

UV-bestråling af mikroorganismer

Man kan slå mikroorganismer ihjel vha. ultraviolet stråling (UV-lys). Det skyldes at strålingen er så energirig at den kan ødelægge molekyler, fx i celler som derfor kan dø. UV-strålingen er typisk i størrelsesorden dobbelt så energirig som synligt lys. Målet med dette forsøg er at eftervise denne skadevirkning på mikroorganismer. I almindelige renseanlæg UV-bestråler man normalt ikke spildevandet, men det er en mulighed hvis man skal rense spildevand med et stort indhold af mikroorganismer, fx hospitalsspildevand.

For at påvise strålingseffekten, vil vi prøve at få nogle gærceller til at vokse på et fast næringsmedie og se hvad der sker hvis vi forinden har udsat nogle af dem for UV-stråling. I et hospitalsrenseanlæg er de fleste af mikroorganismene bakterier, men det er lettere at arbejde med gærceller hvorfor vi bruger dem i dette forsøg.

Næringsmediet kaldes YPD-agar og er agar iblandet nogle næringsstoffer. Agar fremstilles ud fra nogle havalger, og det kan i almindelighed ikke nedbrydes og udnyttes af mikroorganismer. Til gengæld kan det bruges som stivelsesmiddel, og det danner ved opløsning og opvarmning samt efterfølgende nedkøling en såkaldt gel som man kan have som en plade i en petriskål. Under fremstillingen af gelen kan man tilsætte nogle næringsstoffer der er velegnede for de

mikroorganismer som man ønsker at dyrke.

Næringsstofferne og pH i YPD-agaren er specielt velegnet til at gærceller kan leve og dele sig.

Gærceller er encellede svampe. I nogle tilfælde kan andre svampeceller samt bakterier også vokse på plader af YPD-agar, men skulle det ske, vil vi se bort fra væksten af disse som normalt let skelnes fra gærvæksten.

Vi vil starte forsøget med at sprede en tynd opslæmning af almindelig bagegær i nogle petriskåle med YPD-agar. Opslæmningen skal være så tynd, at gærcellerne så vidt muligt ikke lander oven i hinanden på agaren. Nogle af petriskålene udsætter vi for UV-bestråling, mens andre ikke bestråles, men i øvrigt behandles på præcis samme måde så de kan fungere som kontrollforsøg. Derefter placerer vi petriskålene ved forhold hvor gærcellerne kan dele sig og derved blive til flere. Når de har delt sig tilstrækkeligt mange gange, vil der hvert sted hvor der landede en enkelt gærcelle, nu være en lille *koloni* af gærceller som er synlig med det blotte øje. Antallet af kolonier i petriskålen svarer til antallet af gærceller der oprindeligt blev spredt i skålen.



Figur 1 Kolonier af gærceller på YPD-agar i en petriskål.

Både af hensyn til sikkerhed og for ikke at få falske resultater, er det vigtigt så vidt muligt at arbejde sterilt når man arbejder med mikroorganismer. Uønskede mikroorganismer kan lande på agarpladerne fra fx luften, hænderne eller de redskaber som vi berører agaren med. Derfor skal man vaske hænder inden forsøget og bruge redskaber der er steriliserede, dvs. uden levende mikroorganismer. Når man løfter låget på petriskålen, skal man gøre det kortvarigt og så lidt som muligt. Man skal også undgå gennemtræk i lokalet, for det kan føre særligt meget luft med mikroorganismer hen over agarpladerne så de bliver forurenede med andre mikroorganismer end dem vi ønsker.

Sikkerhed

Så længe nyfremstillede petriskåle med næringssubstrat ikke har været åbne, er de sterile og ufarlige at håndtere - man skal dog ikke indtage (fx spise) noget fra dem.

Når de har været åbnet, kan der være landet mikroorganismer på substratet. Efterfølgende deler de sig og bliver til *vildt mange* mikroorganismer. Nogle af disse kan være sygdomsfremkaldende, så derfor må man i almindelighed *ikke* åbne petriskålene igen. For eksempel kan gule kolonier bestå af gule stafylokokker, en bakterieslægt der kan give dødelig blodforgiftning.

Efter forsøget steriliseres petriskålene, typisk ved autoklaving ved 121 °C i 20 minutter, inden de smides væk. Ved den behandling dør alle mikroorganismerne, selv eventuelle endosporer (bakterier der er i et særligt robust hvilestadium).

Derfor er det også altid vigtigt at man efter at have lavet forsøg, vasker hænderne grundigt, og når der er arbejdet med mikroorganismer, afsprittes hænderne også gerne med håndsprit.

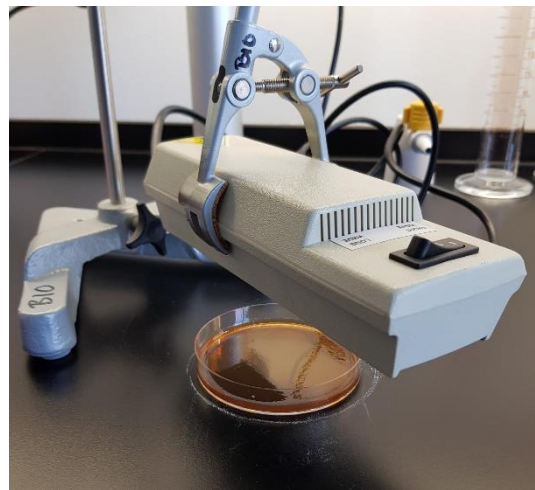
Materialer

6 petriskåle med steril YPD-agar pr. hold, bagegær, steril demineraliseret vand, mikropipetter med sterile spidser, magnetomrørere med sterile røremagneter, reagensglasryster (vortex), drigalskyspatler og ting til at sterilisere dem, UV-lamper (4 W, 254 nm) spændt op i stativer, kridt til at tegne på bordet, linial, vægt, tape, sprittush, 4 L plasticposer. Desuden mikrocentrifugerør, spatler, 250 mL bægerglas, 100 mL måleglas - alt sammen steriliseret.

