

Opgør med myten om Bunsenbrænderens sterile felt

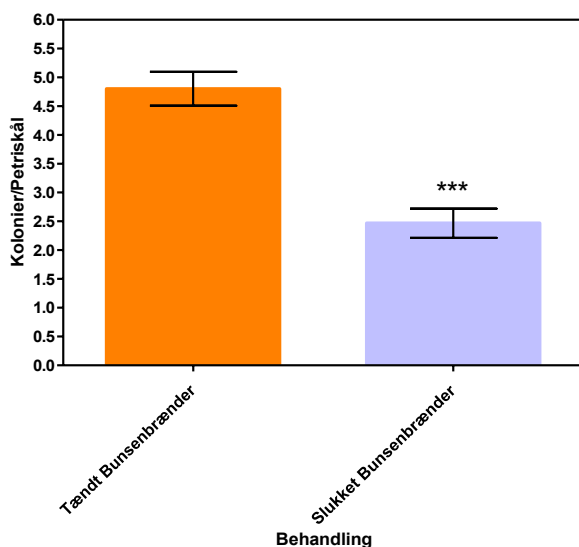
Anna Kaja Høyer, adjunkt, Zealand, ankh@zealand.dk

Forsøg viser, at det ikke reducerer antallet af kim at arbejde tæt på en tændt Bunsenbrænder. Med tændt Bunsenbrænder observeres signifikant flere kim end når Bunsenbrænderen forbliver slukket. Det gør altså situationen signifikant værre at bruge tændt Bunsenbrænder end at lade være.

Det sterile felt er udokumenteret

I mange laboratorier er det kutyme at tænde en Bunsenbrænder for at undgå luftbåren mikrobiel forurening, når man for eksempel arbejder med agarplader. Ideen er at Bunsenbrænderen skaber et sterilt felt, et cirkulært område rundt om Bunsenbrænderen hvor luftkim undgås.

På baggrund af et litteratur-studie var det ikke muligt at finde beskrevne forsøg eller data, der kunne underbygge teorien om, at Bunsenbrænderen skaber et sterilt felt. Der findes artikler, som forklarer mekanismen bag det sterile felt, dog uden at fremlægge dokumentation. De udokumenterede forklaringer tager udgangspunkt i at Bunsenbrænderens flamme opvarmer luften over flammen. Når en luftsøjle bliver opvarmet eller afkølet vil det skabe en horisontal variation i tryk som får luften til at bevæge sig (Ahrens 2000). Ifølge Sanders (2012), vil den varme luft bevæge sig væk fra flammens centrum, og den varme luft vil indeholde mikroorganismer, som bliver flyttet væk fra et område omkring Bunsenbrænderen. Bykowski, Holt & Stevenson (2019) derimod forklarer, at flammen varmer luften så meget op, at mikroorganismene på støvpartiklerne får reduceret deres levedygtighed, og på den måde opstår et sterilt felt.



Figur 1. Resultater fra forsøg med tændt og slukket Bunsenbrænder. Antallet af kolonier pr. Petrisål er givet afhængig af behandlingen med tændt Bunsenbrænderen eller slukket Bunsenbrænder. Hver søjle repræsenterer et gennemsnit af 96 Petrisåle og standardafvigelsen er givet som \pm SEM (standardafvigelsen af gennemsnittet). De to søjler er signifikant forskellige fra hinanden og det vises med de tre stjerner (***) $p \leq 0,001$.

Slukket Bunsenbrænder reducerer antallet af kim med 54 %

På grund af det manglende datagrundlag blev det undersøgt eksperimentelt, om Bunsenbrænderen skaber et sterilt felt - og størrelsen på det sterile felt (se forsøgsdesign).

Med tændt Bunsenbrænder opnås signifikant flere kim, end når Bunsenbrænderen er slukket (se Figur 1). Hver behandling indeholdt 96 Petriskåle og gennemsnittet af kolonier med hhv. tændt og slukket Bunsenbrænder var 4,8 og 2,5 kolonier pr. Petriskål. Den opstillede model forudsiger at behandling med tændt Bunsenbrænder vil give et gennemsnit på 4,6 kolonier pr. Petriskål og slukket Bunsenbrænder vil resultere i 2,1 kolonier pr. Petriskål. Ifølge modellen reducerer slukket Bunsenbrænder antallet af kim med 54 %. Afstanden til Bunsenbrænderen (op til 36 cm) havde ingen betydning for antallet af kim. Resultaterne viser, at Bunsenbrænderen ikke skaber et sterilt felt.

