

Bestimmung der Zelldichte von Bakterienkulturen mit Hilfe der Hellma[®] Faseroptischen Sonde in Kombination mit dem Eppendorf BioSpectrometer[®]

Sarah Kühnapfel¹, Jochen Hallmann³, Ines Hartmann¹, Tanja Musiol¹, Wolf Wente², Martin Armbricht¹

¹ Eppendorf AG, Hamburg, Germany

² Eppendorf Instrumente GmbH, Hamburg Germany

³ Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, Germany

Zusammenfassung

Die photometrische Trübungsmessung zur Bestimmung der Zelldichte einer Bakteriensuspension ist eine grundlegende Methode in jedem molekularbiologischen Labor. Neben dem Verbrauch von Einmalküvetten und Pipettenspitzen erfolgt dabei auch eine Abnahme des Kulturvolumens durch die regelmäßige Entnahme und das anschließende Verwerfen der Probe für die Messung. Hier wird

gezeigt, dass der alternative Einsatz einer faseroptischen Sonde, die ohne die Verwendung von Einwegartikeln und ohne Reduzierung der Bakteriensuspension auskommt, in Kombination mit dem Eppendorf BioSpectrometer mit vergleichbar guten Ergebnissen durchgeführt werden kann und somit eine gute Alternative zur herkömmlichen Messmethode darstellt.

Einleitung

Die Anzucht von Bakterien in Flüssigkultur wird als Ausgangsmethode für viele Experimente genutzt, da durch diese Art der Kultivierung eine hohe Zelldichte erzielt werden kann. Die Expression von rekombinanten Proteinen oder die Vervielfältigung von Plasmid-DNA in Bakterien sind hierfür nur zwei Beispiele. In einer Flüssigkultur wird das Nährmedium entweder direkt von einer Agarplatte mit einer Einzelkolonie oder mit einer entsprechenden Flüssigkeitsmenge aus einer Vorkultur beimpft und anschließend – meist bei 37 °C - im Inkubationsschüttler über einen bestimmten Zeitraum inkubiert. Bei der Anzucht von Bakterien ist es in Abhängigkeit vom Experiment häufig erforderlich, das Wachstum in regelmäßigen Abständen zu überprüfen. Dadurch kann der optimale Zeitpunkt der Zellernte erfasst werden.

Die optische Dichtemessung einer Bakteriensuspension beruht auf der Lichtstreuung, die mit Hilfe eines Photometers oder Spektrometers erfasst werden kann. Ein solcher "Lichtverlust" wird als optische Dichte oder Extinktion im Spektralphotometer bei 600 nm gemessen. Hierfür werden in der Regel Proben mit einem Volumen von 1-2 mL zu verschiedenen Zeitpunkten für die Messung in Kunststoffküvetten entnommen. Der Verbrauch an Materialien wie Einmalküvetten und Pipettenspitzen ist hierbei sehr hoch und die Entnahme der Proben nimmt relativ viel Zeit in

Anspruch. Um beides zu reduzieren, wurde die Eignung von Faseroptischen Sonden für die Bestimmung der optischen Dichte als Alternative zu herkömmlichen Küvettenmessungen getestet.

Die Anwendungsfelder von faseroptischen Sonden erstrecken sich über die Prozesskontrolle von Chemieanlagen, das Monitoring von Bioreaktoren oder die einfache Kontrolle von Synthesen im Labormaßstab. Faseroptische Sonden (s. Abbildung 1) ermöglichen die Messung direkt in der zu messenden Lösung, somit kann auch die spektroskopische Analytik von Proben einfach gestaltet werden. Zeitersparnis und eine erhöhte Ausbeute sind weitere Vorteile dieser Messmethode. Der Anschluss der Lichtleiter einer Sonde kann entweder direkt über sogenannte SMA-Stecker am Photometer erfolgen oder durch einen Adapter im Küvetten-schacht. Für das Eppendorf BioSpectrometer ist die letztere Variante die einfachste Lösung. Über den Adapter wird das Messlicht ausgekoppelt und durch die Lichtleiter zur Sonde geführt. An der Spitze durchstrahlt das Licht einen Messspalt mit definierter Schichtdicke, wird an einem Spiegel reflektiert, wieder in einen zweiten Lichtleiter eingekoppelt und zurück zum Photometer geführt (siehe Abbildung 2). Durch austauschbare Schichtdicken können 1, 2, 5, 10 und 20 mm schnell und flexibel eingestellt werden.



