nucleus
www.nucleus.dk

4

Bestemmelse af celletal

Mange klassiske mikrobiologiske metoder har til formål at undersøge hvor mange mikroorganismer man har i sin prøve. Det undersøger man gennem forskellige metoder til estimering af antallet af celler. I Bioteknologi 2, side 12-13, er spektrofotometrisk måling forklaret. Her følger vejledninger til:

- Tælling i tællekammer
- Kochs pladespredningsmetode
- Måling vha. af stofskifteprodukter

Laboratoriesikkerhed

Normalt arbejder man kun med apatogene, dvs. ikke-sygdomsfremkaldende mikroorganismer i undervisningen. Der er imidlertid altid en risiko for at opformere patogene, sygdomsfremkaldende, bakterier sammen med de ønskede bakterier. Ud over de sædvanlige regler for færdsel i laboratoriet skal man derfor tage visse ekstra forholdsregler i det mikrobiologiske laboratorium:

- Hold orden på arbejdspladsen
- Hold god hygiejne, vask hænder, hold arbejdspladsen ren, rengør og desinficér bordet efter arbejdet og vask alle instrumenter og glasvarer grundigt op (desinficér evt.)
- Spildes mikroorganismer, skal de kontaminerede steder rengøres og desinficeres
- Ved arbejde med visse mikroorganismer kan der være særlige regler mht. bortskaffelse

Derudover skal følgende generelle regler pointeres:

- Bær kittel
- Indtagelse af mad og drikke samt rygning er strengt forbudt

Direkte tælling med Thoma tællekammer

Baggrund

Et Thoma tællekammer er indrettet så man kender dybden af prøven mellem tællekammerets objektglas og dækglas. På tællekammeret er dybden angivet (Tiefe 0,100 mm), se figur 1a. På objektglasset er der ridset et antal kvadrater som man kender arealet af (0,0025 mm^2, se figur 1). Kvadraterne kan ses som et indridset kors på figur 1b. Herudfra kan man beregne det volumen prøve som man tæller celler i.
Ved at tælle hvor mange celler der befinder sig i et bestemt antal kvadrater, kan man nu beregne hvor mange celler der er i prøven.
Det er arbejdskrævende at bruge tællekammermetoden til at bestemme antal celler gennem en hel fermenteringsproces. Hvis man følger væksten vha. spektrofotometer, kan man imidlertid tage en prøve ud med en kendt absorbans og tælle koncentrationen af celler i denne prøve. Ved at dividere absorbansværdien med antal celler pr. mL får man en omregningsfaktor, som man kan gange med i de øvrige absorbansmålinger. På den måde kan absorbansen omregnes til antal celler pr. mL.
Thoma tællekamre anvendes bl.a. til at tælle blodceller i en blodprøve.

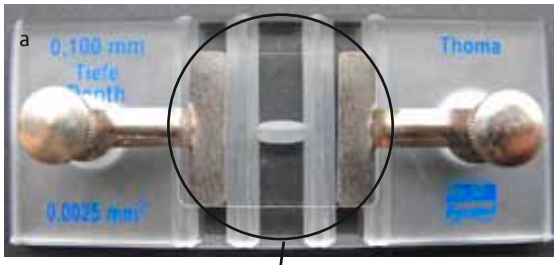
Materialer

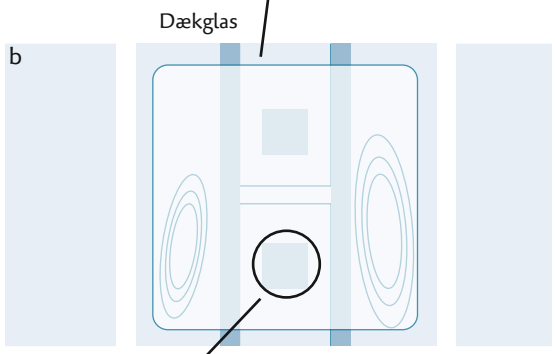
- Cellekultur
- Pipette
- Mikroskop
- Thoma tællekammer

Kresten Cæsar Torp • Bioteknologi 2 © 2010 • by Nucleus Forlag • ISBN 978-87-90363-46-8 • www.nucleus.dk

