

## Forsøgsvejledning – Vækstkurver og bestemmelse af cellekoncentration

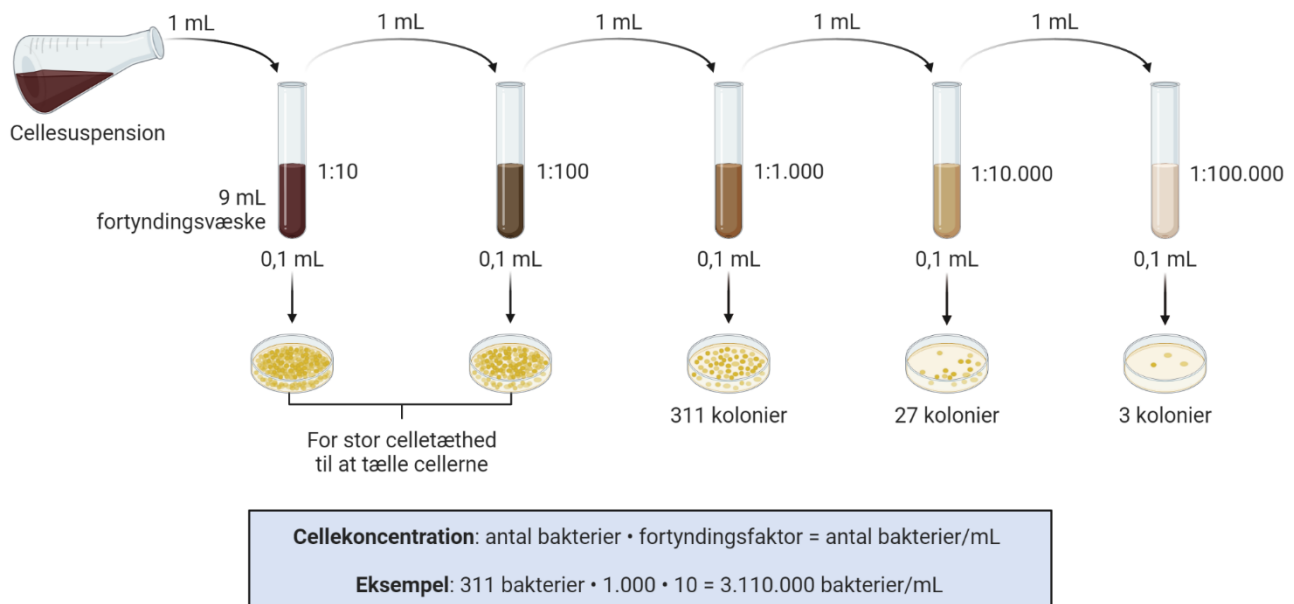
# Fermenteringsteknologi

### Introduktion

Bakterieceller, som har rigeligt med næring, vil i et tidsrum udvise eksponentiel cellevækst, som er kendetegnet ved, at bakteriekulturen fordobler sig med et konstant tidsinterval. Dette tidsinterval betegnes som bakteriekulturens fordoblingstid. *Escherichia coli* er en bakterie, som ofte bruges som modelorganisme, bl.a. fordi den vokser ganske hurtigt – under optimale forhold har *E. coli* en fordoblingstid på 20 minutter! Der er forskellige måder, hvorpå man kan måle bakteriecellers vækst i et flydende vækstmedium.

Cellekoncentrationen i en prøve kan bestemmes ved *pladespredning*. Ved denne metode udspreder man 1 mL bakteriekultur på en agarplade for at foretage en bestemmelse af celleantallet. Ved inkubation af agarpladen vil hver enkelt bakteriecelle udvikle sig til en bakteriekoloni, som kan ses (og tælles) med det blotte øje. Typisk vokser bakterierne med så stor celletæthed, at celleantallet ikke kan bestemmes i den oprindelige bakteriekultur. Derfor skal man fortynde bakterierne vha. en fortyndingsrække (*figur 1*). Ved pladespredning af fortyndingerne tæller man efterfølgende antallet af bakteriekolonier og ganger det med fortyndingsfaktoren, hvormed man bestemmer antallet af bakterieceller i den oprindelige bakteriekultur.

Cellekoncentrationen i en prøve kan også bestemmes ved *spektrofotometri*. Ved denne metode anvender man et spektrofotometer, som måler absorbansen af lys gennem bakteriesuspensionen ved 600 nm. Der er en sammenhæng mellem cellekoncentrationen i prøven og hvor meget lys, der absorberes i prøven. Derfor kan man måle væksten i en bakteriesuspension over tid ved løbende at udtage prøver. For at kalibrere målingerne kan man kombinere spektrofotometri med pladespredning på to eller flere målinger.



**Figur 1.** Pladespredning af fortyndingsrække til bestemmelse af cellekoncentrationen. En faktor 10-fortyndingsrække laves ved at overføre 1 mL cellekultur til 9 mL saltopløsning, hvormed bakterierne fortyndes 10 gange ( $10^{-1}$ ). Efterfølgende overføres 1 mL cellekultur videre til 9 mL saltopløsning, hvor bakterierne fortyndes 100 gange ( $10^{-2}$ ) osv. Ved pladespredning fortyndes bakterierne med en ekstra faktor 10, hvis der kun udplades 0,1 mL fremfor 1 mL.

