

Rendyrkning og identifikation af bakterier

Mange klassiske mikrobiologiske metoder har til formål at undersøge hvilke mikroorganismer man har i sin prøve.

Det undersøger man gennem rendyrkning og identifikation. Her kan du finde en metode til at rendyrke bakterier og svampe og vejledninger til nogle af de metoder man benytter til identifikation:

- Selektive substrater og indikative substrater
- Morfologisk karakterisering (beskrivelse) af kolonier og celler
- Gramfarvning

I dag benytter man ofte færdige kits til hurtig identifikation af bestemte bakterier på baggrund af deres overfladestoffer. Det gør man vha. antistofreaktioner. Her gælder det dog nogle af de klassiske metoder.

Laboratoriesikkerhed

Normalt arbejder man kun med apatogene, dvs. ikke-sygdomsfremkaldende mikroorganismer i undervisningen. Der er imidlertid altid en risiko for at opformere patogener, sygdomsfremkaldende, bakterier sammen med de ønskede bakterier. Ud over de sædvanlige regler for færdsel i laboratoriet skal man derfor tage visse ekstra forholdsregler i det mikrobiologiske laboratorium:

- Hold orden på arbejdspladsen
- Hold god hygiejne, vask hænder, hold arbejdspladsen ren, rengør og desinficér bordet efter arbejdet og vask alle instrumenter og glasvarer grundigt op (desinficér evt.)
- Spildes mikroorganismer, skal de kontaminerede steder rengøres og desinficeres
- Ved arbejde med visse mikroorganismer kan der være særlige regler mht. bortskaffelse

Derudover skal følgende generelle regler pointeres:

- Bær kittel
- Indtagelse af mad og drikke samt rygning er strengt forbudt

Forberedelse af substrater

Bakterier kan vokse på et substrat som indeholder en passende blanding af næringsstoffer. Substratet kan være flydende eller fast.

Et fast substrat indeholder typisk en næringsbouillon, ligesom det flydende, men er tilsat agar, så det stivner til en gelé. Dyrkningen på faste substrater foregår typisk på agarplader i petriskåle. Bakterierne kan indstøbes i agarpladen eller dyrkes på overfladen.

De mest anvendte *basis-substrater* til bakterier er Lysogeny Broth (LB)-medium, et flydende medium som består af gærekstrakt, glucose og pepton, dvs. mælkeprotein fordøjet med enzym.

Plate Count Agar, PCA, er et fast substrat som desuden er tilsat agar. Substratet kan beriges med bestemte næringsstoffer. Vil man fx dyrke mælkesyrebakterier, kan man tilsætte 1,0 g skummetmælkpulver til substratet.

De mest anvendte basissubstrater til svampe er maltekstrakt og maltekstrakt-agar. De består af ølurt, evt. tilsat agar.

Selektive substrater er substrater som fx er tilsat stoffer som kun ganske få bakterier kan tåle. De bruges til at udvælge eller selektere de pågældende bakterier ved dyrkningen. Et eksempel er galdeagar som er tilsat galde, og som derfor kan benyttes til at re dyrke tarmbakterier, særligt colibakterier. Selektive substrater kan også mangle bestemte næringsstoffer, og det selektive princip er at kun de mikroorganismer som selv kan danne dette næringsstof, udvælges. Et eksempel på dette kan ses i Bioteknologi 2, side 81.

Identifikative substrater bruges til at påvise bestemte bakterier. De kan fx være tilsat farveindikatorer som påviser bestemte processer i bakteriens stofskifte. Et eksempel er rødviolet galdeagar (RVG), som bruges til at påvise colibakterier. Ud over det selektive princip med galde, indeholder substratet en pH-indikator som danner rødfarvning omkring kolonier af colibakterier, fordi de danner organiske syrer ved gæring.

Klargøring af substrater

1. Ingredienserne opløses i vand i en kolbe. Følg anvisningerne på pakningen eller i opskriften.
2. Kolben opvarmes på en varmeplade under omrøring, til væsken bliver klar (kræver lidt tålmodighed).
3. Indholdet fordeles på bluecap-flasker eller i reagensglas med Cap-O-Tests. Fordel hellere på flere små flasker end få store. Dels er det lettere at anbringe små flasker i mikroovnen senere når substratet skal smeltes, dels kan man så gemme de uåbnede flasker til en anden gang.
4. Forsyn flaskerne med autoklavetape.
5. Hæld 1 L demineraliseret vand i bunden af autoklaven.
6. Anbring substraterne i autoklaven uden at de står i spænd.
7. Luk autoklaven og autoklavér efter anvisningerne.
8. Efter autoklaveringen forsynes flaskerne med etiketter (substrattype, dato, navn) og gemmes til forsøget.
9. Inden brug skal faste substrater smeltes. Det gøres i vandbad med kogende vand, eller alternativt i mikroovn (hold øje første gang og notér effekt og tid til senere).
10. Nogle ingredienser tåler ikke kogning eller autoklavering. De tilsættes efterfølgende ved at de suges op i en engangssprøjte. Sprøjten forsynes med et sterilfilter, og de tilsættes substratet.
11. Flambér flaskemundingen og låget, og luk flasken igen.