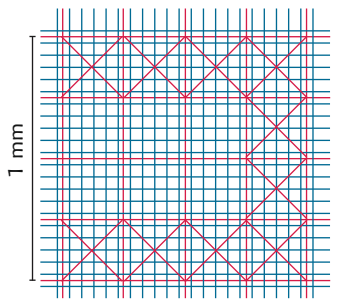
Fremgangsmåde

1. Tællekammeret skal være rent og tørt.
2. Fugt de to kanter til venstre og højre for midterfelterne.
3. Læg et planslebet dækglas på og fastgør det med klemmerne, se figur 1a. Når det ligger rigtigt vil der dannes farvede ringe, Newtonringe, hvor dækglasset har kontakt med objektglasset, se figur 1b.
4. Ryst prøven og læg en dråbe op ad dækglassets kant således at dråben trækkes ind under dækglasset og fylder et af midterfelterne.
5. Søg med 10x objektivet efter streginddelingens øverste venstre kvadrat.
6. Skift til 40x objektivet. Hvis cellerne ligger så tæt at de ikke kan tælles, laves en fortynding af prøven.
7. Cellekammeret er opdelt i 16 felter, som igen er inddelt i små kvadrater. De 16 felter er markeret med røde grænselinier på figur 2. Tæl cellerne i 10 af de 16 felter. De 10 felter er markeret med kryds på figur 2.
8. Hvis en celle rører ved den nederste eller den højre grænselinie, skal den tælles med, men ikke hvis den ligger på den øverste eller venstre. Det er altså kun de blå celler på figur 3, som tælles med.
9. Skyl tællekammeret forsigtigt under rindende vand indtil dækglasset løsner sig. Både tællekammer og dækglas er dyre og går let i stykker.

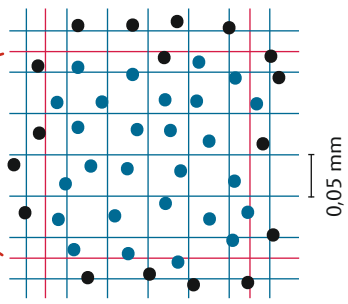




Figur 1. a. Thoma tællekammer med fastsuget dækglas. b. Newton-ringe.



Figur 2. De afkrydsede felter tælles.



Figur 3. De sorte celler tælles ikke med.

Resultater

Felt	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Gennem-snit
Antal celler											

Figur 4. Resultatskema.

Resultatbearbejdning
Tællekammerets dybde er 0,1 mm. Et af de mellemstore felter har altså et volumen på
0,1 mm · 0,25 mm · 0,25 mm = 0,00625 mm^3 = 6,25 · 10^{-6} mL
Hvor mange celler var der i gennemsnit pr. mL?
Husk at gange resultatet med en eventuel fortyndingsfaktor.

Kochs pladespredningsmetode

Formål
At estimere koncentrationen af celler i en flydende bakteriekultur.

Baggrund
Kochs pladespredningsmetode er opfundet af den tyske mikrobiologi Robert Koch. Robert Koch udviklede den teknik at dyrke bakterier på faste substrater, bl.a. agar. Han rendyrkede og identificerede desuden miltbrandbakterien (*Bacillus anthracis*), tuberkulosebakterien (*Mycobacterium tuberculosis*) og kolerabakterien (*Vibrio cholerae*). Læs mere om Robert Koch og hans arbejde på: http://www.denstoredanske.dk/Natur_og_milj%C3%B8/Mikrobiologi/Mikrobiologer/Robert_Koch.
Metodens princip er at man poder 1 mL cellekultur ud i petriskåle og indstøber dem i agar. Pladerne inkuberes ved en passende temperatur, og her vokser hver bakteriecelle op til en koloni som kan ses med det blotte øje. Bakteriekolonierne tælles.
Man vil desværre ofte have så mange bakterier i prøven at de enkelte kolonier ikke kan tælles. Derfor må man først fortynde prøven. For at finde en passende fortynding laver man en fortyndingsrække. Når man finder den fortynding som har et passende kolonital, tæller man antallet af kolonier og ganger det med fortyndingsgraden, så man får antallet af bakterier i den oprindelige prøve. Man laver altid dobbeltbestemmelse, dvs. at man poder ud på to petriskåle ved hver fortynding.
Fortyndingsrækken laves ved at overføre 1 mL kultur til 9 mL steril NaCl-opløsning. Herved fortyndes bakterierne 10 gange (10^{-1}). Ved at føre 1 mL videre til næste reagensglas med 9 mL NaCl-opløsning fortyndes prøven 100 gange (10^{-2}) osv.
Hvis man ønsker at bestemme antal celler i en bakteriekultur anvender man Plate Count Agar (PCA) som substrat. Undersøger man en gærkultur anvendes maltagar (ølurt-agar).
Inkubationstemperaturen er afhængig af hvilke mikroorganismer man leder efter. Leder man efter tarmbakterier som fx *E. coli*, inkuberes ved 37 °C. leder man efter bakterier fra jord- og overfladevand inkuberes ved 22 °C. Gærceller inkuberes typisk ved 25 °C.

