

Material och metoder vid mikrobiologiskt arbete



En sammanställning över material och metoder vid mikrobiologiskt arbete, från Nationellt resurscentrum för biologiundervisning. Innehållet är en bearbetning av Helix laborationspärm (Studentlitteratur, 2004). Se också dokumentet "Säkerhetsanvisningar för laborationer med mikroorganismer", som finns på Bioresurs webbplats, www.bioresurs.uu.se, tillsammans med ytterligare information om laborationer med mikroorganismer.



UPPSALA
UNIVERSITET

Innehåll

| | |
|---|-----------|
| 1. Utrustning vid arbete med mikroorganismer | 3 |
| 1.1 Exempel på lämplig utrustning | |
| 1.2 Beskrivning av materiel | |
| 2. Att arbeta sterilt | 6 |
| 2.1 Steriliseringsmetoder | |
| 2.2 Arbetet avslutas | |
| 3. Bakteriestammar lämpliga för skolan | 8 |
| 3.1 Kort beskrivning av bakteriearter | |
| 3.2 Bakterier från naturliga isolat och GMM | |
| 3.3 Förvaring av bakteriestammar | |
| 4. Beredning av medier | 9 |
| 4.1 Säkerhet | |
| 4.2 Materiel | |
| 4.3 Utförande | |
| 4.5 Gjutning av agarplattor | |
| 5. Renodling | 11 |
| 5.1 Säkerhet | |
| 5.2 Materiel | |
| 5.3 Utförande | |
| 5.4 Renodling från en blandning av bakterier | |
| 6. Spädningsserier | 13 |
| 6.1 Säkerhet | |
| 6.2 Materiel | |
| 6.3 Utförande | |
| 6.4 Resultat och utvärdering | |
| 6.4.1 Räkning av bakteriekolonier | |
| 6.4.2 Mätning av absorptions | |

1. Utrustning vid arbete med mikroorganismer

Vid arbete med mikroorganismer behövs, förutom den utrustning som normalt finns i en laborationssal, viss utrustning enligt nedan.

1.1 Exempel på lämplig utrustning

- Medium, t.ex. Nutrient agar (NA) och Nutrien broth (NB),
- Etanol (70%-ig eller evetueellt T-sprit),
- Virkon, (desinfektionsmedel)
- Petriskålar,
- Glaspipetter,
- Automatpipetter med pipettspetsar,
- Ympnål/platinös,
- Rackla,
- Eppendorfrör,
- Preparatrör (raka provrör utan droppkant med tillhörande hylsor),
- Provrör med skruvlock,
- Bomullstops (helst med långt skaft),
- Tandpetare,
- E-kolvar,
- Autoklaverbar tejp,
- Avfallspåsar som tål autoklivering,
- Autoklav,
- Skakbord, skakvattenbad,
- Vortex-apparat,
- Värmeskåp,
- Vattenbad,
- Spektrofotometer.

1.2 Beskrivning av material

- **Nutrient agar (NA)**, **Nutrient broth (NB)** och **Lysogeny broth (LB)** är bakteriologiska substrat som de flesta bakterier växer på. (se avsnitt om medier senare i kapitlet)
- **Etanol 70%** används för desinfektion av t.ex. bänkytor, 95% vid sterilisering av utrustning som t.ex. racklor eller ympnålar.
- **Virkon** används för desinfektion av bakteriesuspensioner.
- **Petriskålar** används till fast medium. Vanligen används sterila petriskålar av engångstyp. Det går åt cirka 15-20 cm³ agarlösning till en petriskål med diametern 9 cm. Om bakterien ska förvaras en längre tid (månader) kan agarplattor med ett tjockare lager av näringslösning gjutas. Agarplattor inkuberas upp och ned för att förhindra att kondens från locket droppar ned på agarytan.
- **Glaspipetter** med en utvidgning i övre delen där en bomullspropp placerats, är speciellt lämpade för mikrobiologiskt arbete. Bomullsproppen hindrar bakterier från luften att kontaminera en lösning samtidigt som proppen hindrar bakterier att av misstag kontaminera en pipettfyllare.
- **Automatpipetter med pipettspetsar** kan användas i stället för glaspipetter. Pipettspetsar köps antingen sterila eller autoklaveras före användandet.
- **Ympnålar/platinöser** används för att överföra bakteriekolonier från agarplattor eller för att flytta en ögla bakteriesuspension till nytt odlingssubstrat. Det finns både engångsympnålar och ympnålar med metalltråd som återanvänds.
- En **rackla** används för att sprida ut bakteriesuspension över en agaryta. Racklan kan tillverkas av en glasstav som böjs i en gasollåga. Racklan steriliseras med flambering genom att den doppas i 95-procentig etanol, varpå etanolen antänds och får brinna upp. Racklan är då steril. Racklan måste svalna innan den används. Bomullstops kan i många fall ersätta rackla.



