

Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades
Bachelor of Science

Chemotaxie-Simulation einer Bakterienpopulation in einem Gittermodell

Till Pfaff
geboren in Bergisch-Gladbach

2021

Lehrstuhl für Theoretische Physik I
Fakultät Physik
Technische Universität Dortmund

Erstgutachter: Prof. Dr. Jan Kierfeld
Zweitgutachter: Prof. Dr. Matthias Schneider
Abgabedatum: 03. August 2021

Kurzfassung

In dieser Arbeit wird die Simulation einer Population von E.-coli-Bakterien vorgestellt, die sich auf einem zweidimensionalen Feld bewegt. Das Feld hat die Gestalt eines Gitters: Die Bakterien haben jeweils eine diskrete Position und können sich pro Zeitschritt um einen Gitterplatz in eine von vier diskreten Richtungen bewegen.

Die Bakterien können ihr Verhalten an die Umwelt anpassen und damit der Spur eines Lockstoffs folgen. Bei räumlich konstanter Lockstoffkonzentration zeigt sich ein kollektives Verhalten: Die Bakterien bewegen sich innerhalb eines scharfen Pulses mit einer konstanten Driftgeschwindigkeit über das Feld.

Die Beobachtungen aus der Simulation werden mit Ergebnissen des Keller-Segel-Modells und seiner Erweiterungen verglichen, die ebenfalls die Existenz dieser Pulse beschreiben. Es wird deutlich, dass die qualitativen Verläufe mit den bisherigen Modellen sehr gut vereinbar sind. Die quantitativen Aussagen der gegenwärtigen Version der Simulation decken sich jedoch noch nicht vollständig mit den Ergebnissen anderer Herangehensweisen, sodass hier noch Entwicklungsbedarf besteht.

Zuletzt werden einige Versuchsaufbauten präsentiert, die mit dem hier vorgestellten Modell genauer untersucht werden können.

Abstract

This thesis presents a simulation of a bacteria population on a two-dimensional field. The field can be characterised as a grid as individual bacteria are positioned at discrete coordinates and can only move in one of four possible directions per unit time.

Bacteria are able to adapt their behaviour to the conditions of their environment which allows them to follow a gradient in concentration of an attractant substance. On a field where the concentration of the attractant is spatially constant, a pattern emerges in the bacteria population, it forms sharp pulses travelling at constant speed.

These observations are compared to findings of an extended Keller-Segel model. The qualitative results turn out to be very close to the predictions of the physical model. However, the quantitative properties do not fully match the predictions of other approaches which leads to the conclusion that further development of the simulation model may be necessary.

Finally, some experimental setups are presented that are well suited to examination by the simulation model.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	3
2.1	Die einzelne Bakterie	3
2.2	Modell von Keller und Segel	4
2.2.1	Bakterienpulse	5
3	Das Gittermodell	7
4	Ergebnisse	11
4.1	Berechnung der Motilität	11
4.2	Chemotaxie	12
4.3	Kollektives Verhalten	13
4.3.1	Brechung	18
4.3.2	Tunneleffekt	20
5	Zusammenfassung und Ausblick	21
	Literatur	23

1 Einleitung

Viele Arten von Einzellern wie Bakterien, Eukaryoten oder auch die menschliche Samenzelle sind nicht nur in der Lage sich aktiv fortzubewegen, sondern können sogar bevorzugt Orte aufsuchen, die eine gewünschte chemische Umgebung für sie darstellen. Dieses Verhalten wird Chemotaxie genannt. Es wurde bereits Ende des 19. Jahrhundert entdeckt, als Biologen feststellten, dass sich Bakterien vorzugsweise nahe bestimmter eingebrachter Chemikalien aufhalten und andere meiden. Ein eigentlich erstaunlicher Prozess, wenn man bedenkt, dass die Zellen nicht groß genug sind, um räumliche Veränderungen in ihrer Umwelt direkt wahrzunehmen, da hierfür die mikroskopischen Fluktuationen zu hoch sind [1].

Ein besonders eindrucksvolles Phänomen, dass die Chemotaxie im Makroskopischen sichtbar macht, wurde 1893 von M. Beijerinck entdeckt [2]. Er beobachtete, dass Bakterien sich in einem mit Wasser gefüllten Reagenzglas in einem sehr scharfen, mit dem bloßen Auge sichtbaren, horizontalen Streifen anordnen und diesen nicht mehr verlassen. Außerdem stellte er fest, dass dessen Position vom Sauerstoffgehalt der Umgebungsluft abhängig ist, indem sich die Bakterien gemeinsam zur Höhe mit der optimalen Sauerstoffkonzentration bewegen.

1966 stellte J. Adler weitere Untersuchungen dieser Streifen an. Er platzierte *Escherichia Coli* am Rand eines dünnen, mit einem Lockstoff gefüllten Röhrchens [3]. Ein Teil der Bakterien begann nun einen Streifen zu formen, der sich mit konstanter Geschwindigkeit durch das Medium bewegt. Er stellte auch erste Überlegungen zur Erklärung der Beobachtungen an: Die Bakterien erzeugen einen Gradienten in der Galaktose und schwimmen dann bevorzugt in Richtung der steigenden Konzentration. E. Keller und L. Segel veröffentlichten wenige Jahre später ein phänomenologisches Modell für Chemotaxie [4]. Es existiert eine analytische Lösung für die Bakterienpulse im Keller-Segel-Modell, allerdings nur unter der Voraussetzung, dass die Fähigkeit der Bakterien einen Gradienten zu spüren für eine verschwindende Konzentration des Lockstoffs unendlich groß werden muss [5, 6].

Als mögliche Lösung dieses Problem präsentierten M. Seyrich et al. eine erweiterte Form des Keller-Segel-Modells, welche auf Basis der mikroskopischen Eigenschaften einzelner Zellen gefolgt von einem Übergang ins Makroskopische formuliert wurde [7]. Dieses erweiterte Modell liefert die identischen Bakterienpulse wie das Keller-Segel-Modell, sodass davon ausgegangen werden kann, dass dieses zur Beschreibung der Pulse ausreichend ist. Es existieren zudem zahlreiche andere Erweiterungen des Keller-Segel Modells, um Bakterienpopulationen zu beschreiben [8, 9]. Bhattacharjee beschäftigte sich in [10] mit der Frage, unter welchen Umständen emergente Verhaltensmuster der Bakterienpopulation stabil sind. Die Modelle haben als partielle Differentialgleichungen

alle gemeinsam, dass zu ihrer Lösung ein Randwertproblem gelöst werden muss. Dies kann, vor allem in mehreren Dimensionen oder bei komplizierteren Randwerten sehr schnell äußerst komplexe Berechnungen bedeuten. Ein weitere Möglichkeit zur Modellierung bieten hier stets Simulationen auf mikroskopischer Ebene, die Bakterien als individuelle Akteure in einer gemeinsamen Umgebung platzieren und dann individuell handeln lässt. Die Simulationen bieten daher den Vorteil, dass sie sowohl mikroskopische Bewegungen der Bakterien, als auch das emergente Verhalten im Makroskopischen zeigen kann. Thermodynamische Fluktuationen werden hier als Zufallsfunktionen realisiert. Hierbei ist es essentiell, dass das Modell die realen Eigenschaften der Bakterien bestmöglich abbildet, um alle Komplexitäten der Wirklichkeit darstellen zu können, trotzdem aber nur eine geringe Rechenleistung benötigt, um eine große Zahl von Akteuren simulieren zu können.

In dieser Arbeit soll ein Modell vorgestellt werden, das die Chemotaxie von Bakterien auf einem zweidimensionalen Gitter simuliert. Die Bakterien und der Lockstoff befinden sich dabei auf diskreten Positionen und den Bakterien wird pro Zeitschritt die Bewegung in eine von vier verschiedenen Richtungen ermöglicht. Im Folgenden soll geprüft werden, ob diese Annahmen ausreichend sind, um ähnliche Ergebnisse wie die bisherigen physikalischen Modelle liefern zu können.

2 Grundlagen

2.1 Die einzelne Bakterie

Das Bakterium *Escherichia coli* nutzt zur Fortbewegung Flagellen, die aus dem zylindrischen Rumpf der Bakterie wachsen. Ihre Länge beträgt etwa das dreifache der Körperlänge des Bakteriums. An der Basis sind die Flagellen mit biologischen Motoren ausgestattet, die eine Rotationsbewegung ermöglichen. Je nach Drehrichtung zeigen sich nun unterschiedliche Verhaltensmodi [11].

