und im Rezipienten statt.

Das Resultat der Konjugation kann gut visualisiert werden, wenn dem Empfänger ein einfach erkennbares Gen übertragen wird, das nur unter bestimmten Bedingungen exprimiert wird.

1.2 Materialien und Vorgehen

Bei diesem Versuch werden die gleiche Anzahl des Donors *Pseudomonas putida* KT2442, welcher das Plasmid RP4 mit einem Gen *gfp* kodierend für das grün-fluoreszierende Protein GFP (RP4::*gfp*) und ein Gen für eine Kanamycin-Resistenz besitzt, und des Rezipienten *Serratia liquefaciens* (MG 1), welcher Nalidixinsäure-resistent, aber Kanamycin-sensitiv ist und kein *gfp* Gen hat, zusammen gemischt und inkubiert und später wiederum auf Selektivmedien inkubiert (Abbildung 1).

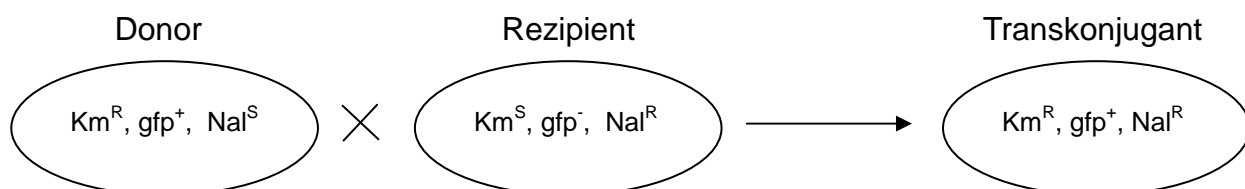


Abbildung 1: Schema des konjugativen Plasmidtransfers

Aus 1.5 ml des Rezipienten und 3 ml des Donors, der in halber Konzentration des Rezipienten vorliegt, werden je 100 μ l gut vermischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Als Kontrolle wird ein Gemisch aus Donor und sterilem LB Medium hergestellt. Von der Lösung wird 50 μ l auf eine LB-Platte pipettiert, von der

Kontrolllösung ebenso viel auf eine separate Platte. Diese werden während zwei Stunden bei 30 °C inkubiert, dann mit je 1 ml 0.9%-iger NaCl-Lösung abgewaschen. Von den Lösungen werden logarithmische Verdünnungsreihen mit 0.9%-igem NaCl hergestellt. Von der Lösung mit dem Donor und dem Rezipienten (konj) werden auf vier Platten mit Nalidixinsäure (50µg/ml) (Nal) je 100 µl (die ursprüngliche Lösung ist 1 ml) der Verdünnungen 10^{-6} , 10^{-7} und 10^{-8} und 100 µl der 10^{-4} verdünnten Kontrolllösung (contr) ausplattiert und auf vier Platten mit Nal und Kanamycin (50 µg/ml) (Kan) werden 100 µl der Verdünnungen 10^{-3} , 10^{-4} und 10^{-5} und 100 µl der 10^{-2} verdünnten Kontrolllösung ausplattiert. Die insgesamt 8 Platten, jede mit einer bestimmten Verdünnung und einer bestimmten Lösung, werden über Nacht bei 37 °C inkubiert und dann bei 4 °C gelagert. Zur Auswertung werden die Anzahl Kolonien unter Tages- und Blaulicht ausgezählt, um die Konjugationsfrequenz zu bestimmen.

1.3 Resultate

Beim Betrachten der Nal+Kan Platten unter Blaulicht haben zwei unter Tageslicht sichtbare Kolonien nicht geleuchtet.

Lösung / Verdünnung	# Rezipient	# Transkonjugant	# totale Anzahl	# Anzahl auf 1 ml
konj 10^{-7}	65	1	66	$6.6 \cdot 10^8$
konj 10^{-8}	4	0	4	$4.0 \cdot 10^8$
konj 10^{-9}	0	0	0	0
contr 10^{-5}	0	0	0	0
gemittelte Anzahl				$5.3 \cdot 10^8$

