



På bilden har *E.coli* odlats upp på en agarplatta tillsammans med 4 olika livsmedel. Övan till vänster har ett blåbär placerats och bredvid ett lingon, båda dessa har hämrat tillväxten av bakterier. Nere till vänster har ett filterpapper dränkt i citronsaft vilket också påverkat tillväxten. Nere till höger har ett torkat enbär placerats men inte påverkat bakterietillväxten. Ett tips är dock att dela eller mosa torra livsmedel för att få bättre kontakt mot agarytan.

Foto: Bioresurs

# Antibakteriella ämnen

## Bakgrund

Växter, djur och människor utsätts hela tiden för bakterier och andra mikroorganismer som potentiellt kan orsaka sjukdomar. Vårt eget immunsystem har till uppgift att skydda oss från bl.a. främmande mikroorganismer. Det är ett komplicerat system som består av många olika komponenter såsom antikroppar, makrofager, granulocyter och flera andra celler som på olika sätt samspelar för att känna igen och oskadliggöra främmande inkräktare. Växter och svampar har inte ett immunförsvar som fungerar på samma sätt som människan eller andra djur, men de måste också kunna skydda sig från skadliga mikroorganismer och bildar därför giftiga ämnen som skydd. Till och med mikroorganismerna själva lever i konkurrens med varandra och utsöndrar giftiga ämnen för att överleva.

Det finns många olika ämnen som kan hämma tillväxten eller döda mikroorganismer. Det kan vara olika naturliga ämnen som bildas av till exempel vitlök eller ingefära, men också kemikalier eller olika desinfektionsmedel. I barrskogens förna, bildar både svampar och bakterier antibakteriella ämnen för att försvara sig mot andra mikroorganismer.

För att testa om ett ämne har någon påverkan på bakteriers tillväxt sprids i det här försöket en bakteriesuspension ut på en agarplatta. På plattan placeras sedan de ämnen man vill undersöka, t.ex. små filterpapperslappar doppade i olika lösningar eller små bitar av fasta ämnen. En klar zon utan bakterieväxt bildas runt de prover som är giftiga för bakterierna – ju större diameter på hämningszonen, eller avdödningszonen, desto giftigare.

## Säkerhet

- Iakttag god laborativ mikrobiologisk teknik.
- Endast klass 1-bakterier får användas.
- Hälsosofarliga ämnen ska inte användas som testkemikalier.

## Uppgift

Vilka ämnen påverkar bakterietillväxt och till vilken grad?

## Material

- Kulturer av *Micrococcus luteus* och/eller *Escherichia coli* på agarplattor.
- 0,9% NaCl-lösning
- Steril ympnål
- Sterila agarplattor med allsidigt medium (NA eller LB-plattor)
- Steril pipett eller mikropipett med sterila spetsar och/eller Vortex
- Filtrerpapperslappar uttagna med hålslag
- Steril pincett
- Förslag på metalljonlösningar (0,01- 0,2 M): T.ex. kopparklorid ( $\text{CuCl}_2$ ), aluminiumklorid ( $\text{AlCl}_3$ ), järnklorid ( $\text{FeCl}_3$ ), zinkklorid ( $\text{ZnCl}_2$ ).
- Förslag på övriga lösningar: T.ex. desinfektionsmedel eller hygienprodukter.
- Förslag på fasta ämnen: T.ex. kryddor (färska eller i pulverform), vitlök, gul lök, ingefära, salt, peppar, socker.
- Jord från barrskog. Hämta prov från råhumusskiktet i en barrskog. Använd rena redskap och fyll en ren plastpåse med prov. Ta inte i humusmaterialet med händerna.
- Förslag på halvfasta ämnen: T.ex. blåbär, honung.
- Sterila tops, med långt skaft
- Värmeskåp, (37 °C)
- 70-procentig etanol

## Utförande

1. Tvätta händerna med tvål och vatten.
2. Torka av bänkytan med 70% spritlösning.
3. Överför med en steril ympnål 3-4 bakteriekolonier från din bakterieodling till ett eppendorfrör med 0,5 ml steril 0,9% NaCl-lösning. Bakteriesuspensionen ska bli grumlig. Det är mycket viktigt att bakterierna slammas upp ordentligt, använd en mikropipett med steril spets för att pumpa upp och ner några gånger eller använd en Vortexapparat för att skaka röret om det behövs.
4. Doppa en tops i bakteriesuspensionen och stryk ut bakterierna på plattan med näringsagar. Sprid ut bakteriesuspensionen med bomullspinnen TÄTT på en ny agarplatta:
  - a. Börja med att stryka ett kors diagonalt över plattan
  - b. Stryk tätt på översta halvan av plattan
  - c. Vänd 90 ° och stryk över den nu övre halvan
  - d. Vänd 90 ° och stryk över den nu övre halvan
  - e. Vänd 90 ° och stryk över den nu övre halvan
5. Vänd på plattan och ha locket mot bänken. Märk plattan med ditt namn på sidan av petriskålen eller på undersidan vid kanten. Dela in plattan genom att dra streck på undersidan med pennan och markera vad du har tänkt att testa i varje del. Ungefär 3-4 saker är lämpliga att testa på en platta.
6. Följande tre metoder används beroende på vilket ämne som testas:
  - a) Olika lösningar kan testas genom att små runda filtrerpapperslappar, som tagits ut med hålslag, doppas i testlösningar. Lapparna placeras sedan på agarytan med de utstrukna bakterierna. Använd steril preparernål eller pincett 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 så lika som möjligt.