Støbning af agarplader

1. Placér petriskålene i en række langs bordkanten.
2. Tænd gasblusset.
3. Smelt agaren i flasken.
4. Hæld ca. 25 mL substrat i hver petriskål (ca. 2 mm agar):
 - a. Løft låget på skrå over petriskålen med venstre hånd.
 - b. Hæld agar i med højre hånd og fordel den i skålen ved at dreje den let rundt.
 - c. Læg låget på skrå på skålen, indtil agaren er størknet.
 - d. Læg lågene på pladerne, stabl dem med bunden opad, i passende bundter (så evt. dug samles i låget).
 - e. For hver femte petriskål flamberes flaskens munding.
5. Inkubér pladerne ved stuetemperatur til næste dag.
6. Sortér forurenede plader fra (dem hvor der vokser kolonier frem).
7. Bundt pladerne med bunden opad, sæt tape om og opbevar dem i en plasticpose i køleskab.

Rendyrkning af bakterier

Formål

At rendyrke bakteriearter ud fra en blandingskultur.

Baggrund

Princippet i rendyrkning er vist i Bioteknologi 2, figur 3, side 9.
Forklar figuren for hinanden.

Materialer

- Blandingskulturer fx med de tre bakterietyper *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* og *Micrococcus luteus*.
- Podenål
- Bunsenbrænder
- 2 petriskåle med PCA (Plate Count Agar)
- Varmeskab

Fremgangsmåde i oversigt

Læs om laboratoriesikkerhed inden du begynder!

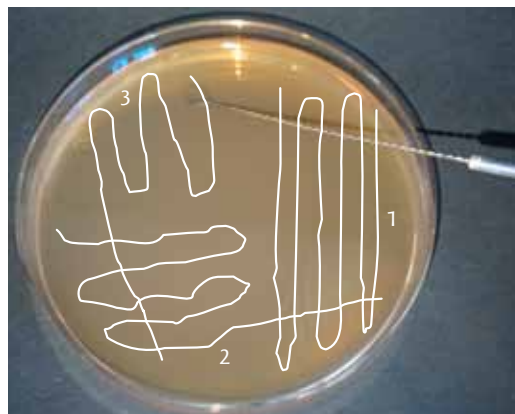
Trin i rendyrkningen:

1. Blandingskultur med tre bakteriekulturer udleveres.
2. Blandingskulturen udstryges på to agarplader.
3. Agarpladerne inkuberes i varmeskab ved 37 °C i 48 timer, hvorefter de gemmes i køleskab til næste time.
4. Enkeltliggende kolonier af de tre bakterietyper beskrives og identificeres.

Hvis der ikke findes enkeltliggende kolonier af de tre typer, skal der laves endnu et rendyrkningstrin. Det udføres på samme måde.

Udstrygning (trin 2)

1. Podenålen holdes med højre hånd.
2. Glød podenålens metalnål og flambér dens skaft.
3. Hold blandingskulturen i venstre hånd.
4. Tag låget af blandingskulturen med højre hånds lillefinger og hold det der.
5. Stik nålen ned i kulturen så der følger en dråbe med op i nålens øje.
6. Flambér glassets munding og sæt låget på. Anbring kulturen i holderen.
7. Løft låget af petriskålen med venstre hånd så skålen samtidig kan drejes med ringfingeren.
8. Spred bakteriekulturen på pladen gennem tre tag med nålen, se figur 1. Spredningen skal sikre, at der er forskellige koncentrationer af bakterier forskellige steder på pladen, så man kan finde enkeltliggende kolonier.
9. Glød og flambér nålen.
10. Inkubér petriskålen med bunden opad i varmeskab.



Figur 1. Udstrygning af bakteriekultur i tre omgange.

Identifikation af bakterier

Formål

At afprøve metoder til at beskrive og identificere bakterier.