Tabelle 1: Anzahl auf Nal

Lösung / Verdünnung	# Rezipient	# Transkonjugant	# totale Anzahl	# Anzahl auf 1 ml
konj 10^{-4}	0	1888	1888	$1.888 \cdot 10^7$
konj 10^{-5}	0	400	400	$4.000 \cdot 10^7$
konj 10^{-6}	0	31	31	$3.100 \cdot 10^7$
contr 10^{-3}	0	0	0	0
gemittelte Anzahl				$2.996 \cdot 10^7$

Tabelle 2: Anzahl auf Nal+Kan

Mit der Auszählung der Platten (Tabelle 1 und Tabelle 2) – bei Berücksichtigung der

entsprechenden Verdünnung – kann die Konjugationsfrequenz pro ml (1)

$$\frac{\text{gemittelte Anzahl Kolonien auf Nal+Kan Platte}}{\text{gemittelte Anzahl Kolonien auf Nal Platte}} \quad (1)$$

mit 0.057, also 5.7%, bestimmt werden.

1.4 Diskussion

Von der Kontrollgruppe (nur Donor) sind auf den Selektivplatten keine Bakterien gewachsen, was zu erwarten war, weil der Donor Kanamycin-sensitiv ist. Es bleibt zu erwähnen, dass der ursprüngliche Donor das *gfp* Gen, obwohl vorhanden, nicht exprimiert, weil dieses dort an einen starken *lac* Repressor gekoppelt ist. Das Auftreten von Bakterien auf der Nal+Kan Platte unterstützt die These der Konjugation nach dem postulierten Schema (Abbildung 1).

Ein Rezipient hat Erbgut aufgenommen, welches ihm die Möglichkeit gibt, resistent gegen das Antibiotikum Kanamycin zu sein, und das GFP Protein zu bilden. Auf der Selektivplatte Nal+Kan dürften aber keine Bakterien sein, die zwar unter Tageslicht, nicht aber unter Blaulicht sichtbar sind. Denn diese müssten zwar eine Kanamycin-Resistenz aufweisen aber kein *gfp* Gen haben, bzw. dieses nicht exprimieren, was nur auf den Donor zutrifft, der aber aufgrund seiner Nalidixinsäure-Sensitivität auf der Nal+Kan Platte nicht wachsen kann. Da dies aber offenbar in unseren Resultaten der Fall ist, muss angenommen werden, dass der Donor auf der Selektivplatte nicht vollständig wegselektiert wurde. Das wäre auch eine Erklärung für die etwas erhöhte Konjugationsfrequenz, die bei 1-2% zu erwarten war.

2 Versuch 2

2.1 Einleitung

Im Erdboden findet sich eine grosse Diversität von Bakterien. Einige von diesen können bei tendenziell negativen Umweltbedingungen Dauerformen ausbilden. Diese sporenbildende Bakterien können in dieser Form extreme Umweltbedingungen wie hoher Druck, Temperatur oder Trockenheit bis zu mehreren Jahren überdauern. Die Sporen sind im Gegensatz zu den vegetativen Bakterien wasserfrei und metabolisch inaktiv. Ändern sich die Umweltbedingungen wieder in Richtung der optimalen Bedingungen des Bakteriums, keimen die Sporen und entwickeln sich zu aktiven Zellen. Bakterien sind also in der Lage, sich vor temporär widrigen Umweltbedingungen zu schützen, und zu einem späteren Zeitpunkt wieder vegetativ zu werden, und sich zu vermehren. Dies ist

insbesondere von Bedeutung, weil diese Sporen bzw. die sporenbildenden Bakterien nicht oder nicht hinreichend mit Hitze oder Desinfektionsmittel vernichtet werden können und zu einem späteren Zeitpunkt wieder aktiv werden, was in sterilen Forschungslabors oder medizinischen Einrichtungen ein Problem sein kann.

Durch gezieltes Aussetzen von Bakterien in simulierten extremen Umweltbedingungen z.B. mit grosser Hitze kann im Labor diese Problematik untersucht werden.

2.2 Materialien und Vorgehen

Um sporenbildende Bakterien nachzuweisen, werden Bakterien mehrmals grosser Hitze ausgesetzt.