Abbildung 1: Faseroptische Sonde von Hellma

Für optimales Wachstum und Belüftung erfolgt die Anzucht im Kolben meist in Orbital-Inkubationsschüttlern. Der Einsatz eines programmierbaren Inkubationsschüttlers mit Kühlung, wie z.B. der Eppendorf New Brunswick™ Innova® 42R, gewährleistet neben einer exakten Temperaturregulierung für optimale Wachstumsbedingungen auch die zeitliche Programmierung von Temperaturen und Drehzahlen. So können Bakterienkulturen bei bekannter Wachstumskinetik - beispielsweise über einen definierten Zeitraum bei 37°C schüttelnd inkubiert und anschließend ab einem vorprogrammierten Zeitpunkt zum Abstoppen des Wachstums bis zu 4 °C stationär gekühlt werden.* Ein „Überwachsen“ der Kultur über die exponentielle Phase hinaus, kann somit verhindert werden. In der Flüssigkultur überleben Bakterien bei guter Kühlung ungefähr eine Woche. Somit kann die Kultur über Nacht oder sogar über das Wochenende ohne Probleme aufbewahrt werden.

Material und Methoden

Material

- > Eppendorf BioSpectrometer® kinetic
- > Inkubationsschüttler Eppendorf New Brunswick™ Innova® 42R
- > Hellma® Analytics 66.1668-U.V, Mini-Probe Faseroptische Sonde, Schichtdicke: 10 mm
- > PMMA Makroküvette, Schichtdicke: 10 mm
- > Bakterienkultur: *Escherichia coli* DH5α
- > C.ROTH® LB-Medium (Luria/Miller) f. d. Molekularbiologie

Methoden

Zur Herstellung einer für die Messreihe verwendbaren Bakterienkultur wurde zunächst eine Vorkultur von *Escherichia coli* DH5α hergestellt. Diese wurde über Nacht für ca. 18 Stunden im Inkubationsschüttler Eppendorf New Brunswick Innova 42R bei 37 °C und 180 rpm schüttelnd inkubiert. Am folgenden Tag wurden daraus zwei Mal 2 mL Vorkultur

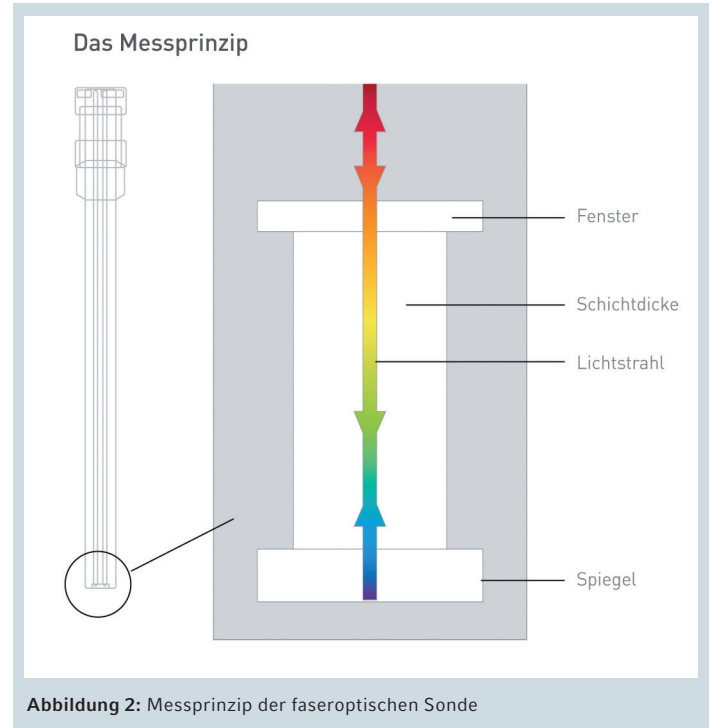
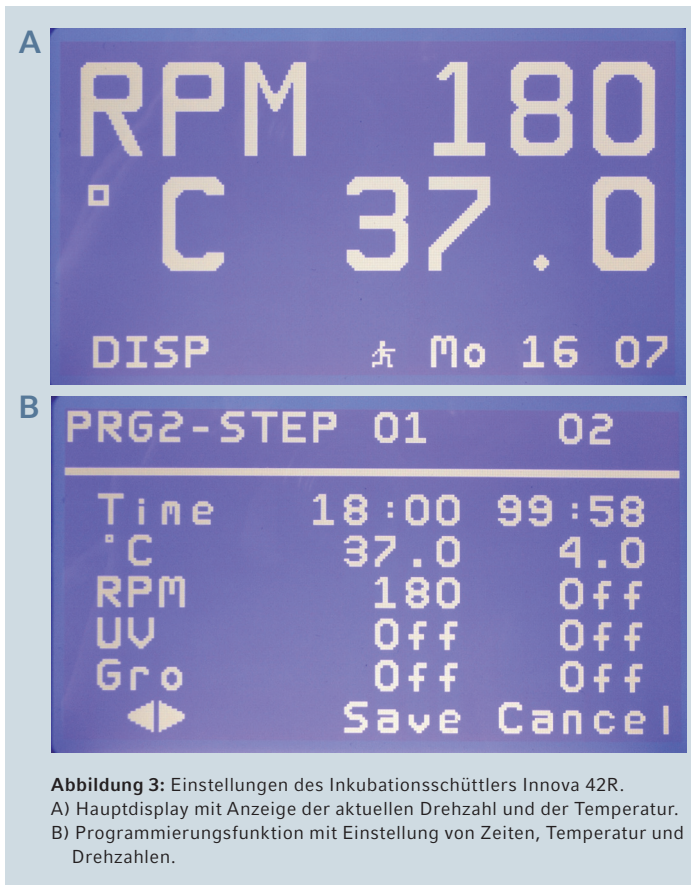


