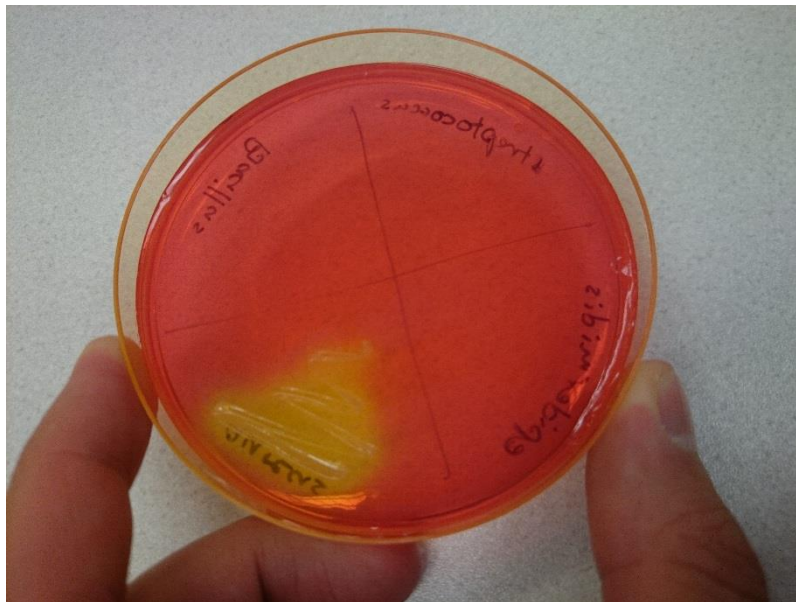


Mikrobiologi vt2019

NBIA23, 91BI21, 92BI21,
91BI27, 92BI27

Laborationskompendium



Innehåll	Sid
Laborationsplanering	2
Övergripande kursmål	3
Mikrobiologisk arbetsrutin	4
Laboration 1	5
Laboration 2	8
Laboration 3	14
Laboration 4	21
Laboration 5	27

Laborationsplanering

För tid och lokal se TimeEdit.

Laborationstillfälle	Att göra	Läs mer på sidan
Introduktion	Mikrobiologisk arbetsrutin (Sterilteknik)	4
Laboration 1	1.1 Isoleringsutstryk	5
	1.2 Egen <i>Staph. aureus</i> del 1 <i>Isoleringsutstryk</i>	6
Laboration 2	2.1 Gramfärgning	8
	2.2 Avläsning av isoleringsutstryk	10
	2.3 Egen <i>Staph. aureus</i> del 2 <i>Avläsning av isoleringsutstryk</i> <i>Omsättning</i> <i>Gramfärgning</i>	10
Laboration 3	3.1 Diagnostisering av bakterier. Produktion av extracellulära enzymer samt skillnader i enzymaktivitet	14
	3.2 Egen <i>Staph. aureus</i> del 3 <i>Koagulas-test</i>	17
Laboration 4	4.1 Viable count	21
	4.2 Egen <i>Staph. aureus</i> del 4 <i>Antibiotikaresistensbestämning</i> <i>Avläsning Koagulas-test</i>	22
	4.3 Avläsning diagnostisering (3.1)	23
Laboration 5	5.1 Avläsning Viable count (4.1)	27
	5.2 Egen <i>Staph. aureus</i> del 5 <i>Avläsning Antibiotikaresistensbestämning (4.2)</i>	27
	5.3 Teoretisk laboration – konjugation	28
	Utförande	29
	Resultat och analys	30
5.4 Städning	30	

Övergripande kursmål

Kursens mål är att ge grundläggande teoretiska och praktiska kunskaper i mikrobiologi. Efter genomgången kurs ska studenten kunna:

- beskriva uppbyggnad, metabolism, näringskrav och tillväxt hos de prokaryota cellerna: bakterier, arkéer
- redogöra för uppbyggnad och livscyklar hos virus
- redogöra för genetiskt utbyte mellan bakterier
- redogöra för prokaryota cellernas ekologi, inkluderande förståelse för deras betydelse såväl i naturen som inom medicin
- använda grundläggande mikrobiologiskt tekniker för odling, diagnostik och fysiologi

Examination av laborationer

Närvaro vid samtliga laborationer är ett krav för att få godkänt på kursen.

Som uppföljning och utveckling av laborativa färdigheter och labsäkerhet kommer laboration 4 genomföras som en "spotterlab". Efter detta moment ska varje enskild student skicka in sitt spotter-protokoll med reflektioner via LISAM. Mer information samt en mall för detta finns tillgänglig på LISAM.

Laboration 1-3 kommer följas upp med ett självvärtande quiz på LISAM. Detta quiz kommer att finnas tillgängligt lagom till att laboration 3 avslutats.

I anslutning till det sista labbtillfället kommer vi även följa upp laborationsserien "Egen Staph. aureus" genom muntliga redovisningar i mindre grupper. Gruppen skickar därefter in en kort reflektion via Lisam.

Labbkursen avslutas med ytterligare ett quiz där både teori och resultat/iakttagelser från alla laborationerna behandlas. För därför anteckningar under laborationerna, och se också till att ni har koll på bakomliggande teori.

OBS! Ingen skriftlig laborationsrapport. Däremot fungerar laborationerna som ett komplement till föreläsningarna och kan därmed bidra till förståelse av teorin som presenteras där. Det innebär att även de kunskaper som erhålls på labb kan komma till nytta vid den skriftliga tentamen.

Mikrobiologisk arbetsrutin

Aseptisk miljö

För att minska föroreningsgraden kring arbetsplatsen tvättas bordsytan med desinfektionsmedel. En gaslåga används för att bränna bort material på platinaöglan (används för odling av bakterier) och sterilisera arbetsinstrumentet (röröppningar, ympnålar mm).

Märkning

Allt försöksmateriel (agarplattor, rör, objekt-glas) måste noggrant märkas med vederbörandes namn/gruppnummer, datum samt övriga data, som kan vara nödvändiga. Varje kursdeltagare måste hålla reda på de försök, som gruppen utfört och var de har placerats. Tänk på att märkningen ska hålla under hela experimentet och inte får störa vid t.ex. avläsningen.

Sterilt arbetsätt

Hur du arbetar sterilt kommer att demonstreras första laborationsdagen. Nedan följer några påminnelser. Om du blir osäker, fråga handledarna.

Vid arbete med platinös av platina, kom ihåg att hela platinöstråden inklusive fästansordningen ska brännas av. Detta åstadkommes bäst genom att hålla platinösen nästan lodrätt i bunsenlågan. Platinösen ska brännas av till glödning och sedan svalna ordentligt före användning.



Pipetter och pasteurpipetter är sterilt förpackade och ska tas ur sina pipettkassetter omedelbart före användning. Man får således inte ta ut en steril pipett och lägga den på bänken och därefter använda den. Man får inte heller stoppa tillbaka en pipett som tagits upp men ännu ej använts, i den sterila kassetten.

Korkförsedda rör, buljonger, agarplattor är också sterila och ska så bevaras tills de inokuleras.

Disk och avfall

All märkning på materiel som ska diskas (alltså inte engångsprodukter) ska tas bort innan det placeras på anvisad plats.

Pasteurpipetter och objektglas slängs i den gula behållaren för infekterat avfall som finns på laborationsbänken.

Graderade glaspipetter ställs i hinken (med spetsen nedåt) som finns på laborationsbänken.

Rör (och deras innehåll) lämnas i plåthinken på diskvagnen. På skruvkorsrören ska locken lossas lite innan! Övrig disk sorteras (infekterad/ej infekterad) enligt anvisningar.

Endast papper som används vid handtvätt kastas i papperskorgarna vid handfaten. Annat torkpapper samt handskar kastas i plastade papperssäckar.

Agarplattor som ska kastas placeras i plastpåsar i den anvisade plastbacken.

Riskbedömning

Riskbedömningar för laborationerna finns i slutet av varje beskrivning för respektive laboration. Genomgång av riskbedömningen sker i början av varje laborationstillfälle.

