

# STOCKHOLMS BIOLOGISKA LABORATORIUM AB

## ALLMÄNNA RÅD OCH ANVISNINGAR FÖR ODLING AV MIKROORGANISMER

1. Mikroorganismer odlas i allmänhet enklast på ett agarsubstrat. Detta skall förutom vatten och agar - agar innehålla en energikälla ( t ex socker ) samt alla för organismen nödvändiga näringsalter och tillväxtämnen. Det färdiga substratet bör vara till konsistensen som hård gelé.
2. Ett bakteriesubstrat bör vara neutralt eller något basiskt, pH 7,0 - 7,5. Vid odling av järteckenbakterier är dock ett surare pH att föredra, pH 6,3 - 6,8, då pigmentbildningen är kraftigast. Svampsubstratet bör vara surt, pH 5,0 - 6,0, då de flesta svampars optimala tillväxt inträffar inom detta pH - intervall.
3. De flesta svampar och bakterier kan odlas vid rumstemperatur ( 20<sup>o</sup> - 25<sup>o</sup> C ). Den optimala tillväxten inträffar dock i allmänhet vid högre temperaturer ( 25<sup>o</sup> - 35<sup>o</sup> C ). Om tillväxten hastigt måste avbrytas, t ex på grund av att eleverna inte har möjlighet att "avläsa" ett försök vid den lämpligaste tidpunkten, kan försöksodlingarna placeras i kylskåp ( 2<sup>o</sup> - 5<sup>o</sup> C ) någon tid. Man får emellertid då ofta bildning av kondensvatten i t ex petriskålar. Denna kondensbildning kan många gånger reduceras om skålarna placeras upp och ned.
4. Stamkulturer förvaras bäst i kylskåp i väl proppade ( bomullspropp ) och med aluminiumhätta försedda snedagarrör. Oympning av stamkulturer bör i så fall ske var tredje eller var fjärde månad. Förvaring i frysbox rekommenderas inte.
5. Vid överympning av mikroorganismer till nytt substrat användes en ympnål, kollehallare, med spets av kromnickel- eller platinatråd. För bakteriearbeten användes en spets med ögla. För svampympningar är en något grövre och i spetsen utplattad platinatråd att föredra. Svampmycel är nämligen ofta segt och måste skäras.
6. Vid ympningen doppas ympnålen nedre del i alkohol och flammas över gaslåga. Spetsen bör rödglödgas. Den avkyles sedan genom att stickas ned i substratet. Vid bakterieympning doppas därpå ögla i bakteriekulturen och avstrykes med fram- och återgående rörelser på ytan av det nya agarsubstratet. Vissa arter såsom Lactobacillus plantarum är mikroaerofila. I dessa fall sticks platinaspetsen med bakterier flera gånger rakt ner i agarsubstratet. Bakterien kommer då att växa inne i agarn, där syrehalten är låg. Vid svampympning överförs ett litet stycke agar med därpå växande mycel till det nya substratet.
7. Bildning av fortplantningsorgan hos svampar ( perithecier, sporsäckar o s v ) är stundom en långsam process, som kan ta någon eller några veckor i anspråk.

8. Man bör iakttaga försiktighet vid arbete med rikt sporulerande svampar såsom Penicillium, Mucor och Aspergillus, så att icke försök och odlingar med andra organismer infekteras av dessa. Om flera olika arter skall användas samtidigt, ympas lämpligen de rikt sporulerande sist.
9. De arter av mikroorganismer som tillhandahålles av Stockholms Biologiska Laboratorium är icke patogena. Personer med utpräglad allergi mot mögel bör dock iakttaga viss försiktighet vid arbete med rikt sporulerande svamparter, i synnerhet Penicillium och Aspergillusarter.
10. När ett mikrobiologiskt försök är avslutat, bör använda glaskärl omedelbart rengöras, gammal näringsagar och engångsartiklar kastas. Kasta aldrig använd agar i diskbänkens vask, då detta ofelbart medför stopp i avloppet.

Litteratur

- Börje Norén: Mikrobiologi, Almqvist & Wiksell, Stockholm 1967
- G. Svartz-Malmberg och T. Holme: Mikrobiologi för laboratorieassistenter, Almqvist & Wiksell, Stockholm 1967

60

## Gramfärgning

Vid studiet av mikroorganismer använder man sig ofta av metoder där cellerna färgas för att de i sin helhet eller någon speciell struktur hos dem (cellvägg, kapsel, kärnsubstans etc.) lätt skall kunna iaktas i mikroskop. Gramfärgning är en färgningsmetod som har fått stor betydelse inom systematiken, därför att man med dess hjälp kan indela bakterierna i två olika huvudgrupper nämligen *Grampositiva* och *Gramnegativa*.

Metoden utarbetades av den danske läkaren Gram som egentligen försökte finna en metod att färga bakterier som befinner sig inne i en cellvävnad, men av en händelse kom underfund med att olika bakterier reagerar på två olika sätt gentemot färgningsmetoden.

