



Øvelse: Dyrkning og vurdering af antallet af mikroorganismer i et flydende vækstmedie

Af Lone Als Egebo

Baseret på siderne 109-118

Indledning

Man kan dyrke og følge væksten af en mikroorganisme i et laboratorium. Nogle af de mikroorganismer som er nemme at dyrke er kolibakterier, *Escherichia coli*. Under ideelle forhold har kolibakterier en generationstid på ca. 20 min.



Figur 1. *E.coli*. Kilde: Royaltyfri stockillustrations-ID: 133011737.

Man kan følge væksten af *E. coli* ved at måle tætheden af den i en flydende kultur på forskellige tidspunkter. Det kan man fx gøre ved hjælp af et *spektrofotometer*.

Normalt bruger man et spektrofotometer til at måle en opløsning af et farvet stofs evne til at absorbere lys. Indtil koncentrationen af farvestof på et tidspunkt bliver så tæt at det absorberer alt lys, er der en lineær sammenhæng mellem farvestoffets koncentration og dets evne til at absorbere lys.

En kultur af en mikroorganisme er meget mindre ensartet end en farvet opløsning. I stedet for en absorption sker der derfor en brydning og dermed en spredning af lyset, og man kalder det derfor *optisk densitet (OD)* når man måler på kulturer af mikroorganismer.

Resultatet af en måling bliver dog vist som en *absorbans (A)* på spektrofotometerets display og 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.

Man kan også måle tæthed af *E.coli* 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 hedder *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.



For at få et konkret mål for antallet af mikroorganismer ved en bestemt tæthed, kan man kombinere tæthedsmålingen med udpladning og optælling af mikroorganismer i en petriskål med et vækstmedie. Man kan også kombinere tæthedsmålingen med brug af et tællekammer i et mikroskop.

Evt. kan man ved brug af filtrering, måle på biomassen af bakterier, ligesom man evt. kan måle på deres forbrug af glucose i forbindelse med vækst.

Formål

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

Materialer

- Kulturer af kolibakterier på agarplade
- Termostatvandbad med rystefunktion
- Spektrofotometer med kuvetter
- Densitometer
- Mikropipetter med sterile spidser
- Pr. gruppe:
- Startkultur af *E.coli*.
- 150 mL flydende næringsmedium i konisk kolbe
- 2 reagensglas med flydende næringsmedie

Fremgangsmåde

Udføres af læreren et par dage i forvejen

Overfør bakteriekolonier fra agarpladen til et reagensglas med næringsmedie.

Stil reagensglasset i et termostatvandbad med rystefunktion, gennemluftning eller omrøring ved 37 °C.

Efter en dag har man en startkultur der er i den stationære fase.

Overfør 10 mL startkultur til en konisk kolbe med flydende medie.

Overfør 1000 µL startkultur til hver af de to reagensglas.

Tænd spektrofotometeret.

Udtag med jævne mellemrum en prøve af kulturen til måling i spektrofotometeret (tæthed målt som 'absorbans'). Vurdér selv med udgangspunkt i organismens generationstid, hvor ofte der skal udtages en prøve.



Klargøring af spektrofotometer

1. Tænd computeren.
2. Forbind spektrofotometeret til computeren via USB-kablet. Start Logger Pro softwaren op, programmet finder selv spektrofotometeret.
3. Spektrofotometeret skal nu kalibreres før brug (en slags nulstilling). I menuen **Forsøg** vælges **Kalibrer Spectrometer**, 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 sider af kuvetten. Sæt den 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 opsamlingsstilstand **Abs vs 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 samhørende værdier mellem tid og absorbans fx i Excel.
5. Gentag punkt 4 med de øvrige prøver.
6. Målingerne i spektrofotometeret kan suppleres af målinger i densitometeret.

Resultater og resultatbehandling

1. Opstil et skema hvor der anføres samhørende værdier af tid, OD og antal celler.
2. Udarbejd dernæst en graf der viser sammenhængen mellem tid og celleantal.
3. Udarbejd 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. At analysere en graf vil sige at man beskriver og forklarer dens forløb.
2. Hvad er fordelene ved at starte med en kultur der er i den stationære fase?
3. Sammenlign evt. data fra spektrofotometeret og densitometeret. Stemmer resultaterne overens?
4. Hvilke fejlkilder og usikkerheder kan der være ved fremgangsmåden? Vides det fx helt præcist hvor mange bakterier der er?
5. Hvordan kan man evt. få et mere præcist mål for antallet af bakterier i en flydende kultur?
6. Kom med eksempler på industriel anvendelse af *E. coli*.

Konklusion

Er formålet opfyldt? Hvorfor/hvorfor ikke?