Laboration 1

1.1 Isoleringsutstryk

En av de vanligaste metoderna för att isolera bakterier är att göra utstryk med steril platinöglå på en agarplatta. Metoden bygger på antagandet att en väl avgränsad koloni härstammar från en enda bakterie. För att öka säkerheten bör man stryka den isolerade kolonin ett par gånger till på agarplatta och testa att den endast ger upphov till en sorts bakterie.

Läs mer!

Medier och labbkulturer, Kapitel 5.5, s 180-183 (14:e Kap 3.2, s 100-102)

Sterilisering/Autoklavering, Kapitel 5.15, s 200-201 (14:e Kap 5.17, s 195-196)



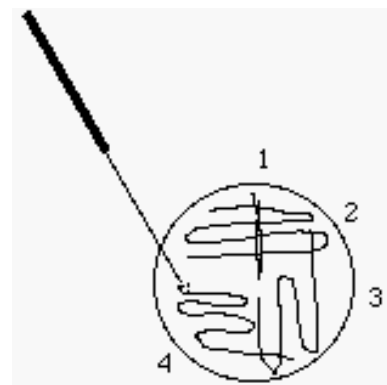
Materiel

bakteriesuspension A (för en okänd blandning bakterier)
Columbiaplatta (1 st/student)
platinös
brännare
värmeskåp, 37°C

Utförande

Varje kursdeltagare övar utstryk från bakteriesuspensionen A på en Columbia-platta.

1. Märk plattorna.
2. Glödga hela platinatråden och för skaftet ett par gånger genom lågan (flampering). Låt tråden svalna.
3. Skruva av locket på röret med bakteriesuspensionen, flampera rörmynningen och doppa platinöglan i suspensionen. Lägg inte ner locket.
4. Flampera rörmynningen och skruva på locket.
5. Stryk med platinösen från kanten mot centrum några gånger fram och tillbaka på en Columbiaplatta (=primärutstryk, utstryk 1 i figur).
6. Glödga platinatråden igen, låt svalna.
7. Gör utstryk nr 2 (se figur 1)
8. Upprepa proceduren med utstryk 3 och 4 enligt figur. Glödga platinatråden mellan varje utstryk!
9. Inkubera i värmeskåp, vid 37°C, över natt. Labbhandledare tar ut ur inkubatorn.



Laboration 1

1.2 Egen *Staphylococcus aureus* – del 1

Isolering

Gula stafylokocker (*Staphylococcus aureus*) är bland våra vanligaste omgivningsbakterier. De flesta barn och vuxna är periodvis bärare av dessa bakterier, vanligen i näsan, men även på andra slemhinnor och på huden. Risken för bärarskap på huden är störst om den är skadad t.ex. av eksem eller småsår. Bärarskap är också vanligare hos sjukvårdspersonal, injektionsmissbrukare, diabetiker och dialyspatienter.

Läs mer!

Staphylococcus aureus, Kapitel 16.6, s 544 (14:e Kap 15.7, s 517-518).

För information om den ut- och invändiga normalfloran, se kap 24.5 777-780 (kap 23.2, s 731-732) och kap 24.3, s775-777 (kap 23.5, s736-738). Och för infektioner, se kap 28.2, s 868-872 (kap 27.2, s 819-821).

Mer information specifikt om infektion av *Staphylococcus aureus* finns på sidorna 937-939 (892-894).

Avsikten med laborationsserien är att:

Undersöka hur stor del av kursdeltagarna som är bärare av *Staphylococcus aureus* i näshålan.

Prova att använda ett selektivt substrat av den typ som används inom den medicinska mikrobiologin för isolering av *S. aureus*.

Renodla en önskad bakterie genom utstryk på en agarplatta med platinös.

Genom några olika tester verifiera att den isolerade bakterien är *S. aureus*.

Testa den isolerade stammen med avseende på antibiotikaresistensmönster enligt "lappmetoden".

Materiel

Chapmanplatta (1 st/student)

Blodagarplatta (1 st/student)

steril 0,9 % NaCl-lösning

platinöser (av platina eller plast; 1 μ l)

brännare

steril bomullspinne(1 st/student)

Utförande

1. Märk en platta av vardera: blod och Chapman per student
2. Fukta en steril bomullspinne i sterilt 0,9 % NaCl. För in bomullspinnen (eller platinös av plast) i näsan och vrid runt några varv.
3. Gör ett primärutstryk med bomullspinnen på en blodagarplatta och en Chapmanplatta. Från primärutstryket görs vidare utstryk med vanlig platinös.
4. Inkubera vid 37°C över natt.
Labbandledare tar ut ur inkubatorn.

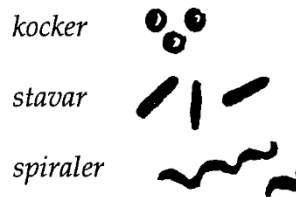
Risicanalys – Isoleringstutstryk

Kemikalie/laboration/Process Isoleringstutstryk Egen Staphylococcus aureus – del 1 Inga kemikalier ingår i laborationen (näringsbuljong)	
Institution/Avdelning IFM/Biologi	Område/Enhet Biologi
Laboratorium/lokal Pasteur / Mendel	
Risikbedömning <input type="checkbox"/> Låg risk <input checked="" type="checkbox"/> Måttligt riskfyllt <input type="checkbox"/> Riskfyllt <input type="checkbox"/> Mycket riskfyllt	
Ingående kemikaliers inneboende farliga egenskaper (även slut- och mellanprodukter om möjligt) Inga märkningsklassade kemikalier används	
Risker med förvaring, beredning, hantering och avfallshantering ska beskrivas vid normalfallet och vid oförutsedda händelser Inga märkningsklassade kemikalier används. Smittorisk vid hantering av bakterier och kontaminerade material.	
Risikbegränsande åtgärder (skyddsutrustning, hanteringsinstruktioner m.m.) Hantering av bakterier: <ul style="list-style-type: none">• Använd labbrock.• Arbetsytor och händer skall rengöras med desinfektionsmedel vid labbstart och avslut.• Handskar skall användas om laboranten har öppna sår, eksem eller upplever laborationen som mycket obehaglig.• Kontaminerat material i form av papper, handskar och dylikt slängs i plastade papperssäckar som går direkt till förbränning. Gaslåga: <ul style="list-style-type: none">• Lämna aldrig lågan oövervakad! En person i gruppen ansvarar för att den är under uppsikt.• Se till att bänken är fri från brännbara material.• Ha långt hår uppsatt.	
Risikbedömningen är utförd av: Martin Brengdahl	Datum 20190215
Arbetsgivarrepresentants underskrift:	Datum

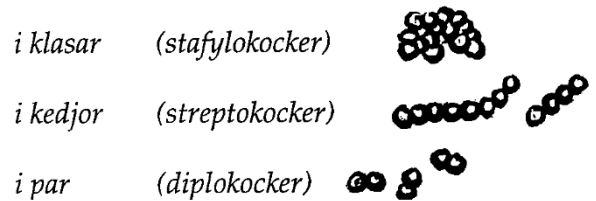
Laboration 2

2.1 Gramfärgning

Med hjälp av olika färgningsmetoder och mikroskopering kan man studera olika bakteriers morfologi. Olika metoder för färgning avslöjar olika saker. Metylenblåfärgning är en snabb och enkel metod för att kunna studera storlek, form och lagring hos bakterier. Gramfärgning är en annan metod där man förutom form och lagring även kan studera skillnader i cellväggens uppbyggnad. Med speciella färgningar kan man se om bakterier t.ex. har kapsel eller är endosporbildande. Alla sådana egenskaper är viktiga för att man ska kunna identifiera vilken bakterie som finns i ett prov.