Drehen sich die Flagellen gegen den Uhrzeigersinn, bündeln sie sich zu einem einzelnen Strang, der das Bakterium vorwärts treibt, es „läuft“, engl. *run*. Wenn die Flagellen jedoch mit dem Uhrzeigersinn rotieren, bildet sich kein Bündel und es kommt nicht zu einer Fortbewegung. Stattdessen zeigt sich ein unregelmäßiges Rotieren auf der Stelle, was auch „purzeln“, engl. *tumble* genannt wird (vgl. Abb. 2.1) [12].

Bei *E. coli* wird ein Zusammenspiel aus Run- und Tumble-Phasen beobachtet. Im Allgemeinen Fall ist dies äquivalent zu einem persistenten Random Walk, also einem Lauf mit zufälligen Richtungsänderungen, der aber durch längeres Geradeaus-Laufen gekennzeichnet ist.

E. coli ist nun aber in der Lage, sein Bewegungsverhalten zusätzlich an Informationen aus seiner Umwelt anzupassen. Je nach wahrgenommenem Gradienten im Lockstoff, der auch als Chemoattraktant bezeichnet wird, passt es die Länge der Run-Phasen an. Experimentell wurde gezeigt, dass sich nach einem kurzen Puls von Attraktanten die Flagellen zunächst bevorzugt gegen den Uhrzeigersinn drehen, nach kurzer Zeit jedoch die Drehung mit dem Uhrzeigersinn eine leichte Bevorzugung erhält [13]. Dies zeigt die Anpassung an den Gradienten, sodass sich sagen lässt, dass die Zelle bevorzugt lange Run-Phasen wählt, wenn sie eine steigende Nahrungskonzentration wahrnimmt und kürzere, wenn sie eine gleichbleibende oder sinkende Konzentration wahrnimmt. [1]

Die Sensoren zur Konzentrationsmessung befinden sich am ganzen Körper verteilt. Den Gradienten approximiert ein Bakterium allerdings aufgrund zu großer Fluktuationen nicht über einen räumlichen Vergleich zwischen Punkten an seinem Körper. Stattdessen erfolgt die Approximation über einen zeitlichen Vergleich. Dazu bildet die Zelle eine

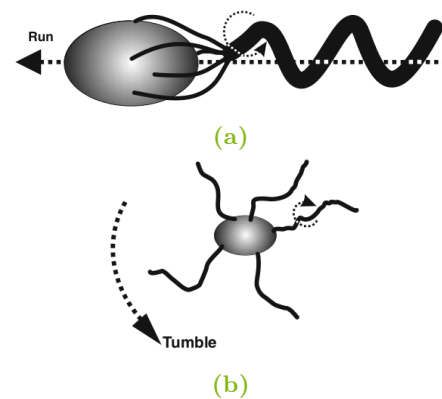


Abbildung 2.1: Realisierung der Run- und Tumble-Bewegungsabläufe. [12]

gewichtete Summe über ihre zeitliche Erinnerung der zuvor gemessenen Konzentrationen. [1].

E.-coli-Bakterien sind $2 - 6 \mu\text{m}$ lang [11] und bewegen sich mit einer Geschwindigkeit von $v = 10 - 35 \mu\text{m/s}$ [12]. Empirisch zeigen sich Run-Dauern von $t_{\text{Run}} = 1 - 4 \text{ s}$ [11], sowie Tumble-Vorgänge, die eine Winkeländerung von $\theta = (68 \pm 39)^\circ$ hervorrufen [11].

2.2 Modell von Keller und Segel

Ein Modell zur physikalischen Beschreibung eines Ensembles von Bakterien und Chemoattraktanten wurde 1970 von Keller und Segel vorgestellt [4]. Betrachtet werden zunächst die Bilanzgleichungen

$$\begin{aligned}\frac{\partial}{\partial t} \rho(x, y) + \nabla \cdot \vec{j}_\rho + Q_\rho(\rho, c) &= 0, \\ \frac{\partial}{\partial t} c(x, y) + \nabla \cdot \vec{j}_c + Q_c(\rho, c) &= 0,\end{aligned}$$

mit der Dichte der Bakterien ρ und des Chemoattraktanten c . \vec{j} beschreibt die zugehörige Stromdichte und Q einen Quell- bzw. Senkenterm. Zwei Mechanismen steuern die Bewegung der Bakterien, sodass sich \vec{j}_ρ zu

$$\vec{j}_\rho = \mu \nabla \rho - \chi(c) \rho \nabla c$$

ergibt. Der erste Summand beschreibt die Strömung der Bakterien ohne Einfluss des Chemoattraktanten, sodass für $\nabla c = 0$ die Gleichung der Diffusionsgleichung entspricht. μ beschreibt dabei die Motilität der Bakterien und nimmt die Rolle des Diffusionskoeffizienten ein. Diese Zufallsbewegung wird als unabhängig von c angesehen, sodass μ als konstant angenommen werden kann.

Der zweite Summand beschreibt die Wirkung der Chemotaxie, wobei angenommen wird, dass eine Proportionalität zwischen ∇c und der Flussdichte besteht. Die chemotaktische Antwort ist außerdem proportional zu ρ selbst, da eine größere Anzahl an Bakterien, die sich chemotaktisch bewegen auch ein größerer Fluss folgen muss. χ ist die Stärke der chemotaktischen Antwort, wobei die genaue Form dieser Funktion Gegenstand zahlreicher Forschungen ist. Da χ der „Sinneseindruck“ der objektiven Konzentration c ist, wird hier davon ausgegangen, dass sie einer Stevensschen Potenzfunktion der Form

$$\chi = \delta(c - c_{\min})^\alpha$$

folgt, mit c_{\min} als Schwellenkonzentration, also der kleinsten wahrnehmbaren Konzentration. Wird c als der Wert interpretiert, der über die Reizschwelle hinausragt, kann die Gleichung als

$$\chi = \delta c^\alpha \tag{2.1}$$

geschrieben werden.

Der Fluss des Chemoattraktanten \vec{j}_c sei rein diffusiv, sodass

$$\vec{j}_c = D \nabla c$$

mit dem Diffusionskoeffizienten D gilt.

Die Bakterienzahl sei konstant, sodass vereinfachend $Q_\rho = 0$ angenommen wird. c wird von den Bakterien mit der konstanten Konsumrate k verbraucht, sodass $Q_c = -k\rho$ gilt.

Werden nun alle Terme in die o.g. Bilanzgleichungen eingesetzt, erhält man die Keller-Segel-Gleichungen

$$\frac{\partial}{\partial t} \rho(x, y) = \mu \nabla^2 \rho - \nabla \cdot (\chi(c) \rho \nabla c) \quad (2.2a)$$

$$\frac{\partial}{\partial t} c(x, y) = D \nabla^2 c - k\rho. \quad (2.2b)$$

Wird die Diffusion des Attraktanten vernachlässigt, kann (2.2b) zu

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -k\rho \quad (2.3)$$

vereinfacht werden.

2.2.1 Bakterienpulse

Wird eine Population von N Bakterien an der Seite eines Objekträgers mit Länge \hat{x} und Breite \hat{y} platziert, in dessen Innerem ein konstantes $c = c_0$ herrscht, zeigt sich ein interessantes Verhalten. Die Bakterien breiten sich in einer scharfen Wellenfront aus, die nahezu keine Diffusion aufweist und sich mit konstanter Geschwindigkeit durch das Medium bewegt. Es wird dadurch erklärt, dass über den Chemoattraktanten eine Wechselwirkung innerhalb der Population stattfindet, die sich daher kollektiv verhält: Durch den Nahrungskonsum entsteht am Ort der Population ein Tal in der Chemoattraktanten-Konzentration, das an den Rändern folglich hohe Gradienten aufweist. Die Bakterien laufen diesen Gradienten hinauf und konsumieren dabei weiter, sodass sich auch der Gradient verschiebt, welchem die Bakterien weiter folgen [3]. Für diesen Aufbau gilt

$$\nabla = \frac{\partial}{\partial x},$$

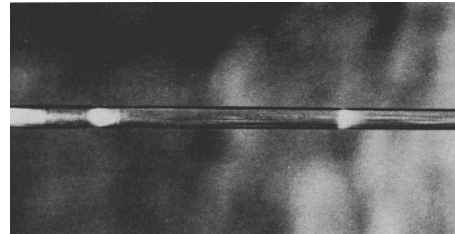


Abbildung 2.2: Bakterienpulse in einem Röhrchen. [3]

da eine Ausbreitung nur in x -Richtung beobachtet wird.

