

Linkadresserne fungerer pr. 1.7.2011. Forlaget tager forbehold for evt. ændringer i adresserne.

Antibiotikaforsøg

Denne øvelse kan laves i sammenhæng med forsøget 'Rendyrkning og identifikation af bakterier' fra Bioteknologi 2, tema 3.

Formålet med forsøget er at undersøge effekten af forskellige slags antibiotika – jf. Bioteknologi 4, s. 21-23, 38-41 – på to forskellige bakteriestammer som kan købes via dette link:

<http://www.emu.dk/gym/fag/bi/formularer/mikroorganismer.pdf>. Eleverne kan eventuelt selv medbringe noget antibiotika fra deres eget medicinskab. Information om antibiotika/lægemidler kan blandt andet findes på <http://www.medicin.dk/> og <http://www.netdoktor.dk/>.

Forarbejde

Støbning af LB agarplader i petriskåle (til 1000 mL: 10 g trypton eller pepton, 5 g gær ekstrakt, 10 g NaCl, 10 g agar, deioniseret vand til 1000 mL – blandes grundigt, autoklaveres og afkøles lidt inden ophældning; det rækker til ca. 30 plader). Plader til flydende antibiotika skal være ca. 7 mm tykke, mens plader til fast antibiotika skal være ca. 3 mm.

Materialer pr. gruppe

- 2 tynde agarplader
- 2 tykke agarplader
- Spritpen
- 2 bakteriekulturer i vækst
- Mikropipetter med sterile spidser
- Drigalskispatel
- 96 % ethanol
- Fyrfadsllys
- Pincet
- 4-6 slags fast antibiotika
- Propbor Ø 75 mm
- Flydende antibiotika I og II
- Sterilt vand

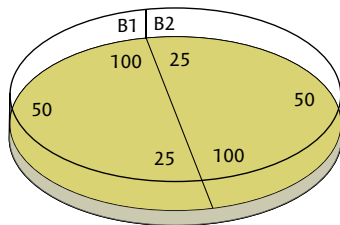
Fremgangsmåde

Jeres lærer demonstrerer hvordan man udplader bakterier, laver brønde og hvordan man arbejder korrekt med petriskåle og mikroorganismer, så risikoen for kontaminering minimeres.

Dag 1

1. Skriv på siden af bunddelen af to petriskåle med tyndt lag agar: navn eller mærke for jeres gruppe, samt A1 og A2. Skriv 4-6 små bogstaver (a-f) jævnt fordelt på bunden af de to petriskåle, idet et bogstav svarer til et fast antibiotikum.
2. Udplad 100 µL af den ene bakteriekultur på plade A1. Dette gøres ved at suge 100 µL bakteriekultur op med mikropipetten og tømme det ud på agarpladen. Drigalskispatten dyppes i ethanol, flammeres, afkøles på indersiden af petriskålens låg, og derefter fordeles bakteriekulturen grundigt og jævnt over hele agarpladen.
3. Med en ny pipettespids opsuges 100 µL af den anden bakteriekultur, der udplades på samme måde på plade A2.

4. Når agarpladerne er tørret lidt, placeres jeres faste antibiotika (tabletter) med en steriliseret pincet på de to agarplader oven på hvert lille bogstav, så fx penicillin ligger oven på a, streptomycin ligger oven på b, osv. Husk at sterilisere pincetten mellem plade A1 og A2 så bakterierne ikke sammenblandes.
5. Placér petriskålene med bunden nedad i varmeskab ved 37 °C et døgn og derefter i køleskab indtil aflæsning.
6. A-skemaet for dag 1 udfyldes, idet I finder information om de bakterier og det antibiotika I har anvendt.
7. Skriv på siden af bunddelen af de to petriskåle med tykt lag agar: navn eller mærke for jeres gruppe, lav en streg tværs over bunden så hver petriskål opdeles i to halvdele. Nummerer halvdelene B1, B2, B3, B4 ved at skrive på siden. Skriv med små tal jævnt fordelt på hver halvdel af bunden: 25, 50, 100, idet hvert tal svarer til koncentrationen af det flydende antibiotikum:



8. Udplad 100 µL af den ene bakteriekultur på plade B1,B2 som beskrevet ovenfor – husk at skifte pipettespids for hver udpladning i hele øvelsen.
9. Udplad 100 µL af den anden bakteriekultur på plade B3,B4.
10. Når agarpladerne er tørret lidt, laves seks brønde på hver plade, idet der laves en brønd over hvert tal. Brøndene skal være ca. 5 mm dybe og må ikke gå helt ned til bunden af petriskålen. Propboret steriliseres idet det dyppes i ethanol, flamberes og afkøles på indersiden af petriskålens låg. Der bores forsigtigt ned og agarproppen fjernes.
11. Steriliser propboret for hver brøndboring og lav de resterende 11 brønde på agarpladerne.
12. Fyld antibiotika i brøndene efter B-skemaet. Der bruges flydende antibiotikum I til brøndene i B1 samt B3 og flydende antibiotikum II til brøndene i B2 samt B4.
13. Placér petriskålene med bunden nedad i varmeskab ved 37 °C et døgn og derefter i køleskab indtil aflæsning.
14. B-skemaet for dag 1 udfyldes.

Dag 2

1. Aflæs jeres resultater og udfyld skemaerne.

A-skema dag 1

A1 bakteriefakta:
A2 bakteriefakta:
a antibiotikainformation:
b antibiotikainformation:
c antibiotikainformation:
d antibiotikainformation:
e antibiotikainformation:
f antibiotikainformation:

A-skema dag 2

	a	b	c	d	e	f
A1 klarhedszone Ø [mm]						
Kommentarer						
A2 klarhedszone Ø [mm]						
Kommentarer						

B-skema dag 1

B1,B3 antibiotikainformation:
B2,B4 antibiotikainformation:

Dag 1	Brønd B1 25	Brønd B1 50	Brønd B1 100	Brønd B2 25	Brønd B2 50	Brønd B2 100	Brønd B3 25	Brønd B3 50	Brønd B3 100	Brønd B4 25	Brønd B4 50	Brønd B4 100
Antibiotikum I [μ L]	25	50	100	-	-	-	25	50	100	-	-	-
Sterilt vand [μ L]	75	50	0	75	50	0	75	50	0	75	50	0
Antibiotikum II [μ L]	-	-	-	25	50	100	-	-	-	25	50	100
Dag 2												
Klarhedszone \varnothing [mm]												
Kommentarer												

Diskussion/bearbejdning

1. Beskriv resultaterne for henholdsvis A-forsøget og B-forsøget og forklar dem.
2. Er der forskel på resultaterne alt efter om det er grampositive eller gramnegative bakterier? Begrund svaret.
3. Er der overensstemmelse mellem klarhedszonens diameter og koncentrationen af antibiotikummet?
4. Hvorfor er det vigtigt at afkøle propboret inden brøndboring?
5. Hvis der er en enkelt bakteriekoloni i en klarhedszone, hvad kan det så være udtryk for?
6. Hvilke grunde kan der være til at medicinalindustrien hele tiden udvikler nye typer antibiotika?
7. Hvordan kan forsøget udbygges?
8. Hvad kan viden fra dette forsøg bruges til?