Formålet med denne øvelse er at måle *E. coli*-cellers vækst og følge cellernes vækstkurve over tid. Det sker ved at udtage prøver af en *E. coli*-cellekultur. I forsøget bruges måling med spektrofotometri som et *indirekte* mål for cellekoncentrationen af *E. coli*-celler, mens måling med pladespredning bruges som et *direkte* mål.

## Materialer

- 100 mL LB-medium
- 250 mL konisk kolbe
- 1 mL pipette + pipettespidser
- 37 °C vandbad med rystning
- Starterkultur af *E. coli*

## Spektrofotometri

- 1 mL pipette + pipettespidser
- Spektrofotometer + kuvetter

## Pladespredning

- 1 mL pipette + pipettespidser
- 3 × 6 stk. fortyndingsrør med 9 mL steril 0,9% NaCl (mærket -1, -2, -3, -4, -5 og -6)
- 3 × 12 stk. LB-plader, dvs. to pr. fortyndingsrør (mærket -1, -2, -3, -4, -5 og -6)
- Drigalskispatel
- Petriskål med 70% ethanol
- Bunsenbrænder + tændstikker
- 37 °C varmeskab

## Fremgangsmåde

*Dagen inden forsøget podes LB-medium i en konisk kolbe med E. coli. Kolben stilles i et 37 °C vandbad med rystning. Bakterierne vokser over natten, og dagen efter har man en starterkultur af E. coli.*

### Forsøgsdag 1: spektrofotometri og pladespredning (~ 3½ time)

Der udføres ét samlet forsøg, hvor man på skift udtager prøver til bestemmelse af cellekoncentrationen.

1. Overfør 100 mL LB-medium til en 250 mL konisk kolbe. Anbring det i et 37 °C rystevandbad i 10 minutter.
2. Imens klargøres forsøget og forsøgsopstillingen. Overfør 1 mL LB-medium til en kuvette, og brug denne som kontrol for at standardisere absorbansen fra måling til måling gennem hele forsøget. Dette gøres, fordi LB-mediet indeholder partikler, der udover cellerne også absorberer lyset fra spektrofotometeret.
3. Til  $t = 0$  startes der et ur, og LB-mediet podes med 1 mL *E. coli*-starterkultur og blandes grundigt.
4. Udtag straks prøver til måling af cellekoncentrationen ved spektrofotometri og pladespredning.

- **Spektrofotometri:** 1 mL prøve af bakteriekulturen overføres til en kuvette, og absorbansen af prøven måles på et spektrofotometer ved 600 nm ( $OD_{600}$ ). Husk at standardisere målingen ved også at måle absorbansen af kontrollen. Notér målingerne i *bilag 1*.
- **Pladespredning:** Fortyndingerne foretages via en 10-faktor fortyndingsrække, og der laves fem fortyndinger af hhv. fortyndingsfaktor  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  og  $10^{-5}$ . For hver af de fem fortyndinger udplades der på to LB-plader for at lave en dobbeltbestemmelse.

*10<sup>-1</sup>-fortynding:* 1 mL prøve af bakteriekulturen overføres til det første fortyndingsrør mærket med -1. Bland bakteriefortyndingen grundigt f.eks. ved at suge forsigtigt op og ned med pipetten.

*10<sup>-2</sup>-fortynding:* Skift pipettespids. Udtag 1 mL af  $10^{-1}$ -fortyndingen, og overfør det til det andet fortyndingsrør mærket med -2. Bland bakteriefortyndingen grundigt.

*10<sup>-3</sup>-fortynding:* Skift pipettespids. Udtag 1 mL af  $10^{-2}$ -fortyndingen, og overfør det til det tredje fortyndingsrør mærket med -3. Bland bakteriefortyndingen grundigt.

Osv...

*10<sup>-6</sup>-fortynding:* Skift pipettespids. Udtag 1 mL af  $10^{-5}$ -fortyndingen, og overfør det til det fjerde fortyndingsrør mærket med -6. Bland bakteriefortyndingen grundigt.

*Udpladning:* Skift pipettespids. Udtag 0,1 mL prøve af den givne bakteriefortynding, og overfør det til en agarplade. Spred prøven udover LB-pladen med drigalskispåtlen, efter at den er dyppet i 70% ethanol, opvarmet over bunsenbrænderen og afkølet mod agarpladens agar. Udplad på to LB-plader for hver af de fem fortyndinger. Skift pipettespids mellem overførslerne.

Husk at mærke agarpladerne med prøvenummer og fortyndingsfaktor.

5. Forsæt med at udtage prøver til måling af cellekoncentrationen ved spektrofotometri og pladespredning i 3 timer. Udtag 1 mL prøve til spektrofotometri hvert 10. minut og 1 mL prøve til pladespredning hvert 90. minut. Notér det eksakte tidspunkt, hvor prøverne udtages.
6. Bundt LB-pladerne med bunden opad, og inkubér dem i et 37 °C varmeskab i 1-2 dage. Hvis der er længere tid til næste forsøgsgang, kan agarpladerne efter inkubation opbevares i et køleskab i 1-2 uger.