Es gelten die Anfangsbedingungen

$$c(x, 0) = \text{const.} = c_0, \quad \rho(x, 0) = \rho_0(x)$$

und die Neuman-Randbedingungen

$$\frac{\partial \rho}{\partial x} = 0, \quad \frac{\partial c}{\partial x} = 0 \quad \text{für} \quad x = 0 \quad \text{und} \quad x = \hat{x}.$$

Da von der Existenz der Pulse ausgegangen wird, wird (2.3) auf Lösungen mit

$$\rho(x, t) = \rho(\xi) \quad c(x, t) = c(\xi), \quad \text{mit} \quad \xi = x - v_P t$$

untersucht. v_P beschreibt dabei die konstante Ausbreitungsgeschwindigkeit des Pulses. In [5] wird gezeigt, dass Pulse nur existieren, wenn in (2.1) $\alpha \leq -1$ ist. Es muss also eine Polstelle bei $c = 0$ liegen. Daher wird $\alpha = -1$ angenommen.

Somit können die Gleichungen (2.2a) und (2.3) zu

$$v_P \frac{\partial \rho}{\partial \xi} = \frac{\partial}{\partial \xi} \left(\delta \frac{\rho}{c} \frac{\partial c}{\partial \xi} \right) - \mu \frac{\partial^2 \rho}{\partial \xi^2} \quad (2.4a)$$

$$v_P \frac{\partial c}{\partial \xi} = k \rho \quad (2.4b)$$

vereinfacht werden. Mit diesen Voraussetzungen können die Gleichungen (2.4) gelöst werden. Es ergeben sich nach [5]

$$\rho(\bar{\xi}) = \frac{v_P^2 c_0}{\mu k (\bar{\delta} - 1)} e^{-\bar{\xi}} (1 + e^{-\bar{\xi}})^{-\bar{\delta}/(\bar{\delta}-1)} \quad (2.5a)$$

$$c(\bar{\xi}) = c_0 \left(1 + e^{-\bar{\xi}} \right)^{-1/(\bar{\delta}-1)}, \quad (2.5b)$$

mit $\bar{\xi} = v_P \xi / \mu$ und $\bar{\delta} = \delta / \mu$.

Da \hat{x} im Vergleich zur Breite der Pulse groß ist, kann $x \in (-\infty, +\infty)$ angenommen werden. Nun kann (2.4b) von $\xi = -\infty$ bis $\xi = +\infty$ integriert werden. Mit den Randbedingungen

$$\lim_{x \rightarrow -\infty} c = 0 \quad \text{und} \quad \lim_{x \rightarrow +\infty} c = c_0$$

und $N := \hat{y} \int_{-\infty}^{\infty} \rho(\xi) d\xi$ kann v_P schließlich als

$$v_P = \frac{Nk}{\hat{y}c_0} \quad (2.6)$$

angegeben werden. [5]

3 Das Gittermodell

In der Simulation existieren die Bakterien als individuelle Objekte auf einem Feld. Sie führen in diskreten Zeitschritten Δt Handlungen aus, dazu zählen die Bewegung, die Nahrungsaufnahme und die Wahrnehmungsfunktion. Diese Funktion misst pro Δt die aktuelle Konzentration des Chemoattraktanten c und speichert sie in einer Liste, aus der die zuletzt gemessenen Konzentrationen ausgelesen werden können. Die Bakterien können an beliebigen, diskreten Positionen x, y auf dem Feld, einem endlich großen, zwei-dimensionalen Gitter mit Gitterkonstante a platziert werden. Auf jedem der Gitterplätze befindet sich außerdem eine diskrete Konzentration $c(x, y)$ des Chemoattraktanten. Pro Zeitschritt bewegt sich jede Bakterie um einen Gitterplatz, nach links, oben, rechts oder unten.

Jede Bakterie hat eine Reihe von Attributen, die ihren Zustand definieren: Sie besitzt zunächst eine Ausdauer, welche die Bakterie durch Konsumieren des Chemoattraktanten bis zu einem Maximalwert hin auffüllen kann. Das Konsumieren eines Chemoattraktanten-Teilchens erhöht die Ausdauer um zwei Einheiten. Pro Zeitschritt wird eine Ausdauereinheit verbraucht. Während die Bakterie keine Nahrung zu sich nimmt, verringert sich ihre Ausdauer somit stetig, bis die Bakterie schließlich, bei einer Ausdauer von 0, stirbt.

Um die Bakterienzahl konstant zu halten, wird die Annahme getroffen, dass ein Bakterium sich nur dann fortpflanzen kann, wenn im Gleichen Zeitschritt ein anderes Bakterium stirbt. Die Bakterienzahlerhaltung ist entscheidend, um die Simulation mit den Modellen von Keller und Segel sowie Seyrich et al. in Einklang zu bringen. Bakterien können ansonsten nicht direkt miteinander wechselwirken.

Die Bakterie besitzt außerdem eine mittlere Lauflänge λ . Sie ist abhängig davon, wie „sicher“ sie sich ist, einen Konzentrationsgradienten ∇c hinaufzulaufen. In der Literatur wird statt λ auch häufig die Tumble-Rate $\alpha = v / \lambda$ angegeben, wobei v die Geschwindigkeit der Bakterie während der Run-Phase beschreibt. Seyrich et al. gehen davon aus, dass die Bakterie ∇c über eine Lineare Antwortfunktion approximiert. Sie zeigen, dass in erster Näherung

$$\nabla c \cdot \vec{e}_r(t) \propto \int_{-\infty}^0 R(t-t') c(t') dt'$$

gilt [1, 7]. $\vec{e}_r(t)$ beschreibt die Schwimmrichtung, $R(\tau)$ die zeitabhängige Gewichtung der Konzentra-

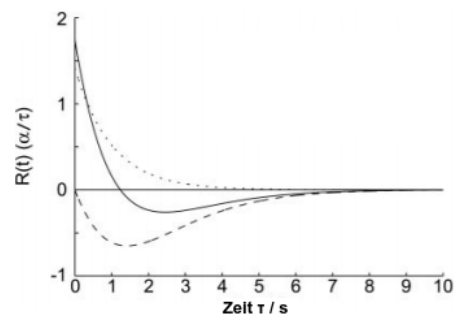


Abbildung 3.1: Die durchgängig gezeichnete Linie zeigt den Filterkern $R(\tau)$ [1].

tion $c(t')$.

$R(t - t') c(t')$ kann also als die „Erinnerung“ an die Konzentration zum Zeitpunkt, der t' zurückliegt, verstanden werden.

In Abbildung 3.1 ist die Funktion $R(\tau)$ dargestellt. Da der Gradient und nicht die Absolutkonzentration approximiert werden soll, muss $\int_{-\infty}^0 R(\tau) d\tau = 0$ gelten [7]. In der Abbildung wird auch deutlich, dass Konzentrationen, die länger als $\tau \approx 15$ s zurückliegen, fast nicht mehr gewichtet werden, sodass von einer maximalen Zeit τ_{mem} , die das Gedächtnis zurückreicht, ausgegangen werden kann. Auf Basis des approximierten Gradienten formuliert die Zelle ihre chemotaktische Antwort, von der die mittlere Lauflänge abhängig ist.

In der Simulation wurde der Gradient vereinfachend mit

$$\nabla c \cdot \vec{e}_r(t) = \frac{1}{n} \left(2(c_1 - c_2) + \sum_{i=3}^n (c_{i-2} - c_i) + 2(c_{n-1} - c_n) \right),$$

approximiert. Es gilt $n = \tau_{\text{mem}} \cdot \Delta t$ mit den zuletzt gemessenen Konzentrationen c_i .

Im diskreten Modell wird die Lauflänge λ durch die Wahrscheinlichkeit p_{run} , in Δt geradeauszulaufen, realisiert. Die Bakterie führt hierbei eine Bernoullikette aus; eine Lauflänge von n Schritten tritt also mit einer Wahrscheinlichkeit von p_{run}^n auf. Somit ergibt sich λ als der Erwartungswert der Bernoullikette

$$\lambda = 1a \cdot p_{\text{run}} + 2a \cdot p_{\text{run}}^2 + 3a \cdot p_{\text{run}}^3 + \dots = \frac{p_{\text{run}}}{(1 - p_{\text{run}})^2} \cdot a.$$

Der Grenzwert lässt sich über Differenzieren der geometrischen Reihe nach

$$q \frac{d}{dq} \sum_{k=0}^{\infty} q^k = \sum_{k=1}^{\infty} k q^k = \frac{q}{(1 - q)^2} \quad (3.1)$$

bestimmen. Die Dimensionierung erfolge nach den Größenangaben in Kapitel 2.1. Da eine Bakterie genau einen Gitterplatz belegt, wird $a = 4 \mu\text{m}$ gewählt. Mit $v = 20 \mu\text{m/s}$ ergibt sich die Dauer eines Zeitschritts damit zu $\Delta t = a / v = 0,2$ s.

