



Illustration: Ola Lundström

# Grundläggande mikrobiologi

Text: Britt-Marie Lidesten



## Minst är flest

Bakterierna som lever i och på ytan av vår kropp är många gånger fler än antalet mänskliga celler. Motsvarande gäller om man jämför antalet gener från dessa bakterier och mänskliga gener.

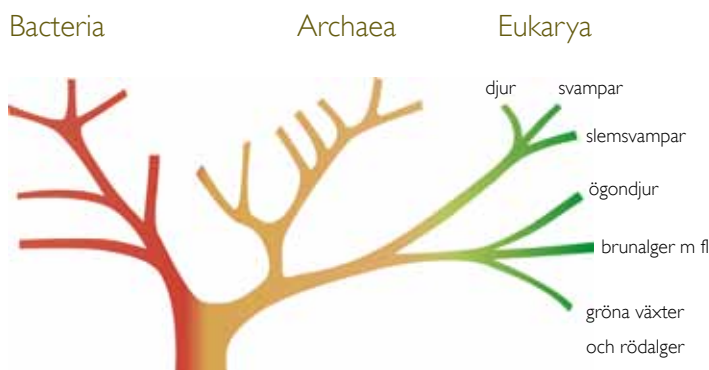
Enbart i tarmkanalen finns bakterier som sammanlagt väger cirka två kg. De hjälper oss att bryta ner födan, syntetisera vitaminer och aminosyror som vår kropp behöver och skyddar oss genom att utbilda vårt immunförsvar så det kan skilja vänner från fiender.

Det internationella projektet "Metagenomics of the Human Intestinal Tract" ([www.metahit.eu](http://www.metahit.eu)) kartlägger bakterierna i människans tarmflora och söker samband mellan tarmbakteriernas gener och hälsa och sjukdom hos människan. I anslutning till projektet publicerades nyligen en artikel i Nature (volume 473, issue 7346), "Enterotypes of the human gut micro-

biome". Artikeln beskriver hur forskare kartlade bakterier i tarmkanalen hos personer från olika länder och fann att man kunde göra en indelning i tre grundtyper av bakteriesamhällen med olika sammansättning av bakterier, så kallade enterotyper.

I stället för att sekvensera enstaka mikroorganismer vill man ofta, som i exemplet ovan, analysera spektrumet av alla förekommande DNA-sekvenser i prov från så skilda miljöer som exempelvis människans tarmkanal eller naturliga vatten. Detta kallas metagenomik. Skillnader mellan organismsamhällen i olika miljöer kan studeras och man finner ofta DNA-sekvenser som inte kan kopplas till någon känd bakterie.

Vid Uppsala universitet arbetar man med mikroorganismer i både sötvatten och marina miljöer. Under Bioresursdagarna för gymnasielärare i november 2011 höll professor Stefan Bertilsson, Institutionen för ekologi och genetik, Uppsala universitet, en föreläsning om den forskning som bedrivs inom området.



## Systematisk indelning

Det som vi i dagligt tal kallar bakterier delas in i två systematiska huvudgrupper, domänerna Bacteria och Archaea. Dessutom finns en tredje domän, Eukarya. Som framgår av figuren till vänster skiljs Archaea ut från den eukaryota grenen på ett tidigt stadium av evolutionen.

Bakterier har ett horisontellt utbyte av DNA-sekvenser, vilket innebär att DNA-material överförs mellan celler inom samma generation. Överföringen är inte begränsad till bakterier av samma art. En grundläggande fråga är därför om man överhuvudtaget kan definiera arter av bakterier.

## Mikrobiologi i gymnasiets ämnesplan i biologi

Ett nytt delområde i gymnasiets ämnesplan i biologi handlar om "Sterilteknik och odling av mikroorganismer". Vi som arbetar på Bioresurs ser därför behovet av att uppmärksamma grundläggande mikrobiologi.

Det var också anledningen till att Bioresursdagarna 2011 för gymnasielärare handlade om mikroorganismer, den ena dagen fokuserade på mikroorganismer och hälsoaspekter och den andra på mikroorganismer i ett ekologiskt perspektiv. Denna artikel tar upp grundläggande praktisk mikrobiologi och är exempel på sådant som vi behandlade under kursdagarna.

