



Egenskaper hos *Halobacterium*



Saltdammar vid San Francisco Bay med rosa Haloarchaea.
Foto: Wikimedia Commons

Organismvärlden delas in i tre grupper: bakterier, arkéer och eukaryoter. Arkéerna är närmast släkt med eukaryoterna, dit bland andra djuren, växterna och svamparna hör. *Halobacterium sp. NRC-1* hör till arkéerna och som många arkéer klarar den att leva i extrema miljöer. Det är en modellorganism för arkéerna som är väl undersökt.

Uppgiften är att göra iakttagelser och beskriva egenskaper hos *Halobacterium*, som växer dels på platta, dels i vätskekultur.

Säkerhet

Halobacterium är inte patogen och det finns inte heller några kända patogener bland övriga arkéer. Risken för kontamination av kulturer är minimal eftersom cellerna endast växer i medium med hög salthalt. *Halobacterium* är av dessa anledningar lämplig för skolbruk.

Material

- Plattor med utstryk av *Halobacterium*
- Flytande kulturer med *Halobacterium*
- Stereolupp
- Mikroskop med faskontrastinställning och 1 000 gångers förstoring, objektglas, täckglas,
- Tandpetare
- NaCl-lösning, 25%
- Märkpenna

Utförande

1. Studera kolonier

Studera en platta i stereolupp med utstryk av *Halobacterium*. Jämför utseendet av kolonier som helst ligger väl åtskilda.

Finns det några skillnader? Beskriv utseendet hos kolonierna.

2. Studera flytande kulturer

Studera tre olika vätskekulturer i stationärfas med *Halobacterium*. OBS! Skaka inte om kolvarna utan låt dem stå kvar på bänken.

Finns det några skillnader? Beskriv utseendet hos de tre kulturerna.



3. Absorbansspektrum för *Halobacterium*

Vi har sett att kolonier av *Halobacterium* på agarplattor kan ha olika färg och att även flytande kulturer får olika utseende om de ympas med kolonier med olika färg. Hur kan man förklara dessa skillnader? En förklaring skulle kunna vara att cellernas innehåll av färg varierar.

Extrahera färgen från flytande kulturer ympade med rosa, vita respektive röda *Halobacterium*-kolonier. Se till att kulturerna har hög celltäthet. De bör ha fått växa i minst 1,5 veckor i 40-42 °C i skakvattenbad.

- Centrifugera helst totalt cirka 30 ml av respektive kultur (använd eventuellt flera centrifugrör) i cirka 8 minuter och 4 000 varv per minut. Se till att cellerna har centrifugerats ner och att supernatanten är klar.
- Häll av supernatanten och rör upp pelleten med cirka 0,5 ml avjonat vatten. Skaka om och låt stå några minuter.
- Blanda lysatet med cirka 2 ml aceton. Det ska bildas en klar, färgad vätska överst i röret. Om vätskan är grumlig centrifugeras röret på samma sätt som ovan.
- Använd 1,5 ml kvartskvett och scanna absorbansen mellan 300 och 600 nm.

4. Studera celler i mikroskop

Går det att se skillnad på cellerna från kolonier med olika färg i mikroskop?

Använd stereolupp och välj ut rosa, röda och vita kolonier från en platta med utstryk av *Halobacterium*. Sätt en droppe med 25% NaCl-lösning på så många objektglas som antalet kolonier du vill studera. Använd en tandpetare för att överföra celler från en enskild koloni till en droppe med 25% NaCl-lösning på ett av objektglasen. Lägg på täckglas. Studera med faskontrastinställning i 1 000 gångers förstoring med immersionsolja. Rör försiktigt fininställningen och ställ in i skärpeinställningen på absolut bästa nivå.

Cellerna varierar i storlek och form, men bortsett från detta, finns det någon gemensam egenskap hos cellerna som skiljer ut celler från kolonier med olika utseende? Beskriv skillnader i cellernas utseende relaterat till koloniernas utseende.

5. Sammanfatta resultaten från undersökningarna genom att besvara frågorna:

- Hur kan man förklara att kolonier av *Halobacterium* kan vara rosa, vita och röda?
- Hur kan man förklara att cellerna i flytande kulturer med *Halobacterium* som har rosa och vit färg lägger sig vid ytan, medan cellerna i en flytande kultur med röda celler lägger sig på botten?
- Hur kan man förklara att kolonier med rosa och vita celler är ogenomskinliga medan kolonier med röda celler är genomskinliga?
- Hur kan man förklara skillnaderna i utseende hos celler som man ser i mikroskop – att vita och rosa celler skiljer sig från röda celler?