Wird ohne Gradient eine Run-Dauer von 1 s angenommen, ergibt sich $\lambda_0 = 5a$ und

$$\begin{aligned} p_{\text{run}}(\lambda) &= \left(\frac{1}{2} - \sqrt{\frac{\lambda}{a} + \frac{1}{4}} \right) \cdot \frac{a}{\lambda} + 1 \\ \Rightarrow p_{\text{run}}(\lambda_0) &\approx 64\%. \end{aligned}$$

Die Verteilung der diskreten Orientierungsänderung in einer Tumble-Phase wird aus der empirischen Winkelverteilung aus 2.1 berechnet. Dazu wird eine periodische Gaußverteilung

$$P(\theta) = \sum_{-\infty}^{\infty} \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \exp\left(-\frac{(\theta - \mu)^2}{2\sigma^2}\right), \quad \theta \in [0, \infty)$$

verwendet, für die gilt

$$\int_{\theta_0}^{\theta_0 + \pi} P(\theta) d\theta = 1.$$

$0^\circ < \theta < 45^\circ$ entspricht keiner Orientierungsänderung, $45^\circ < \theta < 135^\circ$ einer Drehung nach links oder rechts und $135^\circ < \theta < 180^\circ$ einer Drehung nach hinten. Durch Integration ergeben sich die Wahrscheinlichkeiten

$$\begin{aligned} p_{\text{geradeaus}} &\approx 24\%, \\ p_{\text{links}} = p_{\text{rechts}} &\approx 34\% \\ \text{und } p_{\text{hinten}} &\approx 8\%. \end{aligned}$$

In Abbildung 3.2 werden die Trajektorien einer einzelnen Bakterie in der diskreten Simulation mit der Aufnahme einer realen Bewegung verglichen.



(a) [11]



(b)

Abbildung 3.2: Vergleich reales Bakterium und Gitter-Modell.

Die Implementierung der Simulation erfolgt über einen objektorientierten Ansatz. Bakterien und Attraktant-Teilchen sind einzelne Objekte, die von einem Gitter-Objekt verwaltet werden. Dieses gewährleistet die Randbedingungen und steuert die Wechselwirkungen zwischen den Teilchen. Alle Objekte besitzen eine Zeitentwicklungsfunktion, die das Objekt auf Basis der aktuellen Umwelt nach den in Kapitel 3 definierten Regeln um einen Zeitschritt entwickelt. Das Gitter kann zu jedem Zeitpunkt für die Auswertung abgespeichert werden.

Der Bakterie stehen hier beispielhaft die vier möglichen Lauflängen

$$\lambda = \{5a, 10a, 25a, 50a\}$$

zur Verfügung, zwischen denen sie je nach Verlauf des Gradienten auswählt. Es wurden folgende Annahmen getroffen:

Nimmt sie einen Gradienten $\geq 0,7 a / \Delta t$ wahr, steigt ihre Lauflänge um ein Niveau an, bei einem Gradienten $\geq 0,2 a / \Delta t$ bleibt die Lauflänge konstant und bei einem Gradienten ≤ 0 sinkt sie um ein Niveau ab.

Die generierten Daten werden mit NumPy, SciPy und matplotlib ausgewertet [14, 15, 16].

Die Vorgabe des experimentellen Aufbaus erfolgt über das Einlesen einer Bilddatei.

4 Ergebnisse

4.1 Berechnung der Motilität

Die Motilität μ beschreibt die Bewegung der Bakterien ohne Einfluss des Chemoattraktanten. Sie ist nach (2.2a) das Analogon zur Diffusionskonstante und steht in Abhängigkeit von der mittleren Lauflänge und der Geschwindigkeit einzelner Zellen. Empirisch kann sie mit

$$\mu = \frac{\langle r^2 \rangle}{2t}$$

aus dem mittleren Quadrat der zurückgelegten Strecke pro Zeit ermittelt werden. Dazu wurden $N = 5000$ Bakterien mittig auf dem Gitter mit $c = 0$ platziert. Nach einer Zeit $t = 500$ s wurde Abbildung 4.1 aufgenommen. Das Histogramm zeigt die gemessenen quadratischen Abstände $r^2 = (x - x_0)^2 + (y - y_0)^2$ vom Startpunkt.

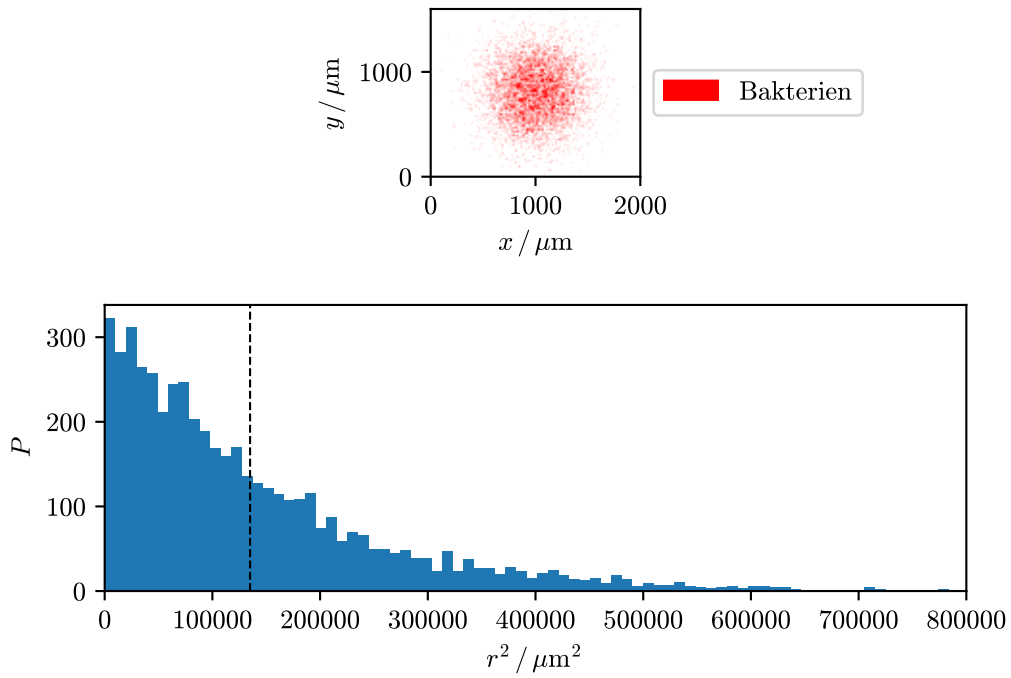


Abbildung 4.1: Messung der Motilität.

Der Mittelwert ergibt sich zu $\langle r^2 \rangle = 135 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$, sodass

$$\mu = 135 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$$

gilt. Berg gibt in [11] $\mu_{\text{real}} = 400 \mu\text{m}^2/\text{s}$ an. Reale E.-coli-Bakterien sind damit etwas motiler.

Ein großer Vorteil des hier vorgestellten Modells ist die Gestaltungsfreiheit des Gitters. Sie erlaubt den Aufbau verschiedenster Szenarien und Experimente, ohne das Lösen komplexer mathematischer Probleme. Im Folgenden werden einige der vielen möglichen Aufbauten gezeigt und diskutiert.

4.2 Chemotaxie

Eine einzelne Bakterie ist bereits in der Lage, einer Spur des zunehmenden Chemoattraktanten zu folgen, wie in Abbildung 4.2 gezeigt ist. Gut zu erkennen sind hier die längeren Run-Phasen, wenn das Bakterium einen positiven Gradienten wahrnimmt.

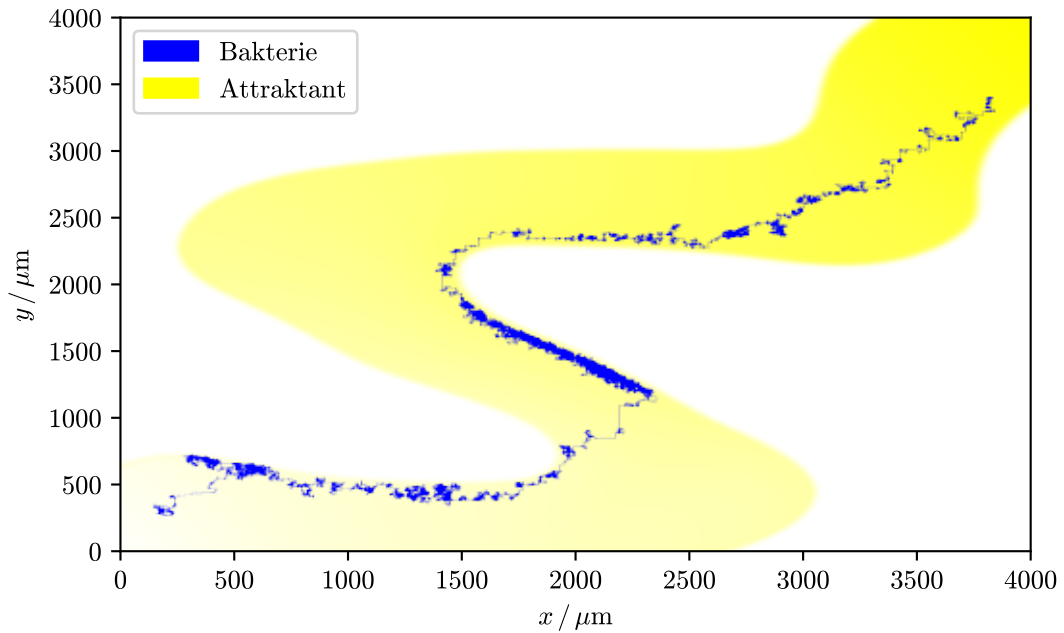


Abbildung 4.2: Eine einzelne Bakterie läuft einen Gradienten hinauf.