Abbildung 2: Messprinzip der faseroptischen Sonde

entnommen und jeweils in zwei 1-Liter Kolben mit 200 mL LB-Medium überführt. Mit diesen zwei Kulturen wurde die Messreihe anschließend erstellt. Ein dritter Kolben wurde als Leerwert mit ausschließlich 200 mL LB-Medium mitgeführt. Die Inkubation der Kulturen während der Messreihe erfolgte im Inkubationsschüttler bei 37 °C und 180 rpm. Die entsprechenden Displayeinstellungen sind in Abbildung 3 gezeigt.

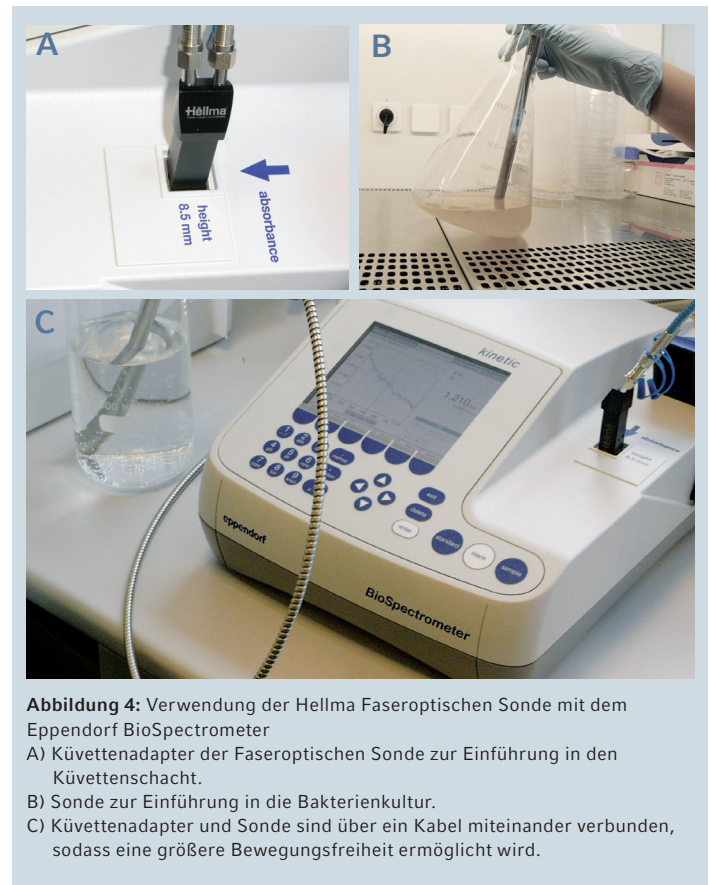
Die ersten drei Stunden wurde je ein Mal pro Stunde eine Messung durchgeführt. Danach wurde mit zunehmender Trübung der Kulturen halbstündlich gemessen, bis nach insgesamt 4,5 Stunden der Inkubationsschüttler auf 4 °C eingestellt wurde. Unter diesen Bedingungen wurden die Kulturen schließlich über Nacht ohne Schütteln weiter inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine weitere Überprüfung der optischen Dichte.

