

# Forsøgsvejledning – Isolering af colifager fra spildevand

## Virologi – læren om vira

### Introduktion

Forestil dig du arbejder i forskningsafdelingen på et medicinalfirma der udvikler og producerer fagcocktails. Dig og din gruppe har fået til opgave at udvikle en ny fagcocktail imod madforgiftning. Under jeres forarbejde finder i frem til at patogene arter af bakterien E.coli ofte er skyld i tilfælde af madforgiftning. Derfor vil i gerne inkludere fager der inficerer disse patogene E.coli arter i jeres fagcocktail – såkaldte colifager. I finder ret hurtigt frem til at E. coli's naturlige habitat bl.a. er i tarmene på mennesker og andre dyr. Fra naturvidenskabelige artikler finder i også ud af, at andre forskere har haft held til at isolere colifager fra spildevand bl.a. ved brug af metoden fagtypning. I beslutter jer derfor at forsøge med samme metode som disse forskere.

Fagtypning blev oprindeligt brugt til at artsbestemme bakterier. Man havde en samling af bakteriofager, som man havde karakteriseret, således at man kendte deres vært/værter. Når man så skulle artsbestemme en bakterie, så groede man bakterien i et tyk lag på en agarplade. Når bakterien var vokset frem, så dryppede man fager ud på bakterien. Hvis der kom plaques, som er små huller i laget af bakterier, så kunne man ud fra bakteriofagen artsbestemme bakterien. Man kan også benytte metoden til at bestemme værter for fager, ved at benytte kendte bakterier og ukendte fager.

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.

### Materialer (pr. hold)

- Et rør med E.coli overnatskultur
- Et rør med spildevandsprøve i LB medie, der har stået natten over.
- Et eppendorfrør med sterilt LB medie (kontrol)
- Sterile LB agar plader (4)
- 0,22µm filter til sprøjter (2)
- 10 mL sprøjter (1)
- Reagensglas m. låg eller plastikrør med låg (1)
- p1000 og p20 automatpipette, samt sterile spidser.
- Sterile podenåle eller drigalski spatel
- Plastikposer til affald og stativ (1)
- Handsker

## Vær opmærksom på!

I kommer ikke til direkte at håndtere spildevand, men derfor skal i stadig arbejde forsigtigt. Brug handsker og kittel når i arbejder og husk at vaske hænder, når i er helt færdige.

Når i skal filtrere jeres prøve, så pres forsigtigt prøven igennem filtret. I må endelig ikke presse for hårdt.

Det er vigtigt at i arbejder så sterilt som muligt. Så når i udtager E.coli kultur til jeres agarplader, så hold røret skråt når i udtager. Det samme gælder, når i fordeler kulturen på agarpladen, sørg for at holde låget henover pladen, mens i fordeler. I kan evt. være to om det, en der fordeler og en der holder låget.

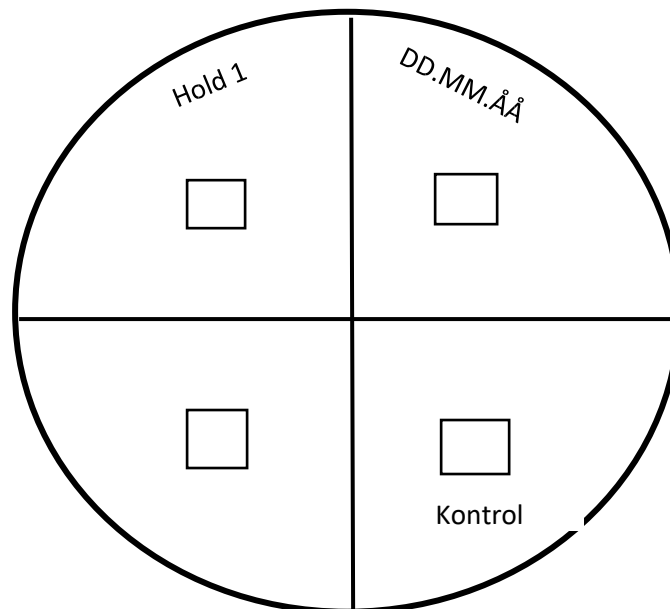
I tilfælde af spild af E. coli kultur, neutraliser spild med 70% ethanol. Ved tilfælde af kontakt med huden af E. coli, vask området grundigt med vand og sæbe.