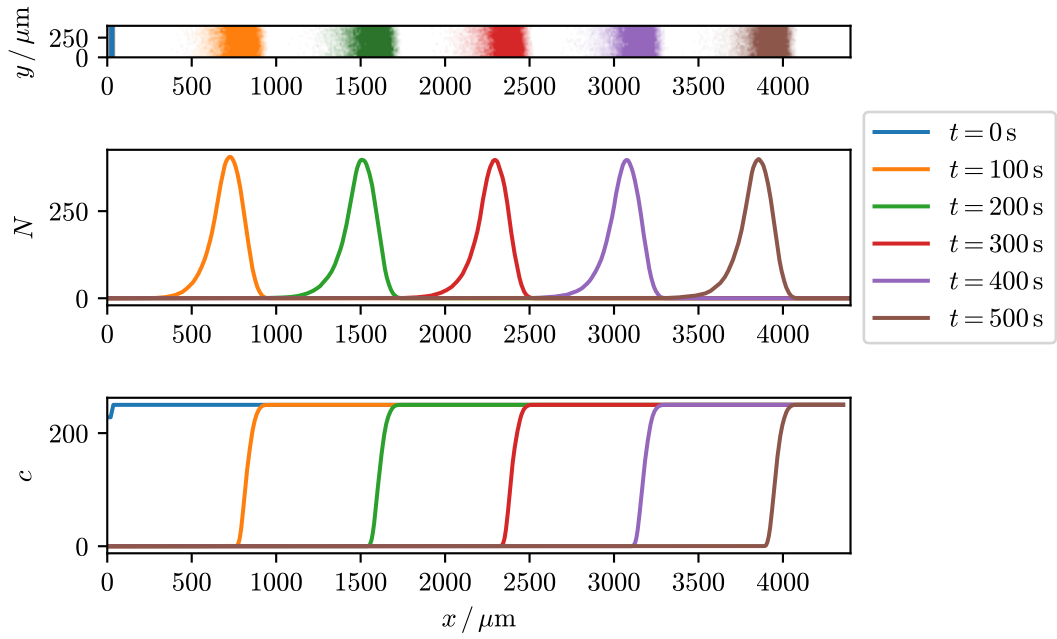
Mit diesen Fähigkeiten kann das Bakterium beispielsweise ein Labyrinth lösen. Jin et al. haben einen solchen Aufbau für einen Mikroschwimmer vorgestellt [17]. Am Ausgang wurde eine Nahrungsquelle platziert, die über Diffusionseigenschaften verfügt. Nach einiger Zeit entstand dann ein Gradient im Labyrinth, als Folge der Diffusion. Diesen konnte der Schwimmer wie eine Spur zum Ausgang verfolgen.

4.3 Kollektives Verhalten

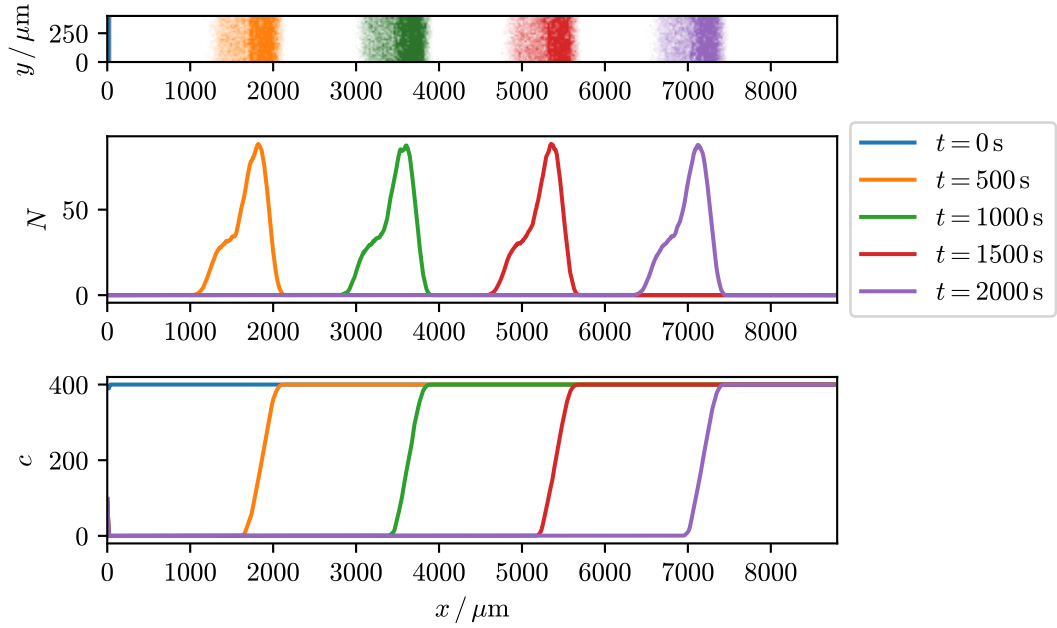
Im Gittermodell sind die in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Bakterienpulse ebenfalls beobachtbar. Dazu werden an der linken Seite des Gitters die Bakterien in einem dünnen Streifen platziert. Zum Zeitpunkt $t = 0$ liegt auf dem gesamten Gitter eine homogene Verteilung von Chemoattraktanten mit $c(x, y) = c_0$. Nun wird die Simulation gestartet und das Gitter in konstanten Zeitabschnitten abgespeichert.. Abbildung 4.3 zeigt die Pulse für zwei verschiedene Verhältnisse N_p / c_0 in grafischer Form.

Die Grafiken sind jeweils dreiteilig: Grafik 1 zeigt die Pulse im Gitter, Grafik 2 die über \hat{y} summierte Bakterienzahl N und Grafik 3 die Chemoattraktantenkonzentration c , wobei die letzten beiden Grafiken jeweils über $\Delta x = 40 \mu\text{m}$ geglättet wurden. Es sind außerdem die verschiedenen Skalierungen der x -Achse zu beachten.

In y -Richtung gelten periodische Randbedingungen. Die Simulation wurde beendet, sobald das erste Bakterium den rechten Rand erreicht hat. Das Gitter kann somit als die Oberfläche eines Zylinders aufgefasst werden.



(a) $c_0 = 250 / a^2$ und $N = 22\,000$.



(b) $c_0 = 400 / a^2$ und $N = 10\,000$.

Abbildung 4.3: Bakterienpulse im Gittermodell.

Zum Vergleich sind in Abbildung 4.4 Wellenformen aufgetragen, die mit dem Modell von Seyrich et al. generiert wurden.

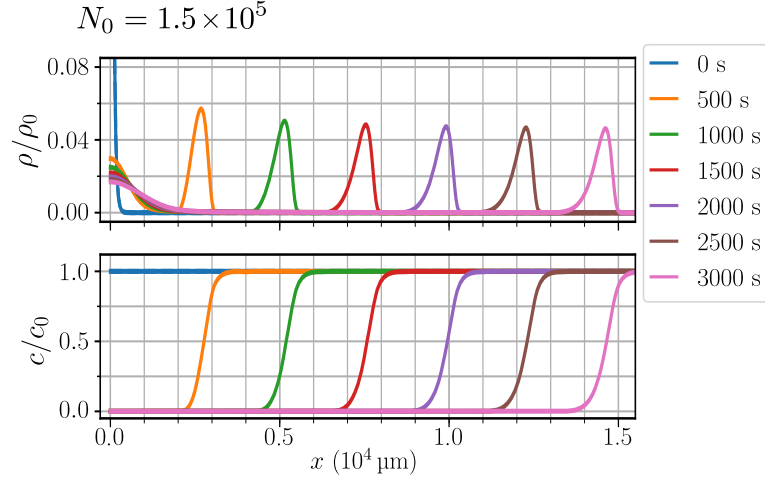


Abbildung 4.4: Bakterienpulse im Modell von Seyrich et al. [7].

Es wird eine qualitativ ähnliche Pulsform deutlich.