* Der Innova 42R ermöglicht eine Temperaturkontrolle von 20°C unter Raumtemperatur (Minimum 4 °C) bis 80°C. Der erreichbare Temperaturbereich ist abhängig von der Umgebungstemperatur, der relativen Luftfeuchte und den installierten Ausstattungsoptionen.



Die Messungen wurden mit einem Eppendorf BioSpectrometer kinetic durchgeführt. Dabei wurde die vorprogrammierte Methode OD600 verwendet. Aus der gemessenen optischen Dichte konnte das Bakterienwachstum der Kulturen ermittelt werden. In Abbildung 5 sind der Weg zur Einstellung der genannten Methode und die dazugehörigen Messparameter abgebildet.

Die Messungen wurden dabei folgendermaßen durchgeführt: Für den Nullwertabgleich (Blank) wurde mit der faseroptischen Sonde zunächst das LB-Medium gemessen. Anschließend erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte in den Bakterienkulturen. Dabei wurde die Sonde möglichst schräg in das Gefäß



gehalten, damit sie mit ausreichend Flüssigkeit bedeckt war (Abbildung 4B). Um störende Luftblasen zu vermeiden, sollte während des Messzeitpunktes möglichst wenig Bewegung in der Kultur sein.

Für die Vergleichsmessungen wurden jeweils 1 mL der Bakterienkultur entnommen und in PMMA Makroküvetten gemessen. Es erfolgte jeweils eine Fünffachbestimmung. Um ein steriles Arbeiten zu gewährleisten, wurde die Sonde vor jeder neuen Messreihe mit 70 %igem Ethanol gereinigt. Zwischen den Messzeitpunkten wurde sie in VE-Wasser (Abbildung 4C) aufbewahrt, damit sich keine Verunreinigungen festsetzen konnten.

A Method Selection

Main Groups	Sub Groups	Methods
<ul style="list-style-type: none"> Folder Favorites Folder Absorbance Folder Routine Folder Basic Folder Advanced 	<ul style="list-style-type: none"> Folder Nucleic acids Folder Proteins direct UV Folder Proteins (reagent) Folder Dye labels Folder Bacterial density 	<ul style="list-style-type: none"> Icon OD 600 <New Method>

Cut Copy Rename Delete Paste **Function**

B OD600: check parameters measure samples process results print & export ...

Cuvette	10 mm
Wavelength	600 nm
Unit	Abs
Factor	1
Decimal places	3
Show scan	off
Autoprint	off

Info
Edit parameters:
"Edit" softkey.

Edit Page up Page dn Abort < Back Next >

C OD600_2mm: check parameters measure samples print & export new series

OD600_2mm 2012-09-18 16:19:37

B 01 Blank
ID:

0.000_{A₆₀₀}

Info
Measure sample:
"sample" key.
Enter a dilution:
"Dilution" softkey.

Dilution Edit ID Data Abort < Back Next >

D OD600: check parameters measure samples print & export new series

OD600 2012-09-18 16:24:43

01
ID:

0.944_{Abs}
0.944_{A₆₀₀}

Info
Measure blank or sample:
"blank", "sample" keys.
Scroll results:
▲ and ▼ keys.

Dilution Edit ID Data Finish < Back Next >

Abbildung 5: Einstellung der Parameter am BioSpectrometer für die Anwendung des 10 mm Lichtweges in der Methode der OD 600.

A) Auswahl der Methode OD600.

B) Überprüfung der Parameter wie Schichtdicke und Wellenlänge.

C) Anzeige zur Blankmessung.