flaska med odlingsmedium



agarplatta (i petriskål)



mätpipett i glas



automatpipett med pipettspets



ympnål (engångs)



ympnål (metall)



rackla

- **Eppendorfrör** kan autoklaveras och passar för mindre volymer av lösningar.
- Provrör utan kant kallas **preparatrör**. Dessa är lämpliga att använda vid mikrobiologiskt arbete eftersom innehållet kan skyddas med en huv som sitter löst på röret och möjliggör en viss luftväxling.
- **Provrör med skruvlock** är användbara för t.ex. förvaring av mikroorganismer. Provrören fylls i så fall till hälften med näringsagar och autoklaveras. Provrören med den flytande agarlösningen placeras i lutande ställning så att en sned agaryta bildas. En renkultur av bakterier stryks ut på ytan, får tillväxa och röret kan sedan förvaras med åtskruvat lock i rumstemperatur eller i kylskåp.
- **Bomullstops** kan användas för att stryka ut en bakteriesuspension på en agarplatta. Tops med långa träskaft fungerar bäst och kan ersätta en rackla om halten mikroorganismer inte ska beräknas.
- **Tandpetare** kan användas till att hämta bakterier från en enskild koloni.
- **E-kolvar** eller flaskor kan användas till vätskekulturer. För att hindra kontamination kan kolvens öppning täckas med aluminiumfolie, bågare eller bomullspropp.
- **Autoklav** används för sterilisering av lösningar och kärl.
- **Skakbord/skakvattenbad** används för att flytande bakteriekulturer ska få ökad syretillförsel och därmed tillväxa bättre.
- En **vortex-apparat** används för att blanda om innehållet i ett provrör. När t.ex. en spädningsserie görs är det mycket viktigt att lösningarna blandas om.
- Uppodling av bakterier sker vanligen i ett **värmeskåp**, en s.k. **inkubator**, där temperaturen är termostatreglerad. I de flesta fall går det bra att odla bakterier i rumstemperatur, men odlingen kan ta lite längre tid.
- **Spektrofotometer** kan användas för att mäta absorptionsen i t.ex. en bakteriesuspension. En våglängd på ca 550 nm är lämplig vid denna typ av mätning.

eppendorfrör



provrör med skruvlock



bomullstops



E-kolv täckt med aluminiumfolie. Tejprens av autoklavtejp som får en svart rand då den hettats upp (för sterilisering).



2. Att arbeta sterilt

Det finns alltid mikroorganismer i luften, på laborationsbänkar och på utrustning, samt på hår, hud och kläder. Mikroorganismer från omgivningen kan förorena och påverka försöksresultatet. För att något ska vara sterilt krävs att det steriliseras i t.ex. autoklav, värmeskåp eller öppen låga. Material som stått öppet och oskyddat för nedfall från luften kan inte längre betraktas som sterilt.

Arbeta på ett lugnt ställe utan luftdrag eller i en speciell sterilbänk. Börja med att ta av ringar och armband från händerna, tvätta noggrant med tvål och vatten, eventuellt även handdesinfektion, och använd labbrock. Arbetsytan torkas med 70% etanol (eller utspädd T-sprit) innan arbetet börjar, samt efter avslutat arbete. 70% etanol löser upp bakteriernas membraner, vilket 95% etanol inte gör. Tänk på att alkoholbehandling inte räcker för fullständig sterilitet. Steriliserade föremål som läggs på bänken är alltså inte längre sterila. När bänken torkas med 70% etanol, passiviseras och minskas antalet bakterier på arbetsytan, men långt ifrån alla oskadliggörs – och nya kommer ständigt till från omgivningen. (En punktlista som beskriver hur eleverna ska arbeta sterilt hittar du på Bioresurs webbplats.)