Es soll nun überprüft werden, ob im Gittermodell die Relation (2.6) gilt. Zu diesem Zweck werden zwei Messreihen angefertigt, in denen nacheinander c_0 sowie N_P variiert werden. Es wird jeweils die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Pulse bemessen, indem zunächst die Positionen der Pulsmaxima $x_P(t)$ zu jeweils 10 verschiedenen Zeitpunkten bestimmt werden. Um die Geschwindigkeiten zu bestimmen, werden jeweils lineare Ausgleichsrechnungen mit $x_P(t) = v_{P, \text{exp}} \cdot t$ durchgeführt. In Abbildung 4.5 wird $v_{P, \text{exp}}$ gegen N_P / c_0 aufgetragen.

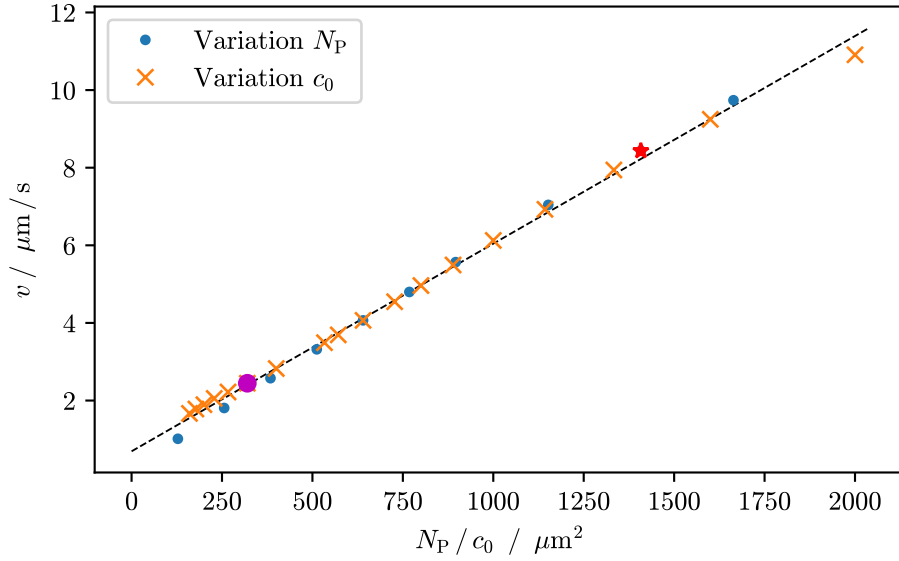


Abbildung 4.5: Geschwindigkeit der Pulse bei verschiedenen N_P und c_0 , mit $\hat{y} = 400 \mu\text{m}$. Der rote Stern gibt das in Abb. 4.3a verwendete Verhältnis an, der violette Punkt das aus Abb. 4.3b.

Es ist gut zu erkennen, dass die beiden Datenreihen eine hohe Korrelation aufweisen. Daher wurde eine lineare Ausgleichsrechnung über beide Reihen ausgeführt. Es ergibt sich

$$v_P = a \cdot \frac{N_P}{c_0} + 0,692 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}.$$

mit

$$a = 0,00428 \frac{1}{\mu\text{m s}}.$$

Mit $k = 1 / 0,2 \text{ s}$ und $y = 400 \mu\text{m}$ ergibt sich aus (2.6)

$$a_{\text{theor.}} = \frac{k}{y} = 0,0125 \frac{1}{\mu\text{m s}}.$$

Der experimentelle Wert weicht von diesem um 66 % ab. Da aber das qualitative Verhalten sehr gut mit dem theoretischen Modell übereinstimmt, wird vermutet, dass diese Abweichung auf die Wahl der Dimensionierung des Gitters zurückzuführen ist.

Zusätzlich ist nicht auszuschließen, dass weitere Faktoren Einfluss nehmen und die Pulsgeschwindigkeit im Gittermodell nicht vollständig durch (2.6) beschrieben werden kann.

Im Modell von Seyrich et al. wird hier ebenfalls zunächst eine Linearität beobachtet. Bei großen N_P / c_0 zeigt dort jedoch ein abruptes Abflachen der Kurve. Grund hierfür ist ein Sättigungseffekt, der durch eine maximale Kapazität an Bakterien in einem Wellenpuls hervorgerufen wird. Dieser Effekt wird sich im Gittermodell mit der aktuellen Konfiguration jedoch nicht einstellen. Zum einen ist dazu Ausdauer der Bakterien derzeit nicht groß genug, um längere Zeit ohne Nahrung zu überleben, zum anderen werden gestorbene Bakterien dort reproduziert, wo andere Bakterien genügend Nahrung haben, d. h. im Puls. Mit anderer Konfiguration könnte dieser Effekt allerdings sichtbar gemacht werden.

In Abbildung 4.6 wurden außerdem die Halbwertsbreiten der Pulse im Gittermodell gezeigt. Es wurde hier eine Regression mit einer exponentiellen Funktion mit der Gestalt

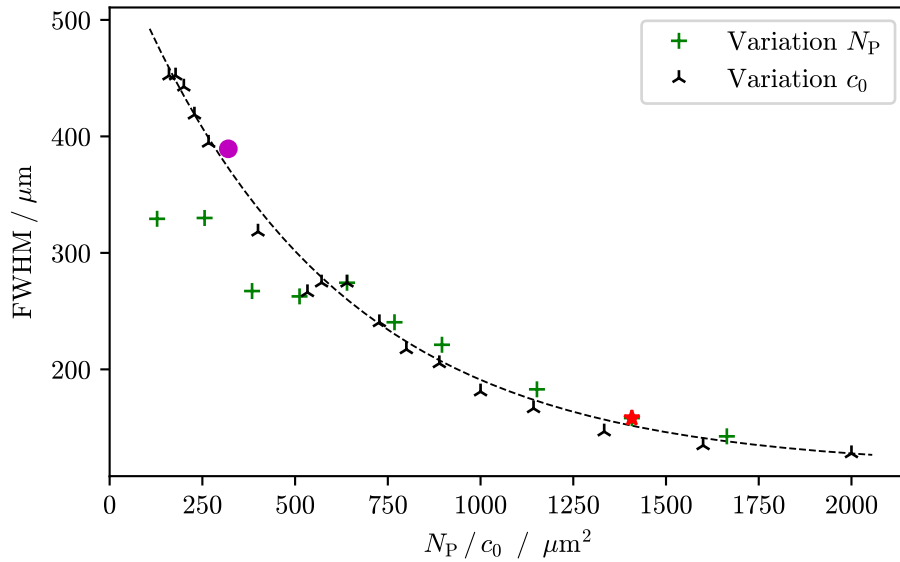


Abbildung 4.6: Pulsbreiten im Gittermodell. Der rote Stern gibt das in Abb. 4.3a verwendete Verhältnis an, der violette Punkt das aus Abb. 4.3b.

$$\text{FWHM} = A \cdot e^{-\beta \cdot N_P / c_0} + \text{FWHM}_0$$

durchgeführt. Dabei wurden die ersten drei Werte aus der ersten Datenreihe (grüne Pluszeichen) nicht miteinbezogen. Der Grund für deren große Abweichungen von der exponentiellen Kurve ist durch einen verstärkten Einfluss von Zufallsbewegungen bei geringen N_P zu erklären. Dies erschwert die genaue Bestimmung der Breiten erheblich.

Aus der Regression ergeben sich die Koeffizienten

$$A = 458 \mu\text{m} \quad \beta = 1,8 \cdot 10^{-3} \frac{1}{\mu\text{m}^2} \quad \text{und} \quad \text{FWHM}_0 = 115 \mu\text{m}.$$

Auch im Modell von Seyrich et al. wird ein Verlauf beobachtet, der eine exponentiellen Abnahme sehr ähnlich ist.

4.3.1 Brechung

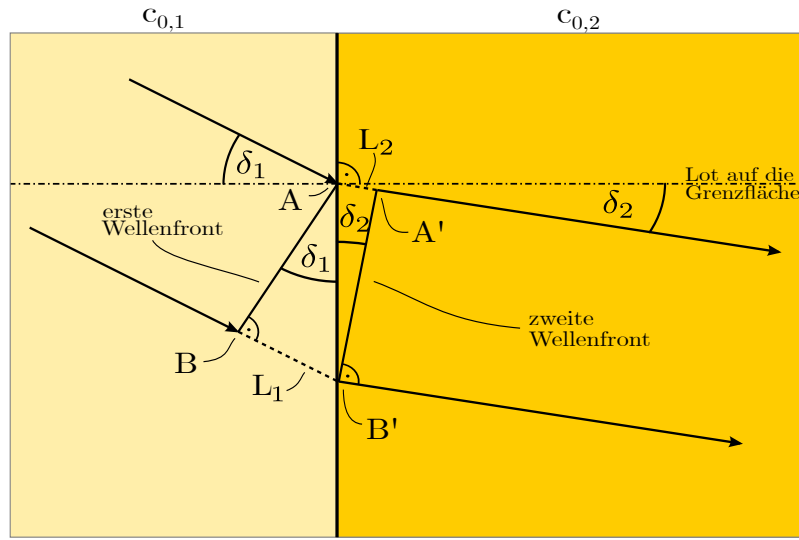


Abbildung 4.7: Brechungsgesetz, basiert auf [18].