Aus einer frischen Bodenprobe wird dazu 2 g Erde in 20 ml sterilem LB-Medium aufgeschlämmt 20 Minuten stehen gelassen und vom Überstand 3 ml in drei Caps, also 1 ml pro Cap, pipettiert. Zwei dieser Caps (B und C) werden in einem Wasserbad bei 80 °C während 20 Minuten inkubiert und später weiterverwendet. Vom übrigen Cap (A) wird mit jeweils 900 µl einer 0.9%-igen NaCl-Lösung eine logarithmische Verdünnung zu 10^{-1} und eine zu 10^{-2} hergestellt. Von dem Cap A wird 50 µl auf einer Agar-Platte gleichmässig verteilt, von den Verdünnungen wird ebenfalls 50 µl auf je eine entsprechende Platte verteilt. Die drei Platten der Gruppe A trocknen für einige Minuten an der Luft. Das Cap C wird nach der Inkubation sogleich für 2 Stunden bei 30 °C weiter inkubiert. Von dem Cap B wird wie für die Gruppe A eine Verdünnung hergestellt und die drei 50 µl der Lösungen auf eine entsprechende Platte gleichmässig verteilt und an der Luft getrocknet. Das Cap C wird nach der zweiten Inkubation ein weiteres Mal bei 80 °C für 20 Minuten in einem Wasserbad inkubiert. Nach dieser zweiten Hitzebehandlung wird wie bei Gruppe A und B eine Verdünnungsreihe hergestellt und 50 µl auf einer jeweiligen Platte verteilt, die dann an der Luft getrocknet wird.

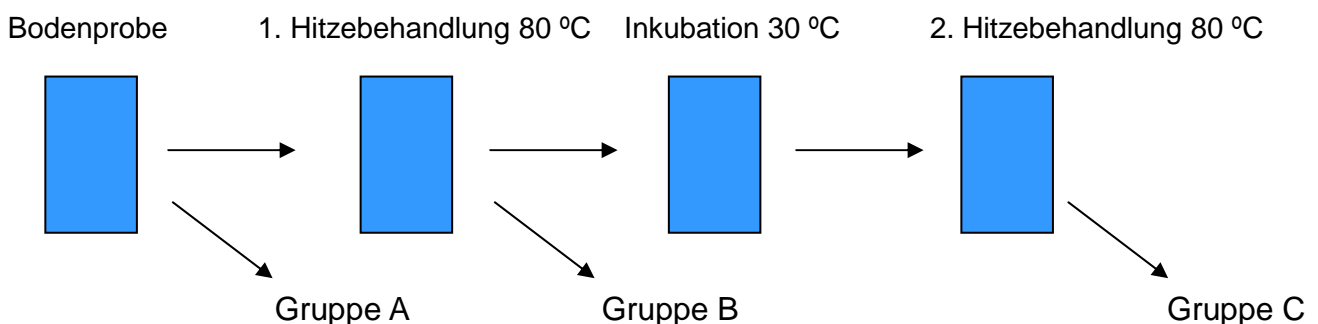


Abbildung 2: Schema der Hitzebehandlungen

Nach diesen Hitzebehandlungen und Inkubationen (Abbildung 2) werden die neun Platten

bei 30 °C für 2 Tage inkubiert und dann gekühlt gelagert.

2.3 Resultate

Die Anzahl Bakterienkolonien auf den Platten nimmt von A zu B und von B zu C stets ab. Bei der grössten Verdünnung (10^{-2}) sind in der Gruppe A 176, in der Gruppe B 24 und in der Gruppe C noch 8 Bakterienkolonien zu finden. Die Kolonien der Gruppe A sind in ihrer Form und Farbe divers. Während die Bodenprobe und ihre 10^{-1} Verdünnung fast die gesamte Agarplatte überwachsen ist, sind bei der 10^{-2} Verdünnung die Kolonien gut getrennt einzeln erkennbar. Grosse graue und gelbe, sowie kleinere milchig weisse, tropfenförmige Kolonien sind gewachsen. Auch sind Bakterienkolonien erkennbar, von denen aus einem Zentrum viele weisse, fadenförmige Arme ausgehen. Auf den Platten der Gruppe B finden sich vor allem noch weisse und graue Tropfen und ebenfalls eine fadenförmig ausgebreitete Fläche. Bei den Platten der Gruppe C sind nur noch wenige Kolonien zu erkennen. Es finden sich keine weissen fadenförmigen Strukturen mehr, aber bei der 10^{-1} Verdünnung einen schwarzen Fleck von schimmelpilzartiger Struktur.