Kommentarer till undersökningarna

Färgvariationer

De flesta kolonier är rosa och ogenomskinliga, men några är röda och genomskinliga. Det kan också finnas någon enstaka vit, ogenomskinlig koloni. Det kan dessutom vara olika färger på sektorer i kolonierna.

Eleverna ska försöka ge förklaringar till koloniernas varierande utseende. En hypotes kan vara att det har skett en ärftlig förändring i gener som styr utvecklingen av rosa färg, så att det antingen bildas röd eller vit färg. Detta undersöker vi genom att göra ett absorptionspektrum.

Absorptionspektret visar att färgsammansättningen i lysatet från röda och rosa arkéer är lika. Vita arkéer ger ett avvikande spektrum utan toppar i det aktuella våglängdsområdet. En hypotes att det har skett en genetisk förändring som påverkat bildningen av den rosa färgen så att en annorlunda röd färg uppstått stämmer inte. Däremot saknar vita celler förmåga att bilda rött pigment.

Cellernas röda färg bildas av retinal, en karotenoidliknande molekyl, som bildar ett komplex med bakteriorhodopsin i cellernas membran. Celler som är vita har förändringar i genomet som påverkar bildningen av den röda färgen. Förändringar sker förhållandevis frekvent eftersom transposoner förflyttar sig inom genomet och påverkar uttrycket av generna. Arkéer brukar även ha flera uppsättningar av ringformade kromosomer. Hur många fungerande gener det finns i kromosomkopierna kan påverka totala mängden av en viss genprodukt och eventuellt är det orsaken till att vissa kolonier har varierande rosa färg.

Cellerna har liksom växterna möjlighet att omvandla solljus till kemisk energi. Retinal kan absorbera ljusenergi varvid en ändring från trans- till cisform sker samtidigt som protoner förflyttas till cellmembranets utsida. Spänningsskillnaden möjliggör produktion av ATP.

Cellerna har även en ljusdriven pump (halorodopsin) för att kunna transportera in kloridjoner in i cellen. Cellerna pumpar dessutom stora mängder kaliumjoner in i cellen. Detta gör det möjligt att hålla samma osmotiska potential i cellens inre som i omgivningen.

Att det kan vara olika färger på sektorer i kolonierna beror på en ärftlig förändring i någon av dottercellerna till den ursprungliga cellen i kolonin och visar hur cellerna fortplantar sig, det vill säga genom delning.

Litteraturuppgifter finns som anger att färgproduktionen förbättras genom att pH-värdet i den flytande kulturen höjs till ca pH 8-9.

Gasfyllda vesiklar

I kolvarna med rosa eller vita *Halobacterium* ser man överst ett rosa eller vitt skikt. Suspensionen i kolven med röda celler ser genomskinlig ut och ett rött lager finns på botten. Slutsatsen blir att de rosa och vita cellerna finns vid ytan, men inte de röda.

Halobacterium kan ha ett stort antal gasfyllda vesiklar i sina celler. Det gör att cellerna flyter upp till ytan i en vätskekultur. Detta sker först när kulturen uppnår stationärfas, efter uppodling under ca en vecka i skakvattenbad, 40-42°C. Vätskekulturer med gasfyllda celler blir ogenomskinliga med antingen rosa eller vit färg. Om cellerna saknar vesiklar blir en vätskekultur mer genomskinlig och cellerna lägger sig på botten. Kolvarna måste stå utan att man rör dem tills cellerna har antingen hunnit flyta upp till ytan eller sedimentera.

När *Halobacterium* växer på agarplatta blir kolonier som innehåller celler med vesiklar ogenomskinliga. De flesta kolonier brukar vara rosa, men det kan också förekomma kolonier som är svagt rosa eller helt vita. På en platta med många kolonier brukar några av kolonierna vara röda och genomskinliga. Cellerna i dessa kolonier saknar vesiklar.