Bunsenbrænderens fremtid i det mikrobielle laboratorium

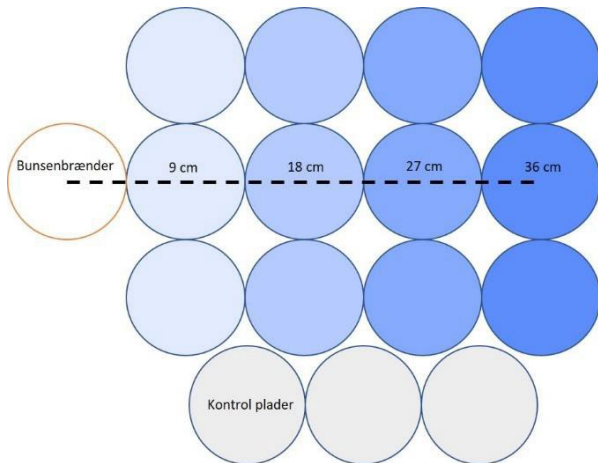
Det er muligt, at Bunsenbrænderen ved at varme luften op skaber turbulens, og på den måde øger antallet af luftbåren kontaminering. Man bør overveje hvornår man bruger Bunsenbrænder i det mikrobielle laboratorium, hvis den anvendes for at undgå luftkim. Da tændt Bunsenbrænder øger risikoen for kontaminering, vil laborantuddannelsen i Slagelse genoverveje, hvordan Bunsenbrænderen anvendes i undervisningen.

Forsøgsdesign

Forsøget indeholder to behandlinger – med tændt og slukket Bunsenbrænder. Foran hver Bunsenbrænder placeres 12 vækstmedieplader (Plate Count agar, PCA, 9 cm diameter, se Figur 2) som åbnes i en time. I behandlingen med tændt Bunsenbrænder, tændes Bunsenbrænderen før Petriskålene åbnes. Derudover er der 3 kontrol-plader (PCA) som ikke åbnes. Pladerne inkuberes i tre døgn ved 37 °C. Forsøget gentages otte gange.

Behandlingen med tændt og slukket Bunsenbrænder opsættes i samme tidsrum, men i hvert sit laboratorium. Hver gang forsøget gentages bytter den tændte og slukkede Bunsenbrænder laboratorium. Til hver opsætning af forsøget udvælges to tilfældige Bunsenbrændere fra vores samling og luftindtagets indstilling kontrolleres ikke. Bunsenbrænderens placering på bordet udmåles med lineal så Bunsenbrænderens forreste kant er 24 cm fra konsollen.

De 30 vækstmedie plader som bruges til en gentagelse af forsøget støbes i Laminar Air Flow bænk ud fra samme batch. De 12 Petriskåle placeres i fire rækker á 3 plader (se Figur 2). Den første række af Petriskåle placeres så den midterste Petriskåls kant støder op til Bunsenbrænderens kant. Den anden række af Petriskåle placeres så de støder op til den første række osv.



Figur 2. Forsøgsopstilling for en enkelt behandling.

Databehandling

Dataindsamlingen består i at tælle antallet af kolonier på hver Petriskål. Data blev analyseret med det statistiske software R (version 4.2.2, R Core Team 2022). Da data var Poisson-fordelt blev en "Generalised Linear Mixed Model" opstillet hvor "behandling", "afstand til Bunsenbrænder" samt interaktionen mellem "behandling og afstand til Bunsenbrænder" indgik som forklarende variable. Som tilfældig effekt indgik "gentagelse". For Poisson-fordelt data gælder det, at gennemsnittet er lig med variansen. Det undersøges om denne antagelse er overholdt ved at tjekke modellen for overdispersion. Ved at ændre link funktionen til kvadratrodd bliver overdispersion beregnet til 1,099. Ifølge "Data Analysis with R Statistical Software – A Guidebook for Scientists" af Rob Thomas er en overdispersion under 2 acceptabel. Ved hjælp af pakken DHARMA (Hartig 2022) blev residualerne undersøgt og godkendt. Modellen reduceres ved hjælp af ANOVA til en model hvor "behandling" er eneste forklarende variabel og "gentagelse" indgår som tilfældig effekt. Den endelige model: $\sqrt{y} = 2,14757 - 0,70322(x)$.

Kilder:

Ahrens, C. D. (2000). The atmosphere in motion: air pressure, forces, and winds. I C. D. Ahrens, *Meteorology Today - An Introduction to Weather, Climate, and the Environment* (s. 208-237). Pacific Grove: Brooks/Cole.

Bykowski, T., Holt, J., & Stevenson, B. (2019). Aseptic Technique. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, s. e31.

Hartig, F. (2022). DHARMA: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level / Mixed) Regression Models_. R package version 0.4.6, <<https://CRAN.R-project.org/package=DHARMA>>.

R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Sanders, E. (2012). Aseptic Laboratory Techniques: Volume transfers with Serological Pipettes and Micropipettors. *Journal of Visualized Experiments*, s. e2754.

Zealand

Thomas, R. *et al.* (2017). Data Analysis with R Statistical Software – A Guidebook for Scientists, Eco-Explore, Newport Printing.