Mikroorganismer tas upp i det centrala innehållet för Biologi 2 där mikroorganismer nämns på två ställen, men kopplingar kan även göras till fler delar av det centrala innehållet. Ur det centrala innehållet för Biologi 2: "Mikroorganismer och deras betydelse för hälsa och sjukdom." och "Sterilteknik och odling av bakterier". Dessutom ingår olika aspekter på mikrobiologi i Biologi 3.

I den inledande texten till ämnesplanen i biologi, som beskriver syftet med biologiämnet, anges de förmågor som "undervisningen i ämnet biologi ska ge eleverna förutsättningar att utveckla". Arbeta med mikroorganismer stämmer väl in på dessa och jag vill speciellt lyfta punkt 3: "Förmåga att planera, genomföra, tolka och redovisa fältstudier, experiment och observationer samt förmåga att hantera material och utrustning."

Förutsatt att elever lär sig grundläggande sterilteknik och odling av bakterier kan de sedan planera, genomföra, tolka och redovisa enkla försök med mikroorganismer. Några exempel på lämpliga försök beskrivs nedan. Med utgångspunkt i dessa försök kan grundläggande teori och praktiska tillämpningar behandlas.

## Anvisningar på hemsidan

På Bioresurs startside, länk "Säkerhet", finns anvisningar för arbete med mikroorganismer som utarbetats i samarbete med Arbetsmiljöverket. Här beskrivs bland annat grundläggande mikrobiologisk praxis. Det finns även ett stort antal laborationer graderade i tre kompetensnivåer, som innebär att en värdering gjorts av

säkerhetsaspekterna för respektive försök. Att genomföra försök på kompetensnivå 3, som är den högsta nivån, kräver goda kunskaper i sterilteknik och odlingsteknik.

På vår hemsida finns kompletterande beskrivningar till försöken nedan, samt beskrivning av metoder för färgning av bakterier. Se [www.bioresurs.uu.se](http://www.bioresurs.uu.se), Tema, Bioteknik i skolan.

## Odlingsteknik

Sterila petriskålar i plast och olika slag av odlingsmedier i pulverform finns hos ett flertal företag som säljer laboratrieutrustning, se Bioresurs hemsida, länk "Inköp". Färdiga standardmedier i glasflaskor kan också inköpas och agarblandningen smälts i vattenbad innan agarplattorna gjuts. Större sjukhus, som har mikrobiologiska laboratorer, säljer ibland färdiga agarplattor.

### Renutstryk

Om man ska hålla bakteriekulturer i odling är det viktigt att lära sig känna igen de olika arterna genom att studera renutstryk på agarplattor. Hur ser kolonierna ut: Vilken färg har de, hur ser ytan ut, är kanten jämn och har de någon lukt? Vid minsta misstanke om att bakterierna på agarplattan inte är av den förväntade typen ska man destruera bakterierna och starta en ny odling.

Ett renutstryk görs genom successiva utstryk av bakterier så att det till slut hamnar enstaka bakterier på agarytan som växer ut till väl åtskilda kolonier, se bilder till höger och beskrivning på hemsidan. På detta sätt kan man se om det har blivit någon kontamination.

Låt gärna eleverna göra renutstryk från en vätskesuspension med fysiologisk koksaltlösning eller Nutrient broth som innehåller en blandning av två bakterier. Välj exempelvis *E. coli* och *M. luteus*, som är lätta att skilja åt på färgen. Gör blandningen omedelbart innan övningen ska genomföras eftersom *E. coli* har en snabbare tillväxt än *M. luteus* och tar överhand om bakterierna får växa tillsam-



mans i näringslösning. Uppgiften för eleverna är sedan att separera de båda bakteriearterna på skilda agarplattor.

Bakterier kan odlas på fast näringsmedium på agarplatta och i flytande näringsbuljong i exempelvis E-kolv eller provrör. Odling i näringsbuljong kräver goda kunskaper i sterilteknik eftersom det finns risk för att man av misstag odlar upp okända bakterier som kan medföra en säkerhetsrisk. (Kompetensnivå 3.) De försök som beskrivs i denna artikel kräver inte uppodling av bakterier i näringskultur.