Celler från rosa eller vita kolonier med vesiklar är kraftigt ljusbrytande i faskontrast. I några celler brukar man kunna se vesiklar som tillsammans bildar större ofärgade, rundade kroppar, men man behöver studera många celler för att hitta några där man tydligt ser dessa bildningar. Celler från kolonier som är röda och genomskinliga har inga genomskinliga kroppar. De ser enfärgat mörka ut i mikroskopet.



Forskare diskuterar vilka fördelarna är för cellerna att ha gasfyllda vesiklar och detta är ännu inte helt klarlagt. Man tror att det är fördelaktigt för cellerna att söka sig mot vattenytan, en miljö med hög syrehalt och god ljusstillgång, eftersom vatten med hög salthalt håller betydligt lägre syrehalt än rent vatten.

Men solens uv-strålning är samtidigt DNA-skadande och det är en nackdel för cellerna att utsättas för stark UV-strålning. Samtidigt har *Halobacterium* effektiva DNA-reparationssystem, bl.a. enzymet fotolyas som är ljusberoende och kan reparera DNA-skador. Se vidare Nobelpriset i kemi 2015.

Det är inte hela sanningen att cellerna flyter upp till ytan beroende på att de har gasfyllda vakuoler. De har också flageller som gör att de kan simma och söka sig till optimala miljöförhållanden beträffande näringsämnen, ljus och syrehalt (taxier).

Sensory rhodopsin I, har betydelse för fototaxi och medför att cellerna rör sig mot orange ljus och från UV-ljus. Sensory rhodopsin II medför att cellerna rör sig från blått ljus.

Se absorptionspektrum för *Halobacterium* nedan. De tre topparna kring 500 nm bildar ett karaktäristiskt mönster som är generellt för röda halofiler och gör att man kan känna igen denna grupp.

Jämför gärna med absorptionspektrum för klorofyll a och b nederst på sidan. Fig. från Wikimedia commons, illustration av Daniele Pugliesi.

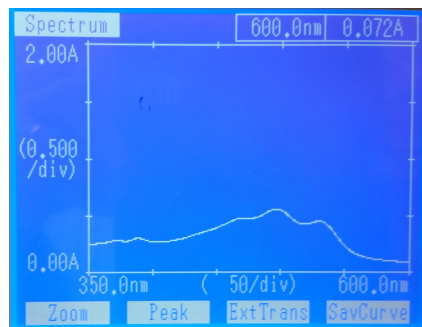
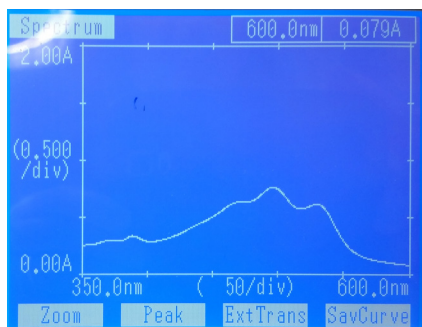


Bild på absorptionskurvor från mätningar som gjorts av Bioresurs. Överst rosa celler, nederst röda celler. De båda diagrammen visar samma form på kurvorna med tre toppar på samma våglängder. Detta mönster används för att identifiera gruppen rödfärgade haloarkéer.

Figuren längst ner på sidan visar som jämförelse absorbansen för klorofyll a och b.



Se även referens till absorptionskurva: Biological properties of carotenoids extracted from *Halobacterium halobium* isolated from a Tunisian solar saltern. Molka Abbas et al. BMC Complementary and Alternative Medicine 2013, 13:255
https://www.researchgate.net/figure/257348133_fig2_Absorbance-spectrum-of-Halobacterium-halobium-M8

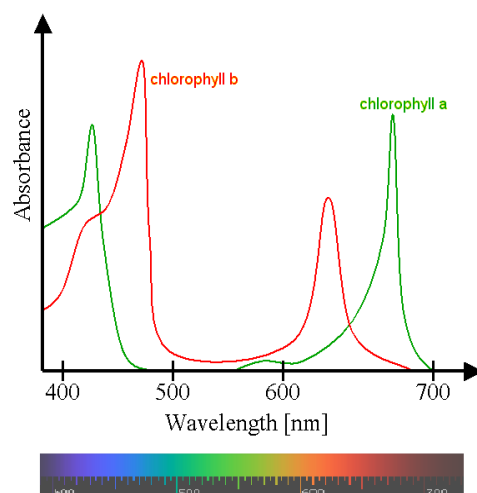
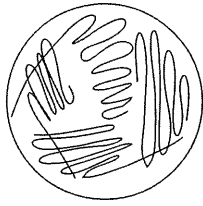
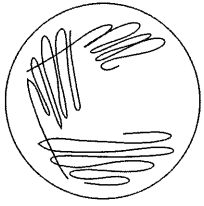
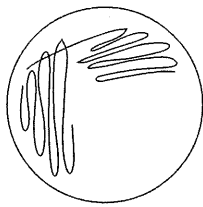
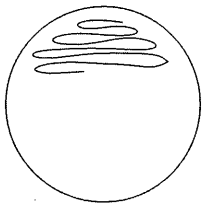


