

Antibiotika-Lösungen der Biochrom AG: Aktuelle Übersicht mit Wirkmechanismen, Eigenschaften und Arbeitskonzentrationen

Information der Biochrom AG vom 19. November 2010

In Zellkulturmedien wachsen neben Zellen auch Fremdkeime wie Bakterien oder Pilze optimal. Dieses Wachstum von fremden Organismen, auch als „Kontamination“ bezeichnet, führt fast immer zum Verlust der jeweiligen Zellkultur. Kontaminationen sind nur durch den vorbeugenden Einsatz von Antibiotika oder durch steriles Arbeiten zu vermeiden. Als Antibiotika (griechisch anti: gegen und biotikos: zum Leben gehörig) wurden ursprünglich niedermolekulare Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen bezeichnet, die auf andere Mikroorganismen wachstumshemmend wirken oder diese abtöten. Heute werden alle Substanzen als Antibiotika zusammengefasst, die gegen jede Form von Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Pilze) wirksam sind (auch Virostatika und Chemotherapeutika), unabhängig davon, ob sie hoch- oder niedermolekular sind und ob sie von Mikroorganismen selbst oder synthetisch hergestellt wurden.

Die Antibiotika können nach ihrer Wirksamkeit, ihrer chemischen Struktur oder nach ihrem Wirkmechanismus unterschieden werden. In der Zellkultur steht dabei eher die Wirksamkeit im Vordergrund: Es gibt bakteriostatische Antibiotika, die nur das Wachstum der Mikroorganismen hemmen, sie jedoch nicht abtöten und bakterizide Antibiotika, die das Wachstum hemmen und die Mikroorganismen zusätzlich abtöten.

Die beiden in der Zellkultur routinemäßig angewandten Antibiotika sind Penicillin und Streptomycin. Das so genannte „Pen/Strep“ wirkt als Cocktail gegen Gram-negative und Gram-positive Bakterien sowie gegen Mykobakterien. Allerdings sind beide Antibiotika nur drei Tage in der Kultur stabil. Soll die Zellkultur länger geführt werden, muss Pen/Strep erneut zugegeben oder durch stabilere Antibiotika ersetzt werden. Da die Biochrom AG verschiedene Antibiotika anbietet, sind nachfolgend wichtige Kriterien wie Arbeitskonzentration, Stabilität und Toxizität als Übersicht aufbereitet und den neuesten Erkenntnissen angepasst. Im letzten Kapitel gibt es eine kurze FAQ-Sammlung zu „Antibiotika“.

1 Die Einteilung der Antibiotika

Die Antibiotika werden nach verschiedenen Kriterien eingeteilt:

- chemische Struktur
β-Laktam, Aminoglykoside, Makrolide, Polypeptide, Tetrazykline usw.
- Wirksamkeit
 1. bakteriostatische Antibiotika (hemmen Wachstum der Mikroorganismen, töten diese aber nicht ab)
 2. bakterizide Antibiotika (hemmen Wachstum der Mikroorganismen und töten diese ab)Bakterizide Antibiotika werden zusätzlich noch in primäre und sekundäre Bakterizide unterschieden. Primäre Bakterizide wirken auch gegen nicht proliferierende Bakterien, sekundäre wirken nur gegen sich teilende Bakterien.

- Mechanismus
 1. Hemmung der Zellwandsynthese: z.B. β -Laktame wie Penicillin und Glykopeptide
 2. Hemmung der Proteinbiosynthese: z.B. Aminoglykoside, Tetrazykline, Makrolide und andere. Zur Gruppe der Aminoglykoside gehören eine Reihe der Biochrom-Antibiotika wie Gentamycin-Sulfat, Kanamycin, Neomycin und Streptomycin.
 3. Störung der Funktion der Zellmembran: z.B. polyene Makrolide wie Amphotericin B und Peptide wie Polymyxin B-Sulfat.
 4. Interferenz mit der bakteriellen DNA bzw. RNA: z.B. Rifampicin.

