

Automatisierte Mikrobiologie: Identifizierung von antimikrobiellen Substanzen für Kosmetika

Bernd Traupe, R&D cosmed, Beiersdorf AG, Unnastr. 48, 20245 Hamburg

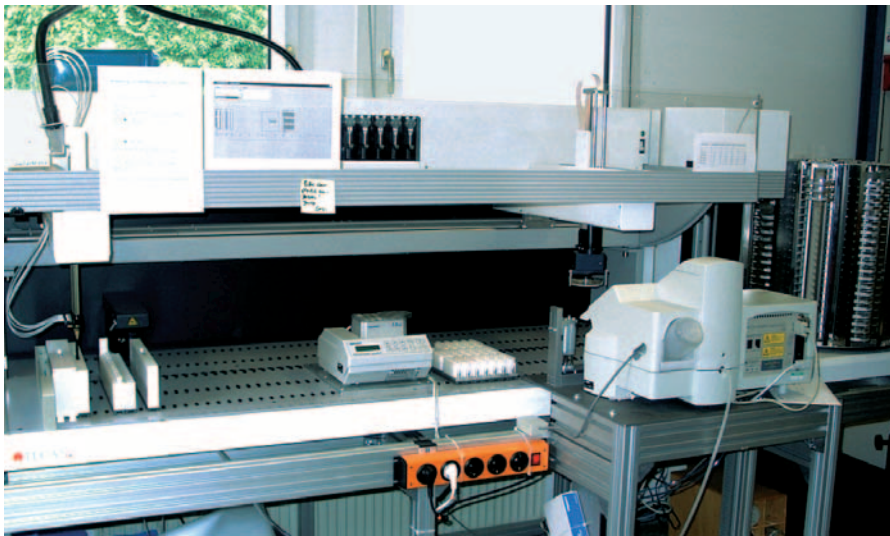


Abbildung 1: Tecan Genesis Workstation mit Eppendorf Thermoshaker und Wasp Spiral Plater.



Abbildung 2: Ausplattieren einer Platte auf dem Spiralplater. Der Roboterarm hält dabei den Deckel der Platte fest.

Einleitung

Für die Entwicklung von Kosmetika wird oft nach Substanzen gesucht, die eine Wirksamkeit gegen Mikroorganismen besitzen. Solche Substanzen werden als Additiva zu verschiedenen Kosmetika gegeben, um die Haltbarkeit zu gewährleisten, bzw. um eine antimikrobielle Wirkung bei der Anwendung, wie z.B. bei Deodorantien, zu gewährleisten. Dieser Artikel beschreibt die Automation eines Tests für die Identifizierung antimikrobiell wirkender Substanzen. Zum Screening werden die potentiellen Substanzen auf ihre wachstumshemmende Wirkung gegen das Bakterium *Corynebakterium xerosis ATCC 7711* getestet. Dazu werden die Substanzen in verschiedenen Verdünnungen jeweils in Doppelbestimmung mit der Bakterienkultur gemischt und die Kontrollen zu einem bestimmten Zeitpunkt (T_0) ausplattiert. Die restlichen Proben werden unter bestimmten Bedingungen inkubiert. Nach 20 Minuten, einer Stunde und drei Stunden werden jeweils Proben gezogen, ausplattiert und

danach die Kolonien ausgezählt. Die Anzahl der Kolonien gegen die Zeit aufgetragen ergibt für jede Substanz eine spezielle „Hemmkurve“, die eine Aussage über die bakteriostatische Wirkung der Substanz zulässt. Da für das Screening von solchen Substanzen eine große Menge von Proben ausplattiert werden muss, bietet sich eine Automatisierung dieses Prozesses an, um den manuellen Durchsatz von ca. 12 Substanzen pro Arbeitstag zu erhöhen.