2.4 Diskussion

Quantativ ist ein sehr deutlicher, abnehmender Trend von den Gruppen A zu C vernehmbar. Dies entspricht der Erwartung, dass mit jeder Hitzebehandlung Bakterien sterben oder ausgeschaltet werden. Auf den Platten der Gruppe A ist alles gewachsen, was unter den optimalen Bedingungen wachsen kann. Das entspricht der festgestellten hohen Diversität und Anzahl Kolonien. Das Bakterium, das auf dem Agarboden fadenförmig gewachsen ist, kann als *Bacillus cereus* identifiziert werden. Dieses wirkt z.B. bei Reis Lebensmittel vergiftend und bildet Sporen, die hitzeunempfindlich sind¹⁾. Die Einnahme solcher Sporen bzw. Bakterien kann zu explosivem Durchfall oder massivem Erbrechen führen¹⁾.

Auf den Platten der Gruppe B müssten eigentlich nur noch Bakterien oder Pilze überlebt haben, die bei der widrig hohen Temperatur Sporen bilden können. Diese hätten die Hitzebehandlung unbeschadet überstanden während alle vegetativen Organismen abgestorben wären. In einer Inkubation hätten die Sporen wieder zu metabolisch aktiven Zellen keimen können. Allerdings müsste in den Platten der Gruppe C gar keine Kulturen gewachsen sein. Denn bei dieser Gruppe wurden die keimenden Zellen durch eine zweite

1) Holtmann, H.: *Basics medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene*, 1. Aufl. München : Elsevier, Urban & Fischer, 2008, S. 50.

Hitzebehandlung abgetötet, bevor diese wieder hätten Sporen ausbilden können. Dass auf den Platten trotzdem Kulturen gewachsen sind, könnte auf eine Verunreinigung oder unsauberes, nicht steriles Arbeiten zurückzuführen sein. Viel wahrscheinlicher ist aber, dass die zweistündige Inkubation bei 30 °C entspricht nicht lange genug war, damit alle Sporen keimen. Es könnten also Sporen, die aufgrund der ersten Hitzebehandlung gebildet wurden auch noch die zweite Hitzebehandlung überstanden haben und erst danach wieder zu vegetativen Zellen geworden sind. Zusätzlich könnte es sein, dass bei der nur 20 minütigen Hitzebehandlung nicht alle vegetativen Zellen abgestorben sind.

3 Versuch 3

3.1 Einleitung

Es ist in der zivilisierten Gesellschaft gebräuchlich, sich nach dem Kontakt mit pathogenen Bakterienquellen, die Hände bzw. Kontaktstellen zu waschen und mit handelsüblichen Desinfektionsmitteln zu reinigen. Insbesondere ist dies im medizinischen Bereich, ferner bei medizinischen Eingriffen der Fall. Auch wird bei einer bakteriellen Infektion, sofern eine solche mittels Test nachgewiesen werden konnte, Antibiotika verschrieben. Desinfektionsmittel und Antibiotika sind offenbar daran beteiligt, spezifisch Bakterien abzutöten, oder zumindest deren Wachstumsraten zu reduzieren.

Setzt man bestimmte Bakterien spezifischen Desinfektionsmitteln und Antibiotika aus, lässt sich eine Aussage über die Resistenz bzw. Sensitivität der Bakterien machen.

3.2 Materialien und Vorgehen

Die vier Bakterienstämme *Escherichia coli* (DH5 α), *Pseudomonas putida* (RP4::gfp), *Serratia liquifaciens* (MG1) und *Staphylococcus epidermidis* (RP62a) werden gezielt den Antibiotika Ampicillin (10 μ g/disc), Tetracyclin (30 μ g/disc), Kanamycin (30 μ g/disc) und Gentamicin (10 μ g/disc), und den Desinfektionsmitteln Quartamon®, Sterillium®, Betadine® und Bepanthen® plus ausgesetzt. Letztere zwei sind Wunden-Desinfektionsmittel, Quartamon ein Desinfektionsmittel für Oberflächen auf Basis quaternärer Ammoniumverbindungen und Sterillium ein Desinfektionsmittel für die Hände auf Propanol Basis.

Des Weiteren wird für jeden Bakterienstamm ein E-Test mit Gentamicin durchgeführt.