2 Details zu den einzelnen Antibiotika der Biochrom AG

Tab. 1 und 2: Details zu den Antibiotika Amphotericin B und Bacitracin

Parameter	Amphotericin B	
Kat. Nr.	A 2612	A 2610 (lyoph.)
Einheit	50 ml (250 μ g/ml)	1x (6x5 ml)
Summenformel	$C_{47}H_{73}NO_{17}$	
CAS-Nr.	1397-89-3	
Molekulargewicht	924,1 g/mol	
Einteilung	Polyene Makrolide, Antimykotikum	
Wirkung	Pilze und Hefen, keinen Effekt auf Bakterien	
Arbeitskonzentration	2,5-3 μ g/ml	
Max. Löslichkeit	40 mg/ml in DMSO, in H_2O unlöslich, mit Na-deoxycholate in H_2O löslich, Lagerung -20 °C	
Stabilität ¹	3 Tage bei 37 °C in Lösung	
Toxizität ¹	30 μ g/ml	
Mechanismus	Störung der Permeabilität der Zellmembran durch Anlagerung an Sterole der Zellmembran von Pilzen. Wirksam u.a. gegen <i>Canidida</i> -Arten. Durch die Bindung an planare Sterole (z.B. Cholesterol) verändert es die Zellmembran und macht sie permeabel für Ionen (K^+ , Mg^{2+}) ² und andere niedermolekulare Substanzen (z.B. Aminosäuren, Zucker, Nukleotide) ³ .	
Isolierung aus	<i>Streptomyces nodosus</i>	

Parameter	Bacitracin
Kat. Nr.	Die Biochrom AG vertreibt die Kombination Bacitracin/Neomycin (siehe Neomycin).
Summenformel	$C_{66}H_{103}N_{17}O_{16}S$
CAS-Nr.	1405-87-4
Molekulargewicht	1422,72 g/mol (Bacitracin A), Gemisch aus 9 Bacitracinen
Einteilung	Polypeptid
Wirkung	Hauptsächlich Gram-positive Bakterien, aber auch Mykoplasmen und Neisserien
Arbeitskonzentration	0,1-1 mg/ml
Max. Löslichkeit	100 mg/ml in H_2O oder Ethanol, Lagerung -20 °C
Stabilität ¹	Bei 25 °C im pH-Bereich > 5 schnell inaktiv
Mechanismus	Hemmt die Zellwandsynthese Gram-positiver Bakterien durch Anlagerung an Bactoprenylpyrophosphat ⁴
Isolierung aus	<i>Bacillus licheniformis</i>

¹ Lindl, T. and Bauer, J. (2008) Zell- und Gewebekultur, 6. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

² Ellis, D. (2002) Amphotericin B: spectrum and resistance, J. Antimicrob Chem 49: 7-10.

³ Holz, R. W. (1979) Antibiotics V, 313 ff, F. E. Hahn ed, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.

⁴ Scogin, D. A. et al. (1980) Binding of nickel and zinc ions to bacitracin A, Biochemistry 19 (14): 3348-52.

Tab. 3 und 4: Details zu den Antibiotika G 418-BC, Gentamycin-Sulfat (Gentamicin)

Parameter	G 418-BC	
Kat. Nr.	A 291-25	A 2912 (flüssig, gebrauchsfertig)
Einheit	10 g	50 ml
Summenformel	$C_{20}H_{40}N_4O_{10} \cdot 2H_2SO_4$	
CAS-Nr.	108321-42-2	
Molekulargewicht	692,7 g/mol	
Einteilung	Aminoglykosid	
Wirkung	Bakterien, Pilze, Hefen, Protozoen und Säugerzellen ^{5, 6} , zur Selektion transfizierter eukaryontischer Zellen	
Arbeitskonzentration	50-1000 µg/ml	
Max. Löslichkeit	10-50 mg/ml in Puffer oder Kulturmedium, Lagerung -20 °C	
Stabilität	In Lösung bei 2-8 °C stabil für 6 Monate	
Mechanismus	Blockiert die Proteinsynthese durch Störung der ribosomalen Funktion	
Isolierung aus	<i>Micromonospora rhodorangea</i>	