Material und Methoden

Instrumente

Zusammen mit der Firma Tecan wurde eine Automatisierungslösung zur Durchführung der oben beschriebenen Assays mit folgenden Einzelbestandteilen aufgebaut:

- Tecan Genesis RSP 200/8 mit Roboterarm, 8 x 1ml Spritzen, 8 Teflon beschichtete Stahlnadeln.
- Fast Wash Pumpe.
- Carrier für Substanzen in Eppendorfcups.
- Reagenzienreservoir mit 70% Ethanol

gefüllt, zur Dekontamination der Pipettieradeln nach jedem Pipettiergang.

- Spezieller Carrier für 3 x 7 Racks mit jeweils vier Probenbehältern (diese Racks können mit dem Roboterarm zum Spiralplater transportiert werden; die Proben in diesen Racks werden ausplattiert).
- Eppendorf Thermomixer zur Inkubation der Bakterien mit den Substanzen.
- Karussell auf der rechten Seite der Workstation zur Lagerung von Agarplatten.
- Barcodeleser auf dem Genesis Arbeitstisch zum Lesen der Plattenbarcodes nach dem Transport auf den Spiralplater.
- Wasp Spiral Plater der Firma Don Whitley Scientific, integriert in die Genesis Workstation (der Spiral Plater wird vom Roboterarm mit Petrischalen und mit Racks mit den auszuplattierenden Proben be- und entladen).

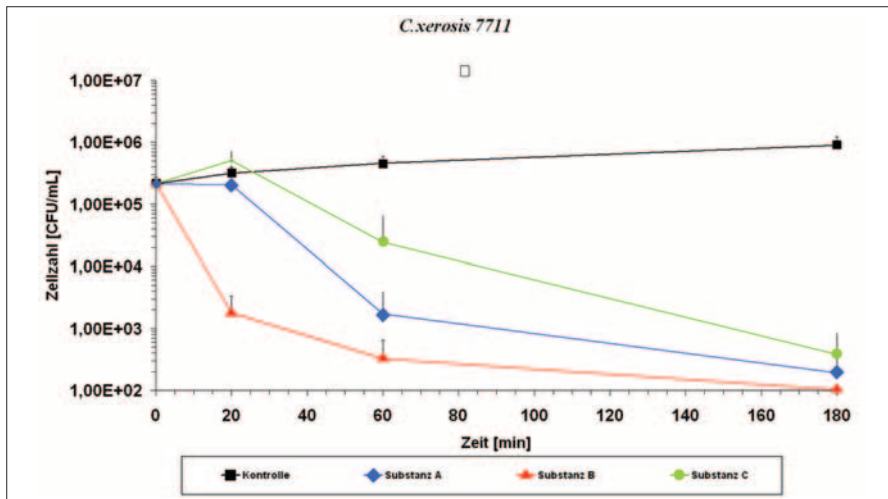


Abbildung 3: Beispiel für die Auswertung eines Screening-Assays: nach Zugabe der zu testenden Substanz werden in bestimmten Zeitabständen die Zahl der CFU (Colony Forming Units) pro ml bestimmt und in einem Diagramm gegen die Zeit aufgetragen. In diesem Beispiel bewirkte Substanz B den stärksten und schnellsten antimikrobiellen Effekt.

Benötigte Chemikalien

Substanz Stammlösung in 20% Ethanol, 70% Ethanol zur Dekontamination der Pipettieradeln, Verdünnungsmedium, Agarplatten 10 cm mit C- Agar Fa. Heipha.

Assay Beschreibung

Vor dem Start wird der Pipettierroboter beladen (5 Testsubstanzen, 2 Kontrollen). 76 barcodierte Agarplatten werden in das Karussell geladen. Die Bakterienstammlösung, Verdünnungsmedium und Dekontaminationslösung werden aufgefüllt. Die Testsubstanzen werden jeweils in Doppelbestimmung und die zwei Kontrollen im Verhältnis 1:1 (oder 500 µl Substanz wird zu 500 µl Bakterienkultur pipettiert) gemischt und auf dem Thermoshaker inkubiert. Zum Zeitpunkt T_0 werden sofort aus den beiden Kontrollen je eine Probe entnommen und eine 1:10 Verdünnung im transportierbaren Probenbehälter erstellt, anschließend wird noch eine 1:100 Verdünnung aus der 1:10 Verdünnung erstellt. Nach jedem Pipettiervorgang werden die Nadeln in 70% Ethanol sterilisiert und dann mit Systemflüssigkeit gewaschen. Diese 24 Proben werden nacheinander zum Spiralplater transportiert und sofort ausplattiert. Dazu transportiert der Roboterarm jeweils ein Rack mit je vier Proben zum Spiralplater und dann nacheinander eine Platte aus dem Karussell