Det är viktigt att undvika att medier kontamineras med okända bakterier lika väl som att förhindra att bakterier från odlingar sprids oavsiktligt. Lämna aldrig kulturer öppna utan lock eller annan förslutning.

2.1 Steriliseringsmetoder

1. Det vanligaste sättet att sterilisera material är autoklivering. Vid autoklivering används en autoklav, en slags "tryckkokare", där materialet utsätts för mättad vattenångor under tryck. Autoklivering sker vanligen vid 120 °C och 1 atö (atmosfäriskt övertryck) under 20 minuter (gäller för en liter vätska). (Normalt lufttryck motsvarar 0 atö (ca 100 kPa). Det innebär att 1 atö motsvarar det dubbla lufttrycket (ca 200 kPa).

Det är viktigt att vattenången fyller autoklavbehållaren under autoklivering efter som det inte går att uppnå lika hög temperatur när vattenången är blandad med luft. Allt material som ska autokliveras måste tåla den höga temperaturen (föremål av plast kan smälta i autoklaven).

Vätskor som ska steriliseras hålls i preparatrör, E-kolvar eller flaskor. Kärlen fylls inte till mer än högst 2/3, eftersom det annars är risk för att vätskan kokar över under autoklivering. Lock till flaskor skruvas inte åt helt utan sätts bara på till hälften, så att luftväxling kan ske. Till preparatrören används huvar. Om lock saknas till kärl som ska autokliveras kan aluminiumfolie eller bomullspropp användas istället.

OBS! Följ instruktionerna och säkerhetsbestämmelserna för autoklivering. Öppna aldrig en autoklav innan tryckmätaren visar 0 atö (normalt lufttryck).

2. *Torrsterilisering* görs vid 160–180 °C under 1,5–3 timmar i värmeskåp. Tomma glasvaror av olika slag, som pipetter, glaspetriskålar, E-kolvar och bägare kan steriliseras i värmeskåp. Kärlens öppningar täcks med t.ex. aluminiumfolie och pipetter kan läggas i en speciell metallkyvett eller förpackas i aluminiumfolie.
3. Petriskålar med agarmedium samt kärl med flytande bakteriekulturer ska vara förslutna med någon form av lock och öppnas så kort stund som möjligt. När du tar av ett flasklock eller en preparathuv bör flaskans eller rörets övre kant hastigt rännas av i en gaslåga både före och efter det att material tagits ut från odlingskärl. Öppna rör eller flaskor ska hållas riktade ifrån den som arbetar. Arbeta med lugna rörelser så att luften inte virvlas upp onödigt mycket.
4. En rackla eller föremål av metall kan steriliseras genom flambering. Föremålet doppas då i 95% etanol som sedan omedelbart antänds. Vid flambering av racklan ska endast spriten antändas – om racklan hålls kvar i lågan spricker den. Låt den varma racklan svalna genom att hålla den mot ett sterilt parti av agarytan i en petriskål.

OBS! Se upp så att spriten i kärlet inte antänds. Ha alltid ett lock i beredskap för att kväva eld.

5. Ympnålar steriliseras genom att skaftet (inte övre delen av plast) bränns av hastigt i gas-låga varefter öglan och metalltråden glödgas i lågan. Öglan måste svalna eller kylas av i sterilt medium – i annat fall dör de mikroorganismer som hämtas upp med öglan.
6. Glaspipetter, som är avsedda för sterilt arbete, har en utvidgning överst där en liten bomullstuss placeras för att hindra bakterier att komma in i pipetten. När pipetter stoppats med bomull ränns eventuellt utstickande bomull bort genom att ändarna av pipetterna snabbt förs genom en låga. Pipetter förpackas i aluminiumfolie eller placeras i speciella kyvetter för sterilisering i autoklav eller i värmeskåp.

Pipettspetsar kan autoklaveras men även bomullsproppade, sterila pipettspetsar kan köpas. Det är inte nödvändigt att använda bomullsproppade pipettspetsar, men det förutsätter att automatpipetten/mikropipetten hanteras korrekt. En automatpipett/mikropipett ska aldrig vändas upp och ned.
7. *Joniserande strålning och UV-ljus* kan användas för sterilisering. UV-strålning steriliserar endast ytor, medan joniserande strålning kan tränga in i materialet.
8. *Sterilfiltrering* kan användas för lösningar som inte tål den höga temperaturen under autoklaveringen. Bakterier kan filtreras bort med filter av porstorlek $<0,5 \mu\text{m}$ och lösningen samlas upp i ett sterilt kärl.

