**Untersuchung der antibakteriellen**

**Wirkung von Sulfanilamid**

**Zubereitung der Bakterienkolonien**

**Die Einhaltung der sterilen Bedingungen während des ganzen Versuches ist unumgänglich!** Sie sollten sich stets bewusst sein, dass störende Bakterien überall lauern. Sie fallen in die Lösungen von oben herab, sie bewegen sich jedoch nie nach oben oder seitwärts.

Wir benutzen die Bakterienart *Bacillus subtilis* für unsere Tests.

1. Pipettieren Sie unter Einhaltung möglichst steriler Bedingungen je 0.2 ml der Bakteriensuspension auf zwei Petrischalen, die eine Agar-Nährschicht enthalten.
2. Bereiten Sie ein Reagenzglas vor, das 2ml steriles Ionentauscherwasser (ITW) enthält.
3. Streifen Sie mit einer sterilen Impföse über die Platte mit Zellen des Bacillus subtilis, bis die Öse mit Zellen gefüllt ist.
4. Streifen Sie die Zellen in der Impföse in das Reagenzglas mit 2ml ITW ab und verteilen Sie die Zellen in der Flüssigkeit indem Sie das Reagenzglas auf dem Vortex mischen.
5. Bringen Sie nun mit einer sterilen Mikropippetenspitze 0,1 ml „Bakterienlösung“ auf den Nährboden der Petrischale. Verteilen Sie die Zellen sorgfältig mit dem sterilen Trigalski-Spatel. Achten Sie darauf, dass die Petrischalen jeweils möglichst schnell wieder mit dem Deckel verschlossen werden.
6. Unterteilen Sie die Unterseite der Petrischalen mit einem Permanentmarker in je vier Quadranten und bezeichnen Sie diese mit den Zahlen 1 und 2 und den Buchstaben K+ (pos. Kontrolle) und K- (negative Kontrolle)

**Antibakterielle Wirkung des Sulfanilamids**

1. Lösen Sie in drei 100 ml Bechergläsern je 0,5 g der folgenden drei Substanzen in 50 ml siedendem Ionentauscherwasser (Bechergläser beschriften mit 1, 2 und K+):
	* 1. Sulfanilamid, von Ihnen hergestellt (1)
		2. Acetamidobenzolsulfonylamid (Sulfanilamid mit Schutzgruppe) (2)
		3. Sulfanilamid, gekauft (positive Kontrolle: K+)

Passen Sie die Menge Wasser entsprechend der Menge Substanz an, falls Sie nicht genügend davon haben.

1. Stanzen Sie für jede Petrischale 4 kleine Kreise aus einem Bogen Filterpapier mittels eines Lochers aus oder verwenden Sie die vorbereiteten Kreise.
2. Tauchen Sie eine Pinzette in 95%igem Ethanol und bringen Sie diese anschliessend in die Flamme des Bunsenbrenners um sie zu sterilisieren. **Die Einhaltung der sterilen Bedingungen während des ganzen Versuches ist unumgänglich!** Sie sollten sich stets bewusst sein, dass störende Bakterien überall lauern. Sie fallen in die Lösungen von oben herab, sie bewegen sich jedoch nie nach oben oder seitwärts.
3. Tauchen Sie einen der Filterpapierkreise mit der sterilisierten Pinzette in die siedende Lösung 1 und legen sie sofort in eine leere Petrischale, die Sie zudecken.
4. Sterilisieren Sie die Pinzette erneut (siehe oben) und wiederholen Sie den vorhergehenden Punkt mit den restlichen Lösungen 2 und K+.
5. Tauchen Sie schliesslich einen Filterkreis ins kochende ITW. Dieser Kreis wird uns als negative Kontrolle dienen (K-)
6. Heben Sie nun den Deckel der Petrischalen mit den Bakterien **senkrecht** nach oben so weit, dass Sie mit der Pinzette hineinkommen können. Legen Sie nun den Kontrollkreis in die Mitte des vorher mit „K-“ markierten Quadranten. Drücken Sie die Kreise jeweils leicht in die Agar-Schicht, damit die Substanzen hineindiffundieren können.
7. Sterilisieren Sie erneut die Pinzette und legen Sie den Kreis mit der Lösung 1 in die Mitte des entsprechend markierten Quadranten. Verfahren Sie analog mit den restlichen beiden Lösungen 2 und K+, wobei Sie jedes Mal die Pinzette sterilisieren.



1. Die so behandelten Petrischalen werden nun bei 25°C aufbewahrt. Sie sollten zuerst nach 24 und danach nach 48 Stunden mit der Digitalkamera fotografiert werden. Das Wachstum der Bakterien macht sich durch eine Trübung der Agarschicht bemerkbar. Die Stellen, an denen die Sulfonamide ihre antibakterielle Wirkung entfalten, bleiben klar.
2. Werten Sie die Fotografien aus.

**Nach 24 Stunden**

**Nach 48 Stunden**

**Auswertung der Ergebnisse**

Übertragen Sie die Ergebnisse der Untersuchung in die untenstehende Tabelle.

Sehr starke antibakterielle Wirkung = +++

Starke antibakterielle Wirkung = ++

Schwache antibakterielle Wirkung = +

Keine Wirkung = 0

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Sulfanilamid hergestellt** | **Sulfanilamid mit Schutzgruppe** | **Negative Kontrolle** | **Positive Kontrolle** |
| 24 Std | 48 Std | 24 Std | 48 Std | 24 Std | 48 Std | 24 Std | 48 Std |
|  |  |  |  |  |  |  |  |

**Interpretation:**