Fremgangsmåde

1. Vask hænder, og sprit dem om muligt af.
2. Husk hele tiden at bruge sterilt udstyr, og undgå at forurene prøverne med host og den slags.

3. Afvej ca. 1 g gær direkte i bægerglasset ved at stille det på vægten og overføre gæren med den sterile spatel.
4. Læg en rørepinde i glasset.
5. Afmål 100 mL steril, demineraliseret vand, og hæld det i bægerglasset.
6. Opslæm gæren i bægerglasset ved at placere det på en magnetomrører.
7. Når gæren er *helt* opslæmmet, overføres vha. mikropipette 10 μ L gæropløsning samt 990 μ L steril, demineraliseret vand til et mikrocentrifugerør.
8. Luk mikrocentrifugerøret, og omrøst indholdet 3-5 sek. vha. reagensglasrysteren.
9. Overfør 10 μ L af *denne* blanding til et nyt mikrocentrifugerør sammen med 990 μ L steril, demineraliseret vand, og omryst denne blanding på samme måde som før. Denne blanding kaldes **gærfortyningen**.
10. Overfør vha. mikropipette 50 μ L af gærfortyningen til en af petriskålene med YPD-agar.
11. Spred gærfortyningen jævnt på hele pladen vha. en steril drigalskyspatel, og læg låget på petriskålen.
12. Overfør på samme måde 50 μ L gærfortyning til hver af de andre petriskåle, og spred det med drigalskyspatlen. Husk at sterilisere drigalskyspatlen hver gang! I har nu seks petriskåle med gærfortyning på YPD-agar. De seks petriskåle med indhold skal gerne være ens.
13. Skriv med lille skrift holdnavn i kanten af *bunden* på petriskålene. På tre af dem skrives desuden 'UV'.
14. Spænd UV-lampen op i et stativ, så den kan lyse nedad. Placer lampen så afstanden mellem lampen og agaroverfladen på en petriskål der står lige under lampen, er 6 cm.
15. Tænd UV-lampen på bølgelængden 254 nm, og placer en *tom* petriskål lige under lampen så *hele* pladen er belyst. **Kig ikke direkte ind i UV-lyset**. Tegn en kridtstreg på bordet så det er let at se hvor petriskålene skal placeres - det er jo vigtigt at de bliver placeret og dermed belyst ens. Fjern den tomme petriskål, men lad lampen være tændt.
16. Fjern nu låget på en af de tre petriskåle der er mærket 'UV', og sæt den ved kridtstregen under lampen i præcis 30 sekunder. Fjern den herefter, og sæt låg på.
17. Belys på samme måde de to andre petriskåle der er mærket 'UV'.
18. Sæt et par tapestrimler på alle de seks petriskåle så låget ikke kan tages af, men så der stadig er luftsprække det meste af vejen rundt ved låget.
19. Sæt de seks petriskåle i en stabel i en 4 L plasticpose. Slå en knude på posen, så agaren i skålene ikke tørrer ud.
20. Placer petriskålene ved 20-30 °C indtil der ses tydelige gærkolonier på i alt fald nogle af pladerne. Ved 30 °C tager det typisk et døgn's tid, og ved lavere temperatur et par dage.
21. Optæl nu antallet af kolonier på de enkelte plader *uden at tage låget af*, og noter i skemaet nedenfor.



22. Autoklaver petriskålene, så alle mikroorganismene dræbes.

Resultater

	Antal kolonier	Antal kolonier	Antal kolonier	Middeltal
Ikke UV-bestrålet				
UV-bestrålet				

Overvejelser

- Analyser resultaterne: Beskriv dem med få ord, og forklar dem. Kom gerne ind på nogle molekylære celledetaljer.
- Hvis UV-bestrålingen ikke har hindret gærvæksten tilstrækkeligt, hvilke faktorer kan man så ændre for at øge effektiviteten?
- Vi har arbejdet med gærceller, men i fx hospitalsspildevand er det i høj grad bakterier man kan have behov for at slå ihjel vha. UV-bestråling. Undersøg hvordan bakterier adskiller sig fra gærceller, og diskuter om man kan forvente samme effekt af bestrålingen hvis det var bakterier vi havde arbejdet med.
- UV-stråling og synligt lys er eksempler på elektromagnetisk stråling. Man kan lidt forsimplet betragte elektromagnetisk stråling som små pakker af energi. Pakkerne kaldes fotoner. Fotonernes energi afhænger af strålingens bølgelængde på denne måde:

$$E_f = \frac{198,6 \text{ aJ} \cdot \text{nm}}{\lambda}$$

hvor E_f er fotonenergien og λ er bølgelængden. Enheden aJ betyder attojoule og er det samme som 10^{-18} J, altså en *meget* lille energimængde. Beregn hvilken bølgelængde strålingen skal have for at være halvt så energirig som den UV-stråling vi bruger (254 nm). Undersøg hvilken farve synligt lys det svarer til. Overvej om dette beregningseksempel ændrer svaret på nogle af de andre spørgsmål?

- Hvor mange gange er vores første gæropslætning (den vi lavede i et bægerglas) fortyndet i vores *gærfortynding* som vi spreder på agarpladerne? Hvad er koncentrationen i g/mL? Vurder om det er en passende fortynding, og foreslå hvordan vi kunne have lavet en passende fortynding hvis det ikke er tilfældet.