## Fremgangsmåde

### På dagen

Hvert hold får udleverede følgende: 1x rør m. E.coli overnatskultur, 1x rør m. spildevandsprøve i LB medie der har stået natten over, 4x LB agarplader.

- 1) Start med at inddele alle agarpladerne i fire lige store dele. Marker en af delene som kontrolområde og de tre andre som prøveområde. Skriv desuden holdnummer og dato på. Evt. marker med en lille firkant, hvor prøven vil blive lagt. Et eksempel på dette ses på nedenstående figur.



Hvis pladerne er lidt dugget, så start med at tørre dem i et varmeskab. Sæt dem ind med bunden i vejret og ryk bunden så den står skævt op låget.

- 2) Når pladerne er tørre så overfør 500µL E.coli overnatskultur til hver agarplade med en p1000 automatpipette på alle fire afmærkede områder. For at fordele kulturen ud på pladen så kan i enten dreje pladen blidt fra side til side eller i kan benytte en steril pødenål eller drigalski spatel. Husk at arbejde så sterilt som muligt.

- 3) Når dette er gjort så tørres pladerne i et varmeskab, det er vigtigt at pladerne er helt tørre forend prøven dryppes på.
- 4) Imens pladerne tørrer så filtrer spildevandsprøven der har stået natten over i LB medie. Det kan være noget hårdt at filtrere prøven direkte igennem et 0,22 $\mu$ m filter, så derfor kan prøven med fordel for filtreres igennem et større filter på 0,45 $\mu$ m.

Stil et opsamlingsrør (eller to) i et stativ, således at de står fast. Dernæst tager i et filter ud af indpakningen og placerer det for enden af en sprøjte. Placer sprøjte og filter i et af rørene, så i kan filtrere prøven direkte ned i røret. Hvis i benytter jer af to rør, hvorfra et er til forfiltrering så husk at notere hvilket rør i bruger til hvad.

Fjern presserøret fra sprøjten, mens filter og resten af sprøjten stadig står i røret. Hæld forsigtigt jeres prøve op i sprøjten, placer presserøret tilbage i sprøjten og pres forsigtigt prøven igennem filteret og ned i opsamlingsrøret.

- 5) Så snart i er færdige med at filtrere prøven så smides sprøjte og filter i skraldespanden.
- 6) Med en p20 automatpipette drypper i nu 5 $\mu$ L filtrat ud på den tørret LB agar plade med E.coli på de små firkantede afmærkede områder. Der skal dryppes 3x5 $\mu$ L på hver plade. Igen er det vigtigt at i husker jeres sterilteknik og holder låget let henover pladen, når i drypper filtratet ud.
- 7) Som kontrol drypper i 5 $\mu$ L sterilt LB medie på den fjerdedel, som i har markeret med kontrol, på det lille firkantede afmærkede område.
- 8) Lad filtratet tørre på pladerne førend de stables, placeres i en pose og inkuberes med bunden i vejret. Husk at skrive holdnummer på posen.

Efter 1-2 dage kan pladerne tages ud af inkubatoren og i kan tjekke dem for plaques.

## Spørgsmål

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.
2. Hvis i skulle inkludere fager imod disse bakterier i jeres fagcocktail, hvor ville i så lede?
3. Hvilke faktorer tror i, har indflydelse på størrelsen af en plaque.
4. Forventer i at få homogene (samme fag) eller blandede (forskellige fager) plaques på jeres plader? Giv en begrundelse på jeres svar.
5. Er der fager som i ikke kan isolere på denne måde? Altså fager som ikke ville give plaques.