2.2 Arbetet avslutas

Efter laborationen tvättas bänken med 70% etanol. Innan du lämnar laboratoriet ska du tvätta händerna med tvål och vatten, och eventuellt handdesinfektion.

Det är inte nödvändigt att avdöda kulturer med kända mikroorganismer från riskklass 1 innan de kastas, eller att desinficera sådant material som varit i kontakt med organismer från riskklass 1. Agarplattor med kända klass-1-organismer samt engångsutrustning kan läggas i dubbla plastpåsar som försluts och sedan kastas i brännbart avfall. Glasvaror som varit i kontakt med organismer från riskklass 1 kan diskas och sköljas som vanligt.

Enklare odlingsförsök av svamp på toalettrullar eller liknande kan förslutas och kastas som brännbart avfall. Enklare försök med möjligt bröd eller frukt i slutna kärl eller påsar kan också kastas som brännbart avfall.

Lösningar med mikroorganismer från riskklass 1 kan sköljas ut i avloppet, så länge det handlar om mindre volymer.

Om det är avfall som innehåller något annat än än riskklass 1-organismer, odling av okända bakterier eller genetiskt modifierande mikroorganismer gäller en mer reglerad avfallshandling. För en mer utförlig beskrivning, läs i dokumentet "*Säkerhetsanvisningar för laborationer med mikroorganismer*" på Bioresurs webbplats (klicka på Säkerhet).

3. Bakteriestammar lämpliga för skolan

Använd enbart bakterier från riskklass 1 i skolan. Fyra vanliga och lämpliga arter i skolan är *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium* och *Bacillus subtilis*.

3.1 Kort beskrivning av bakteriearter

Micrococcus luteus. En grampositiv bakterie, rund i formen och med förmåga att utsöndra enzymer till omgivningen för att bryta ned organiska ämnen (viktig nedbrytare). Arten är obligat aerob och dör vid syrebrist. Hittas i jord, damm, vatten och luft och ingår i normalfloran på människans hud. Kan kolonisera mun och övre luftvägar och har i vissa fall orsakat infektioner på sjukhus hos immunsvaga patienter. Tål torra och salta miljöer utan att bilda sporer.

Escherichia coli finns i nedre delen av tarmen hos nästan alla varmblodiga djurarter, inklusive människa. De orsakar normalt inte sjukdom. Plasmider, d.v.s. cirkulära DNA-molekyler som är fristående från bakteriens övriga genmaterial, är vanliga och viktiga hos *E. coli*. De kan innehålla bl.a. gener som ger resistens mot antibiotika eller förmåga att bilda toxin.

Bacillus megaterium är en stor (dubbelt så stor som *E. coli*) stavformad bakterie som hittas i jord. Arten kan överleva i rätt extrema miljöer så som öken genom att bilda sporer. Den kan överleva både under aeroba och anaeroba förhållanden.

Bacillus subtilis. Vanliga i omgivningen. Grampositiva och aeroba. Överlever som endosporer om miljöns villkor blir dåliga. Sporererna är motståndskraftig mot ogynnsamma förhållanden. I jord kan de överleva minst 100 år.

Läs mer i faktexten *Beskrivning av 4 olika bakteriearter* som finns på Bioresurs hemsida.

3.2 Bakterier från naturliga isolat och GMM

Om mikroorganismer hämtas från naturliga miljöer kommer det oftast med en blandning av en mängd olika arter. Från en sådan blandning vill man kanske isolera en speciell bakterie för att få fram en renkultur. Vid arbete med naturliga isolat finns dock risken att man odlar upp patogena bakterier. Den typen av arbete bör inte göras av elever i skolan eftersom det krävs extra noggrann mikrobiologisk teknik och rutin för att göra det på ett säkert sätt.

3.3 Förvaring av bakteriestammar

Det är lämpligt att göra i ordning flera renkulturer på en gång och att ta fram en ny renkultur inför varje laborationstillfälle. En oanvänd renkultur sparas tills det är dags att göra en ny stamkultur. Jäst- och bakteriestammar hanteras på samma sätt.

Det är viktigt att den som ansvarar för stamkulturen har god vana (avancerad kompetensnivå) vid sterilarbete för att inte riskera att av misstag odla upp okända och eventuellt patogena bakterier.