zum Spiralplater. Die Platte wird abgesetzt und der Deckel abgenommen. Anschließend dreht sich der Teller des Spiralplaters (Abb. 2). Dabei wird der Barcode gelesen. Danach entnimmt die Pipettieradel vom Spiralplater eine Probe und plattiert sie durch gleichmäßiges Dispensieren während einer linearen Bewegung auf die rotierende Agarplatte. Dadurch entsteht eine spiralförmige Flüssigkeitsverteilung auf der Platte. Der Roboterarm setzt den Deckel wieder auf und transportiert die Platte zurück zum Karussell. Die Proben werden bei 30°C auf einem Shaker inkubiert. Nach 20 Minuten, einer Stunde und drei Stunden werden weitere 24 Proben entnommen und ausplattiert, so dass in einem Lauf mit fünf zu testenden Substanzen 76 Agarplatten verwendet werden. Nach Inkubation über 48h werden die Bakterienkolonien ausgezählt.

Ergebnisse

In jedem Lauf werden fünf Substanzen in Doppelbestimmung getestet, und gegen zwei Kontrollen verglichen. Nach den Zeitpunkten 0, 20 Minuten, 1 Stunde und 3 Stunden werden Proben entnommen und ausplattiert. Die Agarplatten werden 48h bei 30°C inkubiert, anschließend ausgewertet und die Bakterienzahl gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Für jede Substanz wird dann die Hemmung des Bakterienwachstums gegenüber den Kontrollen bewertet.

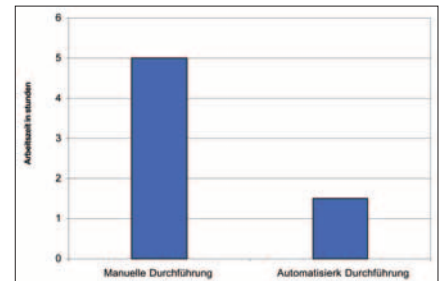


Abbildung 4: Zeitgewinn der automatisierten Durchführung des Tests. Der maximale Durchsatz ist hierbei noch nicht erreicht und kann noch um einen Faktor 2 erhöht werden.

Ein Beispiel für die Auswertung eines Assays ist in der Abbildung 3 gezeigt.

Für die Durchführung eines manuellen Assays (ohne Automatisierung) benötigt eine erfahrene Laborkraft ca. 5h. Unter Verwendung der beschriebenen Automatisierungslösung beträgt der Zeitbedarf für die gleiche Probenmenge nur ca. 1,5 h.

An einem Arbeitstag werden mit der manuellen Methode 5 Substanzen getestet, mit der automatisierten Methode 10 Substanzen, wobei die theoretischen Möglichkeiten der Automatisierungslösung in Bezug auf den Probendurchsatz noch nicht voll ausgeschöpft werden. Somit kann der Durchsatz der zu untersuchenden Substanzen weiter verdoppelt werden.

Das System ist mit einer Access Datenbank verknüpft, welche die Plattenbarcodes generiert und dann den Barcode der Probe und den Barcode der Platte zusammenführt. Die Auswertung mit dem IUL Reader wird im Moment noch offline durchgeführt, kann aber an die Access Datenbank angeschlossen werden, um die Anzahl der Kolonien direkt dem Plattenbarcode zuzuordnen.

Dieser Artikel wurde erstmals in BioTec 11-12/2003 veröffentlicht.