Fig. Daniele Pugliesi, Wikimedia Commons



Renodling av arkéer

Vid undersökningar av mikroorganismer vill man oftast arbeta med renkulturer. En renkultur är en odling i vilken samtliga celler härstammar från endast en ursprunglig cell. En sådan kultur kan åstadkommas genom att mikroorganismer gradvis späds ut, t.ex. genom utstrykning på agarplatta. På så sätt får enskilda celler möjlighet att dela sig och utvecklas till en koloni. En väl åtskild koloni kan anses härstamma från en enda cell.

Materiel

- Kultur av *Halobacterium* från agarplatta
- Ympnål/platinös
- Ren agarplatta med medium avpassat för *Halobacterium*
- Eventuellt gasolbrännare

Utförande

1. Placera agarplattan med *Halobacterium*-kolonier framför dig på bänken.
2. Bränn hastigt av metallskaftet på ympnålen och glödga platinaöglan i gaslågan. Håll öglan nästan lodrätt i lågan så att hela metalltråden glödgas samtidigt. Alternativt använd en steril engångsplatinös.
3. Hämta arkéer från en agarplatta: Lyft locket på agarplattan och håll det som skydd mot kontaminering från luften. Låt ympnålen svalna några sekunder genom att doppa ner den i plattan med *Halobacterium*, på ett ställe där det inte finns några kolonier (eller använd platinös). Hämta celler från en koloni som är väl separerad från övriga kolonier.
4. Du ska nu göra ett renutstryk. Följ punktlistan nedan. Se även bildserie ovan.
 - Stryk ett sicksackmönster med ympnåleöglan (eller platinösen) över en tredjedel av agarytan. Undvik att skära ned i agarytan.
 - Sätt på locket på agarplattan.
 - Bränn av ympnålen på samma sätt som tidigare eller byt engångsplatinös.
 - Vrid plattan ett tredjedels varv. Lyft locket. Låt ympnålen svalna genom att sticka ned den på ett sterilt ställe i agarytan.
 - Stryk ett streck med ympnåleöglan över det föregående utstryket och stryk sedan ett sicksackmönster över ytterligare en tredjedel av agarytan.
 - Sätt på locket på agarplattan.
 - Bränn av ympnålen eller byt till ny engångsplatinös.
 - Vrid plattan ett tredjedels varv. Lyft locket. Stryk ett streck med ympnåleöglan över det föregående utstryket och stryk sedan ett sicksackmönster över den sista tredjedelen av agarytan.
 - Sätt på locket på agarplattan.
 - Bränn av ympnålen.
5. Inkubera agarplattan i värmeskåp (40-42 °C) i cirka en vecka.

Plattan bör nu innehålla kolonier med celler som kan vara rosa eller vita och ogenomskinliga eller röda och genomskinliga. Gör eventuellt en renodling av de olika kolonityperna genom att välja ut väl isolerade och rena kolonier. Använd metoden för renutstryk som beskrivits ovan.



Tillväxt och optimal salthalt

Halobacterium har isolerats från saltad fisk, men förekommer även i saltdammar där den dock inte är särskilt vanlig. Här dominerar i stället andra saltälskande bakterier. I den här laborationen ska vi ta reda på mer om cellernas miljökrav.

Vilken är den optimala halten natriumklorid som *Halobacterium* är anpassad till?

Även andra miljöfaktorer kan undersökas på liknande sätt, exempelvis temperatur- och pH-optimum, samt olika komponenter i mediet.

