

Forsøgsvejledning til lærere: Isolation af colifager fra spildevand

Virologi – læren om vira

Introduktion

Fager kan findes overalt, hvor der også er bakterier til stede, de er faktisk den mest udbredte organisme på jorden. Mikrobiologer har estimeret, at i 1 mL havvand kan der findes omkring 10^7 bakteriofager.

I denne øvelse skal eleverne se om de kan isolere colifager, altså bakteriofager som udelukkende inficerer E.coli, fra en prøve med spildevand. E.coli bakterier lever i tarmene hos mennesker og dyr, så hvis man finder E.coli i naturen, så er det et tegn på, at der er fækal forurening i området. Derfor er spildevand, det perfekte sted at lede efter colifager.

Spildevandsprøven inkuberes natten over i LB medie for at opformere antallet af colifager. LB medie er optimal medie til at gro E.coli bakterier i, hvilket dermed også vil opformere antallet af colifager.

Den nemmeste metode til at isolere colifager er ved at filtrere prøven igennem et $0,22\mu\text{m}$ filter og dernæst dryppe filtratet ud på en agarplade fuldt dækket E.coli bakterier. Et $0,22\mu\text{m}$ filter filtrerer alle levende organismer fra undtagen virus. I filtratet vil der derfor kun være fager. Hvis der er colifager til stede i prøven og dermed også i filtratet, så vil de kunne inficere E.coli bakterierne på agarpladen og dermed dræbe dem. Dette vil kunne ses som plaques på en agarplade der er fuldt dækket med E.coli bakterier.

Plaques dannes når en fag inficerer en bakterie. Når livscyklussen for fagen er ovre, så vil værtsbakterien dø og hundredvis til tusindvis af nye fager vil blive frigivet. På en agarplade fuldt dækket af bakterier, så vil fagerne sprede sig til de omkringliggende bakterier. Med tiden når flere og flere fager gennemfører deres livscyklus, så vil flere og flere bakterier dø. Dette vil ses som små huller i mængden af bakterier, hvor der ingen bakterier er tilstede, idet de er døde.

Størrelsen af plaquen afhænger af hvor hurtigt livscyklussen tager, samt hvor mange nye fager der dannes ved hver cyklus. Turbiditeten af en plaque afhænger af, om fagen er en obligat lytisk fag eller en temperat fag. En obligat lytisk fag vil efterlade helt klare plaques, idet alle bakterierne dræbes. Hvorimod en temperat fag vil efterlade mere turbide plaques, idet nogle af bakterierne overlever, hvis den inficerede fag går i den lysogene cyklus.

Materialer (til en klasse på 30, der er inddelt i 6 hold)

- En spildevandsprøve (ca. 5 mL er nok til en klasse på 30)
 - En plade med E.coli udstreget, brug helst en K12 stamme.
 - Sterilt LB medie (100 mL)
 - Sterile LB agar plader (24)
 - 0,22µm filter til sprøjter (12 agar)
 - 10 mL sprøjter (6)
 - Reagensglas m. låg eller plastikrør med låg (6 til prøve, 6 til E.coli overnatskultur, 6 til filtrering) - p1000 og p20 automatpipetter samt sterile spidser.
 - 37°C varmeskab
 - Varmebad m. ryst eller rysteinkubator (skal kunne holdes på 37°C)
 - Sterile podenåle eller drigalski spatel
 - Plastikposer til affald og stativ (6)
 - Handsker
- Evt. ekstra
- Reagensglas eller plastikrør til forfiltrering (6)
 - 0,45µm filter til sprøjter (6)
 - Sprøjter til forfiltrering (6)

Vær opmærksom på!

Spildevand skal håndteres meget forsigtigt. Brug derfor handsker og kittel når du håndterer spildevandsprøven.

Når eleverne udfører forsøget, skal de også bære kittel og handsker. De skal desuden være varsomme og presse prøven langsomt igennem filteret. De må ikke presse for hårdt.

Alt hvad der kommer i kontakt med bakterier og spildevand skal smides i en skraldespand til biologisk affald.

I tilfælde af spild af E. coli kultur, neutraliser spild med 70% ethanol. Ved tilfælde af kontakt med huden af E. coli, vask området grundigt med vand og sæbe.