12 Agarplatten werden mit den obigen Bakterienkulturen beimpft. Dafür wird jeder Stamm in einer 0.9%-igen NaCl-Lösung auf eine 0.5 McFarland resuspendiert. Die Agarplatten

werden dann flächendeckend mit einem mit Bakterienlösung angefeuchtetem Wattestäbchen eingestrichen (3 Platten je Bakterienstamm). Die vier E-Test Streifen werden in der Mitte einer entsprechenden Platte placiert. Für jeden Bakterienstamm werden die 4 verschiedenen Antibiotika discs (à je 6 mm Durchmesser) in genügendem Abstand vom Petrischalenrand placiert. Für jeden der vier Stämme werden zwei sterile discs (ebensogross) in je 10 µl Quartamon und Sterillium getränkt, die zwei übrigen mit Bepanthen plus und Betadine behandelt und in den vier beimpften Agarplatten placiert. Dabei muss, wenn mit der Pinzette gearbeitet wird, diese in einer Hitzequelle sterilisiert werden. Die Platten werden für 18 Stunden bei 30 °C inkubiert.

Sind die Bakterien resistent gegen ein Antibiotikum oder Desinfektionsmittel, wachsen sie ungehindert um die entsprechende disc herum (n). Sind sie jedoch sensitiv, bildet sich ein Hemmhof um die disc, dessen Durchmesser (inkl. disc) in mm ausgemessen werden kann, wenn möglich der gemittelte Wert zweier orthogonalen Durchmessern. Bei dem Gentamicin E-Test Streifen ist der minimal inhibitory concentration (MIC) Wert abzulesen, wo die Hemmhofspitze den Test Streifen touchiert. Die Resistenz (R) / Sensitivität (S) wird anhand internationaler Vorgaben bestimmt.

3.3 Resultate

Staphylococcus epidermidis (PR62a)

	Am10	Gm10	Km30	Te30	Bepanthen plus	Sterillium	Quartamon	Betadine	Gn MIC [µg/ml]
Messung [mm]	38	32	34	44	25	30	35	27.5	12.5
R oder S	(S)	S	S	S					S

Tabelle 3: *Staphylococcus epidermidis* (PR62a)

Pseudomonas putida (RP4::gfp)

	Am10	Gm10	Km30	Te30	Bepanthen plus	Sterillium	Quartamon	Betadine	Gn MIC [µg/ml]
Messung [mm]	8.5	27	n	22.5	14.5	65	3.65	7.5	5
R oder S	(R)	S	R	(S)					S

Tabelle 4: *Pseudomonas putida* (RP4::gfp)

<i>Escherichia Coli</i> (DH5 α)									
	Am10	Gm10	Km30	Te30	Bepanthen plus	Sterillium	Quartamon	Betadine	Gn MIC [μ g/ml]
Messung [mm]	21	24.5	34	17.5	25	13	22	12	0.95
R oder S	S	S	S	S					S

Tabelle 5: *Escherichia Coli* (DH5 α)

<i>Serratia liquefaciens</i> (MG1)									
	Am10	Gm10	Km30	Te30	Bepanthen plus	Sterillium	Quartamon	Betadine	Gn MIC [μ g/ml]
Messung [mm]	n	25.5	27.5	8	8	6	27	8	0.38
R oder S	R	S	S	R					S

Tabelle 6: *Serratia liquefaciens* (MG1)

3.4 Diskussion

Es ist anzumerken, dass für *E. coli* äquivalente Fremdwerte verwendet werden, weil diese bei uns nicht gewachsen sind. *S. epidermidis* (Tabelle 3) und *E. coli* (Tabelle 5) sind als vorwiegend sensitiv für sämtliche Antibiotika aufgefallen, dafür sprechen auch die Ergebnisse der E-Test Streifen. Nicht immer konnten die gemessenen Werte mit Vorgaben verglichen werden, weil diese nicht vorhanden waren. Betrachtet man einen Durchmesser aber relativ zu den Hemmhofgrößen anderer Antibiotika desselben Stammes kann eine Tendaussage über Resistenz und Sensitivität gemacht werden (in Klammern angegeben). *P. putida* (Tabelle 4) sind resistent gegen die Antibiotika Ampicillin (Amp) und Kanamycin (Kan) und *S. liquefaciens* (Tabelle 6) sind resistent gegen Ampicillin und Tetracyclin. Anzumerken ist, dass das RP4::gfp Plasmid in *P. putida* viele Antibiotika Resistenzgene besitzt, namentlich Amp, Kan und Tetracyclin²⁾, allerdings werden diese nicht exprimiert. Von allen Desinfektionsmitteln ist Quartamon das wirkungsvollste. Nicht sehr hemmend wirkten Betadine und Sterillium. Allerdings wissen wir, dass z.B. Sterillium grösstenteils aus n-Propanol und Isopropanol besteht. Da diese beiden Stoffe leicht flüchtig sind, ist es durchaus vorstellbar, dass während der Dauer der Arbeitsschritte die Wirkstoffe bereits aus der Lösung verdampft sind. Es kann also keine Aussage gemacht werden, wie effektiv die untersuchten Desinfektionsmittel in ihrem Anwendungsbereich sind.