Säkerhet

Halobacterium är inte patogen och det finns inte heller några kända patogener bland övriga arkéer. Risken för kontamination av kulturer är minimal eftersom cellerna endast växer i medium med hög salthalt. *Halobacterium* är av dessa anledningar lämplig för skolbruk. Risk finns för kontamination i kulturer med salthalt lägre än cirka 5%.

Material

- *Halobacterium* uppodlad i vätskekulturer med varierande salthalt från 0 g NaCl till mättad saltlösning. Exempel på serie med olika halter av NaCl per 50 ml medium: 5g, 7,5 g, 10g, 12,5g, 15g, 17,5 g, 20 g. Mediet innehåller alla övriga komponenter enligt beskrivning i bilagan. Medium utan NaCl används som blank.
- Spektrofotometer och kyvetter.
- Vattenbad (40-42 °C, helst med skakmöjlighet). Ett alternativ till skakvattenbad är att man manuellt skakar om kolvarna emellanåt, men odlingen tar i så fall längre tid.

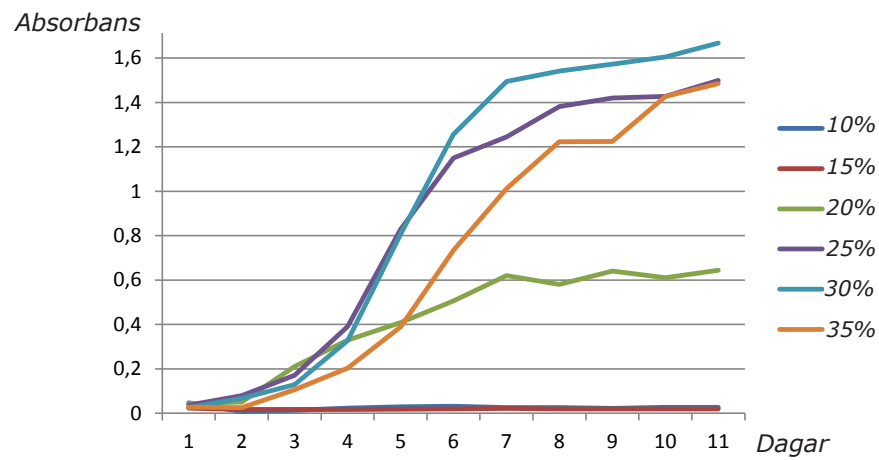
Tillväxtkurva och bestämning av optimal salthalt

1. Gör ett medium enligt beskrivning på sidan 13, men utan NaCl.
2. Bestäm vilka koncentrationer av natriumklorid som ska testas. Välj koncentrationer från 0 g till medium mättat med NaCl, se exempel ovan.
3. Fördela 50 ml medium utan NaCl i så många 100 ml E-kolvar som antalet olika koncentrationer med NaCl. Gör helst dubbelprov. Tillsätt NaCl i de valda mängderna. (En mer exakt salthalt får man genom att justera mediets volym till 50 ml efter det att NaCl tillsatts.) Täck öppningen på kolvarna och övre delen av kolvhalsen med dubbel aluminiumfolie. Autoklavera (även medium som ska användas som blank). Låt svalna till 40 °C.
4. Ympa E-kolvarna med 1 ml flytande kultur med *Halobacterium*. Använd en kultur som har tydligt rosa färg.
5. Mät absorbansen vid 600 nm. Använd medium utan salt och celler som blank.
6. Låt kolvarna stå i vattenbad (40-42 °C, helst skakvattenbad) och upprepa absorbansmätningen efter cirka en vecka.
7. Om det finns möjlighet att mäta absorbansen dagligen (eller vid några tillfällen under en vecka) får man på detta sätt en tillväxtkurva för cellerna. Om absorbansen mäts efter cirka en vecka ser man optimumvärdet beträffande halten NaCl.



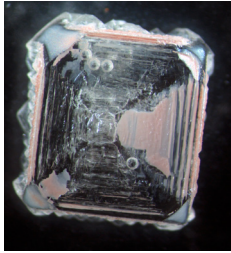
Kommentarer till undersökningarna

Diagrammet visar mätningar som vi på Bioresurs har gjort för att visa tillväxt och optimal salthalt.



Absorbans vid 600 nm i sex kulturer med varierande halt av natriumklorid angett i procent. och avsatt mot antal dagar för tillväxt.

Grafen visar att salthalten har avgörande betydelse för tillväxten av *Halobacterium*, med optimum för 30% natriumklorid.



