

Spiring og vækst af mikroorganismer

Her beskrives en nyudviklet metode til at forudsige spiring og vækst af mikroorganismer under naturlige forhold. Metoden er afprøvet inden for jordbundsmikrobiologi, og den kan uden større modifikationer bruges inden for andre faglige discipliner såsom levnedsmiddel-mikrobiologi

Af Charlotte Thrane, cth@kvl.dk og Jens Wolstrup, KVL

Det er almindelig udbredt at undersøge effekten af simple eller komplekse miljøbetingelser på mikroorganismers vækst ved dyrkning på petriskåle i laboratoriet. Men resultaterne vil ofte være mangelfulde eller misvisende i forhold til, hvordan mikroorganismene reagerer i naturlige miljøer som eksempelvis jord. Her beskrives en metode, hvor man direkte undersøger effekten af det naturlige miljø på mikroorganismernes vækst. Kun i det naturlige miljø findes der konkurrence fra andre mikroorganismer, endvidere kan substratet som oftest ikke reproduceres i almindelige laboratorieforsøg. I nogle sammenhænge er det væsentligt at kende effekten af miljøet på et tidligt tidspunkt i mikroorganismernes vækstfase – dvs. før der er dannet makroskopiske kolonier. Højberg *et al.* (1997) har udviklet en metode til anaerob dyrkning af bakterier, som vi siden har modificeret til at kunne belyse forskellige problemstillinger inden for jordbundsmikrobiologi. Med denne metode er det muligt at:

1. undersøge spiring og vækst af mikroorganismer i det naturlige miljø, som organismene findes i eller introduceres til
2. undersøge meget tidlig spiring og vækst af mikroorganismer (f.eks. sporespiring).

Metoden

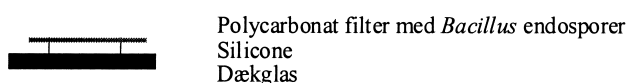
Princippet i metoden er udviklet af Højberg *et al.* (1997). I vores forsøg er metoden modificeret til de valgte problemstillinger (figur 1). For at kunne studere sporespiring og mikrokolonidannelse på enkeltcelleniveau immobiliseres sporerne i et siliconelag. De immobiliserede bakterier kan let håndteres, da de monteres på et dækglas. Denne »sandwich« kan derpå placeres i det miljø, hvor man ønsker at se effekten af bakteriernes spiring og vækst. Opstillingen til forsøget er beskrevet i »Eksempel 1« og vist i figur 1. For at muliggøre mikroskopi af cellerne indfarves bakterierne slutteligt med et fluorescensfarvestof.

Eksempel 1: Direkte mikroskopi af *Bacillus* sporespiring i jord

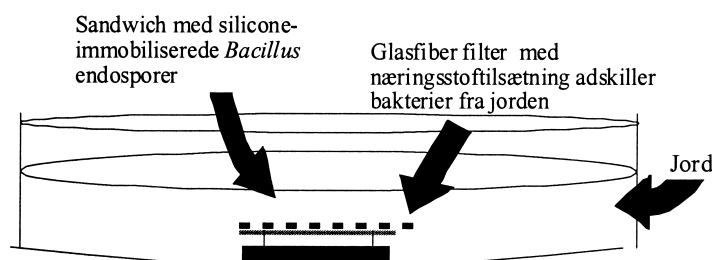
Det er almindeligt udbredt at bejdse frø med fungicider. Formålet er at forhindre patogene svampe fra jorden i at angribe spirende frø og unge kimplanter. For at nedsætte brugen af kemikalier i jordbruget har man gennem lang tid søgt efter alternative metoder til at beskytte planter med – herunder brug af biologiske bekæmpelsesmidler.

I et forskningsprojekt på Institut for Økologi, KVL søges

Sandwich:



Jord mikrokosmos:



Figur 1. Forsøgsopstilling til undersøgelse af sporespiring i jord. Bakterier filtreres ned på en polycarbonatmembran, som placeres ovenpå et dækglas med et tyndt lag silicone. Når bakterierne placeres i siliconen forbliver de immobile, og spiring af enkelte sporer eller mikrokolonidannelse fra enkelte sporer kan derfor ses ved mikroskopi (figur 2, side 26). I det viste eksempel er »sandwichen« med de immobiliserede sporer placeret i et jordmikrokosmos. I dette forsøg var det hensigten at simulere et frø bejdet med antagonistiske baciller sammen med et spiringsstimulerende næringsstof. Således er der mellem jorden og de immobiliserede baciller placeret et glasfiberfilter med skummet-mælk. Når forsøget gøres op, farves bakterierne med acridinorange og mikroskoperes.