Kocker kan vara lagrade på olika sätt:



Gramfärgning är en differentierande dubbelfärgningsmetod som uppfanns 1884 av Christian Gram från Danmark. Färgningen används på ett tidigt stadium vid undersökningar, när det gäller att identifiera och klassificera en bakterie. Bakterierna färgas först med kristallviolett och behandlas sedan med en jodlösning. Bakterie-utstryket tvättas därefter med en blandning av etanol och aceton. Vissa bakteriearter bibehåller den blåvioletta färgen efter denna tvättning och benämns då Gram-positiva. De som avfärgas benämns Gram-negativa. Man har numera infört ytterligare ett färgningssteg, som innebär att cellerna efter alkohol-tvättningen kontrastfärgas med safranin-lösning. Gram-negativa celler blir då röda, medan Gram-positiva behåller sin blåvioletta färg.

Läs mer!

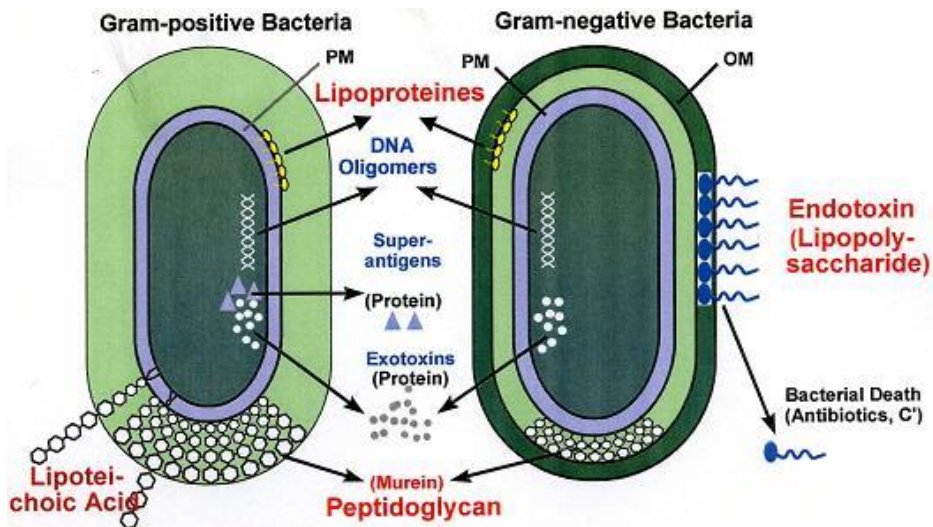
Mikroskopi och gramfärgning, Kap 1.5, s 47-51 (kap 2.1, s 49-52)

Cellmorfologi, Kap 2.1, s 71-72 (kap 2.5, s 56-57)

Peptidoglykaner, Kap 2.4, s 78-81 (kap 2.10, s 65-68)

Endosporer, Kap 2.10, s 89-92 (kap 2.16, s 76-80)

Gramfärgning



Materiel

Escherichia coli
Staphylococcus epidermidis
Staphylococcus aureus
Bacillus subtilis
Salmonella sp
Proteus mirabilis
Streptococcus sp

Kristallviolett
Aceton-etanol blandning
Lugols lösning
Safranin
rent vatten
pasteurpipetter (plast)
platinös
brännare
objektglas
täckglas
filtrerpapper
mikroskop (100x)
immersionsolja
klädnyor

Utförande

1. På ett objektglas sätts en liten droppe kranvatten.
2. Tag "en ögla" bakterier med platinös och slamma upp i droppen på objektglaset.
3. Sprid med hjälp av platinösen droppen till en yta av ungefär 2 cm².
4. Torka preparatet på lagom höjd (15-20 cm) över brännarens låga (vattnet får ej börja koka).
5. Fixera genom att föra objektglaset, med bakteriesidan uppåt, genom lågan 4-5 gånger.
6. Täck den torkade bakteriemassan med kristallviolett och vänta 2-3 min.
7. Skölj bort kristallviolett-lösningen med Lugols-lösning (samla upp vätskan i särskild behållare) och låt den sistnämnda lösningen verka i 2 min, medan glaset försiktigt vickas, så att hela ytan täcks.
8. Skölj preparatet med aceton-etanol (samla upp vätskan i särskild behållare) tills den avdroppade lösningen är nästan avfärgad.
9. Skölj preparatet noggrant i rinnande vatten (över vasken).
10. Droppa på några droppar safranin-lösning och låt färgen verka 1 min.
11. Skölj under rinnande vatten (över vasken).
12. Torka preparatet försiktigt med hushållspapper, glöm inte att torka objektglasetts undersida.
13. Lägg en droppe vatten samt ett rent täckglas på bakteriefläcken och avläs.

Avläsning

Titta i mikroskop och rita av och redogör för hur preparaten ser ut. Notera relativ storlek, men också form och ev. lagring.

2.2 Avläsning av isoleringsutstryk (1.1)

Avläsning

Läs av plattorna från 1.1.

I det tredje eller fjärde utstryket bör enskilda kolonier växa ut.

-Hur många kolonityper kan urskiljas?

-Hur många bakterietyper innehöll den utlämnade suspensionen?

2.3 Egen *Staph. aureus* – del 2 Avläsning – Gramfärgning - Omsättning

Avläsning

Läs av plattorna från 1.2.

Studera Chapmanplattan med avseende på syrabildning (omslag av pH-indikatorn i plattan till gult). Studera blodagarplattan och lägg märke till variationen i kolonimorfologi, som indikerar att det är fråga om olika bakterier som vuxit ut. Förekommer hemolys (dvs. lys av de röda blodkropparna)? Dokumentera vad du ser.

Omsättning

Varje grupp (grupp om 4 studenter) ska ha en *S. aureus* att gå vidare med. Om ingen i gruppen har en trolig *S. aureus* får fortsatta laborationer vara på en "lånad" bakterie från labbstammen. Kontakta labbhandledaren.

1. Gramfärga och mikroskoper "en halv" koloni, som kan förväntas vara *S. aureus* (omslag av pH-indikatorn i plattan till gult).
2. Sätt bakterien (från den halva kolonin som är kvar på Chapmanplatta från punkt 1) på en ny Chapmanplatta. Märk plattan!
3. Inkubera vid 37°C över natt. Labbhandledare tar ut ur inkubatorn.

Risikanalyt – Gramfärgning

Kemikalie/laboration/Process Gramfärgning. Ingående reagenser med tillhörande CAS-koder nedan. Aceton-etanol (Blandning á 50/50; CAS Aceton: 67-64-1; CAS Etanol: 64-17-5) Kristallviolett (2%; CAS: 548-62-9) Lugols Lösning (CAS Jod: 7553-56-2; CAS Kaliumjodid: 7681-11-0) Safranin (Lösning, 0,25%; CAS: 477-73-6)	
Institution/Avdelning IFM	Område/Enhet Biologi
Laboratorium/lokal Pasteur/Mendel	
Riskbedömning <input type="checkbox"/> Låg risk <input checked="" type="checkbox"/> Måttligt riskfyllt <input type="checkbox"/> Riskfyllt <input type="checkbox"/> Mycket riskfyllt	
Ingående kemikaliers inneboende farliga egenskaper (även slut- och mellanprodukter om möjligt) Aceton-etanol R11 Mycket brandfarligt. R36 Irriterar ögonen. R66 Upprepad kontakt kan ge torr hud eller hudsprickor. R67 Ångor kan göra att man blir dåsig och omtöcknad. Kristallviolett 2% (är eventuellt cancerframkallande. LiUs policy är att ämnen med märkning cancerframkallande, mutagen eller fosterskadande alltid ska sorteras som farligt avfall oavsett koncentration). R22 Farlig vid förtäring. R41 Risk för allvarliga ögonskador. R45 Kan ge cancer. R50/53 Mycket giftigt för vattenlevande organismer, kan orsaka skadliga långtidseffekter i vattenmiljön. Lugols lösning R20/21 Farligt vid inandning och hudkontakt. R22 Farligt vid förtäring. R36/38 Irriterar ögonen och huden. R50 Mycket giftigt för vattenlevande organismer. Safranin R36/38 Irriterar ögon och hud. R41 Risk för allvarliga ögonskador.	

Risker med förvaring, beredning, hantering och avfallshantering ska beskrivas vid normalfallet och vid oförutsedda händelser

- Stänk på hud och kläder vid hantering av färger. Alla färgerna som används under laborationen färgar hud och kläder kraftigt.
- Aceton-etanollösningen kan börja brinna vid kontakt med låga.
- Hantering av bakterie, smittorisk.
- Laborationsmaterial kontaminerat av bakterier, smittorisk.
- Gaslåga, risk för att kläder/person fattar eld.