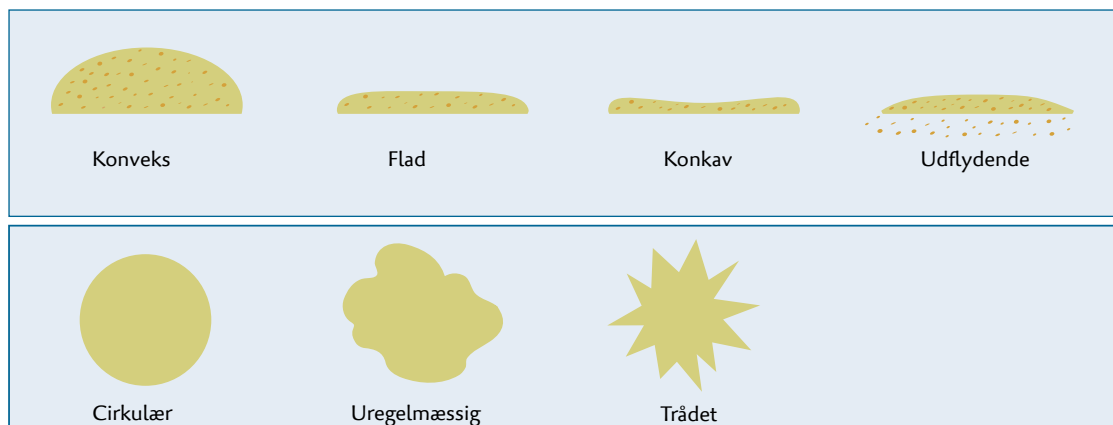
Baggrund

Det er let at kende forskel på en ko og en svale. De ser forskellige ud. Man siger også at de kan adskilles på deres morfologi (dvs. den ydre form). Selv om to bakterietyper kan være endnu mere forskellige fra hinanden rent genetisk, kan vi som regel ikke umiddelbart se forskel på dem, – de er alt for små. Det er imidlertid ofte nødvendigt at identificere bakterier. Det kan det fx være for at stille en præcis diagnose i forbindelse med en infektionssygdom, for at undersøge levnedsmidler for deres indhold af specielle sygdomsfremkaldende bakterier, eller fordi man ønsker at bruge en bestemt bakterie i forbindelse med en produktion.

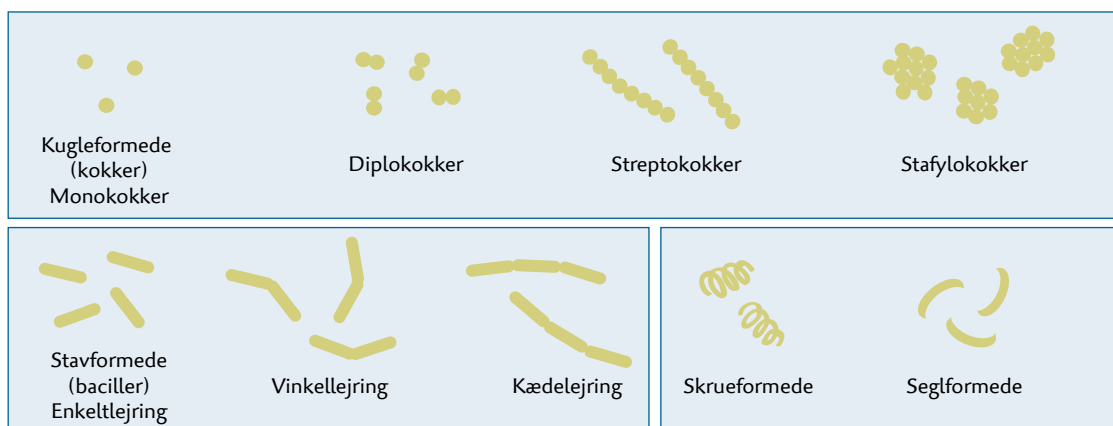
Når man skal identificere bakterier, gør man det normalt på baggrund af en række egenskaber som kan undersøges enten direkte, i mikroskop eller gennem forskellige laborietests.

Vi skal i denne undersøgelse identificere bakterier ud fra deres morfologiske egenskaber, dvs. koloniernes eller bakteriecellernes udseende, se figur 2 og 3, og gramfarvning. Find information om hvor gramfarvningen stammer fra og hvad den kan bruges til.

Før man kan identificere en bakterie, er det vigtigt at man gennem en renyrkning har fået den adskilt fra andre bakterier som den forekommer sammen med. Derfor starter identifikationen med at renyrke tre bakterietyper fra en udleveret blandingskultur. Derefter opformerer vi renyrkulturene, og til sidst beskriver og identificerer vi de tre bakterie-typer.



Figur 2. Kolonityper. Ud over koloniens form angiver man dens farve og om overfladen er tør eller fugtig.



Figur 3. Bakteriecellers form og lejrning.