Alle Delfi
produkter
leveres gennem et
landsdækkende net af
kvalificerede forhandlere

DATAMAX®

Labelprintere fra Delfi Technologies

Se priserne på
www.delfi.dk



DMX-E-4203

DMX-E-4203 Standard labelprinter

Datamax' kompakte bud på en fleksibel labelprinter. Med en kompakt størrelse og bredt print-hoved, opfylder DMX-E-4203 stort set alle printbehov med enkle midler. DMX-E-4203 er forsynet med Windows driver. Dette gør det nemt for alle, at installere samt tilslutte printeren på en pc. Med en meget høj Dpi opløsning, sikrer DMX-E-4203 en flot samt let-læselig labeludskrift. DMX-E-4203 findes selvfølgelig både i ren thermo og thermo transfer, med en nem håndtering af labels samt farvebånd.

- Kompakt thermoprinter • 4" brede labels • 203 x 203 dpi • Seriel og parallel interface standard • 3" skrivehastighed • thermo og termotransfer version • 2 mb ram og 1 mb flash ram
- Kan tilsluttes eksternt keyboard og DMX print-boks for netværk-udprintning



DMX-E-3202

DMX-E-3202 Personlig labelprinter

Datamax' DMX-E-3202 er det bedste bud på en prisvenlig thermo labelprinter. Printeren er utrolig kompakt og printer på op til 80mm brede thermo etiketter eller bonruller. Datamax leverer også DMX-E-3202 med et højopløsnings printerhoved. Printeren kan emulere flere standarder, her kan nævnes EPSON ESCPOS command sprog for POS applikationer, EPSON 24 pin matrix emulering, samt tilslutning til standard RS232. Disse egenskaber gør DMX-E-3202 til en fleksibel lille thermoprinter til de mindre backoffice-løsninger eller POS løsninger.

- Yderst kompakt thermoprinter • Prisaggressiv • 203 x 203 dpi • Seriel interface • 2" printhastighed • EPSON 24 pin matrix/ EPSON ESCPOS command printer sprog. • 512 kb flash memory
- Blackmark sensor eller hulsensor

DMX-W-6208 WIDE labelprinter

Mærkningskonceptet i logistikkæden fore-skriver pallemærkning med minimum A5 labels. Dette gør Datamax WIDE-serien ideel til denne type opgaver. WIDE-serien udskriver Labels med min. 6" bredde i 200 x 200 dpi. Alle strekkodertyper er implementeret i printeren, også 2 dimensionelle strekkoder. Printeren leveres med 2Mb flash ram & 16 MB DRAM, hvor der bla. er support for direkte download af grafikfiler såsom PCX, BMP og IMG filer. DMX-W-6208 er et naturligt valg i fødevarer-industrien, i produktionen, logistikkæder til detailhandlen, i forsendelsen o.s.v.

- Industrielt hårdført metaldesign • Thermo og Thermotransfer • 8" lynhurtig labelprint • 6,7" brede Labels • 200 x 200 dpi • Seriel og parallel interface, kan tilsluttes Ethernet • 32 bit multiprocessor og 2 mb flash ram for en lynhurtig labelproces • Let medie- og folieudskiftning • Eksternt keyboard, Cutter og rewinder er options • Kan tilsluttes trådløst, eller Twinax/Coax interface for IBM mainframe computere

DMX-ST-3210 Special labelprinter

DMX thermo billetprinteren er en decideret high performance robust labelprinter med billet-print som speciale. Den er særligt designet for applikationer ved f.eks. airport-gates, billetluger og backoffice billetudskrifter. DMX-ST-3210 printer i standard-bredderne 1.9" til 3.25" både rullede og fan-foldede billetter. Den er som de øvrige Datamax printere nem at vedligeholde og nem at anvende.