Riskbegränsande åtgärder (skyddsutrustning, hanteringsinstruktioner m.m.)

Färglösningar:

Använd labbrock, handskar och skyddsglasögon.

S7 Förpackningar med Etanol förvaras väl tillslutna.

S9 Aceton förvaras på väl ventilerad plats.

S16 Aceton-etanol förvaras åtskilt från antändningskällor.

S24/25 Undvik kontakt med huden och ögonen.

S26 Vid kontakt med ögonen, spola genast med mycket vatten och kontakta läkare.

S36/37 Använd lämpliga skyddskläder och skyddshandskar vid hantering av Kristallviolett.

S39 Använd skyddsglasögon eller ansiktsskydd.

S61 Undvik utsläpp av Kristallviolett och Lugols lösning till miljön. Läs särskilda instruktioner/varuinformationsblad.

Hantering av bakterier:

- Använd labbrock och labbglasögon.
- Arbetsytor och händer skall rengöras med desinfektionsmedel vid labbstart och avslut.
- Handskar skall användas om laboranten har öppna sår, eksem eller upplever laborationen som mycket obehaglig.
- Kontaminerat material i form av papper, handskar och dylikt slängs i plastade papperssäckar som går direkt till förbränning.

Gaslåga:

- Lämna aldrig lågan oövervakad; någon i gruppen ansvarar för att den är under uppsikt.
- Se till att bänken är så ren från brännbart material som möjligt.
- Ha långt hår uppsatt.

Första hjälpen samt åtgärder vid brand och spill

Första hjälpen

Inandning: Flytta genast den skadade till frisk luft. Frisk luft, värme och vila. Tillkalla läkare.

Förtäring: Ge genast den skadade flera glas vatten. Framkalla EJ kräkning vid förtäring av Lugols lösning. Kontakta läkare.

Hudkontakt: Tag av förorenade kläder och spola huden med vatten. Kontakta läkare om irritationen kvarstår.

Ögonkontakt: Spola GENAST ögonen med mycket vatten. Håll ögonlocken brett isär. Fortsätt att skölja i minst 15 minuter medan läkare kontaktas.

Spill av kemikalier på person

Gäller alla kemikalier. Skölj noga med tempererat vatten

Spill av kemikalier på yta

Använd handskar, skyddsglasögon och labbrock vid sanering!

Kristallviolett: Färgen torkas upp med papper som läggs i behållare av glas eller plast, farligt avfall

Safranin, Lugols lösning: Färgen torkas upp med papper som slängs i plastad papperssäck

Brand i person

- Kväv elden med brandfilt, nöddusch eller brandsläckare.
- Nöddusch i minst 15min.
- Om skadan är stor eller mycket smärtsam, ring 112 för vidare instruktioner.

Brinnande aceton-etanol

- Kväv med brandfilt.

Spill av bakterier på arbetsyta

- Dränk spillet i desinfektionsmedel, låt verka i 5 min.
- Torka upp med papper och släng i plastad papperssäck.

Spill av bakterier på person

- Sprita noggrant, låt torka.
- Tvätta händerna noga med tvål och vatten.

Riskbedömningen är utförd av:

Martin Brengdahl

Datum

20190215

Arbetsgivarrepresentants underskrift:

Datum

Laboration 3

3.1 Diagnosticering av bakterier

Produktion av extracellulära enzymer samt skillnader i enzymaktivitet

Alla patientprover som kommer till ett kliniskt mikrobiologiskt laboratorium handläggs av naturliga skäl inte på samma sätt. Bakterier växer olika bra på olika substrat, olika bakterier växer olika fort och mängden bakterier i proven varierar.

Beroende på varifrån och under vilka omständigheter ett prov är taget odlas därför de eventuella bakterierna ut på bestämda uppsättningar av substrat. Substraten väljs och kombineras så att bästa möjliga betingelser ges för patogena bakterier att växa fram samtidigt som växt av eventuell normalflora undertrycks (anrikning och selektering). Dessutom bör helst patogenerna i provet vara lätta att skilja åt utifrån växtsätt och kolonituseende (differentiering). Man kan alltså utifrån detta tala om anrikande, selekterande respektive differentierande substrat.

Det gäller för laboratoriet att i proven identifiera eventuella patogena bakterier och skilja ut dessa från normalfloran. På många ytor av kroppen finns bakterier som normalt inte orsakar sjukdom. Till exempel har huden, svalget och tarmens insida var och en sin egen normalflora. På andra delar av kroppen finns normalt inga bakterier, till exempel i de övre urinvägarna och i hjärt-kärlsystemet.

Normalfloran skyddar människan från invasion av sjukdomsframkallande (patogena) mikroorganismer och deltar i viktiga metaboliska processer i kroppen. Även bakterier som tillhör kroppens normalflora kan dock, om de befinner sig på fel plats, orsaka sjukdom. De flesta infektioner i modern sjukvård orsakas av patienternas egen mikroflora.

Läs mer!

Diagnostiska metoder behandlas i kapitel 28, s 867-898 (kap 27, s 817-850).

För mer information om de specifika delar som rör denna labb, läs:

Den kliniska miljön, s 867-876 (s 817-827)

Exotoxiner: Kap 25.5, s 801-807 (kap 23.9, s 744-748 + tabell 23.5, s 743)

Katalys och Enzymer: Kapitel 3.5, s 116-117 (kap 3.5, s 105-106)



Produktion av extracellulära enzymer

Materiel

Staphylococcus aureus
Staphylococcus epidermidis
Streptococcus sp
Bacillus subtilis

4 olika plattor (1 platta/4 bakterier):

- mjölkagarplatta
- stärkelseagarplatta
- blodagarplatta
- Chapmanplatta

platinös

brännare

värmeskåp 37°C

Utförande

1. Agarplattorna (en av varje: mjölkagarplatta, stärkelseagar-platta, blodagarplatta, Chapmanplatta) delas in i fyra lika stora sektorer genom att rita med spritpenna på botten.
2. De fyra arterna av bakterier kan då testas på samma platta genom att, med platinös, göra utstryk av de olika kulturerna i varsin sektor. Se till att bakteriearterna är väl åtskilda på plattan och märk tydligt vad som är vad.
3. Plattorna inkuberas vid 37°C i ett dygn. Labbhandledare tar ut ur inkubatorn.



Klassificering av bakterier med hjälp av skillnader i enzymaktivitet

Det enzymatiska mönstret för varje bakterieart eller bakteriesläkte är specifikt. Påvisande av olika enzymaktiviteter är viktigt för klassifikation av framför allt gram-negativa stavar t ex inom *Enterobacteriaceae*.

Kolhydratjäsning

Bakterien odlas i buljong innehållande en sockerart och en indikator.

Under kolhydratspjälkningen bildas sura metaboliter, pH ändras och indikatorn slår om. Eventuellt bildas även gas (som kan uppsamlas och påvisas i ett Durhamrör). Genom att inokulera en bakteriestam på ett flertal buljonger med olika sockerarter eller andra substanser kan man erhålla ett spektrum av metaboliska egenskaper för bakterien i fråga. En sådan så kallad kort jäsningsserie kan bestå av tre rör med test på laktos- och mannitjäsning, β -galaktosidasaktivitet, H₂S-bildning samt indolproduktion.

- **KIA-rör**

För identifiering av bakterier som fermenterar laktos och/eller bildar H₂S. Mediet innehåller glukos, laktos, järn samt pH-indikator.

Glukos fermenteras först varvid syra bildas och det blir ett färgomslag från rött till gult. Om bakterien kan jäsa laktos sker en fortsatt syraproduktion och mediet är fortfarande gult efter 24 timmar.

Om bakterien inte kan fermentera laktos används syret i övre delen av röret för att bryta ned aminosyror (när glukosen är slut). Nedbrytning av aminosyror är en basisk process och ett nytt färgomslag, tillbaka till rött, sker i övre delen av mediet. Om bakterien bildar H₂S syns det som en svart fällning av järnsulfid ($\text{H}_2\text{S} + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{FeS}$).