Parameter	Gentamycin-Sulfat (Gentamicin)				
Kat. Nr.	A 2710 (lyoph.)	A 2712	A 271-23	A 271-25	A 271-26
Einheit	1x (6x5 ml)	50 ml	2,5 g	10 g	25 g
Summenformel	$C_{19-21}H_{39-43}N_5O_7 \times 2,5 H_2SO_4$				
CAS-Nr.	1405-41-0				
Molekulargewicht	694,75-723,75 g/mol; Komplex aus drei chemisch ähnlichen Gentamycinen: C ₁ , C ₂ und C _{1a} '				
Einteilung	Aminoglykosid				
Wirkung	Gram-positive und Gram-negative Bakterien sowie Mykoplasmen ⁸				
Arbeitskonzentration	15-50 µg/ml				
Max. Löslichkeit	10-250 mg/ml in H ₂ O, Lagerung -20 °C				
Stabilität ¹	5 Tage bei 37 °C				
Toxizität ¹	3 mg/ml				
Mechanismus	Hemmung der Proteinbiosynthese durch Anlagerung an die 30 S-Untereinheit des Ribosoms und Zerstörung der Zellmembran ⁹				
Isolierung aus	<i>Micromonospora purpurea</i>				

⁵ Waitz, J. A. *et al.* (1974) Biological Activity of Antibiotic G-418, a New *Micromonospora*-Produced Aminoglycoside with Activity Against Protozoa and Helminths, *Antimicrob Agents Chemother* 6 (5): 579-581.

⁶ Panchal, C.J. *et al.* (1984) Susceptibility of *Saccharomyces* spp. and *Schwanniomyces* spp. to the Aminoglycoside Antibiotic G418, *AEM* 47 (5): 1164-1166.

⁷ Weinstein, M. J. *et al.* (1967) Biological Activity of the Antibiotic Components of the Gentamicin Complex, *J Bact* 94 (3): 789-790.

⁸ Rudin, A. *et al.* (1970) Antibacterial Activity of Gentamicin Sulfate in Tissue Culture, *Appl Microbiology* 20 (6): 989-990.

⁹ Kadurugamuwa, J. *et al.* (1993) Surface Action of Gentamicin on *Pseudomonas aeruginosa*, *J Bact* 175 (18): 5798-5805.

Tab. 5, 6 und 7: Kanamycin, Neomycin und Partricin

Parameter	Kanamycin
Kat. Nr.	A 2512
Einheit	50 ml (5 mg/ml)
Summenformel	$C_{18}H_{36}N_4O_{11} \times H_2SO_4$
CAS-Nr.	25389-94-0
Molekulargewicht	582,58 g/mol, Gemisch aus Kanamycin A und < 5 % Kanamycin B
Einteilung	Aminoglykosid
Wirkung	Gram-positive, Gram-negative Bakterien und Mykoplasmen
Arbeitskonzentration	50-100 µg/ml
Max. Löslichkeit	10 mg/ml in H ₂ O
Stabilität ¹	5 Tage bei 37 °C
Toxizität ¹	10 mg/ml
Mechanismus	Bindet an die 30S Ribosomenuntereinheit und verhindert so die Proteinbiosynthese ¹⁰
Isolierung aus	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>

Parameter	Neomycin
Kat. Nr.	A 2412 (Kombination Neomycin/Bacitracin)
Einheit	50 ml
Summenformel	$C_{23}H_{46}N_6O_{13} \times 3H_2SO_4$
CAS-Nr.	1405-10-3
Molekulargewicht	908,88 g/mol, Gemisch aus Neomycin B und C
Einteilung	Aminoglykosid
Wirkung	Gram-positive und Gram-negative Bakterien
Arbeitskonzentration	50 µg/ml
Max. Löslichkeit	100 mg/ml in H ₂ O oder Methanol, Lagerung -20 °C
Stabilität ¹	Bei 37 °C, 5 Tage
Toxizität	3 mg/ml
Mechanismus	Hemmung der Proteinbiosynthese, Hemmung der Phospholipase C und D ¹¹
Isolierung aus	<i>Streptomyces fradiae</i>

Parameter	Partricin
Kat. Nr.	A 2812
Einheit	50 ml
Summenformel	$C_{79}H_{119}O_{31}N_5$
CAS-Nr.	-
Molekulargewicht	1634,8 g/mol
Einteilung	Polyen-Antimykotikum
Wirkung	Pilze und Hefen ¹²
Arbeitskonzentration	0,5 µg/ml
Max. Löslichkeit	50 µg/ml in H ₂ O
Stabilität ¹	3 Tage bei 37 °C
Mechanismus	Verhindert die Proliferation
Isolierung aus	<i>Streptomyces aureofaciens</i>

¹⁰ Masukawa, H. (1969) Localization of Sensitivity to Kanamycin and Streptomycin in 30S Ribosomal Proteins of Escherichia Coli, J Antibiotics 22 (12):612-623.