- Direct thermo • Standard billetmål fra 1.9" til 3.25" bredde. • 1mb flash ram og 4 mb ram • Parallel, seriel og RS 422 tilslutning • Lynhurtig - printer op til 10" billetter i sekundet • Standard billet industri programmeringssprog • Ekstra ram moduler til forskellige billetformater • Tid og dato i printeren tilgængelig via software kommandoer



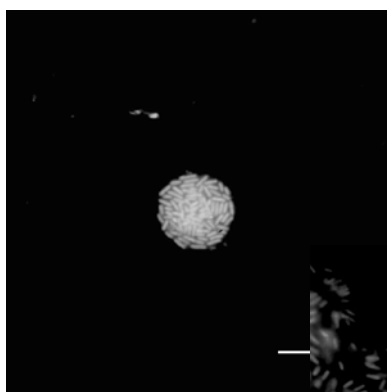
DMX-W-6208



DMX-ST-3210

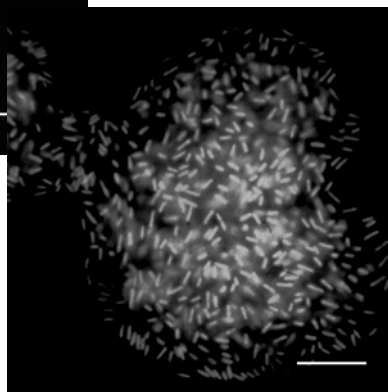
Delfi Technologies A/S

Et lille udpluk af vores sortiment, evt. spørgsmål, så ring! Tlf. 70 222 555
Mød os også på Internettet: www.delfi.dk



Figur 2. Direkte mikroskopi af sporespiring og mikrokolonidannelse af den svampehæmmende *Paenibacillus polymyxa* CM5-5. (A, til venstre) Spiring af bakterien under sterile forhold på agar viser en tæt mikrokolonistruktur.

(B, til højre) En mikrokoloni af bakterien ses her i jordmikrokosmos med tilsætning af skummetmælk. Celletætheden i denne mikrokoloni er mindre end under sterile forhold. Bar=30 μ m.



der efter bakterier, der forekommer naturligt i danske sukkerroemarken og har en hæmmende effekt over for plantepatogene svampe. Inden for biologisk bekæmpelse af de spiringsskadelige svampe af slægterne *Pythium* og *Rhizoctonia* har forskellige *Bacillus*-stammer vist en god effekt.

Bacillus spp. er en gruppe af bakterier, der er uønskede eller ønskede alt afhængig af, om det er patogene eller gavnlige stammer. Metoden er i det viste eksempel anvendt til studier i jord for at undersøge spiring og mikrokolonidannelse af en svampehæmmende *Bacillus* spp.

Denne bakteriegruppe danner sporer, der har en god overlevelse under ugunstige forhold. Sporernes tørkeresistens og dermed langtidsholdbarhed på frø gør brug af *Bacillus* spp. til frøbejdsning til et realistisk alternativ til kemisk frøbejdsning. Derimod er det langt vanskeligere teknologisk at anvende ikke-sporedannende bakterier som *Pseudomonas* spp., da man endnu ikke har gode metoder til at bejds disse bakterier på frø på en måde, så deres overlevelse sikres. Imidlertid er sporespiringen af *Bacillus* spp. under naturlige forhold oftest lav og for langsom til, at bakterien kan nå at beskytte et spirende frø mod hurtigt voksende spiringsskadelige svampe. Det gør det til et problem at anvende *Bacillus* spp. kommercielt.

Det blev derfor undersøgt om sporespiring kunne stimuleres ved tilsætning af næringsstof. Blandt de undersøgte billige og komplekse næringsstoffer viste skummetmælk sig at give en

god stimulering af spiring og mikrokolonidannelse af bakterierne (figur 2). Det vil i fremtidige forsøg blive undersøgt, hvorvidt bejdsning af frø med de svampehæmmende bakterier og skummetmælk vil reducere angreb af patogene svampe i sukkerroedyrking.