- **Mannitrör**

För identifiering av bakterier som kan fermentera mannit (och som producerar gas under fermentationen).

Mediet innehåller sockerarten mannit och pH-indikator. När mannit fermenteras bildas syra och det blir ett färgomslag från blått till gult. Om gas bildas samlas den upp i Durhamröret.

- **Indolrör**

För identifiering av bakterier som har β -galaktosidasaktivitet och/eller indolproducerande bakterier. Mediet innehåller ONPG och tryptofan. I närvaro av β -galaktosidas spjälkas ONPG till galaktos och O-nitrofenyl, som är guldfärgad. För att påvisa eventuell indolproduktion tillsätts Kovac's reagens efter inkuberingen. Indol reagerar med Kovac's och gör den rödfärgad.

Materiel

3 hemliga bakteriearter; A, B och C.

Arterna är antingen *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* eller *Proteus mirabilis*

3 KIA-rör (Kligler-Iron-Agar)

3 mannitrör

3 indol/ONPG rör

platinös

brännare

värmeskåp 37°C

Utförande

1. Märk tre olika rörserier (KIA-, mannit och indol/ONPG- rör) med beteckningen (A-C) för respektive bakteriestam.
2. Med en platinös tas en "droppe" upp från respektive bakteriesuspension och inokuleras i sin rörserie. Inokulera KIA-rör sist.
3. Inkubera i 37°C över natt. Labbhandledare tar ut ur inkubatorn.



3.2 Egen *Staph. aureus* – del 3

Koagulastest, inledning

Koagulas är ett enzym som orsakar att fibrinogen omvandlas till fibrin, varvid en fibrinkapsel bildas runt bakterien. Förmågan att producera koagulas anses bl.a. vara kopplat till stafylokockers virulens.

Testet används alltså för att skilja på koagulas-positiva och koagulas-negativa stafylokocker.

Materiel

Brain Heart Infusion (BHI) broth
platinös
sterilt skruvkorksrör
Egen *S. aureus* (från lab 2.3)

Läs mer!

Läs om virulensfaktorer som koagulering i kapitel 25.5, s 801-802 (kap 23.8, s 742-744).

Utförande

1. Märk ett skruvkorksrör
2. Pipettera upp 2 ml Brain Heart Infusion broth i röret. Ympa därefter en koloni av *S. aureus* och blanda noga.
3. Inkubera över natt vid 37°C.
Labbandledare tar ut ur inkubatorn.



Risicanalys – Diagnostisering av bakterier

Kemikalie/laboration/Process

Diagnostisering av bakterier

Studier av enzymatisk aktivitet hos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus sp* och *Bacillus subtilis* genom att testa amylasaktivitet, proteasaktivitet, hemolytisk aktivitet, salttolerans och förmåga att jäsa kolhydrater.

Mjölkgagar, stärkelseagar, blodagar, Salt-mannitolagar.

Lugols jodlösning

1g jod (CAS: 7553-56-2)

2 g kaliumjodid (CAS: 7681-11-0)

300 ml avjonat vatten

KIA-rör (Kligler-Iron-Agar)

mannitrör

indol/ONPG rör

Kovacs-remsor

Institution/Avdelning

IFM

Område/Enhet

Biologi

Laboratorium/lokal

Pasteur/Mendel

Riskbedömning

Låg risk

Måttligt riskfyllt

Riskfyllt

Mycket riskfyllt

Ingående kemikaliers inneboende farliga egenskaper (även slut- och mellanprodukter om möjligt)

Indol (CAS: 120-72-9): Xi Irriterande, Xn Hälsoskadlig, N Miljöfarlig

Kovacs-remsor: Xn Hälsoskadlig

Risker med förvaring, beredning, hantering och avfallshantering ska beskrivas vid normalfallet och vid oförutsedda händelser

Smittorisk vid hantering av bakterier och kontaminerade material..

Gaslåga, risk för att kläder/person fattar eld.

Indol:

R21/22 Farligt vid hudkontakt och förtäring.

R37/38 Irriterar andningsorganen och huden.

R41 Risk för allvarliga ögonskador.

R50/53 Mycket giftigt för vattenlevande organismer, kan orsaka skadliga långtidseffekter i vattenmiljön.

Kovac-remsor:

Inandning: Kan vara skadligt vid inandning. Kan orsaka irritation i andningsvägarna

Förtäring: Kan vara farligt vid förtäring..

Hud: Kan vara farligt vid upptag genom huden. Kan orsaka hudirritation.

Ögon: Kan orsaka ögonirritation.

Risikbegränsande åtgärder (skyddsutrustning, hanteringsinstruktioner m.m.)**Indol:**

- S26** Vid kontakt med ögonen, spola genast med mycket vatten och kontakta läkare
- S36/37/39** Använd lämpliga skyddskläder, skyddshandskar samt skyddsglasögon eller ansiktsskydd
- S60** Detta material och dess behållare skall tas om hand som farligt avfall
- S61** Undvik utsläpp till miljön. Läs särskilda instruktioner/varuinformationsblad

Kovac-remsor:

Använd labbrock, handskar och skyddsglasögon.

Hantering av bakterier:

- Använd labbrock och labbglasögon.
- Arbetsytor och händer skall rengöras med desinfektionsmedel vid labbstart och avslut.
- Handskar skall användas om laboranten har öppna sår, eksem eller upplever laborationen som mycket obehaglig.
- Kontaminerat material i form av papper, handskar och dylikt slängs i plastade papperssäckar som går direkt till förbränning.

Gaslåga:

- Lämna aldrig lågan oövervakad! En person i gruppen ansvarar för att den är under uppsikt.
- Se till att bänken är fri från brännbara material.
- Ha långt hår uppsatt.

Första hjälpen samt åtgärder vid brand och spill

Indol:

Stänk i ögonen: Skölj noga med tempererat vatten i minst 15 min, ring 112.

Kovacs-remsor

Kontakt med ögonen: Spola genast med mycket vatten och kontakta läkare.

Hudkontakt: Tvätta med tvål och mycket vatten.

Spill av kemikalier på yta

Använd handskar, skyddsglasögon och labbrock vid saneringen!

Brand i person

Kväv elden med brandfilt, nöddusch eller brandsläckare.

Nöddusch i minst 15 min.

Om skadan är stor eller mycket smärtsam, ring 112 för vidare instruktioner.

Spill av bakterier på arbetsyta

- Dränk spillet i desinfektionsmedel, låt verka i 5 min.
- Torka upp med papper och släng i plastad papperssäck.

Spill av bakterier på person

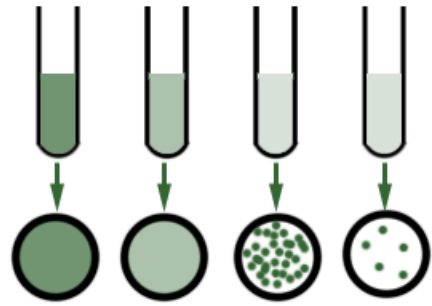
- Sprita noggrant, låt torka.
- Tvätta noga med tvål och vatten.

Riskbedömningen är utförd av: Martin Brengdahl	Datum 20190215
Arbetsgivarrepresentants underskrift:	Datum

Laboration 4

4.1 Viable Count (spotterlab)

Enstaka bakterier utspridda på en lämplig näringsagarplatta kommer under inkubering att föröka sig genom enkel tudelning och så småningom ge upphov till synliga kolonier. Dessa kolonier antas härstamma från en ursprunglig bakterie (även om så inte alltid är fallet). Härigenom kan antalet levande bakterier (egentligen antalet CFU, Colony Forming Units) i den ursprungliga suspensionen beräknas.