b) Använd en avklippt droppipett av plast eller en steriliserad korkborr och ta ut brunnar i agarskiktet. Brunnarna kan sedan fyllas med pulver eller lösningar.

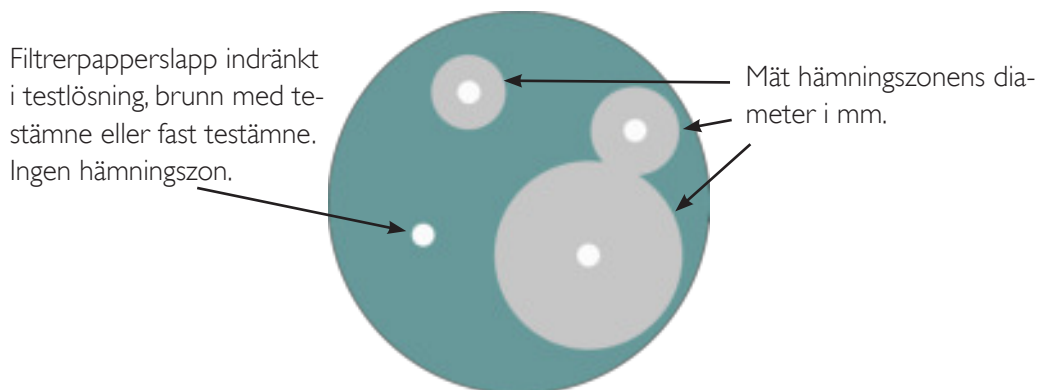
c) Bitar av fasta ämnen kan placeras direkt på ytan.

7. Inkubera plattorna i 37 °C över natt. Håll plattorna rättvända, d.v.s med locket uppåt. Lägg plattorna efter inkuberingen i plastpåse eller plasta in med parafilm för att förhindra uttorkning och placera i kylskåp (görs av läraren) tills avläsning av resultatet.

## Analys av resultat

En klar zon utan bakterietillväxt runt det testade ämnet visar att det är giftigt för bakterien. Om det bildats en klar zon runt det testade ämnet kallas det för en hämningszon – ju större diameter på denna hämningszon, eller avdödningszon, desto giftigare är ämnet för bakterien (förutsatt att diffusionshastigheten i agar för de olika ämnena är jämförbar).

Lägg den stängda agarplattan med undersidan/agarsidan mot dig och locket nedåt mot bänken. Hämningszonens diameter mäts med ett skjutmått (mm) och mäts som diametern av den hämmade zonen. Om ingen hämningszon finns (d.v.s att bakterierna har växt helt intill) så anges det som diametern 0 mm. Mät diametern på hämningszonen och jämför de olika ämnen som du har testat och till vilken grad de har påverkat bakterietillväxten.



## Mikrobiella medier

Odling av bakterier görs i flytande medier eller på agarplattor med näring tillsatt till agarn. I näringsmedier ingår en blandning av buljong, salt, peptider och jäst. Bakterierarter är anpassade för olika miljöer och växer mer eller mindre bra i olika odlingsmedier. Vissa medier är anpassade för att speciellt selektera fram särskilda bakteriearter. NA och LB-medier är breda och passar många olika sorters bakterier. NB (Nutrient broth) är ett flytande medium som när det blandas med agar kallas NA (Nutrient agar). LB (Luria broth) kan vara flytande medium eller fast om det innehåller agar (LB-plattor).

## Tips till läraren

- Som alternativ kan punkt 3 i utförandet förberedas genom att en bakteriesuspension odlas upp i flytande näringslösning över natten. Ta några bakteriekolonier från en agarplatta med hjälp av en steril ympnål och slammas upp i rör med cirka 10 cm<sup>3</sup> NB. Låt kulturen växa över natten i värmeskåp (ca 37 °C)
- Denna laboration och andra laborationer inom mikrobiologi hittar du på Bioresurs hemsida: <https://bioresurs.uu.se>, välj Resurser och Mikrobiologi. Här hittar du även instruktioner som beskriver mikrobiologiska arbetsmetoder.
- Bioresurs har tagit fram säkerhetsanvisningar för arbete med mikroorganismer i skolan: <https://bioresurs.uu.se/resurser/sakerhet-och-risker/sakerhet-mikroorganismer/>