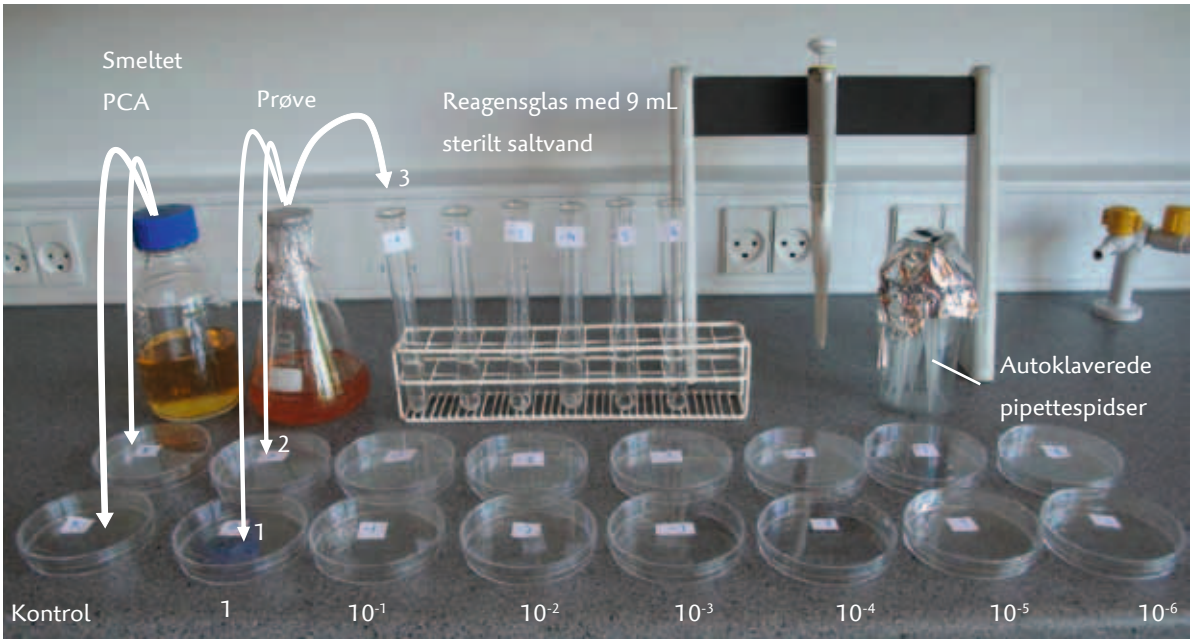
Materialer

- Bakteriekultur, gærkultur eller vandprøve
- 5 autoklaverede reagensglas med Cap-O-Tests forsynet med etiketter (0, -1, -2, -3, -4, -5)
- 14 sterile petriskåle, mærket to og to (0, -1, -2, -3, -4, -5 og kontrol). Skriv på bunden, lågene kan blive forbyttet.
- 6 sterile 1 mL pipetter
- 10 mL pipetter med sterile spidser
- Steril 0,9 % NaCl-opløsning
- PCA (Plate Count Agar), smeltes før forsøget i vandbad eller mikroovn
- Bunsenbrænder
- Varmeskab

Fremgangsmåde i oversigt

Læs om laboratoriesikkerhed inden du begynder!