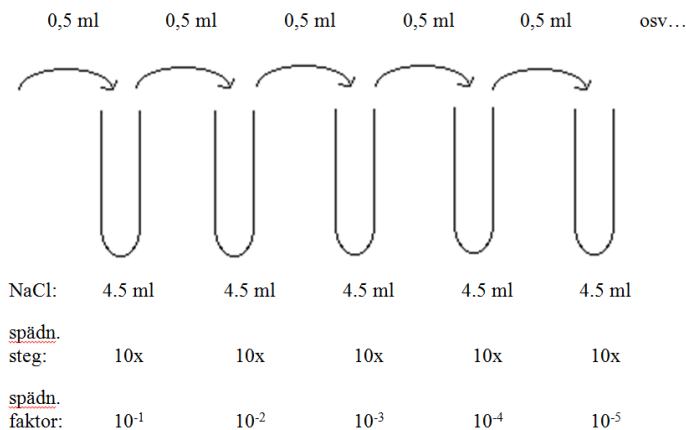
Mycket ofta är en bakteriesuspension så koncentrerad att bakterierna hamnar i stora samlingar om en droppe bakteriesuspension sprids ut på en agarplatta. Resultatet blir då en jättekoloni från ett stort och okänt antal ursprungsbakterier. Därför måste den ursprungliga suspensionen spädas för att det ska gå att beräkna antalet CFU.

Genom att späda i kända steg och sprida en känd mängd av den spädda suspensionen på en agarplatta kan man med hjälp av det antal kolonier som bildas räkna ut hur hög koncentration levande bakterier som fanns i den ursprungliga bakteriesuspensionen.

Materiel

Bakteriesuspension (med okänd koncentration) av antingen *Salmonella* eller *Bacillus*

6 st Columbiaplattor
steril 0,9 % NaCl-lösning
sterila mät- och pasteurpipetter
sterila skruvkorksrör
värmeskåp, 37°C



Läs mer!

Läs mer om Viable (/plate) count och konceptet CFU i kapitel 5.7, s 185-186 (kap 5.9, s 179-181).

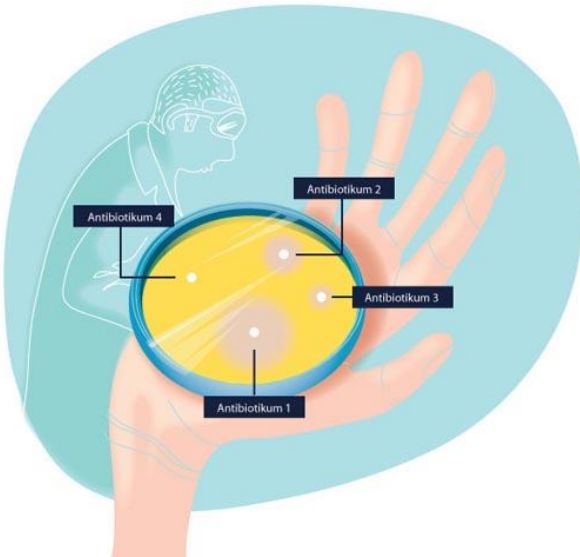
Utförande

1. Märk allt materiel (agarplattor och rör)
2. Pipettera sterilt 4.5 ml steril 0,9 % NaCl till sju skruvkorksrör.
3. Blanda bakteriekulturen i skruvkorksröret väl, pipettera sedan sterilt 0.5 ml bakteriekultur till det första NaCl-röret. Blanda väl! Bakteriesuspensionen har nu späts ut 10 gånger och har spädningsfaktor 10^{-1} .
4. Ta en ny pipett och överför sterilt 0.5 ml från rör 1 till rör 2 (spädd 10 gånger). Blanda väl!
5. Med ny pipett överförs sterilt 0.5 ml från rör 2 till rör 3. Blanda väl!
6. Gör ytterligare fyra spädningssteg, det sista röret ska då ha spädningsfaktor 10^{-7} , och har alltså späts 10^7 gånger.
7. Tag 0,1 ml (tre droppar med pasteurpipett) av innehållet från rören med spädningsfaktor 10^{-5} , 10^{-6} och 10^{-7} och överför till agarplattor. Gör två (identiska) plattor av vardera koncentration, sk tekniska replikat.
OBS! Endast en pipett behövs om man går från lägsta koncentration mot en högre.
8. Dropparna på plattorna sprids ut jämnt på agarytan med en steril rackla.
9. Plattorna inkuberas över natt i 37°C

4.2 Egen *Staph. aureus* – del 4

Antibiotikaresistensbestämning & Avläsning Koagulastest

Antibiotikaresistensbestämning



Materiel

Egen *S. aureus* (från lab 2.3)
Resistensplatta
steril 0,9 % NaCl-lösning
platinös
sterila skruvkorksrör
pipetter
antibiotikalappar (OBS! Flera olika sorter!)

Utförande

1. Märk 2 st skruvkorksrör plus en resistensplatta
2. Slamma 1 koloni från er Chapmanplatta (från lab 2.3) i 1 ml 0,9 % NaCl. Blanda noga.
3. Från uppslamningen tas 0,50 ml och blandas ut i 5 ml 0,9 % NaCl.
4. Av den spädda suspensionen hälls 5 ml ut på 1 st resistensplatta. Vicka plattan så att hela ytan täcks.
5. Ställ plattan på kant och sug upp överskottsvätskan med steril pasteurpipett.
6. Plattan ställs med locket på glänt i 37°C för torkning i 30 min.
7. Placera ut antibiotikalapparna på plattan och låt plattan stå 60 min i rumstempertur för att antibiotikumet skall diffundera ut i agarn. (Skriv tiden då plattorna skall in i värmeskåp på tejpen)
8. Inkubera i 37°C över natt. Labbhandledare tar ut ur inkubatorn.

Läs mer!

Lär mer om antimikrobiella ämnen och resistensmekanismer i kapitel 5.17, s 203-206 och i kapitel 28.10, s 888-894, 896-898 (kap 5.19, s 200-202, och kap 27.11-14, s 835-840).

Avläsning Koagulastest

Materiel

Egen *S. aureus* i BHI = "övernattskultur"
Brain Heart Infusion (BHI) broth
blodplasma
steril 0,9 % NaCl-lösning
2 st Falconrör (sterila plaströr, 15 ml)

Utförande

1. Märk 2 st Falconrör.
2. Till vardera av de båda rören tillsätts 0,5 ml blodplasma och 0,5 ml 0,9 % NaCl.
3. Till rör 1 pipetteras 0,1 ml av "övernattskulturen" (från lab 3.2).
4. Till rör 2 (negativ kontroll) pipetteras 0,1 ml steril Brain Heart Infusion broth.
5. Inkubera rören vid 37°C i en inkubator.
6. Avläs efter 1-3 tim och efter ett dygn. *S. aureus* är koagulas-positiv, dvs. koagulerar blodplasman

4.3 Avläsning av diagnostisering (lab 3.1)

Avläsning extracellulära enzymer & Avläsning av skillnader i enzymaktivitet

Avläsning extracellulära enzymer

Utförande

Avläs resultaten av bakterietillväxt och enzymaktivitet för samtliga* plattor. Gradera både tillväxt och aktivitet och fyll i tabellen enligt skalan nedan.

*Endast för stärkelseplattan: Läs av tillväxten enligt ovan. "Framkalla" sedan stärkelseplattan genom att droppa på Lugols lösning med en pasteurpipett (plast) tills att ytan är täckt. Avläs sedan enzymaktivitetet.

- +++ Om tillväxt eller aktivitet är mycket hög.
- ++ Om tillväxt eller aktivitet är hög.
- + Om tillväxt eller aktivitet finns.
- + - Om tillväxt eller aktivitet kan anas.
- Ingen tillväxt eller aktivitet

Materiel

Lugols lösning
Pasteurpipett (plast)

Bakterie	Tillväxt/ proteolytisk aktivitet	Tillväxt/ amylas- aktivitet	Tillväxt/ hemolytisk aktivitet	Tillväxt/ syrabildning
<i>S. aureus</i>	/	/	/	/
<i>S. epidermidis</i>	/	/	/	/
<i>Strep. sp</i>	/	/	/	/
<i>B. subtilis</i>	/	/	/	/

Avläsning av skillnader i enzymaktivitet

Materiel

Kovacs-remsor

Utförande

1. Avläs alla rör.
2. Tillsätt Kovacs-remsor, en per rör, till indolrören (OBS! Läs av ONPG först!).
3. Tolka resultaten, fyll i tabellen på nästa sida. Jämför resultaten av era okända bakteriestammar med de kända jäsningsmönstren.