## Forsøgsdag 2: celleantalsbestemmelse og databehandling (~ ½ time)

1. Udtag LB-pladerne fra varmeskabet/køleskabet.
2. Optæl antallet af bakteriekolonier på agarpladerne. Optælling sker nemmest på bagsiden af skålene ved at markere hver optalt bakteriekoloni med en tusch. Udlad agarplader, hvor der er for stor celletæthed til at optælle antallet af bakteriekolonier. Notér målingerne i *bilag 2*.

3. Beregn antallet af bakterieceller pr. mL prøve på agarpladerne ved at gange antallet af bakteriekolonier med fortyndingsfaktoren. For det mest præcise resultat vælges normalt kun agarplader med mellem 30 og 300 kolonier. Beregn gennemsnittet. Notér resultaterne i *bilag 2*.

**OBS!** Fordi der blev udpladet 0,1 mL pr. fortyndingsrør, skal antallet af bakteriekolonier ganges med en ekstra faktor 10 for at bestemme antallet af bakterieceller pr. mL prøve – se evt. *figur 1* for beregning!

## Spørgsmål

1. Plot data af forsøget, dvs. cellekoncentration som funktion af tiden. Brug differensen mellem  $OD_{600}$ -målingerne for prøve og kontrol som mål for cellernes koncentration. Husk enheder på akserne i plottet.
2. Beskriv kendetegnene for alle vækstfaser i vækstkurven, fra nølefasen til dødsfasen.
3. Hvilke vækstfaser ses i forsøget? Stemmer den observerede vækst overens med den forventede vækst? Hvorfor/hvorfor ikke?
4. Bestem cellernes vækstrate i den eksponentielle fase ud fra plottet. Husk enhed på vækstraten.
5. Bakterien *E. coli* har normalt en fordoblingstid på 20 minutter. Er dette i overensstemmelse med data af forsøget? Hvorfor/hvorfor ikke?
6. Plot celler pr. mL som funktion af absorbans for de tre tidspunkter, hvor cellekoncentrationen blev målt ved pladespredning samtidig med spektrofotometri. Beregn en omregningsfaktor mellem celler/mL og  $OD_{600}$  – hvad er celler/mL ved  $OD_{600} = 1$ ?
7. Er der proportionalitet mellem celler pr. mL og absorbans i en prøve? Hvorfor/hvorfor ikke?
8. Hvilke fejlkilder og usikkerheder kan der være ved fremgangsmåden for hhv. pladespredning og spektrofotometri? Sammenlign de to metoder, og beskriv deres fordele og ulemper.

**Bilag 1: data for bestemmelse af cellekoncentration ved spektrofotometri**

Prøve nr.	Tid	OD <sub>600</sub> (kontrol)	OD <sub>600</sub> (prøve)	Differens OD <sub>600</sub> (prøve) – OD <sub>600</sub> (kontrol)
1 (t = 0 min.)				
2 (t = 10 min.)				
3 (t = 20 min.)				
4 (t = 30 min.)				
5 (t = 40 min.)				
6 (t = 50 min.)				
7 (t = 1 t.)				
8 (t = 1 t. 10 min.)				
9 (t = 1. t. 20 min.)				
10 (t = 1 t. 30 min.)				
11 (t = 1 t. 40 min.)				
12 (t = 1 t. 50 min.)				
13 (t = 2 t.)				
14 (t = 2 t. 10 min.)				
15 (t = 2 t. 20 min.)				
16 (t = 2 t. 30 min.)				
17 (t = 2 t. 40 min.)				
18 (t = 2 t. 50 min.)				
19 (t = 3 t.)				

**Bilag 2: data for bestemmelse af cellekoncentration ved pladespredning**

Prøve nr.	1 (t = 0 min.)	Antal bakteriekolonier		Antal bakterieceller pr. mL antal bakterier · fortyndingsfaktor	
Fortynding					
	10 (-1)				
	100 (-2)				
	1.000 (-3)				
	10.000 (-4)				
	100.000 (-5)				
	1.000.000 (-6)				
<b>Gennemsnit</b>					

Prøve nr.	10 (t = 1 t. 30 min.)	Antal bakteriekolonier		Antal bakterieceller pr. mL antal bakterier · fortyndingsfaktor	
Fortynding					
	10 (-1)				
	100 (-2)				
	1.000 (-3)				
	10.000 (-4)				
	100.000 (-5)				
	1.000.000 (-6)				
<b>Gennemsnit</b>					

Prøve nr.	19 (t = 3 t.)	Antal bakteriekolonier		Antal bakterieceller pr. mL antal bakterier · fortyndingsfaktor	
Fortynding					
	10 (-1)				
	100 (-2)				
	1.000 (-3)				
	10.000 (-4)				
	100.000 (-5)				
	1.000.000 (-6)				
<b>Gennemsnit</b>					