Kristall av NaCl
med *Halobacterium*.

Levande celler från saltkristaller

Pröva att regenerera växande *Halobacterium* från saltkristaller.

Börja med att indunsta en flytande kultur med *Halobacterium* så att saltkristaller bildas.

Studera saltkristallerna i stereolupp. Vilken form har de? Kan man se att det finns celler av *Halobacterium* på eller i kristallerna?

Pröva sedan att återigen få en kultur med växande *Halobacterium* genom att tillsätta en saltkristall till ett flytande medium med 25% salthalt.

Saltkristallerna kan förvaras under lång tid och fortfarande innehålla levande celler. Testa hur lång överlevnaden är!

Kommentar

Medium med låg salthalt infekteras lätt, det gäller speciellt medier med salthalt lägre än cirka 5%.

Om endst optimum för salthalt ska bestämmas kan man mäta absorbansen efter cirka en vecka, men en tendens brukar man se redan efter ett par dagar. Om man dessutom vill visa den successiva tillväxten i en flytande kultur mäter man absorbansen regelbundet under cirka en och en halv vecka. Gör gärna täta mätningar när man kan ser att tillväxten ökar snabbt på kort tid (logfas).



DNA från *Halobacterium*

Vad händer när *Halobacterium* utsätts för avjonat vatten? Hur kan man ta fram dna från *Halobacterium*?

Material

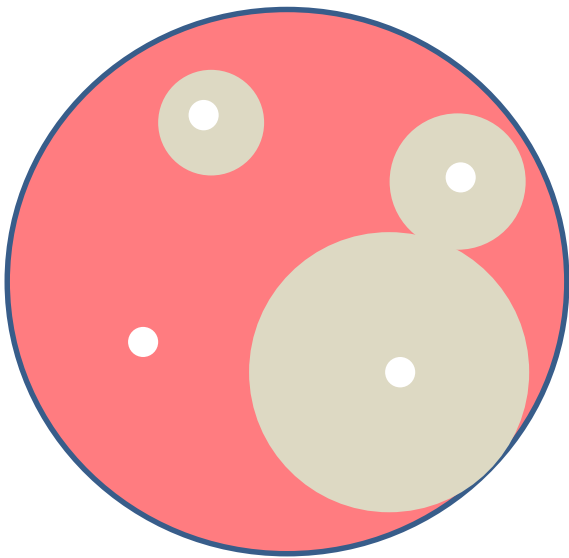
- Flytande kultur med *Halobacterium*. Kulturen ska ha hög celltäthet och starkt rosa färg.
- Etanol, 95%, iskall (förvaras i frys)
- Provrör av glas, 3 ml
- Pipett

Utförande

1. Håll cirka 1 ml flytande kultur i ett glasprovrör som rymmer cirka 3 ml.
2. Tillsätt cirka 1 ml avjonat vatten.
3. Blanda om och låt stå ett par minuter.
4. Luta provröret. Använd pipett och låt 0,5-1 ml iskall 95% etanol långsamt och försiktigt rinna längs sidan på provröret så att etanolen skiktas över cellsuspensionen.
5. Håll provröret mot ljuset och studera etanolfasen under några minuter utan att skaka.

Kommentar

Det är mycket lätt att extrahera dna ur *Halobacterium* eftersom cellerna kräver hög salt-halt för att överleva och därför lyserar omedelbart när de kommer i kontakt med vatten. Man ser en tydlig ring av utfällt dna med protein i etanolfasen strax ovanför gränssytan till cellsuspensionen. Efter ett tag bildas trådar av dna och protein i etanolfasen.



Giftverkan av olika ämnen

För att testa giftverkan av olika ämnen används ett enkelt toxikologiskt test med arkéer som försöksorganismer. Många olika ämnen i både flytande och fast form kan undersökas med denna metod.

Modellförsöket kan vara en utgångspunkt vid diskussioner om miljögifter och hälsofrågor. Alltför höga halter av metalljoner i mat och dricksvatten skadar levande organismer. Detta gäller t.ex. kopparjoner. Höga kopparjonhalter i dricksvattnet gör att små barn kan få diarré. Ljust hår som tvättas i kopparhaltigt vatten kan få en grön färgton. Metaller och andra ämnen kan också hämma tillväxten av mikroorganismer.