Avläsning extracellulära enzymer

Utförande

Markera med ett enkelt + eller - de olika omslagen/reaktionerna, enligt beskrivningarna från föregående labb, sidorna 15-16 i kompendiet.

Bakterie	KIA laktos/H ₂ S	Mannit jäsn/gas	ONPG/Indol
A	/	/	/
B	/	/	/
C	/	/	/

Läs mer!

Kemiska/Biokemiska processer kopplade till metabolism och diagnosticeringsmetoder:
Kap 3.6, s 117-119; Kap 3.8, s 121-124 (Kap 3.6, s 106-108; Kap 3.8, s 110-112);
Kap 3.9, s 124-126; Kap 3.12, s 130-131 (Kap 3.9, s 112-113; Kap 3.13, s 119-120)

Risicanalys – Viable Count & Antibiotikaresistensbestämning

Kemikalie/laboration/Process Viable count Antibiotikaresistensbestämning	
Natriumklorid, 0,9 %, CAS: 7647-14-5 (ej märkningspliktig)	
Institution/Avdelning IFM/Biologi	Område/Enhet Biologi
Laboratorium/lokal Pasteur / Mendel	
Riskbedömning <input type="checkbox"/> Låg risk <input checked="" type="checkbox"/> Måttligt riskfyllt <input type="checkbox"/> Riskfyllt <input type="checkbox"/> Mycket riskfyllt	
Ingående kemikaliers inneboende farliga egenskaper (även slut- och mellanprodukter om möjligt) Antibiotikadiskar: Penicillin G, Oxacillin, Fusidic acid, Clindamycin	
Risker med förvaring, beredning, hantering och avfallshantering ska beskrivas vid normalfallet och vid oförutsedda händelser Smittorisk vid hantering av bakterier och kontaminerade material Gaslåga, risk för att kläder/person fattar eld. Allergirisk vid hantering av antibiotikadiskar	
Riskbegränsande åtgärder (skyddsutrustning, hanteringsinstruktioner m.m.) Hantering av bakterier: <ul style="list-style-type: none">• Använd labbrock.• Arbetsytor och händer skall rengöras med desinfektionsmedel vid labbstart och avslut.• Handskar skall användas om laboranten har öppna sår, eksem eller upplever laborationen som mycket obehaglig.• Kontaminerat material i form av papper, handskar och dylikt slängs i plastade papperssäcker som går direkt till förbränning. Gaslåga: <ul style="list-style-type: none">• Lämna aldrig lågan oövervakad! En person i gruppen ansvarar för att den är under uppsikt.• Se till att bänken är fri från brännbara material.• Ha långt hår uppsatt. Antibiotikadiskar: <ul style="list-style-type: none">• Undvik hudkontakt; hantera med lancett/nål.	
Första hjälpen samt åtgärder vid brand och spill Brand i person Kväv elden med brandfilt, nöddusch eller brandsläckare. Nöddusch i minst 15 min. Om skadan är stor eller mycket smärtsam, ring 112 för vidare instruktioner.	
Spill av bakterier på arbetsyta <ul style="list-style-type: none">• Dränk spillet i desinfektionsmedel, låt verka i 5 min.• Torka upp med papper och släng i plastad papperssäck.	
Spill av bakterier på person <ul style="list-style-type: none">• Sprita noggrant, låt torka.• Tvätta händerna noga med tvål och vatten.	

Riskbedömningen är utförd av: Martin Brengdahl	Datum 20190215
Arbetsgivarrepresentants underskrift:	Datum

Laboration 5

5.1 Avläsning Viable count (4.1)

Utförande

Antalet kolonier räknas på de plattor med en spädningfaktor som ger upphov till ca 20-200 kolonier/platta. Beräkna ett medelvärde av antalet kolonier på de två plattorna av samma spädning, och använd sedan det medelvärdet när ni räknar ut CFU/ml.

Övriga spädningar kan användas för att bedöma hur väl ni lyckats med spädningsserien! Koloniantal på plattor med väldigt riklig tillväxt kan skattas genom att räkna en del av plattan, $\frac{1}{2}$ eller $\frac{1}{4}$, och multiplicera antalet med 2 respektive 4.

Resultat

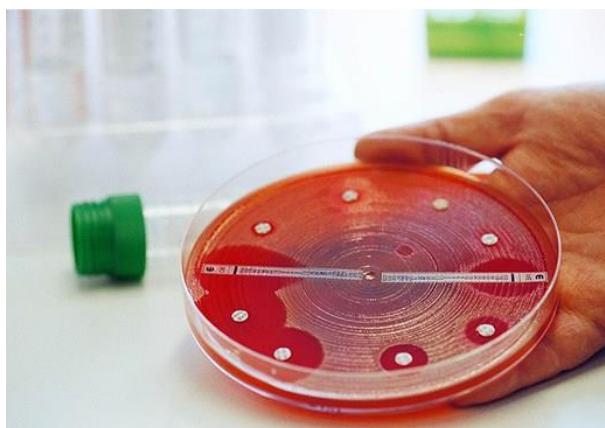
Antal (medelvärdet över båda tekniska replikaten) CFU på plattan =

i spädning

medför CFU/ml i ursprungslösningen

5.2 Egen Staph. aureus – del 5

Avläsning antibiotikaresistensbestämning (4.2)



Läs mer!

Se fig 28.27 (fig. 27.20) och tabell 28.5 för översikt av angreppspunkter för antibakteriella ämnen

Se fig 28.29 (fig 27.25) för strukturell uppbyggnad av olika penicillinsorter

Materiel

linjal
resistenstabell

Utförande

Hämmningszonernas diameter uppmäts (i millimeter).

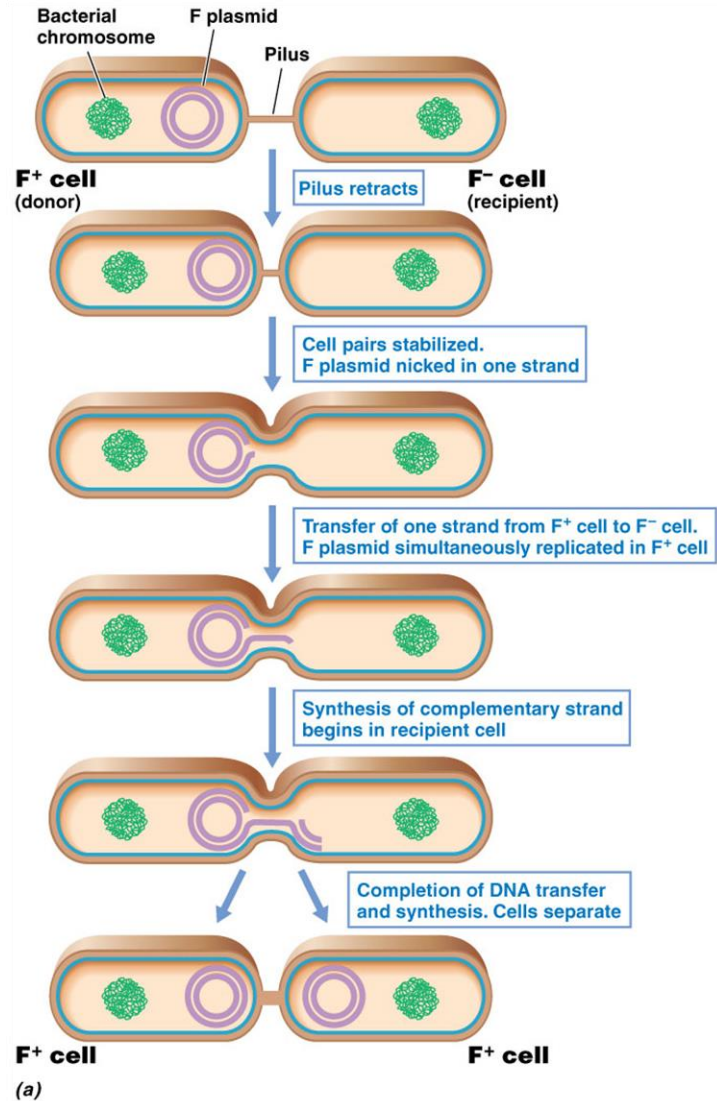
Med hjälp av resistentstabeller bestäms bakteriernas känslighet (resistent, känslig eller intermediär).