Bakterier kan förvaras på olika sätt, t.ex. på agarplattor eller i skruvlocksrör i kylskåp, eller i en 50% glycerollösning som fryses in. Bakterier som strukits ut på agarplattor och som förvaras i kylskåp kan överleva i en till flera månader (beroende på vilken art det gäller). Bakteriekulturen står sig ännu bättre om man stryker ut bakterier på s.k. snedagarrör.

Fyll provrör med skruvlock till hälften med NA, autoklavera därefter och låt rören svalna i halvt liggande position så att en sned agaryta bildas. Stryk ut bakterier på agarytan, låt dem tillväxa och förvara sedan snedagarrören i kylskåp med åtskruvat lock.

Bakterier som förvaras infrysta i glycerollösning överlever i flera år. Gör i ordning glycerolrör genom att föra över 0,50 cm³ glycerol till eppendorfrör som täcks med folie. Autoklavera rören. När glycerolen svalnat tillsätts 0,5 cm³ bakteriesuspension. Blanda om glycerol/bakterieblandningen och förvara sedan rören i frysk. Bakterier tas ur röret med pipett eller ympnål/platinös och sprids på platta eller suspenderas i flytande medium.

4. Beredning av medier

4.1 Säkerhet

- Iakttag god laborativ mikrobiologisk teknik.
- Undvik att andas in finfördelat pulver från medierna.
- Följ anvisningarna vid autoklivering. Locken på flaskorna får inte vara åtskruvade vid autokliveringen. Öppna aldrig en autoklav innan tryckmätaren visa 0 atö (samma tryck inne i autoklaven som utanför).

Om plattor ska gjutas vid ett senare tillfälle då agarn har stelnat medför det stora risker att smälta agar i mikrovågsugn – detta får därför endast utföras av läraren. Locket på flaskorna får inte vara åtskruvat under smältningen i mikrougn. Det finns också risk för att fast medium blockerar kärlets öppning vid uppvärmningen och att kärlet därför sprängs. Smält därför agarmediet i intervall och rotera flaskan försiktigt mellan intervallen. Värm endast små volymer agar i mikrovågsugn.

4.2 Material

- Medium (t.ex. Nutrien agar, NA)
- Autoklaverbara flaskor
- Sterila petriskålar
- Autoklav
- Gasbrännare

4.3 Utförande

1. Beräkna hur stor volym medium som går åt. Till varje agarplatta (9 cm i diameter) krävs 15–20 cm³ medium.
2. Om näringsmediet köps färdigt i pulverform, väg upp rätt mängd medium enligt anvisningarna på förpackningen. Väg annars upp de olika ingredienser som ingår i mediet. Blanda med rätt volym avjonat vatten. Flaskorna ska inte fyllas till mer än två tredjedelar med lösning. (Det är inte nödvändigt att koka upp ett agarmedium före autoklaveringen om rätt mängd medium som behövs till varje flaska vägs upp separat.)
3. Autoklavera flaskorna 20 min i 120 °C. Se till att locke inte är åtskruvade under autoklaveringen.
4. Låt mediet svalna i ca 20 minuter i ett vattenbad (50 °C). (Det bildas mycket kondensvatten i petriskålarna om agarlösningen är alltför varm. Om det bildas mycket kondensvatten kan plattorna torkas upp och ned i värmeskåp (37 °C) efter det att mediet stelnat.) Agar stelnar vid 42 °C. Om mediet stelnat kan flaskan värmas i en autoklav eller i en mikrovågsugn.

OBS! Se Säkerhet vid smältning av agar i mikrovågsugn.

4.5 Gjutning av agarplattor

1. Torka av bänkytan med 70-procentig spritlösning.
2. Placera petriskålarna med locket uppåt i rader på labbänken.
3. Tänd gaslågan. Ta av flaskans lock och bränn snabbt av öppningen på flaskan i gaslågan.