I metoden som beskrivs nedan, sprids en cellsuspension ut på en agarplatta. På plattan kan t.ex. små filterpapperslappar, som doppats i de lösningar man vill undersöka, läggas. En klar zon utan cettväxt bildas runt de prover som är giftiga för cellerna – ju större diameter på avdödningszonen desto giftigare.

Syftet med laborationen är att lära sig använda en enkel toxikologisk testmetod.

Tidsåtgång:

Agarplattor med saltmedium liksom en kultur med *Halobacterium* i flytande saltmedium bereds i förväg. Att göra i ordning försöket tar ca 30 minuter och avläsningen görs tidigast efter en vecka. Plattorna kan förvaras i tätslutande plastlåda i rumstemperatur om avläsningen behöver skjutas upp.

Säkerhet:

Hälsosofarliga ämnen ska inte användas som testkemikalier. *Halobacterium* är inte patogen och kontaminationsrisken är minimal eftersom medum med 25 % salthalt används.

Material

- *Halobacterium* uppodlad i flytande saltmedium under minst en vecka på skakvattenbad, 40-42°C.
- Sterila plattor med saltmedium.
- Förslag på metalljonlösningar (0,1-0,2 ml/dm³): t.ex. kopparklorid (CuCl₂), aluminiumklorid (AlCl₃), järnklorid (FeCl₃), zinkklorid (ZnCl₂), förslag på övriga lösningar: t.ex. desinfektionsmedel, hygienprodukter, även fasta ämnen kan användas.
- Värmeskåp (42 °C)
- 70-procentig etanol.
- Sterila tops (helst med långt skaft)

Beroende på metod behövs eventuellt provrör med ca 1 cm³ vatten, ympnål, dropppipett av plast eller korkborr, preparernål eller pincett och filterpapperslappar gjorda med hålslag.



Utförande

1. Använd ympnål och skrapa *Halobacterium* från en platta. Rör ut cellerna i ca 1 cm³ kok-saltlösning (25 g NaCl per 100 ml vatten) i ett provrör. Ta så mycket celler att suspensionen blir kraftigt grumlig. Ett alternativ är att odla upp *Halobacterium* i flytande saltmedium under en vecka i skakvattenbad vid 42 °C.

2. Doppa en tops i cellsuspensionen och stryk ut *Halobacterium* på den rena plattan med saltagar. Låt varje streck med topsen täcka det föregående. Vänd därefter plattan och stryk ut *Halobacterium* på tvären över den första utstrykningen. Hela ytan ska täckas med täta streck – det får inte bli ett glest ruttmönster!

Ställ de använda topsen i en bägare med lite 70-procentig etanol.

3. Följande tre metoder används beroende på vilket ämne som testas:

- Olika lösningar kan testas genom att små runda filterpapperslappar, som tagits ut med hålslag, doppas i testlösningar. Lapparna placeras sedan på agarytan med de utstruktorna cellerna.

Använd steril preparernål för att placera ut lapparna. Se till att inte ett överskott av vätska följer med lappen – håll den mot kanten av kärlet så att överskottet rinner av. Om resultaten ska kunna jämföras måste alla lapparna behandlas likadant.

- Använd en avklippt dropppipett av plast eller en korkborr som kan steriliseras och ta ut brunnar i agarskiktet. Brunnarna kan sedan fyllas med pulver eller lösningar.

- Bitar av fasta ämnen kan placeras direkt på ytan.

Märk undersidan av petriskålen med vilka ämnen som testas. Lägg plattorna i plastpåse eller tätslutande plastlåda för att förhindra uttorkning.

4. Inkubera plattorna vid 42 °C i en vecka.

Resultat och utvärdering

En klar zon utan växt av *Halobacterium* runt det testade ämnet visar att det är giftigt för cellerna – ju större diameter på avdödningszonen desto giftigare (förutsatt att diffusionshastigheten i agar för de olika ämnena är jämförbar). Mät diametern på avdödningszonen.



Vem gillar *Halobacterium*?

Finns det några organismer som skulle kunna äta *Halobacterium*? Det finns naturliga vattenmiljöer med extremt höga salthalter på många håll i världen beroende på att ett varmt och torrt klimat gör att avdunstningen från grunda vattenmiljöer är stor.