Fremgangsmåde

Udføres af lærer

- 1) Dagen før forsøget overføres ca. 30 μ L spildevandsprøve til et rør m. 5mL forvarmet LB medie. Ryst røret med spildevand førend du udtager de 30 μ L. Overfør de 30 μ L til 5mL forvarmet LB medie. Lad denne blanding stå natten over v. 37C med ryst ca. 200 rpm eller deromkring.

Der skal være et rør med blandingen af LB medie og spildevand til hvert hold.

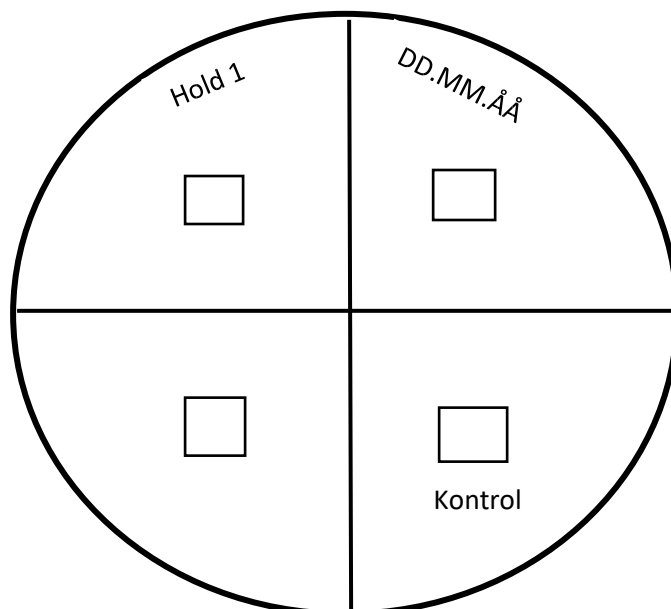
- 2) Inokuler også en E. coli koloni i 10mL LB medie. Hvert hold skal bruge 2 mL E. coli overnatskultur.

På dagen

Eleverne er delt ind i hold på 4-5.

Hvert hold får udleveret et rør med LB medie med spildevandsprøven der har stået natten over, samt et rør med E. coli overnatskultur og fire LB agar plader.

1. Eleverne starter med at dele pladerne over i fire: tre dele til prøve (spildevand) og et til kontrol (LB-medie). Desuden skal eleverne notere holdnummer og dato på pladerne. Som en ekstra markering kan eleverne lave en lille firkant i hver del, for at markere hvor de drypper prøven på. Se nedenunder for eksempel.



2. Eleverne starter med at overføre 500 μ L E.coli kultur til hver plade (på alle fire fordelte områder) med en p1000 automatpipette. For at fordele kulturen ud på pladen kan eleverne enten blidt dreje pladen rundt således at væsken fordeler sig eller de kan fordele den med en steril podenål eller drigalski spatel. Det er vigtigt at eleverne husker at arbejde sterilt. De skal holde røret med E.coli kultur skråt når de udtager

prøve. Desuden må de ikke fjerne låget helt fra agarpladen, når de overfører prøven og dernæst fordeler den.

- 3) Når dette er gjort, så tørres pladerne i et varmeskab, det er vigtigt at pladerne er helt tørre forend eleverne drypper prøver på.
- 4) Imens pladerne tørrer, så filtrerer eleverne spildevandsprøven der har stået natten over i LB medie. Det kan være noget hårdt at filtrere prøven direkte igennem et 0,22µm filter, så derfor kan eleverne med fordel først filtrere det igennem et 0,45µm og derefter filtrere filtratet igennem et 0,22µm filter.

Når de filtrerer spildevandsprøven i LB-medie, så skal eleverne stille deres opsamlingsrør i et stativ, således at det står fast.