Färgningen går till på det sättet att bakterierna sedan de rats på ett objektglas först färgas med en kristallviolett-lösning (basiska färgämnen färgar bl. a. nukleinsyror) och

sedan behandlas med en jodjodkaliumlösning och därpå med alkohol. Alkoholen verkar som ett avfärgningsmedel. De bakterier som vid behandlingen snabbt förlorar färg kallas Gramnegativa. Celler av andra bakteriearter kan motstå denna avfärgning och behåller den färg de fått av kristallviolett-lösningen. Dessa kallas Grampositiva.

Ofta kombineras färgningen med en s. k. kontrastfärgning med något rött färgämne t. ex. karbolfuksin. De Gramnegativa bakterierna färgas då röda medan de Grampositiva behåller den kristallvioletta färgen.

Denna reaktion med färgämnen, Gramreaktionen, har tilldragit sig stort intresse då det visat sig att den har samband med många andra egenskaper hos bakterierna. Alla bakterier som är rörliga och där rörelseorganen, flagellerna, är placerade i ena änden av cellen, är Gramnegativa. Alla orörliga stavformiga bakterier är Grampositiva. De Grampositiva hämmas av basiska färgämnen medan de Gramnegativa inte hämmas vid motsvarande koncentration. Känsligheten gentemot antibiotika är också olika hos Grampositiva och Gramnegativa arter.

### Gramfärgning (se s. 105)

1. Preparatet framställs och fixeras som vanligt.
2. Färga med karbolgentianviolett 1 minut varpå färgvätskan slås bort.
3. Behandla med jodjodkalium 1 minut, varpå lösningen slås bort. Torka försiktigt mellan filtrerpapper.
4. Preparatet avfärgas med 96%-ig alkohol upprepade gånger tills denna avrinner färglös. Alkoholen får icke droppas direkt på preparatet utan på objektglasets ena ända och avfärgningen utförs genom sakta vaggning av objektglasets. Avfärgningen bör pågå ca 1 minut.
5. Preparatet kontrastfärgas med utspädd karbolfuksin (1:20) under 15–30 sekunder samt spolras av och torkas.

Gramnegativa bakterier blir klart ljusröda; grampositiva bakterier mer eller mindre blåviolettera.

Blåglas bör ej användas framför lampan vid mikroskopering. Full belysning nödvändig.

## Framställning av mikroskopiska preparat

En liten droppe av det bakteriehaltiga materialet utstryks på ett rent objektglas med hjälp av en platinanål. Om materialet är fast, t. ex. från en koloni, behöver det blandas med en droppe vatten på objektglasets. Preparatet får torka genom försiktig värmning över en låga. Man säger att man *fixerar* preparatet. Det kan sedan färgas på olika sätt.

### Mikroskopets inställning

1. Kontrollera att svagaste okular (5×) sitter i tuben och att svagaste objektiv (10×) är inställt. Förstoringen blir då  $5 \cdot 10 = 50$  gånger. (Man anger oftast endast objektivets förstoring.) Kondensorn skall vara helt uppskruvad.
2. Ställ lampan på ungefär 1 dm avstånd framför mikroskopet. Justera spegeln, så att synfältet i okularet blir klart belyst, när lampan är tänd. Spegelns plana yta används.
3. Lägg preparatet på objektbordet i objektglasföraren. Objektet flyttas med hjälp av denna, så att det ställe, som skall undersökas, kommer i ljusstrålens väg.
4. Ställ in mikroskoptuben med den grova inställningsskruven, så att preparatet syns skarpt genom okularet. Finjustera belysningen sedan lampans mattskiva avlägsnats genom att skruva ned kondensorn ett par millimeter tills glödlampans periferi syns som en skarp linje. Belysningen centreras genom att spegeln ruckas något. Mattskivan anbringas sedan åter på sin plats. Nu är belysningen rätt inställd och lampan, spegeln eller kondensorn får härefter inte rubbas ur sitt läge. Den inkommande ljusmängden kan vid behov ändras med hjälp av bländaren. Ändra inte belysningen genom att sänka kondensorn!
5. När preparatet studerats med svagaste förstoring, övergår man till nästa förstoring (43×) genom att vrida på revolvern utan att höja tuben. Därefter behövs endast en ringa justering med tubens fininställningsskruv för att få objektet skarpt.
6. Vid övergång till starkaste förstoring (97×), vartill används oljeimmersion (se s. 93) måste tuben först höjas, varefter en liten oljedroppe läggs på objektet. Vrid därefter oljelinsen i läge och sänk tuben försiktigt, tills linsen kommer i kontakt med oljan. Under denna procedur betraktar man objektiven från sidan och ser till att det inte stöter mot glaset. Slutligen betraktar man preparatet genom mikroskopet och ställer in skärpan genom att långsamt vrida fininställningsskruven. Inställningen av starkaste förstoring underlättas, om man ser till att något större föremål med skarpa konturer (färgfläck, luftblåsa) finns i preparatet i synfältets mitt. Olja får inte användas till de svagare förstoringarna, men *måste* användas till immersionslinsen.

### Preparat av mögelsvampar

Placera en liten droppe av laktofenollösning på ett rent objektglas. Med en steril nål, böjd till en krok i änden, tas

litet material från en mögelkoloni. Se till att mycel och inte bara konidier kommer med vid prepareringen. Med hjälp av ett par nålar fördelar man försiktigt materialet i droppen och lägger ett täckglas ovanpå. Undvik så mycket som möjligt luftblåsor i preparatet.