#### *Förvaring av kulturer*

Bakterier kan bevaras genom utstryk på agarplattor, men i så fall krävs det att man förnyar utstryken med någon månads mellanrum. Utstryk på snedagarrör med skruvlock har en längre hållbarhet. Ytterligare en metod är infrysning i glycerol, men här krävs uppodling i näringsbuljong. Autoklavera eppendorfrör till hälften fyllda med glycerol. Tillsätt sedan lika stor volym näringsbuljong med en övernattskultur av bakterier och blanda om. Frys eppendorfrören. Vissa bakterier är känsliga och klarar inte att frysas in med denna metod.

#### *Destruktion av bakterier, avfallshantering*

Viktigt är att tänka på säkerhetsaspekterna vid odlingsförsök. Enstaka mikroorganismer som hamnar på en agaryta bildar genom delning kolonier av miljontals celler. Om okända mikroorganismer odlas upp innebär det att även patogena mikroorganismer kan massföröka.

Odlar inte upp bakterier från exempelvis toaletter eller andra miljöer där man kan förvänta sig att patogener finns. Renodling från plattor med okända bakterier rekommenderas inte. Agarplattor med okända bakterier ska destrueras antingen genom autoklavering, behandling med jodopax eller kastas i speciella behållare för riskavfall som sedan hanteras på ett godkänt sätt. Plattor eller vätskesuspensioner med klass1-bakterier behöver inte destrueras.

## Winogradskykolonn

Mikroorganismer fanns redan tidigt under jordens utveckling. Hur det första livet skall definieras, hur det såg ut och i vilken miljö det utvecklades vet vi inte. Däremot kan vi göra ett enkelt modellförsök för att visa under vilka varierande miljöförhållanden som mikroorganismer kan leva, hur de samverkar med miljön och vilken variation av organismer som kan finnas i en begränsad volym. Vill man endast göra ett enda mikrobiologiskt försök är Winogradskykolonnen ett bra val. Eleverna kan själva ställa iordning kolonner och försöket kan bli utgångspunkt för att diskutera miljöförhållanden och mikroorganismerna anpassningar till varierande miljöer. Se beskrivning på hemsidan.

I Winogradskykolonnen utvecklas en syregradient med högst syrehalt i ytskiktet, där man bland annat finner cyanobakterier och grönalger. I bottenskiktet är det syrefritt med en hög halt av divätesulfid vilket syns genom utfällning av svart järnsulfid. Detta ger en koppling till anaeroba miljöer och övergödningsproblematik i naturliga vatten.

En annan utgångspunkt är fotosyntesen. I ytskiktet finns cyanobakterier och grönalger med den vanliga typen av fotosyntes. Lite längre ner i kolonnen bildas röda och gröna skikt av purpurbakterier och gröna svavelbakterier som har en annan form av fotosyntes, se bilder till vänster.

En tredje utgångspunkt är den systematiska indelningen av de encelliga och små flercelliga organismer som finns i kolonnen. För att studera variationen av organismer som lever i kolonnens övre skikt kan man sticka ner dubbla objektglas i övre delen av kolonnen och låta en biofilm utvecklas på glasytorna under några dagar som sedan studeras i mikroskop. Rikedomen av olika organismer är fascinerande och ger möjlighet att fundera över hur detta lilla ekosystem fungerar.

## Okända mikroorganismer från omgivningen

Ett traditionellt försök är att låta mikroorganismer falla ner från luften på en öppen agarplatta.

Winogradskykolonnerna har utvecklats olika beroende på skillnader i grundmaterial och tillsatser. Den vänstra kolonnens röda färg visar att det finns purpurbakterier, sannolikt av typen fotoautotrofa purpursvavelbakterier. Den gröna färgen i kolonnen t.h. indikerar fotoautotrofa gröna svavelbakterier troligen tillsammans med cyanobakterier. Den svarta färgen i nedre delarna av kolonnerna visar på anaerob miljö och sulfat- och svavelreducerande bakterier.



Beroende på miljö kan organismer av många olika slag hamna på plattan och växa ut till kolonier av olika färg och form.