Aufgrund der Proportionalität zwischen v_P und N_P / c_0 wird überprüft, ob das Verhalten an einer Grenzfläche ähnlich zur optischen Brechung beschrieben werden kann. In Abbildung 4.7 ist das Modell schematisch gezeigt. Da L_1 und L_2 in der gleichen Zeit zurückgelegt werden, gilt

$$\frac{L_1}{L_2} = \frac{v_{P,1}}{v_{P,2}} = \frac{N_{P,1} / c_{0,1}}{N_{P,2} / c_{0,2}}.$$

Mit $L_{1,2} = \overline{AB'} \sin \delta_{1,2}$ und $N_{P,1} = N_{P,2}$ ergibt sich

$$\frac{\sin \delta_1}{\sin \delta_2} = \frac{c_{0,2}}{c_{0,1}}.$$

In Abbildung 4.8 wird eine Brechung im Gittermodell gezeigt. Hier ist an der orangefarbenen Front klar zu erkennen, dass sich der Winkel an der Grenzfläche nicht ändert.

Diese erstaunliche Beobachtung ist vermutlich durch die Annahme zur Fortpflanzung der Bakterien in Kapitel 3 zu erklären. Dies wird an der Grafik zur Bakterienkonzentration deutlich wird: Der Anstieg der orangefarbenen Linie auf Höhe der Grenzfläche zeigt, dass im Medium $c_{0,2}$ bereits eine höhere Bakteriendichte herrscht. Die Geschwindigkeit wird also nicht allein durch verschiedene c_0 beeinflusst, sondern auch durch verschiedene N . Grund für den Anstieg ist vermutlich die höhere Überlebensrate im rechten Bereich: Die Bakterien links sterben häufiger als rechts, werden aber, sobald rechts eine höhere Bakteriendichte herrscht, mit erhöhter Wahrscheinlichkeit rechts reproduziert. Somit sinkt die Bakterienzahl links stetig ab, was diesen Teil der Front verlangsamt.

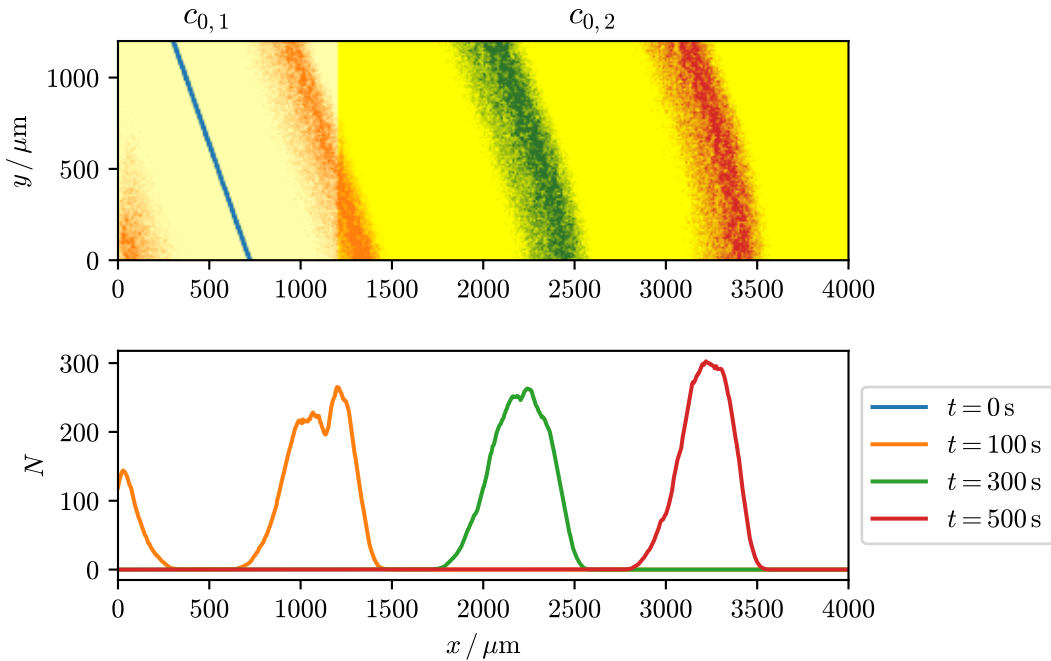


Abbildung 4.8: Brechung im Gittermodell, $c_{0,1} = 140 / a^2$, $c_{0,2} = 220 / a^2$.

Außerdem wird festgestellt, dass bis jetzt nur Pulse mit stationärer Form betrachtet wurden, und die Aufbaueffekte vernachlässigt wurden. Nun existiert mit der Grenzfläche jedoch ein Ort, an dem sich der mittlere von den Bakterien wahrgenommene Gradient sprunghaft ändert. Dazu kommt, dass im Unterschied zur Brechung die Grenzschicht selbst nicht stationär ist, da die Bakterienfront durch den Konsum die Form der Schicht verändert, während sie diese passiert.

4.3.2 Tunneleffekt

Ein weiterer zu untersuchender Effekt ist ein Tunneleffekt, der auftritt, wenn der Chemoattraktant auf einem bestimmten Intervall auf Null gesetzt wird. In Abbildung 4.9 ist eine Simulation gezeigt, bei der die Bakterienpopulation Passagen mit $c = 0$ in den Längen $200\text{ }\mu\text{m}$, $400\text{ }\mu\text{m}$ und $600\text{ }\mu\text{m}$ überwinden soll. Innerhalb der Strecken ohne

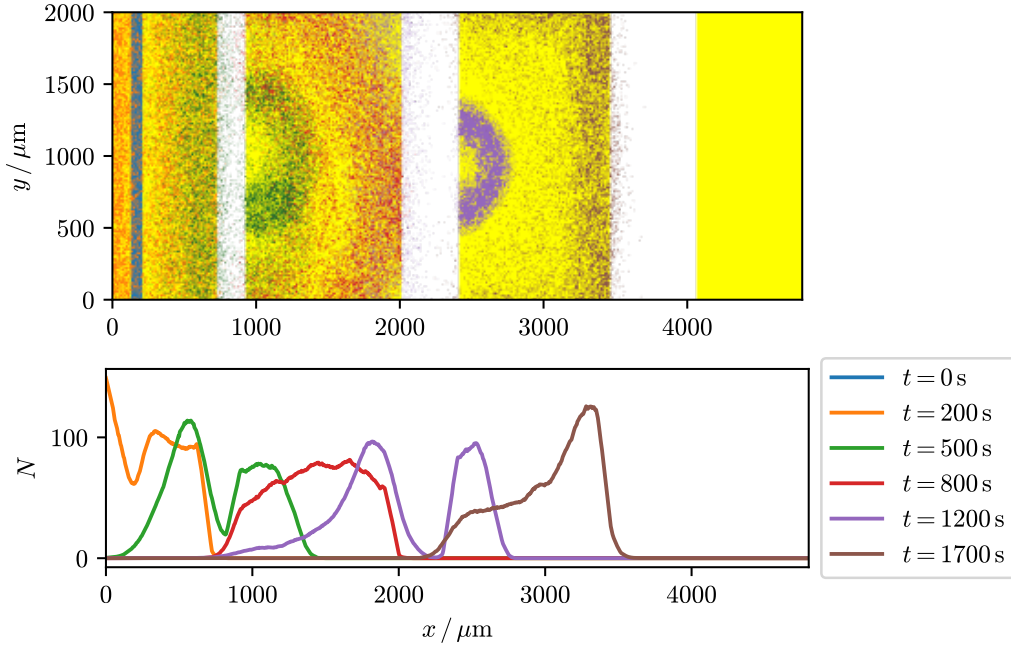


Abbildung 4.9: Der „Tunneleffekt“.

Chemoattraktant kann die Population nicht mehr untereinander wechselwirken, sodass die Bakterien sich nicht mehr chemotaktisch bewegen, sondern allein durch Diffusion. Die Pulse laufen daher sehr schnell auseinander. Zusätzlich können die einzelnen Bakterien durch ihre nun begrenzte Ausdauer nur noch eine begrenzte Distanz zurücklegen. Interessant ist hier außerdem die Beobachtung, dass nach den Passagen eine radiale Ausbreitung stattfindet und von einer Punktquelle auszugehen scheint. Auch hier könnte die Annahme zur Replikation in Kapitel 3 wieder eine Rolle spielen. Es reicht hier nämlich durch diese Annahme die erfolgreiche Passage einer einzigen Bakterie aus, um die gesamte Population auf die andere Seite zu bringen.

