



Eksperiment

Dyrkning og vurdering af antallet af mikroorganismer i et flydende vækstmedie

Indledning

Det er muligt at dyrke og følge væksten af en mikroorganisme i et laboratorium.

Nogle af de mikroorganismer som er nemme at dyrke, er kolibakterier *Escherichia coli*, se figur 1.

Under ideelle forhold har kolibakterier en generationstid på ca. 20 min.

Væksten af kolibakterier kan følges ved at måle tætheden af dem i en flydende kultur på forskellige tidspunkter, fx ved hjælp af et spektrofotometer, se side 48-49 i bogen.

Normalt bruges et spektrofotometer til at måle en opløsning af et farvet stofs evne til at absorbere lys. Der er en lineær sammenhæng mellem farvestoffets koncentration og dets evne til at absorbere lys - indtil koncentrationen af farvestof på et tidspunkt bliver så tæt at det absorberer alt lyset.

En kultur af en mikroorganisme er meget mere uensartet end en farvet opløsning. I stedet for en absorption sker der derfor en brydning og dermed en spredning af lyset. Det kaldes derfor Optisk Densitet (OD) når der måles på kulturer af mikroorganismer.

Resultatet bliver dog vist som en Absorbans (A) på spektrofotometerets display. Absorbansen afhænger også lineært af kulturens koncentration, dvs. af antallet af mikroorganismer, indtil kulturen bliver for tæt. Absorbansen der typisk ligger mellem 0 og 1, måles ved bølgelængden 550 nm. Er absorbansen 1, antages det at svare til $12 \cdot 10^6$ celler/mL.

Tæthed af *E. coli* kan også måles ved hjælp af et densitometer. Dette apparat virker i princippet på samme måde som et spektrofotometer. Forskellen er at resultatet angives i en enhed, der kaldes McFarland units, hvor 1 McF antages at svare til $3 \cdot 10^6$ celler/mL. Apparatet skal ikke nulstilles, og prøven skal ikke hældes op. Det er derfor nemmere at bruge, men mindre præcist.



Figur 1. 3D-illustration af *E. coli*.



Figur 2. Spektrofotometer og densitometer.



For at få et konkret mål for antallet af mikroorganismer ved en bestemt tæthed, kan måling af tæthed kombineres med udpladning og optælling af mikroorganismer på en petriskål med et vækstmedie. Måling af tæthed kan også kombineres med brug af et tællekammer.

Evt. kan der ved brug af filtrering måles på biomassen af bakterier, ligesom der kan måles på deres forbrug af glucose i forbindelse med vækst ved hjælp af glucoseticks.

Formål

At følge væksten af kolibakterier i et flydende vækstmedie og at vurdere antallet af celler på forskellige tidspunkter.

Materialer

Kulturer af harmløs laboriestamme af kolibakterier på agarplade
Termostatvandbad med rystning
Spektrofotometer og kuvetter
Densitometer (evt.)
Pc med software til spektrofotometer
Mikropipetter med sterile spidser

Pr. gruppe:

Startkultur af *E. coli*
150 mL flydende medium i konisk kolbe
2 reagensglas med flydende medium
Evt. glucoseticks
Evt. filtreringsudstyr og bakteriefilter (porestørrelse ca. 0,2-0,4 µm)

Fremgangsmåde

Udføres af læreren et par dage i forvejen:

1. Pod et reagensglas der indeholder medie, med kolonier fra en agarplade. Stil reagensglasset i et termostatvandbad med rystning, gennembobling eller omrøring ved 37 °C. Efter en dag har man en startkultur der er i den stationære fase.

Udføres af elever:

1. Overfør 10 mL startkultur til den koniske kolbe med flydende medium.
2. Overfør 1000 µL startkultur til hver af de to reagensglas.
3. Start spektrofotometeret. Få en instruktion i hvordan spektrofotometeret betjenes eller læs nedenstående vejledning. Få ligeledes en instruktion i brug af densitometeret.
4. Udtag med jævne mellemrum en prøve af kulturen til måling i spektrofotometer (tæthed målt som 'absorbans') eller evt. i densitometer. Vurdér selv med udgangspunkt i organismens generationstid hvor ofte der skal udtages en prøve.



Klargøring af spektrofotometer (Logger Pro)

1. Tænd computeren.
2. Forbind spektrofotometeret til computeren via USB-kablet. Start Logger Pro softwaren op, derefter skulle den selv finde spektrofotometeret.
3. Spektrofotometeret skal nu kalibreres før brug (en slags nulstilling). I menuen 'Forsøg' vælges 'Kalibrer Spectrometer' og vent ca. 90 sekunder, mens lampen varmer op.
4. Fyld en kuvette 3/4 op med sterilt vækstmedium. VIGTIGT! Hold kun fingrene på de rillede/uklare sider. Sæt kuvetten i kuvetteholderen så lyset kan skinne igennem de klare (ikke-rillede) sider.
5. Vælg 'Afslut kalibrering' og dernæst 'ok'.

Måling af optisk densitet (OD) på bakteriekulturer

1. Vælg det regnbuefarvede ikon.
2. Vælg opsamlingstilstand Abs versus tid.
3. Vælg bølgelængde (λ) svarende til 550 nm (eller den værdi, som kommer tættest på) og dernæst ok.
4. Anbring prøven i kuvetteholderen. Aflæs absorbansen (svarer til OD) i nederste venstre hjørne. Indtast samhörørende værdier mellem tid og absorbans fx i Excel.
5. Gentag punkt 4 med de øvrige prøver.

Resultater og resultatbehandling

1. Opstil et skema hvor der anføres samhörørende værdier af tid, OD og antal celler.
2. Lav dernæst en graf der viser sammenhængen mellem tid og celleantal.
3. Lav samme graf med logaritmisk skala på y-aksen.
4. Hvis der er målt biomasse og/eller glucose fremstilles i samme diagram grafer som funktion af tid.

Diskussion

1. Analysér graferne (beskriv og forklar deres udseende).
2. Hvad er fordelene ved at starte med en kultur der er i den stationære fase?
3. Sammenlign data fra spektrofotometeret og densitometeret. Stemmer resultaterne overens?
4. Hvilke fejlkilder og usikkerheder kan der være ved fremgangsmåden? (Ved man fx helt præcist, hvor mange bakterier der er?)
5. Hvordan kan der evt. fås et mere præcist mål for antallet af bakterier i en flydende kultur?
6. Kom med eksempler på industriel anvendelse af *E. coli*.

Konklusion

Udarbejd en konklusion hvor der tages stilling til om eksperimentets formål er opfyldt.