Materialer

- Agarplader med rendyrkede enkeltliggende kolonier af de tre bakterietyper *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* og *Micrococcus luteus*.
- Mikroskop, objektglas, dækglas
- Krystalviolet-opløsning
- Iod-iod-kalium-opløsning (IJK)
- Safranin-opløsning
- Farvekar og filterpapir
- Stinkskaab eller punktudsugning

Fremgangsmåde i oversigt

Læs om laboratoriesikkerhed inden du begynder!

1. Enkeltliggende kolonier af de tre bakterietyper tegnes, fotograferes og beskrives ud fra figur 2.
2. Bakterier fra de enkelte kolonier mikroskoperes. Det er nødvendigt at bruge olieimmersion ved 1000x forstørrelse.
3. Cellerne tegnes eller fotograferes og beskrives ud fra cellernes form, lejring og evt. bevægelighed. Cellernes form og lejring er vist i figur 3.
Alle cellerne vil flyde med de væskestrømninger der er under dækglasset. Det er ikke fordi de er bevægelige. Bevægelige celler vil af og til bevæge sig imod strømmen.
4. Bakterier farves med gramfarvning, se vejledningen nedenfor.
5. De beskrevne bakterier identificeres ud fra figur 5 (se længere nede).

Gramfarvning

Ved gramfarvning kan man inddеле bakterierne i gram-positive (gram+) og gram-negative (gram-) bakterier. Gram+ bakterier vil fremstå som blåsorte mens gram- vil fremstå rødlige. Forskellen skyldes at bakteriernes cellevægge er forskellige i opbygning. Ved farvningen trænger to mindre farvestoffer, krystalviolet og iod-iodkalium ind i cellen og danner et kompleks, som kun kan udvaskes af gram- bakterier. Herefter farves cellerne røde, og gram- bakterier vil derfor få denne farve.

1. Stryk cellekultur ud over et objektglas med en glødet podenål.
2. Fiksér cellerne på objektglasset ved at lade cellekulturen tørre ind over en gasflamme. Hold objektglasset med en træklemme.
3. Læg objektglasset over farveskålen.
4. Dæk præparatet med krystalviolet i 1 min.
5. Skyl krystalviolet af med iod-iodkalium og lad præparatet være dækket af dette i 1 minut.
6. Skyl farvestofferne af med 100 % ethanol.
7. Skyl efter med demineraliseret vand.
8. Dæk præparatet med safranin i 1 min.
9. Skyl af med demineraliseret vand.
10. Dup vand af præparatet og objektglasset og mikroskopér.
Vurdér resultatet.

Resultater

De tre bakterietyper beskrives i resultatskemaet i figur 4. Supplér med tegninger og fotos.

	Type 1	Type 2	Type 3
Koloniernes vækst på agarplade			
Diameter (mm)			
Form og rand			
Tværsnit			
Farve og gennemsigtighed			
Fasthæftning, struktur og overflade			
Mikroskopisk beskrivelse af bakterieceller			
Gramfarvning			
Form og lejrning			
Bevægelighed			

Figur 4. Resultatskema.

Diskussion

1. Sammenlign dine resultater med bakteriernes karakteristika i figur 5.
2. Hvad identificerer du de tre bakterietyper som, når du sammenligner dine resultater med figur 5?
3. Var der overensstemmelse mellem dine resultater og figur 5?
4. Var der uoverensstemmelse mellem dine resultater og figur 5?
5. Hvad kan det skyldes? – Inddrag evt. fejlkilder i diskussionen.
6. Hvilke resultater vil du lægge mest vægt på?
7. Har du forslag til forbedring af metoden?
8. Hvad kan man bruge identifikationsmetoden til?

	<i>Eschericia coli</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Koloniernes vækst på agarplade			
Diameter (mm)	0,5-1	0,5-1	2-4
Form og rand	Uregelmæssig, glat	Regelmæssig, glat	Uregelmæssig, takket
Tværsnit	Konveks	Konveks	Flad
Farve og gennemskinnelighed	Hvidgrå, noget gennemskinnelig	Gyldengul, ugennemskinnelig	Hvidgrå, ugennemskinnelig
Fasthæftning, struktur og overflade	Halvfed	Halvfed	Fast og tør
Mikroskopisk beskrivelse af bakterieceller			
Gramfarvning	Gram-	Gram+	Gram+
Form og lejrning	Korte stave	Kokker	Stave
Bevægelighed	Bevægelig	Ubevægelig	Bevægelig

Figur 5. Sammenligningsskema for bakterietyper.

Kilder

Figur 5: H. Thouggaard m.fl.: Elementær mikrobiologi. Laboratorieteknik, 3. udgave, Teknisk Forlag, 1989.