¹¹ Liscovitch, M. et al. (1991) Inhibition of neural phospholipase D activity by aminoglycoside antibiotics, Biochem J 279: 319-321.

¹² Rimaroli C. and Bruzzese T. (1998) In Vitro Activity of a New Polyene, SPA-S-843, against yeast, Antimicrob Agents Chemother 42 (11): 3012-3013.

Tab. 8, 9 und 10: Details zu Penicillin, Polymyxin B-Sulfat und Streptomycinsulfat; Pen/Strep

Parameter	Penicillin	
Kat. Nr.	A 321-42	A 321-44
Einheit	25 Mio. U	100 Mio. U
Summenformel	$C_{16}H_{17}N_2NaO_4S$	
CAS-Nr.	69-57-8	
Molekulargewicht	356,4 g/mol	
Einteilung	β -Laktam	
Wirkung	Gram-positive Bakterien	
Arbeitskonzentration	20-100 μ g/ml oder 100 U/ml	
Max. Löslichkeit	10-100 mg/ml in H_2O	
Stabilität ¹	Bei 37 °C , 3 Tage	
Toxizität ¹	10 mg/ml	
Mechanismus	Verhindert den letzten Schritt der Zellwandsynthese, die Verknüpfung von Peptidoglycansträngen durch irreversible Interaktion mit der Transpeptidase ¹³	
Isolierung aus	<i>Penicillium chrysogenum</i> (vorher <i>Penicillium notatum</i>)	

Parameter	Polymyxin B-Sulfat	
Kat. Nr.	A 231-40	
Einheit	5 Mio. U	
Summenformel	$C_{55}H_{96}N_{16}O_{13} \times 2H_2SO_4$	
CAS-Nr.	1405-20-5	
Molekulargewicht	1385,63 g/mol	
Einteilung	Polypeptid	
Wirkung	Nur Gram-negative Bakterien, auch gegen nicht proliferierende Bakterien	
Arbeitskonzentration	5-500 μ g/ml	
Max. Löslichkeit	10-20 mg/ml in H_2O oder Methanol, Lagerung -20 °C	
Stabilität ¹	5 Tage bei 37 °C	
Toxizität ¹	3 mg/ml	
Mechanismus	Bindung an die Lipopolysaccharide der Gram-negativen Bakterien führt zur Permeabilisierung der Zellmembran ¹⁴ . Dadurch kommt es zum Verlust von Ionen (Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+}), ungesättigten Fettsäuren und Polyphosphat	
Isolierung aus	<i>Bacillus polymyxa</i>	

Parameter	Streptomycin-Sulfat		
Kat. Nr.	A 331-26	A 331-27	
Einheit	25 g	100 g	
Summenformel	$(C_{21}H_{39}N_7O_{12})_2 \cdot 3H_2SO_4$		
CAS-Nr.	3810-74-0		
Molekulargewicht	1457,4 g/mol		
Einteilung	Aminoglykosid		
Wirkung	Vor allem Gram-negative Bakterien und Mykobakterien		
Arbeitskonzentration	10-100 μ g/ml		
Max. Löslichkeit	10-50 mg/ml in H_2O		
Stabilität ¹	3 Tage bei 37 °C		
Toxizität ¹	20 mg/ml		
Mechanismus	Blockierung der Initiation der Proteinbiosynthese ¹⁵		
Isolierung aus	<i>Streptomyces griseus</i>		
Kombination	Pen/Strep		
Kat. Nr.	A 2210 (lyoph.)	A 2212 (flüssig)	A 2213 (flüssig)
Einheit	1x (6x5 ml)	50 ml	100 ml

¹³ Izaki, K. *et al.* (1966) Glycopeptide Transpeptidase and D-Alanine Carboxypeptidase: Penicillin-Sensitive Enzymatic Reactions, *Proc Natl Acad Sci* 55 (3): 656-663.

¹⁴ Koike, M. *et al.* (1968) Electron Microscopic Studies on Mode of Action of Polymyxin, *J Bact* 97: 448-452.