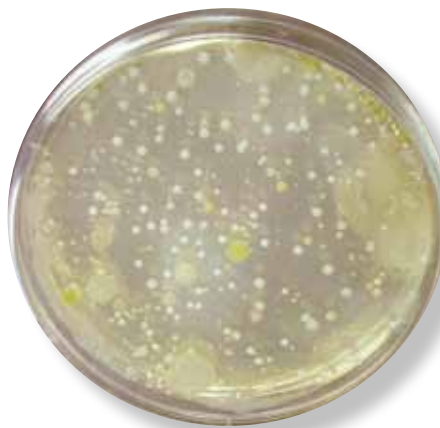
Man kan också trycka föremål mot agarytan. Fingeravtryck från otvättade fingrar och fingrar tvättade med olika medel visar bakteriernas förmåga att överleva på huden. Ytor från föremål som exempelvis frukter, dörrhandtag och disktrasor kan på motsvarande sätt testas.

Mögelsporer gror och bildar luddiga kolonier, medan bakterier och jästsvampar bildar oftast mer distinkta koloniformer. Detta ger utgångspunkt för att diskutera variationen av mikroorganismer i miljön.

## Test av giftverkan på bakterier

Olika ämnens giftverkan kan testas på en eller flera bakteriearter. *M. luteus* är känsligare än *E. coli*, vilket gör den speciellt lämpad för detta försök. Exempelvis kan olika metalljonlösningar, rengöringsmedel, kryddor och lök/vitlök testas. En jämn matta av bakterier sprids ut med tops på en agarplatta och små filterpappersbitar indränkta med de ämnen som ska testas läggs på bakteriemattan. Alternativt kan bitar eller pulver av olika ämnen läggas ut. Efter nå-

gon dag ser man en avdödningszon, diametern på zonen beror av ämnets giftverkan och på ämnets diffusion i agar. Se beskrivning på hemsidan.



Agarplattan har lämnats öppen och en mängd mikroorganismer har hamnat på plattan och växt ut till kolonier av olika färg och form.

På plattan t.h. syns hur bakterien *Micrococcus luteus* påverkas av 1. mald kryddnejlika (störst avdödningszon) 2. kanel (liten avdödningszon) och 3. ingefära (liten avdödningszon), samt 4. färsk ingefära (ingen effekt syns).



## Utrustning för grundläggande mikrobiologiskt arbete

Materialet nedan behövs till försöken i artikeln och de kompletterande försök som finns på [www.bioresurs.uu.se](http://www.bioresurs.uu.se), (Tema, Bioteknik i skolan) samt vid förvaring och destruktion av mikroorganismer.

- Autoklav: en mindre bordsautoklav behövs för att sterilisera medier och avdöda bakterier (vanligen 120 °C och 1 atmosfäriskt övertryck i 20 minuter.)
- Värmeskåp: föremål i glas och metall steriliseras under 2 timmar i 160°C.
- Odlingsskåp: odling av mikroorganismer som gillar lite högre temperatur än rumstemperatur, t.ex. 37°C för *E.coli*.
- Gasbrännare
- Etanol, 70%, till desinfektion av bland annat bänkytor.
- Jodopax, ursprunglig halt av 5% jod späds 1:100, till avdödnings av bakterier
- Ympnål/platinöser
- Sterila, tomma plastpetriskålar för gjutning av agarplattor
- Medier: Nutrient agar (NA), Nutrient Broth (NB), maltagar för odling av svamp.
- Eppendorfrör med steril glycerol för infrysning av bakteriekulturer.
- Tops med långa träskäftar för utstrykning av bakterier. Inköps t.ex. på apotek.
- E-kolvar täckta med aluminiumfolie och glasrör med skruvlock eller huv för uppodling av vätskekultur.
- Runda filterpapperslappar som tagits ut med hålslag
- Mikroskop, objektglas, täckglas
- Färglösningar för färgning med metylenblått eller för gramfärgning.
- Bakterier: *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus megaterium* och *Bacillus subtilis* är klass 1-organismer och är tillåtna att använda i skolan utan några säkerhetsåtgärder utöver grundläggande mikrobiologisk praxis. Som framgår av namnet *M. luteus* är denna bakterie guldfärgad (oftast). *B. megaterium* är en stor grampositiv bakterie som är lätt att se i mikroskop. Vill man jämföra med en bakterie som är liten och gramnegativ är *E. coli* ett bra val. Både *B. megaterium* och *B. subtilis* bildar enzymer som bryter ner kasein och stärkelse.