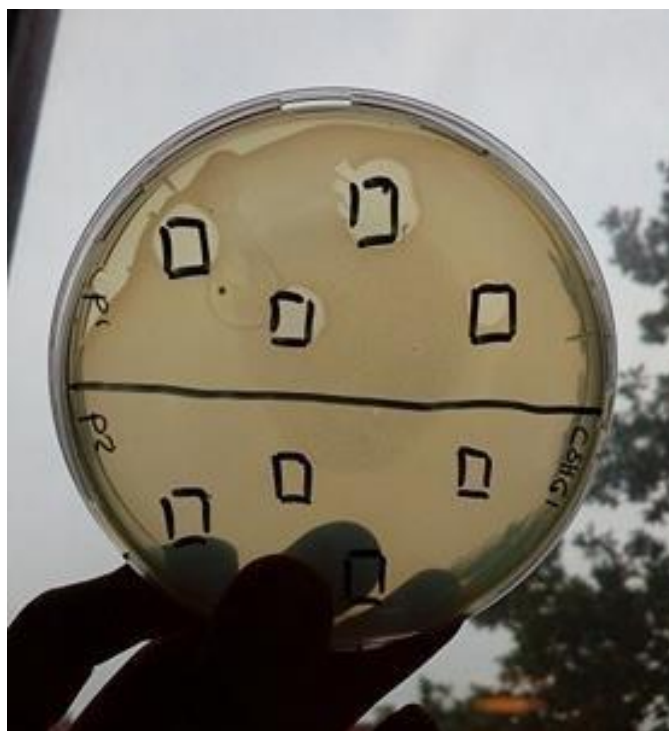
Dernæst tager de et filter ud af pakken og placerer det for enden af en sprøjte. Sprøjte og filter stiller de så op i opsamlingsrøret, således at filteret rører kanten af røret. Hermed kan de nemt fjerne presserøret fra sprøjten, hælde overnatskulturen (LB medie + spildevand) i sprøjten, placere presserøret i sprøjten igen og forsigtigt presse overnatskulturen (LB medie + spildevand) igennem filteret og direkte ned i opsamlingsrøret.

- 5) Så snart de er færdige med at filtrere spildevandsprøven i LB-medie, så smides sprøjte og filter i skraldespanden.
- 6) Med en p20 automatpipette drypper eleverne nu 5µL filtrat (fager) ud på den tørret LB agarplade med E.coli på de små firkantede afmærkede områder. Der skal dryppes 3x5µL på hver plade. Igen er det vigtigt at de husker deres sterilteknik og holder låget let henover pladen, når de drypper filtratet ud.
- 7) Som kontrol drypper eleverne 5µL sterilt LB medie på den fjerdedel, som de har markeret som kontrol, på det lille firkantede afmærket område.
- 8) Lad filtratet tørre på pladerne førend de stables, placeres i en pose og inkuberes med bunden i vejret.

Efter 1-2 dage kan pladerne tages ud af inkubatoren og tjekkes for plaques.

Resultat

Elevernes plader burde gerne se nogenlunde sådan ud.



Spørgsmål og svar

1. Hvilke andre mikroorganismer (bakterier og virus) er kendt for at forårsage madforgiftning? Giv en kort beskrivelse af 3-4 andre, inkluder ting som udseende, habitat og symptomer og andet i finder vigtigt.

Salmonella

- Rod formet, gram negativ bakterie, der er i familie med E.coli.
- Findes både i tarmene hos varmblodet og koldblodet dyr, desuden også i naturen.
- Symptomer: Diarre, opkast, feber og mavesmerter

Listeria

- Rod formet, gram negativ bakterie. Kan leve både anerobt og aerobt.
- Findes både i jorden, på planter, i tarmene hos mennesker og dyr og i produktionsmiljøer -
Symtomer: Feber og diarre, kan desuden spredes uden for tarmene og give anledning til sygdommen listeriose (sjældent).

Norovirus

- Icosahedral virus uden lipid membran. Har positivt enkeltstrenget RNA genom
- Findes i mennesker. Smitter via forurenede fødevarer og mad og desuden også som aerosols. Er yderst smitsom.
- Symptomer: Muskelsmerter, opkast, mavesmerter og vandet diarre

Campylobacter

- Gram negativ bakterie som har en snoet form, er desuden også motil (kan bevæge sig).
- Campylobacter findes hovedsageligt hos fjerkræ og andre dyr.
- Symptomer: Blodig diarre, kramper, feber og smerter

2. Hvis i skulle inkludere fager imod disse bakterier i jeres fagcocktail, hvor ville i så lede?

I deres habitat

3. Hvilke faktorer tror i, har indflydelse på størrelsen af en plaque.

- Antallet af fager i prøven
- Hvor mange nye fager, der bliver dannet ved hver livscyklus.
- Inkuberingstid – desto længere tid pladen står, desto større bliver pladen.
- Antallet af nye værter i nærheden.

4. Forventer i at få homogene (samme fag) eller blandede (forskellige fager) plaques på jeres plader? Giv en begrundelse på jeres svar.

Blandede plaques, idet prøven kommer fra naturen af (spildevandsanlæg)

5. Er der fager som i ikke kan isolere på denne måde? Altså fager som ikke ville give plaques.

Fager der er gået i den lysogene livscyklus vil ikke give plaques.