5.3 Teoretisk laboration – konjugation

Den genetiska informationen för resistens mot ett antibiotikum kan överföras mellan bakterier genom konjugation (läs mer om konjugation i kursboken). Generna som kodar för antibiotikaresistensen finns på resistensplasmider, R-plasmider. Dessa plasmider kodar oftast för proteiner som antingen inaktiverar antibiotikumet eller för proteiner som pumpar ut antibiotikumet (MDR-proteiner, ABC proteiner etc.) ur cellen. I en bakterie kan finnas flera R-plasmider med resistens mot flera olika antibiotika.

Överföringen av R-plasmider är beroende av en resistenstransfer faktor (RTF-faktor, vilken innehåller information till sexpilisyntes (jfr F-faktor). Flera R-faktorer kan tillsammans med en RTF-faktor bilda en enhet, som överförs vid konjugation. På detta sätt kan en bakterie genom en konjugation förvärva resistens mot flera antibiotika. Detta fenomen upptäcktes redan i slutet av 50-talet i Japan då epidemier av multipelresistenta Shigellabakterier (dysenteri) uppträdde. I Sverige spelar fenomenet sannolikt roll för uppkomsten av t.ex. multipel-resistenta tarmbakterier.

Laborationen avser att visa överförandet av tetracyklinresistens från en resistent stam till en känslig stam (*E. coli*). För att kunna skilja resp. stammar åt är stammarna valda så att den tetracyklinresistenta stammen är nalidixankänslig medan den andra stammen är resistent.



Läs mer!

Läs mer om *genöverföring* i kapitel 11, del II, s 349-360 (kap 10, del II, s 323-332).

För *konjugation*, se kapitel 11.8, s 356-358 (kap 10.8, s 329-331).

Förberedelse

Stammarna A, B och L ympas på vardera 10 ml näringsbuljong. Inkuberas i 2,5h i 37°C

Materiel

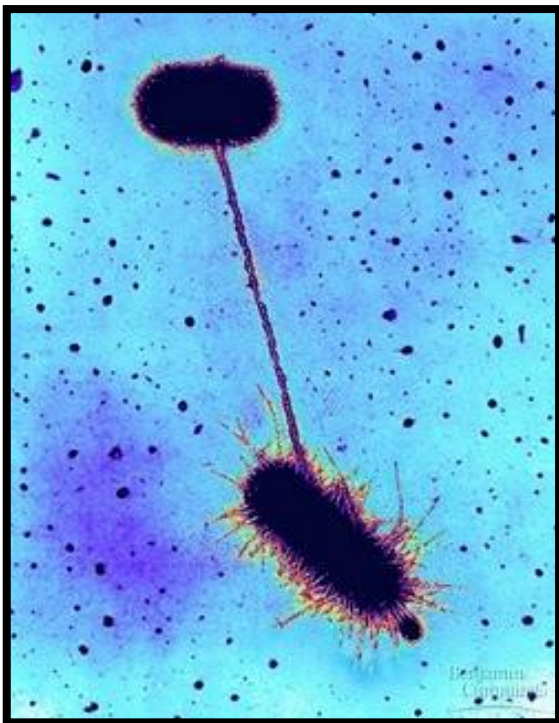
Escherichia coli stam A, B och L

0,9 % steril NaCl-lösning
näringsbuljong, NB
antibiotikaplattdor

Columbiaplattdor
antibiotikumdiskar
sterila skruvkorksrör
sterila mätpipetter (1 och 10 ml)
sterila pasteurpipetter
brännare
inkubator 37°C

Utförande

1. Rörserie 1: 1 ml från bakteriesuspension A respektive B (10^8 - 10^9 bakterier/ml) överföres till varsitt sterilt glaströr.
2. Till båda dessa rör sättes 1 ml av bakteriesuspension L.
3. Rörserie 2: Till 3 skruvkorksrör överföres 1 ml näringsbuljong vardera.
4. Till ett av rören tillsätts 1 ml A, till det andra 1 ml B och till det sista röret 1 ml L.
5. Samtliga rör (från rörserie 1 och 2) inkuberas i inkubator, 37°C, under 40 min.
6. Efter inkubering överförs med steril pasteurpipett 2 droppar från varje rör till nya skruvkorksrör och spädes med 5 ml 0,9 % NaCl (ca 1:100). Blanda väl.
7. Rörserie 1: 0,1 ml (tre droppar med pasteurpipett) från varje spätt rör sprids ut på plattor. Vätskedropparna sprids ut med steril rackla så att hela agarytan täcks.
8. Rörserie 2: 0,1 ml från varje spätt rör sprids ut på plattor med och utan antibiotika. Vätskedropparna sprids så att hela agarytan täcks.
9. Därefter torkas samtliga plattor i rumstemperatur (på labbänken) med locket på "glänt" i 10 min.
10. En antibiotikumdisk utplaceras sedan mitt på vardera av de 8 plattorna med hjälp av steril nål.
11. Plattorna får därefter stå i rumstemperatur i 2 timmar, varefter de inkuberas i inkubator, 37°C, över natten.



	Tetracyklin	Nalidixan
Givarstammar A & B	resistenta	känsliga
Mottagarstam L	känslig	resistent

Teoretisk laboration – konjugation

Resultat och analys

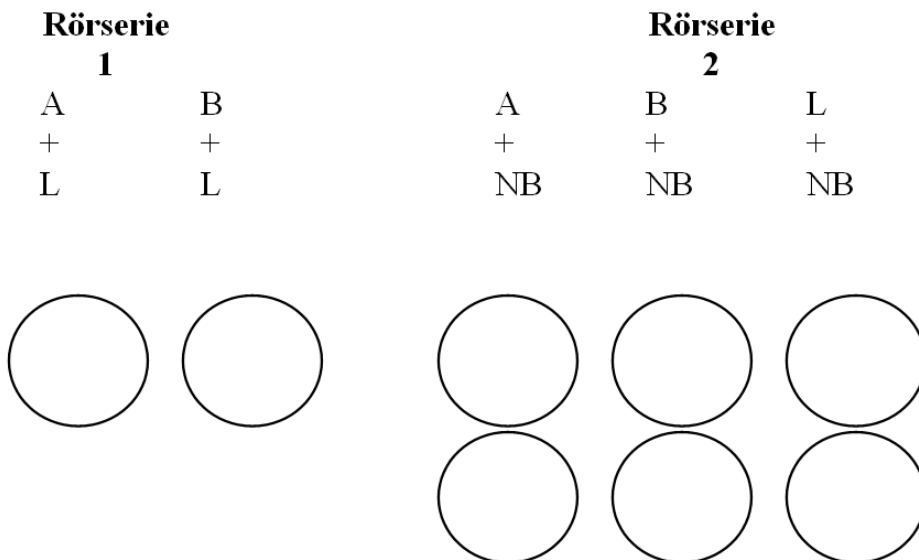
Utförande

Rörserie 1: Endast en av stammarna A och B kan överföra tetracyklinresistens till stam L. Hur tar vi reda på vilken av dem det är?

Förklara de olika stegen i utförandet; vad är de viktiga för?

Förklara vad som växer på de olika plattorna, och varför?

Rita in ditt resultat i figuren nedan (gör då ett antagande om vilken stam det är som kan överföra resistens och utgå från det).



5.4 Städning

Utförande

Se till att ni har läst av allt från samtliga laborationstillfällen. Gå igenom förvaringsbacken och släng kvarvarande plattor och rör på anvisad plats.