4. **OBS!** Om den del medium ska sparas i flaskan gäller det att bibehålla steriliteten och att inte lägga locket på bänken. Locket hålls vänt nedåt med samma hand som du håller petriskålens lock.
5. Lyft lite på locket till petriskålen så att det går att hälla ned agarlösningen, men håll locket över skålen som skydd för bakterier som kan falla ned från luften.
6. Häll i agar så att det precis täcker botten på petriskålen (ca 15–20 cm³). Sätt snabbt på locket. Roter skålen försiktigt i cirklar utan att lyfta den från bordet tills mediet täcker botten.
7. Fortsätt att hälla agar i övriga petriskålar. Bränn av flaskans mynning då och då för att bibehålla steriliteten.
8. Om det bildats bubblor på mediets yta kan du ta bort dessa med hjälp av en gaslåga som förs över agarytan.
9. Låt mediet stelna utan att röra skålarna.
10. Om tiden räcker till, kan du torka plattorna. Vänd dem då upp och ned och låt stå i 37°C över en natt eller längre. Detta gör att agarytan torkar så att kondensationen minskar när plattorna förvaras i kylskåp. Dessutom syns det om någon av plattorna är kontaminerad.
11. Förpacka plattorna i plastpåsar, tejpa igen och förvara dem upp och ned i kylskåp.

5. Renodling

Den metod som beskrivs i laborationen innebär att bakterier successivt späds ut då de sprids ut på en agarplatta. Agarplattorna inkuberas och bakterierna kommer då att dela sig. Separata bakteriekolonier bildas där cellerna hamnat en och en. Ett första steg för att avgöra om kolonierna bildats från samma bakterietyp är att studera koloniernas utseende. Om alla kolonier ser lika ut är det sannolikt att den ursprungliga bakterieodlingen är ren och endast består av en sorts bakterier.



Agarplatta med renutstryk efter inkubation av *Micrococcus luteus*.

5.1 Säkerhet

- Iakttag god laborativ mikrobiologisk teknik.
- Använd endast klass 1-organismer.

5.2 Material

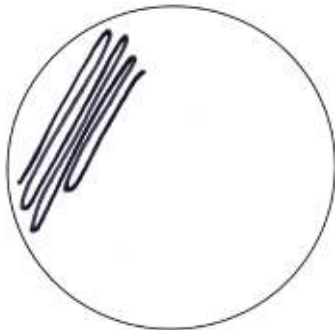
- Agarplattor med allsidig näringsagar, exempelvis Nutrient agar (NA)
- Ympnål/platinös
- Gasolbrännare
- Klass-1-organism, exempelvis *Escherichia coli* K12 och/eller *Micrococcus luteus*.

5.3 Utförande

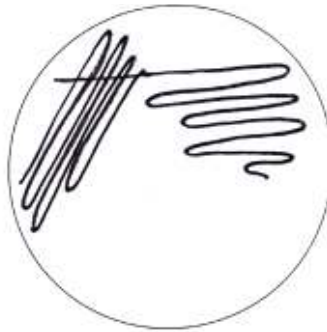
Bakterier hämtas från agarplatta eller preparatrör med suspension:

Sterilisera ympnålen genom att hastigt bränna av metallskaftet och glödga platinaöglan i gasollågan. Håll öglan nästan lodrät i lågan så att hela metalltråden glödgas samtidigt. Låt ympnålen svalna några sekunder. Alternativt används en engångsympnål. Använda den sterila ympnålen och hämta lite bakterier från antingen en koloni på en agarplatta eller ta upp en ögla från en bakteriesuspension.

- **Om bakterier hämtas från agarplatta:** Locket på agarplattan lyfts av under så kort tid som möjligt. Det får inte läggas på bänken utan hålls hela tiden med ena handen (vänster hand för högerhänta). Håll locket som skydd mot nedfall från luften. Se till att inte andas direkt på plattan.
 - **Om bakterier hämtas från ett preparatrör med bakteriesuspension:** Håll röret i vänster hand och ta av locket med höger hand, samma hand som du också håller ympnålen i (beskrivningen gäller för högerhänta). Håll hela tiden locket från preparatröret i handen. Bränn hastigt av mynningen på preparatröret i gaslågan, hämta upp bakterier med den sterila ympnålen.
1. Lyft av locket på en steril agarplatta. Gör ett primärstryk genom att stryka ut bakterierna i ett sicksackmönster över en del av agarytan, se figur 1 på nästa sida. Sätt på locket. Sterilisera ympnål av metall enligt beskrivningen ovan eller släng engångsympnålen i avsedd behållare.
 2. Ta en ny ympnål om du använder engångs. Gör ett sekundärstryk genom att dra ympnålen en gång över utstryk 1 och stryk ut i ett sicksackmönster över en del av den rena agarytan, se figur 2. Sätt på locket. Sterilisera ympnål av metall enligt punkt 3 eller vänd på ympnålen om du använder engångs.
 3. Dra ympnålen en gång över utstryk 2 och gör ett tertiärutstryk i ett sicksackmönster över en del av den rena agarytan, se figur 3. Sätt på locket. Sterilisera ympnål av metall eller släng ympnålen om du använder en steril engångsympnål i avsedd behållare.
 4. Ställ in plattan med locket nedåt i inkubatorn (37 °C) över natt.