D) OD600 Beispielmessung einer Bakterienkultur mit der Hellma Faseroptischen Sonde am BioSpectrometer

Ergebnisse und Diskussion

Der Vergleich der optischen Dichten bei Verwendung der Kunststoffküvette und der Faseroptischen Sonde zeigt, dass es nur geringe Unterschiede in den Messergebnissen gibt. Leichte Abweichungen bei Mehrfachbestimmungen sind zu erwarten, da es sich bei OD-Messungen um reine Trübungsbestimmungen handelt und immer eine Bewegung in der Messkultur berücksichtigt werden muss. In Tabelle 1 ist bei-

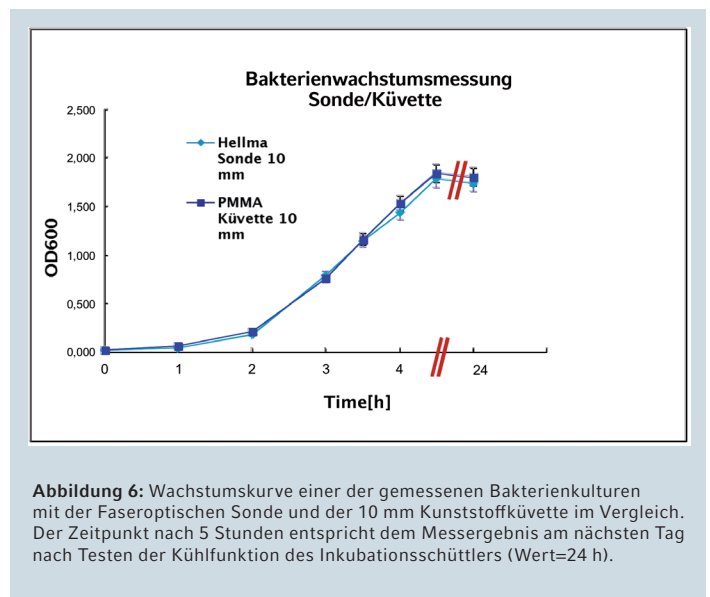
Tabelle 1: Messergebnisse (OD600) der Fünffachbestimmung mit der Hellma Faseroptischen Sonde und PMMA Makroküvetten.

Zeit 3,5 h		
Messung	PMMA Makro Küvette 10 mm	Hellma Sonde 10 mm
1	1,186	1,119
2	1,173	1,159
3	1,144	1,150
4	1,149	1,109
5	1,142	1,185
Mittelwert	1,159	1,144
Standardabweichung	0,020	0,031
VK [%]	1,693	2,690
Abweichung zur 10 mm PMMA Küvette	-	0,014
Abweichung zur 10 mm PMMA Küvette [%]	-	1,243

In Abbildung 6 ist die Wachstumskurve einer der gemessenen Kulturen dargestellt. Die beiden Kurven der optischen Dichten mit Verwendung der Faseroptischen Sonde im Vergleich zur 10 mm Kunststoffküvette sind bis zu einer OD von ca. 1,2 nahezu identisch. Erst ab einer OD von ca. 1,4 gibt es leichte Abweichungen, die allerdings nur sehr gering und daher zu vernachlässigen sind. Aufgrund der Ähnlichkeit der beiden Wachstumskurven lässt sich darauf schließen, dass Sonde und Küvette in gleichem Maße für eine derartige Bakterienwachstumsmessung geeignet sind.

Nach Abbruch des Bakterienwachstums nach einer Zeit von 4,5 Stunden, indem die Kulturen über Nacht im Inkubationsschüttler bei 4°C aufbewahrt wurden, war die optische Dichte geringfügig niedriger als zur letzten Messung am Vortrag. Es erfolgte daher kein weiteres Bakterienwachstum. Damit konnte gezeigt werden, dass die Kühl- und die generelle Programmierfunktion des Inkubationsschüttlers verwendet werden kann, um das weitere Wachstum von Kulturen nach der Inkubationsphase abzustoppen. Dies ist auch über Zeiten hinweg möglich, zu denen es nicht möglich ist, die Gefäße aus dem Inkubator in den Kühlschrank zu stellen.

spielhaft der Messzeitpunkt nach 3,5 Stunden dargestellt. Die Standardabweichung ist bei beiden Messsystemen sehr gering. Außerdem ist zu sehen, dass die Abweichung des Mittelwertes der Messergebnisse der Sonde zu der Kunststoffküvette gering ist. So beträgt die Abweichung beim Messzeitpunkt von 3,5 h nur 1,2 %.