1. Placér de mærkede sterile reagensglas i rækkefølge i stativet og de mærkede petriskåle i to rækker langs bordkanten, se figur 5.
2. Overfør 9 mL steril NaCl-opløsning til hvert reagensglas.
3. 0,1 mL prøve overføres med en steril pipette til rør -1. Omrør bakterierne i væsken ved at suge op og ned et par gange. Pipetten kasseres.
4. Med en ny pipette overføres 0,1 mL fra rør -1 til hver af de to petriskåle mærket -1, og der overføres 1 mL til rør -2. Omrør bakterierne som før og kassér pipetten.
5. Med en ny pipette overføres 0,1 mL fra rør -2 til hver af de to petriskåle mærket -2, og der overføres 1 mL til rør -3. Omrør bakterierne som før og kassér pipetten.
6. Gentag proceduren til alle fortyndingerne er lavet.
7. Kontrolpladerne tilsættes ikke bakterier. De skal kunne identificere eventuelle forureninger.
8. Smelt agaren i flasken og lad den køle af til håndvarm temperatur.
9. Hæld ca. 25 mL substrat i hver petriskål (ca. 2 mm agar):
   a. Løft låget på skrå over petriskålen med venstre hånd.
   b. Hæld agar i med højre hånd og drej skålen let rundt, så bakterierne fordeles i agaren.
   c. Læg låget på skrå på skålen indtil agaren er størknet.
   d. Læg lågene på pladerne, stabl dem med bunden opad i passende bundter (så evt. dug samles i låget).
10. Inkubér pladerne i varmeskab i 48 timer.
11. Bundt pladerne med bunden opad, sæt tape om, og opbevar dem i en plasticpose i køleskab indtil næste forsøgsgang.
12. Identificér de petriskåle som har mellem 25 og 250 kolonier. De øvrige kasseres. Tæl antallet af kolonier på skålene og indfør det i resultatskemaet, figur 6. Er der mange, kan man markere halvdelen eller en fjerdedel af skålen, optælle bakterierne og gange med henholdsvis 2 eller 4. Det kræver dog at kolonierne er spredt ligeligt over pladen.
13. Beregn hvor mange bakterier der var i den oprindelige prøve ud fra hver af de optalte plader ved at gange antal kolonier med fortyndingsgraden. Find gennemsnittet af pladerne. Det er det endelige resultat.



Figur 5. Oversigt over fremgangsmåden ved Kochs pladespredningsmetode.

Fortynding	Antal optalte kolonier		Antal celler pr. mL i den oprindelige prøve (kolonital · fortyndingsgrad)	
Kontrol				
0				
10 (-1)				
100 (-2)				
1.000 (-3)				
10.000 (-4)				
100.000 (-5)				
Gennemsnit				

Figur 6. Resultatskema.

Måling af vækst ved metabolitter

Formål
At følge væksten i en kultur af mikroorganismer ved at følge ændringen i substratkoncentration eller mængden af affaldsstoffer.

Baggrund
Man kan følge væksten i en kultur af mikroorganismer ved at følge hvor meget substrat der forbruges, eller ved at følge hvor mange metabolitter der dannes.

- Sukkerkoncentrationer kan måles med et håndholdt refraktometer som måler substratets lysbrydning eller en oechslevægt som måler dets densitet. Målingerne påvirkes også af andre molekyler som alkohol, hvilket man må tage højde for.
- Glucosekoncentrationen i substratet kan følges med en blodglucosemåler. Målerens virkemåde er nærmere beskrevet i Bioteknologi 2, side 51.
- Syrer kan måles ved titrering eller ved at følge pH. En metode er beskrevet under Tema 3, Link 1d, Forsøg med syrning af mælk.

Ved alkoholgæring kan man måle den CO_2-mængde som bobler af bryggen. Det kan måles enten

- som et vægttab
- ved at tælle bobler
- ved at opsamle gassens volumen i måleglas
- som en trykændring med dataopsamlingsudstyr

Man kan omregne ændringer i tryk eller volumen til hvor mange mol CO_2 der er dannet. Det gøres vha. idealgasligningen: PV = nRT, hvor

P = Trykændringen i systemet (atm)

V = Volumenændring i systemet (L)

n = Antal mol gas dannet (mol)

R = Gaskonstanten = 0,082 $L \cdot atm \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$

T = den absolutte temperatur i systemet (K)

Metoderne er nærmere omtalt i Link 1b, 1c og 1e.