Det är få djurarter som lever i dessa miljöer, men ett litet kräftdjur, *Artemia*, klarar extrema salthalter. I naturliga saltsjöar lever också flamingos, en fågel med vackert rosa färg, som äter *Artemia*. Om flamingos föds upp i en djurpark utan tillgång till saltdammar och *Artemia* får de en grå-vit färg. Hur hänger detta i hop?

Artemia kan bilda ett embryo med skyddande hölje som överlever även om saltdammarna torkar ut. Embryot kan väckas till liv efter flera år. Sådana embryon (brukar kallas Artemiaägg) kan köpas i akvarieaffärer, odlas upp i vatten med tillsatts av 3% havssalt för att bli mat till fiskyngel.

Pröva gärna att mata *Artemia* med *Halobacterium* men problemet är att *Halobacterium* kräver cirka 25% salthalt och *Artemia* växer bättre i lägre salthalt, ca 3%. *Halobacterium* lyserar i så låg salthalt.

Material

- *Artemia*, inköp av ägg i akvarieaffär.
- Ca 1 liter lösning med 3% havssalt (inköps i livsmedelsaffär) och kranvatten.
- Tomma petriskålar eller mindre glasskål/bägare.
- Burk/bägare eller litet plastakvarium på ca 1-2 liter

Utförande

1. Bered lösningen med havssalt och kranvatten.
2. Håll lite av lösningen i en petriskål eller glasskål/bägare och tillsätt lite Artemiaägg (embryon). Tillsätt inte mer än att det blir ett glest skikt på vätskeytan.
3. Titta med förstoringsglas eller stereolupp efter nykläckta *Artemia*. De är någon mm långa, genomskinliga och rör sig ryckigt.
4. När Artemiaäggen har kläckts matas de små kräftdjuren med jäst. Obs! Det är viktigt att ta ytterst lite jäst, inte mer än att lösningen med *Artemia* blir svagt grumlig (opak). Fortsätt sedan att mata *Artemia* dagligen.
5. Om *Artemia* ska överleva i längden krävs att det finns tillgång till saltvattensalger, antingen från en renkultur eller via tillsats av havsvatten. Ett något större kärl behövs även. Ersätt avdunstat vatten med avjonat vatten för att undvika att salthalten i mediet ökar.



Mikrobiologiska begrepp

Mikrobiologi innehåller ett stort antal begrepp som inte används i vardagslag. Klipp ut begreppen nedan och använd dem för att bygga begreppskartor och sortera i olika kategorier utifrån frågeställningar kring mikrobiologi.

Eukaryoter

Bakterier

Arkéer

Haloarkée

Halofil

Koloni

Steril, sterilisera

Autoklavera

Ympa

Tillväxtkurva

Lagfas

Logfas

Stationärfas

Avdödningsfas

Absorbans

Spektrofotometer

Vesikel

Flagell

Termofil

Temperaturoptimum

Optimum för salthalt

Saltdamm/saltsjö

Kemotaxi

Fototaxi

Medium

Agar

Ympnål eller platinös

Patogen

Faskontrast

Immersionsolja



Odlingsanvisningar

Medium för odling av Halobacterium:

Natriumklorid	250 g
Magnesiumsulfat, heptahydrat	20 g
Trinatriumcitrat, dihydrat	3 g
Kaliumklorid	2 g
Hydrolyserat kasein	5 g
Jästextrakt	5 g

Tillsätt avjoniserat vatten så slutvolymen uppgår till 1 liter.

Justera pH till 7,2 med antingen 3 M NaOH eller koncentrerad saltsyra.

Till fast medium sätts 20g agar per liter.

Optimumtemperatur: 40-42°C. Tid för tillväxt på fast eller flytande medium: 1-2 veckor.
För optimal tillväxt av flytande kulturer används skakvattenbad med 40-42°C.

Resurscentrum kommer att under en begränsad tid erbjuda skolor att inköpa plattor med *Halobacterium* och eventuellt portionsförpackat medum. Kontakta info@bioresurs.uu.se för mer information.

Referenser

Inquiry-driven Teaching & Learning the Archaeal Microorganism *Halobacterium* NRC-1.
Priya Dassarma et al. The American Biology Teacher. 78(1): 7-13. 2016.
www.bioone.org/doi/full/10.1525/abt.2016.78.1.7

Brock Biology of Micororganisms. M. Madigan. 2014. Pearson förlag