Sind Bakterienkulturen sehr stark bewachsen, kann eventuell keine optische Dichtemessung erfolgen. Da OD-Messungen bei sehr hohen Bakterienkonzentrationen nicht mehr linear verlaufen, ist es nicht empfehlenswert, die Kultur einfach nur zu verdünnen. Über Messung der verdünnten Lösung kommt man in dem Fall nicht auf die OD der unverdünnten Kultur. Genauer wäre es, wenn für die Messung eine faseroptische Sonde mit geringerer Schichtdicke (z.B. 2 mm) verwendet wird. In dem Fall würde man darüber hinaus auch einen möglichen Verdünnungsfehler umgehen. Falls eine Sonde mit geringer Schichtdicke verwendet werden soll, kann für die Berechnung der OD der entsprechende Wert in den Methodenparametern geändert werden (Abbildung 7). Der erhaltene Messwert wird in der Ergebnisdarstellung automatisch auf die entsprechende 10 mm Schichtdicke hochgerechnet. Die Originalmessdaten werden ebenfalls angezeigt.



Abbildung 7: Einstellende Parameter und angezeigtes Messergebnis bei Verwendung einer Küvette mit 2 mm Schichtdicke.

A) Einstellbare Parameter: Bei Verwendung der 2 mm Schichtdicke muss diese im entsprechenden Feld verändert werden.

B) Angezeigtes Messergebnis: Der Wert mit der kleineren Schrift entspricht dem Originalmesswert gemessenen bei einer Schichtdicke von 2 mm, der mit der größeren Schrift ist der auf 10 mm Schichtdicke hochgerechnete Wert.

Fazit

Mit der durchgeführten Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass der alternative Einsatz einer faseroptischen Sonde vergleichbar gute Ergebnisse zur herkömmlichen Messmethode in einer Küvette liefert. Da es hierbei nicht notwendig ist, Proben aus den Kulturgefäßen zu entnehmen, sondern die Messung direkt innerhalb des Gefäßes erfolgt, kann sowohl Zeit als auch Verbrauchsmaterialien in Form von Pipettenspitzen und Einmalküvetten eingespart werden. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit des Messens von höheren Zelldichten aufgrund der mitgelieferten austauschbaren Schichtdicken.

Zusätzlich konnte der Vorteil der Programmierbarkeit des Inkubationsschüttlers Eppendorf New Brunswick Innova 42R gezeigt werden. Da über Nacht im gekühlten Inkubationsschüttler kein weiteres Bakterienwachstum erfolgte, kann dieser optimal für Wachstum und Kühlung von Bakterienkulturen verwendet werden. Bei bekannter Wachstumszeit einer Bakterienkultur kann dieser Inkubationsschüttler folglich problemlos auch über Nacht oder übers Wochenende mit den gewünschten programmierten Zeiten, Temperaturen und Drehzahlen eingesetzt werden.

Bestellinformationen

Bezeichnung	Bestell-Nr.
Eppendorf BioSpectrometer[®] kinetic 230 V/50-60 Hz, Netzstecker Europa, weitere Netzanschlussvarianten erhältlich	6136 000.002
Eppendorf BioSpectrometer[®] basic 230 V/50-60 Hz, Netzstecker Europa, weitere Netzanschlussvarianten erhältlich	6135 000.009
Eppendorf New Brunswick[™] Innova[®] 42R Inkubation/ mit Kühlung, 1.9 cm Orbit, 230V, 50 Hz	M1335-0006
Eppendorf New Brunswick[™] Innova[®] 42R Inkubation/ mit Kühlung, 2.5 cm Orbit, 230V, 50 Hz	M1335-0016
Hellma[®] Faseroptische Sonde	661.668-UV

Your local distributor: www.eppendorf.com/contact

Eppendorf AG · 22331 Hamburg · Germany

eppendorf@eppendorf.com · www.eppendorf.com

www.eppendorf.com

C. Roth[®] ist eine eingetragene Marke der Carl Roth GmbH & Co., Deutschland. Hellma[®] ist eine eingetragene Marke der Hellma GmbH & Co.KG.

Innova[®] ist eine eingetragene Marke der New Brunswick[™], Scientific Co., Inc., USA. New Brunswick[™] ist eine Marke der New Brunswick, Scientific Co., Inc., USA. Eppendorf[®], das Eppendorf Logo und Eppendorf BioSpectrometer[®] sind eingetragene Marken der Eppendorf AG, Deutschland. Alle Rechte vorbehalten, einschließlich der Graphiken und Abbildungen. Copyright © 2013 by Eppendorf AG.