Figur 1: Första utstryket.



Figur 2: Andra utstryket.



Figur 3: Enskilda bakteriekolonier har bildats efter inkubation där det tredje utstryket har gjorts.

5.4 Renodling från en blandning av bakterier

Metoden med renutstryk används också för att separera olika slag av bakterier från en blandning. En suspension med en blandning av två olika, kända bakterier kan användas för att visa hur det går till att göra en separation av två bakteriearter. **Fortsätt inte att renodla vidare från okända bakterier eftersom risk finns för att patogena bakterier odlas upp.**

Exempelvis kan en suspension med en blandning av *Escherichia coli* K12 och *Micrococcus luteus* användas.

En sådan suspension tillverkas enklast genom att med hjälp av steril ympnål hämta kolonier av respektive bakterie från plattor och suspendera i näringsbuljong, Nutrient Broth (NB), eller enklast vanligt kranvatten. Gör sedan ett utstryk på en agarplatta enligt ovan.

Om det efter uppodling syns kolonier med olika utseende på agarplattan väljs kolonier av vardera slaget ut som ligger väl åtskilda och stryks ut på sterila agarplattor, se ovan. Slutresultatet ska visa kolonier som ligger väl åtskilda så att det går att avgöra om plattan endast innehåller en bakterieart.

6. Spädningsserier

För att hindra att lösningar kontamineras har en speciell teknik utarbetats för att kunna överföra lösningar mellan olika kärl. Tekniken innebär att flaskor och provrör öppnas så kort stund som möjligt och att föremål som förs ned i lösningarna är sterila. Var uppmärksam på att lösningar som ska vara sterila inte är kontaminerade. Skaka kärlet med lösningen och håll upp det mot ljuset. Om vätskan är grumlig är det ett tecken på att lösningen har kontaminerats. Vätskan ska i så fall autoklaveras eller behandlas kemiskt för att avdöda okända mikroorganismer. Det kan vara en fördel att förvara lösningar i rumstemperatur eftersom en eventuell tillväxt av oönskade mikroorganismer snabbt märks.

6.1 Säkerhet

- Iakttag god laborativ mikrobiologisk teknik.
- Använd endast klass 1-organismer.
- Var uppmärksam så att inte spritlösningen antänds om bakteriesuspensioner ska racklas ut på agarplattor. Ha alltid ett lock tillgängligt för att kväva eld.