2) Waters, V.L.: *Conjugative transfer in the dissemination of beta-lactam and aminoglycoside resistance.* : *Front Biosci* 4 (1999): S. 433-456.

4 Versuch 4

4.1 Einleitung

Oftmals ist es von Bedeutung Bakterien oder Bakterienstämme zu identifizieren. So z.B. bei für die Bestätigung einer bakteriellen Infektion für einen medizinischen Befund oder für Experimente im Labor. Ferner ist, wie in Versuch 3 gezeigt werden konnte, die genaue Bestimmung eines pathogenen Bakteriums für die sinnvolle Auswahl eines Antibiotikums unumgänglich und muss in möglichst kurzer Zeit durchgeführt werden können.

Zu diesem Zweck wurden Schnelltestsysteme zur Identifikation einer vorgegebenen Reihe von Bakterien mit einer vorgegebenen Signifikanz entwickelt. Bei dieser Diagnostikmethode werden Bakterienlösungen bzw. Lösungen von Bakterienabstrichen in einer bestimmten Konzentration einem meist trockenen Substrat zugegeben und allenfalls noch ein zusätzliches Reagenz hinzugemischt. Nur bestimmte Bakterien oder Bakterienstämme können während einer Inkubation eine enzymatische Reaktion mit dem Substrat eingehen, was an einem Farbumschlag zu erkennen ist. Es wird also zwischen positiven Reaktionen und negativen Reaktionen unterschieden. Ein zusätzlicher Test ist der Oxidasetest, bei dem eine positive Reaktion mit einer Blaufärbung einhergeht. Die Substratreaktionen können mit vorgegebenen Werten verglichen werden, um auf ein bestimmtes Bakterium schließen zu können.

4.2 Materialien und Vorgehen

Für die Identifikation eines unbekanntes Bakteriums wird ein rapid ID 32 E Streifen von bioMérieux verwendet. Dieser hat für 48 verschiedene *Enterobacteriaceae* 31 vorgegebene Substratreaktionen und einen separaten Oxidasetest.

Von der unbekanntes Bakterienkolonie auf der Agarplatte wird mit einer Einweg-Öse eine auf 0.5 McFarland getrübe Lösung mit 2 ml 0.9%-igem NaCl hergestellt. Von dieser Probe wird je 55 µl in die Substrat-Vertiefung (wells) gegeben und in die wells für Urea (Harnstoff) / UREase, L-Lysin / Lysin Decarboxylase und L-Ornithin / Ornithin Decarboxylase zusätzlich zwei Tropfen Mineralöl. Der Streifen wird dann abgedeckt während 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Für den Oxidasetest (·) wird auf eine spezielle disc mit einer Einweg-Öse Bakterienkultur aufgetragen. Die disc ist mit N,N-dimethyl-p-phenylenediamin-Oxalat und α-Naphthol behandelt, woraus bei Aktivität des Enzyms Cytochrom Oxidase nach einigen Minuten der Farbstoff Indophenolblau entsteht und sichtbar wird. Dem inkubierten Test Streifen wird in das well für L-Tryptophan / INDole noch ein Tropfen JAMES Reagenz von bioMérieux gegeben. Dann wird das

Vorhandensein (+ bzw. 100) oder Fehlen (– bzw. 0) der Farbumschlagsreaktionen für jedes Substrat notiert. Dies wird zur Auswertung mit den Werten einer Identification Table von bioMérieux verglichen. Dabei wird für jedes der 48 Vorgaben für jede der 32 Reaktionen der Betrag der Differenz zwischen unserer Reaktion und dem Vorgegebenen Wert durch 100 geteilt, dann von 1 subtrahiert (je grösser die Differenz, desto kleiner die Wahrscheinlichkeit einer Übereinstimmung) und durch 32 geteilt. Die 32 Ergebnisse zusammengerechnet geben jedem Bakterium aus der Identifikationstabelle eine Wahrscheinlichkeit für die Übereinstimmung (score), wobei 1 einer 100%-igen Übereinstimmung entspricht und 0 einer 0%-igen Übereinstimmung. Um den Aufwand zu minimieren berechnet dies ein Computerprogramm (Appendix A, in abgekürzter Form).