¹⁵ Luzzatto, L. *et al.* (1968) Mechanism of Action of Streptomycin in *E.coli*: Interruption of the Ribosome Cycle at the Initiation of Protein Synthesis, *Proc Natl Acad Sci* 60 (3): 873-880.

3 Häufig gestellte Fragen und Antworten zu Antibiotika

3.1 Woran erkennt man eine Kontamination?

Das Medium wird trüb. Enthält das Medium Phenolrot als pH-Wert-Indikator, ändert sich die Farbe des Mediums in den meisten Fällen von rot nach gelb-orange, da sich die Stoffwechselprodukte der Mikroorganismen im Medium anhäufen und sich dadurch der pH-Wert ändert. Kontaminierte Kulturen können eventuell auch durch Änderung des Geruchs erkannt werden. Unter dem Mikroskop sind Mikroorganismen (außer Mykoplasmen) sehr schnell zu sehen.

3.2 Die Kultur ist trotz vorbeugender Antibiotika-Behandlung kontaminiert. Was sind die Gründe dafür?

Dafür gibt es verschiedene Gründe:

a. Das Antibiotikum ist im Medium zu niedrig dosiert. Die jeweilige Arbeitskonzentration des Antibiotikums im Medium ist unterschiedlich (siehe vorige Tabellen) und sollte möglichst genau eingehalten werden.

b. Weiterhin sind die Antibiotika im Medium, abhängig vom jeweiligen Antibiotikum, ca. 3-5 Tage bei 37 °C stabil. Bei Kühlschranktemperaturen von 2-8 °C sind Antibiotika stabiler, allerdings sollte mit Antibiotika supplementiertes Kulturmedium nicht zu lange im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Soll eine Kultur beispielsweise über fünf Tage wachsen, muss ein entsprechend stabiles Antibiotikum eingesetzt werden. Pen/Strep ist nur drei Tage stabil. Eine Alternative zu Pen/Strep wäre aufgrund des Wirkspektrums Kanamycin (siehe vorige Tabellen), das fünf Tage stabil ist.

c. Das eingesetzte Antibiotikum wirkt nicht, weil die Mikroorganismen mutiert und nun resistent gegen das Antibiotikum geworden sind (weiter siehe Punkt 3.4).

3.3 Was passiert, wenn die Antibiotika zu hoch dosiert wurden?

Zu hoch dosierte Antibiotika wirken toxisch. Dadurch sterben die Zellen ab. Die Arbeitskonzentrationen der einzelnen Antibiotika-Substanzen sollten genau eingehalten werden.

3.4 Können die Mikroorganismen während der Behandlung resistent werden?

Mikroorganismen können während der Behandlung mutieren und resistent gegenüber dem eingesetzten Antibiotikum werden. Resistenzen können bei Langzeitkulturen vermieden werden, wenn für zwei bis drei Passagen komplett auf Antibiotika verzichtet wird.

3.5 Können Mykoplasmen auch durch Antibiotika wirksam entfernt werden?

Mykoplasmen beeinträchtigen die Zellproliferation erheblich durch Nährstoffkonkurrenz und zelltoxische Ausscheidungen. Positiv getestete Kulturen müssen häufig verworfen werden, da Behandlungen mit Antibiotika meist zu aufwendig oder erfolglos sind.

Zur Beseitigung von Kontaminationen durch Mykoplasmen werden Antibiotika eingesetzt, die eine hohe Stabilität im Kulturmedium aufweisen und bei niedriger Konzentration wenig toxisch sind, beispielsweise Kanamycin (Kat. Nr. A 2512). Das Kulturmedium wird dazu mit 100 µg/ml Kanamycin versetzt.

Unsere Empfehlung: Die Biochrom AG empfiehlt als wirksame Alternative zu Antibiotika Mynox[®]-Eliminierungs-Reagenz, welches Mykoplasmen unmittelbar abtötet und biophysikalisch wirkt (mehr Informationen unter <http://www.biochrom.de/produkte/mykoplasmen-reagenzien/>).

3.6 Wie kann geprüft werden, ob die Behandlung erfolgreich war?

Zellkultur über ein bis zwei Passagen ohne Zusatz von Antibiotika kultivieren.