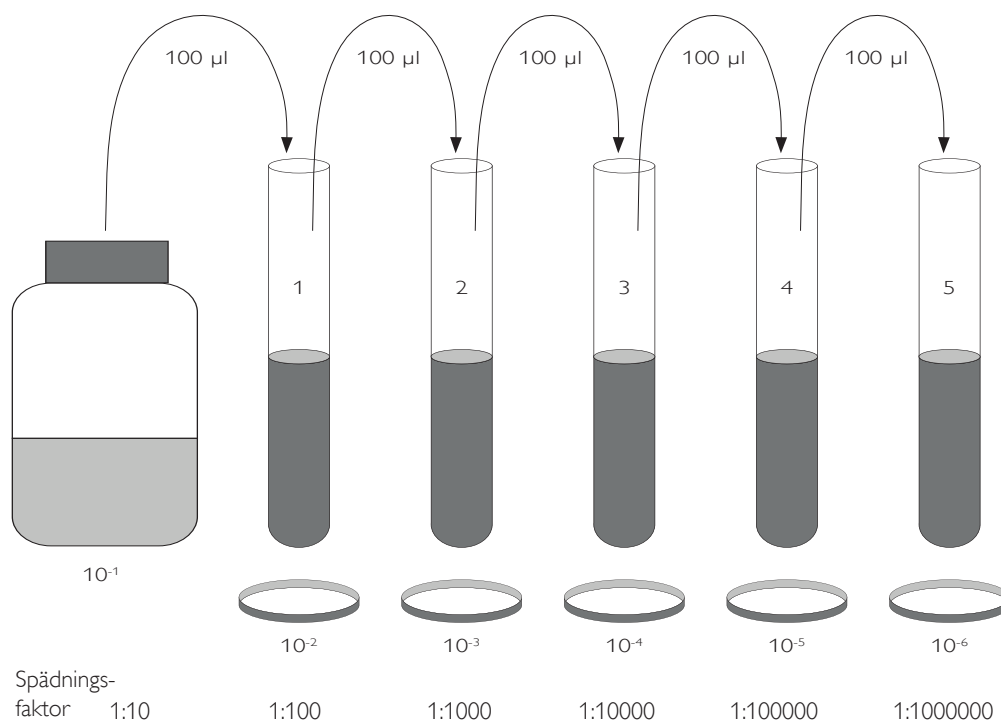
6.2 Material

- Lösning som ska spädas, kan vara från livsmedel (alternativt övernattskultur av t.ex. *E.coli* i NB)
- Preparatrör med steril spädningvätska (9 cm³ i varje rör). Använd 0,9 % NaCl om en bakteriesuspension ska spädas
- Provrörsställ
- Sterila pipetter (1 cm³)
- Pipettfyllare
- Vortexapparat
- Flytande NA-medium eller färdiga NA-plattor (vid utspädning av bakteriesuspension)
- Gasolbrännare (endast vid utspädning av bakteriesuspension)
- (spektrofotometer)

6.3 Utförande

En spädningsserie ska göras där varje steg innebär en utspädning med tio gånger.

1. Ta av huven på det preparatrör med lösning som ska spädas. Håll huven med öppningen nedåt mellan lillfingret och handflatan i samma hand som pipetten hålls.
2. Bränn hastigt av pipetten och halsen på preparatröret i gaslågan.
3. Pipettera upp 1 cm³ vätska.
4. Bränn hastigt av halsen på preparatröret igen och sätt på huven.
5. Ta huven på ett preparatrör med 9 cm³ steril spädningvätska. Håll huven med lillfingret på samma hand som pipetten hålls.
6. Bränn hastigt av halsen på preparatröret i gaslågan.
7. Spruta ned lösningen från pipetten i preparatröret.
8. Bränn hastigt av halsen på preparatröret i gaslågan och sätt på huven.
9. Använd helst en vortexapparat och blanda om innehållet i preparatröret noga.
10. Fortsätt sedan på samma sätt med utspädningen genom att upprepa punkterna 1–9 ovan tills tillräcklig utspädningsgrad uppnåtts (i övningen till spädning 1:1000000).



Spädningsserie i en serie provrör: Spädningen görs från en lösning i en flaska där den ursprungliga lösningen är utspädd 1:10. Den sista spädningen motsvarar en utspädning på 1:1000000 jämfört med den ursprungliga lösningen.

6.4 Resultat och utvärdering

Resultatet av den successiva utspädningen av en bakteriesuspension kan kontrolleras på flera sätt enligt nedan.

6.4.1 Räkning av bakteriekolonier

Tillsätt 0,1 cm³ bakteriesuspension från de olika spädningsstegen och rackla ut på agarplattor. Antalet bakteriekolonier räknas efter inkubering. Alternativt kan 1 cm³ bakteriesuspension från de olika utspädningsstegen överföras till tomma petriskålar. Håll sedan på agarlösning och rotera petriskålen försiktigt så att bakteriesuspension blandas in. Antalet bakteriekolonier räknas efter inkubering.

Agarplattor med mellan 30 och 300 cfu (colony forming units) ger det mest tillförlitliga resultatet. Vid denna halt kan man anta att varje koloni kommer från en bakterie. Vid mer än 300 cfu kan bakterierna ha klumpat ihop sig och vid mindre än 30 cfu är bakteriesuspensionen så utspädd att resultatet inte är tillförlitligt. (Antalet kolonier som är lämpligt att räkna på kan skilja sig åt mellan olika laborationsbeskrivningar.)

Beräkna koncentrationen bakterier i den ursprungliga bakteriesuspensionen genom att ta hänsyn till spädning och ursprunglig volym.

6.4.2 Mätning av absorbans

Absorbansen i bakteriesuspensionen kan mätas med spektrofotometer vid 550 nm. En graf där absorbansen avsätts mot utspädningsgraden blir logaritmisk.