4.3 Resultate

<u>URE</u>	<u>LDC</u>	<u>ODC</u>	ESC	FER	ARA	ADO	RHA	MAN	SOR	CEL	MEL	GRT	MNE	MAL	TRE
0	0	0	0	100	0	0	100	100	100	0	100	100	100	100	100
IND	MNT	PPA	SAC	5KG	PLE	GAT	COL	CMT	TTR	ONAG	PNPG	αGAL	IDP	RAF	.
100	0	0	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100	0	0	0

Tabelle 7: Auslesen der Substratrektionen

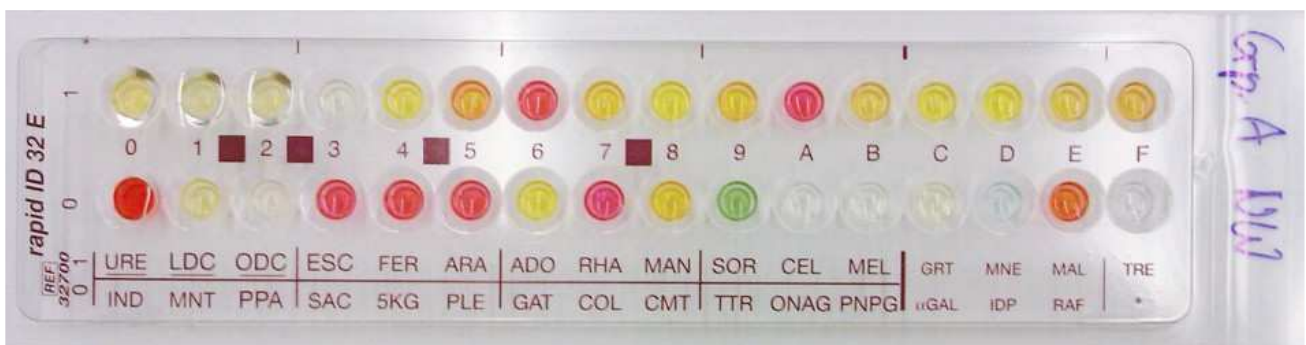


Abbildung 3: Photographie des rapid ID 32 E Teststreifens

Die beste Übereinstimmung (84.9%) wurde für *Escherichia coli* gefunden, gefolgt von *Salmonella ser Paratyphi A* und *Salmonella spp* mit 80.7% bzw. 76.7% Übereinstimmung.

4.4 Diskussion

Bei der Auswertung muss in Betracht gezogen werden, dass nur isolierte Bakterienkulturen zu einem sinnvollen Ergebnis führen, bei Kombinationen von Bakterien kann der Test keine Aussage machen. Mit der grossen Übereinstimmung unserer Werte (Tabelle 7, Abbildung 3) mit *E. coli* kann das Bakterium mit grosser Wahrscheinlichkeit als ebendieses identifiziert werden.