Insgesamt zeigen die beiden Aufbauten sehr interessante Beobachtungen, die großes Potential für weitere Untersuchungen bieten.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Anhand der Ergebnisse wurde gezeigt, dass die Simulation die qualitativen Verläufe der physikalischen Modelle abzubilden. Die quantitativen Aussagen der gegenwärtigen Version der Simulation sind jedoch noch nicht deckungsgleich zu den Ergebnissen anderer Modelle. Um dies zu erreichen, ist weitere Arbeit an der Simulation notwendig.

An den zwei vorgestellten Versuchen wird jedoch das große Potential dieser Simulation deutlich: Das Erstellen von prinzipiell beliebigen Aufbauten ist problemlos möglich und zeigt zudem bereits sehr interessante Beobachtungen. Es ist mit Sicherheit lohnenswert, diese in Zukunft weiter zu untersuchen, um neue Erkenntnisse zu sammeln.

Dazu ist es außerdem sinnvoll, weitere Fähigkeiten einer einzelnen Bakterie in das bestehende Modell einzuarbeiten. Besonders interessant könnte eine Erweiterung sein, in der eine zweite Art von Chemoattraktanten eingeführt wird, der von den Bakterien selbst ausgeschieden wird. Dass reale Bakterien dazu in der Lage sind, wird in [19] festgestellt. Diese Erweiterung ermöglicht den Bakterien auf eine neue Weise miteinander in Wechselwirkung zu treten und könnte verantwortlich für viele beobachtbare Phänomene sein, darunter das Bilden bestimmter Formationen. Es wurde beispielsweise das spontane Zusammenfinden zu Clustern beobachtet, oder Schwimmformationen, in denen Bakterien genau in einer Reihe hintereinander in eine Richtung schwimmen. [19]

Weiterhin sollte zukünftig die Wahrnehmung der Bakterien näher an die Realität angepasst werden. Es gibt zahlreiche Forschungen mit detaillierten Ergebnissen zu den Einflüssen der Umwelt auf die einzelne Bakterie [1, 13], die den bisher implementierten Mechanismus deutlich an die realen Umstände annähern würden.

In den Versuchen sind zwar keine Verfälschungen durch die Effekte des Gitters aufgefallen, aber es sollten insbesondere mögliche Effekte durch die eingeschränkte Bewegungsrichtung einzelner Bakterien überprüft werden. In Zukunft ist auch eine Implementierung beliebiger Richtungen denkbar.

In [11] wird angegeben, dass während einer Run-Phase eine mittlere Richtungsänderung von 27° beobachtet wird. Dieser Effekt der Richtungsdiffusion wurde bisher vernachlässigt. Durch die Implementierung beliebiger Schwimmrichtungen, könnte auch der makroskopische Einfluss dieses Effekts untersucht werden.

Da das hier vorgestellte Modell das Phänomen der Bakterienpulse sehr nah an den bisherigen Theorien und experimentellen Beobachtungen abbildet, kann davon ausgegangen werden, dass die Simulation auch in vielen anderen Aufbauten verlässliche Daten liefert. Zwar bedarf die vorgestellte Simulation mit Sicherheit noch einiger Prüfung, aber es wird

jedoch bereits deutlich, dass hier ein großes Potential für neue Erkenntnisse über die Dynamik von Bakterienpopulationen liegt.

Literatur

- [1] Damon A. Clark und Lars C. Grant. „The bacterial chemotactic response reflects a compromise between transient and steady-state behavior“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102.26 (2005), S. 9150–9155. DOI: 10.1073/pnas.0407659102.
- [2] Martinus W. Beijerinck. „Ueber Atmungsfiguren beweglicher Bakterien“. In: *Zentralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde* 14 (1893), S. 827–845. URL: <https://www.biodiversitylibrary.org/page/51617035>.
- [3] Julius Adler. „Chemotaxis in bacteria“. In: *Science* 153.3737 (1966), S. 708–716. DOI: 10.1126/science.153.3737.708.
- [4] Evelyn F. Keller und Lee A. Segel. „Initiation of slime mold aggregation viewed as an instability“. In: *Journal of Theoretical Biology* 26.3 (1970), S. 399–415. DOI: 10.1016/0022-5193(70)90092-5.
- [5] Evelyn F. Keller und Lee A. Segel. „Traveling bands of chemotactic bacteria: A theoretical analysis“. In: *Journal of Theoretical Biology* 30.2 (1971), S. 235–248. DOI: 10.1016/0022-5193(71)90051-8.
- [6] Toshitaka Nagai und Tsutomu Ikeda. „Traveling waves in a chemotactic model“. In: *Journal of Mathematical Biology* 30.2 (1991), S. 169–184. DOI: 10.1007/BF00160334.
- [7] Maximilian Seyrich, Andrzej Palugniok und Holger Stark. „Traveling concentration pulses of bacteria in a generalized Keller–Segel model“. In: *New Journal of Physics* 21.10 (2019), S. 103001. DOI: 10.1088/1367-2630/ab4522.
- [8] Marcus J. Tindall et al. „Overview of mathematical approaches used to model bacterial chemotaxis II: bacterial populations“. In: *Bulletin of Mathematical Biology* 70.6 (2008), S. 1570. DOI: 10.1007/s11538-008-9322-5.
- [9] Thomas Hillen und Kevin J Painter. „A user’s guide to PDE models for chemotaxis“. In: *Journal of Mathematical Biology* 58.1 (2009), S. 183–217. DOI: 10.1007/s00285-008-0201-3.
- [10] Tapomoy Bhattacharjee et al. *Chemotactic smoothing of collective migration*. 2021. arXiv: 2101.04576 [physics.bio-ph].
- [11] Howard C. Berg. *Random Walks in Biology*. Princeton University Press, 2018. DOI: 10.1515/9781400820023.
- [12] Madhavan Siva Kumar und P. Philominathan. „The physics of flagellar motion of *E. coli* during chemotaxis“. In: *Biophysical Reviews* 2.1 (2010), S. 13–20. DOI: 10.1007/s12551-009-0024-5.

- [13] Jeffrey E. Segall, Steven M. Block und Howard C. Berg. „Temporal comparisons in bacterial chemotaxis“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83.23 (1986), S. 8987–8991. DOI: 10.1073/pnas.83.23.8987.
- [14] Travis E. Oliphant. „NumPy: Python for Scientific Computing“. Version 1.9.2. In: *Computing in Science & Engineering* 9.3 (2007), S. 10–20. URL: <http://www.numpy.org/>.
- [15] Eric Jones, Travis E. Oliphant, Pearu Peterson et al. *SciPy: Open source scientific tools for Python*. Version 0.16.0. URL: <http://www.scipy.org/>.
- [16] John D. Hunter. „Matplotlib: A 2D Graphics Environment“. Version 1.4.3. In: *Computing in Science & Engineering* 9.3 (2007), S. 90–95. URL: <http://matplotlib.org/>.
- [17] Chenyu Jin, Carsten Krüger und Corinna C. Maass. „Chemotaxis and autochemotaxis of self-propelling droplet swimmers“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114.20 (2017), S. 5089–5094. DOI: 10.1073/pnas.1619783114.
- [18] Benutzer: Wollschaf. „Snellius-Brechungsgesetz“. In: *Wikimedia Commons* (2009).
- [19] Elliot J. Marsden et al. „Chemotactic clusters in confined run-and-tumble bacteria: a numerical investigation“. In: *Soft Matter* 10.1 (2014), S. 157–165. DOI: 10.1039/C3SM52358F.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Abschlussarbeit mit dem Titel „Chemotaxie-Simulation einer Bakterienpopulation in einem Gittermodell“ selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erbracht habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Ort, Datum

Unterschrift

Belehrung

Wer vorsätzlich gegen eine die Täuschung über Prüfungsleistungen betreffende Regelung einer Hochschulprüfungsordnung verstößt, handelt ordnungswidrig. Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße von bis zu 50 000 € geahndet werden. Zuständige Verwaltungsbehörde für die Verfolgung und Ahndung von Ordnungswidrigkeiten ist der Kanzler/die Kanzlerin der Technischen Universität Dortmund. Im Falle eines mehrfachen oder sonstigen schwerwiegenden Täuschungsversuches kann der Prüfling zudem exmatrikuliert werden (§ 63 Abs. 5 Hochschulgesetz –HG–).

Die Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt wird mit Freiheitsstrafe bis zu 3 Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.

Die Technische Universität Dortmund wird ggf. elektronische Vergleichswerkzeuge (wie z. B. die Software „turnitin“) zur Überprüfung von Ordnungswidrigkeiten in Prüfungsverfahren nutzen.

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen.

Ort, Datum

Unterschrift