Eksempel 2: Sporespiring af den nematodfangende svamp *Duddingtonia flagrans* i kokasser

Indvoldsorm er et stort problem hos ungt kvæg. Sygdommen skyldes nematoden *Ostertagia ostertagi*. Nematoden inficerer dyrene, når de æder græs, der har vokset i nærheden af en kokasse, hvori de sygdomsfremkaldende nematoder er til stede (nematoderne findes i faeces fra syge dyr). Svampen *Duddingtonia flagrans* danner fangstnet, der fanger nematoderne, hvorefter svampen dræber organismen. Sporerne fra *D. flagrans* tilføres dyrene via foderet. Men det er først i kokassen, svampen har mulighed for at parasitere nematoderne og dermed reducere risikoen for smittespredning. Det er imidlertid essentielt, at svampesporerne spirer hurtigt frem i kokassen for at kunne dræbe nematoderne. Faktorer, der påvirker væksten af svampen, kan foruden substratet være pH og iltforhold.

Svampesporer af *D. flagrans* blev immobiliseret i et system (som vist i figur 1), der blev placeret i en kokasse. Efter 7 døgn blev prøverne taget ud af kokassen og mikroskopert (Klaus Skaalum Lassen, 1999). Det ses af figuren, at svampesporerne er spiret, og der er dannet fangstnet (figur 3). Ligesom i det foregående eksempel ville det ikke have været muligt at reproducere konkurrence og substrat på tilfredsstillende måde under laboratorieforhold.

Metodens perspektiver

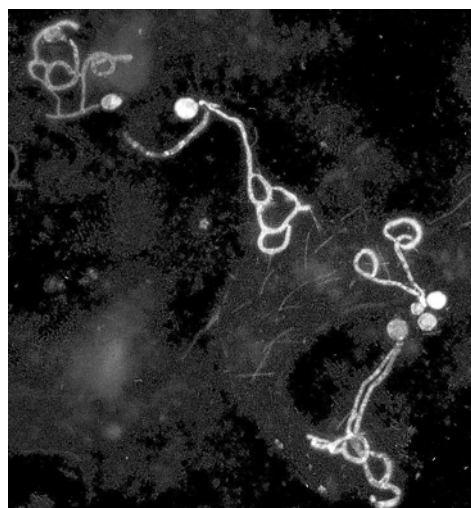
I de viste eksempler er metoden brugt til at anskueliggøre effekten på spiring og vækst på to forskellige mikroorganismer i naturlige miljøer. Ved at se direkte på miljøeffekter slipper man for at skulle vurdere, om resultater opnået under laboratorieforhold med rimelig sikkerhed kan overføres til det naturlige miljø.

Det er oplagt, at metoden kan anvendes inden for andre fagområder end jordbundsmikrobiologi.

Inden for levnedsmiddelmikrobiologi kan metoden bruges til studier af miljømæssige faktoreres effekt på spiring af patogene *Bacillus* spp. sporer. En anden problemstilling inden for dette fagområde kan være i undersøgelser af brug af sporedannede baciller som konservering af levnedsmidler.

Litteratur

- O. Højberg, S. J. Binnerup, J. Sørensen. 1997. Growth of silicone-immobilized bacteria on polycarbonate membrane filters, a technique to study microcolony formation under anaerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2920-2924.
- K. Skaalum Lassen. 1996. Undersøgelser af *Duddingtonia flagrans*' vækstbetingelser i kvæggødning. Herunder afprøvning af nyt vækstskammer. Bacheloropgave ved Institut for Økologi, KVL.
- C. Thrane, S. Olsson, J. Wolstrup, J. Sørensen. 2000. Note: Direct microscopy of *Bacillus* endospore germination in soil microcosms. *Journal of Applied Microbiology* 89: 595-598.



Figur 3. Direkte mikroskopi af spiring og vækst af den nematodfangende svamp *Duddingtonia flagrans* efter inkubering i en kokasse. Det ses af figuren, at svampen er spiret, og der er dannet fangstnet (Foto: Klaus Skaalum Lassen).

Projektet er finansieret af Fødevareministeriets Strukturdirektorat og har Sektion for Genetik og Mikrobiologi på Novo Nordisk og Danisco Seed A/S som industrielle samarbejdspartnere. På KVL er professor Jan Sørensen, lektor Stefan Olsson, lektor Jens Wolstrup, forskningslektor Tommy Harder Nielsen, forskningslektor Charlotte Thrane, forskningsadjunkt Mette Neiendam Nielsen samt laborant Dorte Rasmussen tilknyttet projektet.