Appendix A

```
1 /*****
2 ** program:
3 ** rapid32e
4 **
5 ** version:
6 ** 0.1
7 **
8 ** author:
9 ** Nicolas Weyland <admin@ufoalien.ch>
10 **
11 ** created / last changed:
12 ** 01.11.2011 / 02.11.2011
13 **
14 ** description / changes:
15 ** The results of different reactions with an unknown organism is to
16 ** be compared with the predefined optimum reaction results for
17 ** many organisms. This program rates each comparison with a score
18 ** and finds the best fits, thus the highest (rather best)
19 ** probability for an identification of the unknown organism.
20 **
21 ** A bubble sort algorithm has been chosen to re-align the
22 ** score. Although with  $2^n$  is a high complexity which results
23 ** in low performance this can be neglected (n, is very low).
24 ** --- Nicolas Weyland
25 *****/
26
27 #include <stdio.h>
28 #include <stdlib.h>
29 #include <math.h>
30
31 int main(void)
32 {
33     int organismus[32] = {0,0,0,0,100,0,0,100,100,100,0,100,100,0,0,0,0,100,0,100,0,0,0,100,100,100,100,0,0,100,0}; // our
34     int testers[48][32] = {{1,100,100,100,100,100,100,99,100,100,99,100,0,100,0,97,0,99,100,64,15,0,33,100,100,100,100,99,11,100,100,0},
35 // ****full list shortened, insert data from identification sheet!
36 {4,7,2,9,2,1,1,0,0,0,0,2,1,1,2,0,0,0,0,2,2,1,7,7,5,1,0,4,15,0,0,37}}; // optimum for each
37     int fixpos[48], i, n;
38     for (i = 0 ; i < 48 ; i++) { // fill the row with inc
39         fixpos[i] = i + 1;
40     }
41
42     double score[48], delta_res;
43
44     char *names[] = {"Enterobacter aerogenes", "Enterobacter amnigenus", "Enterobacter ckiacae", "Enterobacter gergivuae", "Enterobacter intermedius", "Enterobacter sakazakii", "Enterobacter cancerogenus", "Escherichia coli", "Escherichia fergusonii", "Escherichia hermannii", "Escherichia vutneris", "Ewingella americana", "Hafnia alvei", "Klebsiella oxytoca", "Klebsiella oneumoniae ssp ozaenae", "Salmonella choleraeszus ssp arizonae", "Salmonella choleraesuis ssp choleraesuis", "Salmonella ser Paratyphi", "Salmonella spp", "Salmonella typzi", "Serratia ficaria", "Serratia fonticola", "Serratia grimesi", "Serratia liquefaciens", "Serratia Marcescenes 1", "Serratia Marcescenes 2", "Serratia odonifera", "Serratia plymuthica", "Serratia rubidaea", "Shigella sonnei", "Shigella spp", "Tatumella tyseos", "Yersinia enterocolitica", "Yersinia frederiksenii", "Yersinia intermedia", "Yersinia kristensenii", "Yersinia pseudotuberculosis", "Yersinia ruckeri", "Aeromonas hydrophila cavuae", "Aeromonas sobria", "Plesiomonas shigelloides", "Vibrio alginolyticus", "Vibrio choleraesuis ssp choleraesuis", "Vibrio fluvialis", "Vibrio metschnikovii", "Vibrio oarahaemolyticus", "Vibrio vulnificus", "Acitenobacter Pseudomonas spp"}; // organism names
45
46     void bubble(double *array, int size) //function for the bubblesort
47     {
48         int i, j, swap;
49         for (i = 0; i < size -1; i++) {
50             swap = 0;
51             for (j = 0; j < size - i - 1; j++) {
52                 if (score[j] < score[j + 1]) {
53                     double buffer = score[j]; // swap it!
54                     int fixbuffer = fixpos[j];
55                     score[j] = score[j + 1];
56                     fixpos[j] = fixpos[j + 1];
57                     score[j + 1] = buffer;
58                     fixpos[j + 1] = fixbuffer;
59                     swap = 1;
60                 }
61             }
62             if(!swap){
63                 break;
64             }
65         }
66     }
67
68     //*****
69     printf("rapid 32 e \n\nweyland 02.11.2011\n\n");
70
71     for (i = 0 ; i < 48 ; i++) { // for each tester organism
72         for (n = 0; n < 32 ; n++) { // for each reaction
73             delta_res = abs ( ( testers[i][n] - organismus[n] ) ); // difference from optimum (Ydelta quality)
74             delta_res = 1 - (delta_res / 100); // normed to 1, "opposite" of Ydelta quality
75             score[i] = score[i] + ( delta_res / 32 ); // reaction score added to overall score (normalised to 1/32)
76         }
77     }
78
79     bubble(score, sizeof(score)/sizeof(double)); // sort score with bubble sort
80     printf("best score is %f (%s)\n", score[0], names[fixpos[0]-1]);
81     for (i = 0 ; i < 5 ; i++) {
82         printf("%i. %f (%s)\n", i+1, score[i], names[fixpos[i]-1]);
83     }
84     return 0;
85 }
```