

Øvelse 2

Bakterier i drikkevand

Formål:

Vi ønsker at bestemme antallet af bakterier i en milliliter (mL) af forskellige vandprøver.

Følgende kan fx undersøges:

- Vand fra drikkevandsflaske, vandværksvand fra hanen, kogt vand (sterilt vand), søvand, vand fra et toilet.

Efter fælles aftale undersøger fx halvdelen af grupperne en type vandprøver (fx fra en drikkeflaske brugt gennem længere tid). Den anden halvdel undersøger en anden type vandprøver (fx frisktappet vandhanevand).

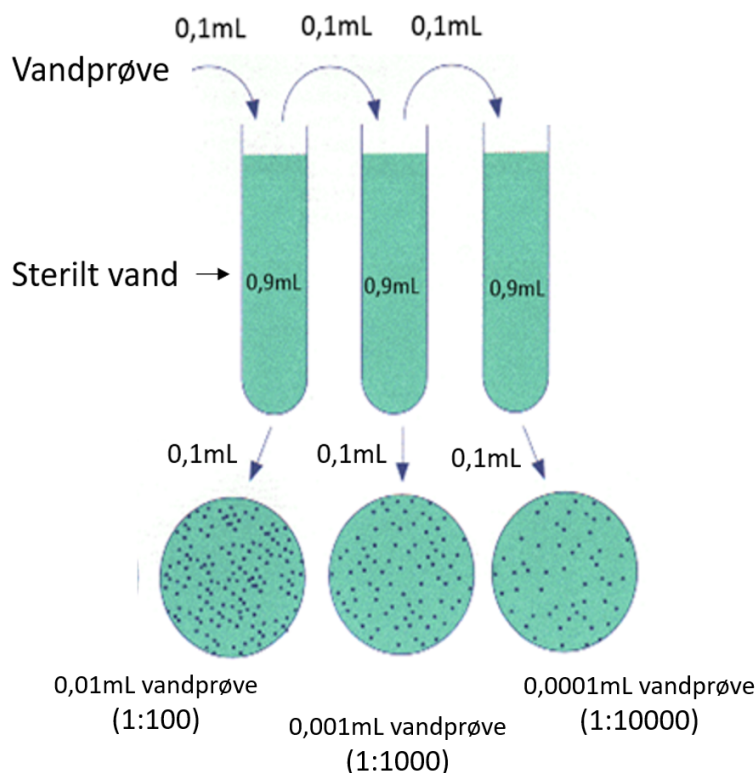
Teori:

I mikrobiologi er det ofte meget nyttigt at sprede bakterier på specielle plader med et næringsmedium, som bakterierne kan bruge som fødekilde, og med agar, som gør mediet stift. Udpladning kan for eksempel bruges til at tælle antal bakterier i en prøve. Der plades ud ved at overføre 0,1 mL (=100µL) fra en fortynding til en plade og sprede væsken over pladen med en steriliseret drigalskispatel. Spatelen skal steriliseres mellem hver udpladning. Det gøres ved at dyppe den i 70 % sprit og føre den hurtigt ind over et stearinlys. Ved denne metode går der ild i spritten, som damper af. Nu er spatelen meget varm, hvilket vil dræbe alle mikroorganismer, hvis den blev brugt direkte. Derfor sættes spatelen i siden af agarmediet, så der sker en hurtig afkøling.

Efter udpladning sættes pladerne til inkubering, så mikroorganismene kan få lov at vokse. Efter inkubering vil man kunne se kolonier på pladerne. Kolonierne består af millioner af bakterier og kolonien er fremkommet af én enkelt bakterie, som har delt sig og er blevet til rigtig mange bakterier. Antallet af kolonier skulle derfor gerne stemme overens med, hvor mange bakterieceller, der har været fra start.

Når man skal udplade prøver, er det vigtigt at forberede passende fortyndinger. Ved at fortynde prøverne kommer der ikke for mange bakterier på pladerne, så kolonierne kan skelnes fra hinanden og er mulige at tælle. Derfor laver vi i dette eksperiment en

fortyndingsrække. Gennem fortyndingsrækken fortyndes vandprøven i et passende omfang, så der forhåbentlig kommer 50-100 kolonier på en af pladerne. Ud fra antallet af kolonier kan vi beregne antallet af bakterier i vandprøven. Princippet i fortyndingsrækken ses her:



0,001 liter (L) = 1mL = 1000 μ L

Materialer:

Hver gruppe skal bruge:

- Vandprøve
- 4 LB-agarplader
- 1 mikropipette (100 μ L) med tilhørende pipettespidser *eller* steril engangspipette.
- 4 mikrocentrifugerør med 900 μ L sterilt vand. (Forberedt af læreren).
- Sprittusch
- Plastikpose
- Tape til lukning af pladerne
- Drigalskispatel
- Flaske med sprit, stearinlys og tændstikker

Fremgangsmåde:

Arbejdsdag 1:

1. Skriv henholdsvis "1:100", "1:1000", "1:10000" og "kontrol" på siden af LB-agar-pladerne med sprittuschen.
2. Skriv henholdsvis "1:100", "1:1000", "1:10000" og "kontrol" på siden af mikrocentrifugerørene.
3. Overfør med mikropipetten 100µl af vandprøve til rør "1:100". Bland væskerne ved at banke på røret med en finger. Husk at lukke låget.
4. Overfør med mikropipetten 100µl fra rør 1:100 til rør 1:1000. Bland væskerne ved at banke på røret med en finger. Husk at lukke låget.
5. Overfør med mikropipetten 100µl fra rør 1:1000 til rør 1:10000. Bland væskerne ved at banke på røret med en finger. Husk at lukke låget.
6. Overfør vha. mikropipetten 100µL væske fra mikrocentrifugerør 1:100 til LB-agar-pladen "1:100". Placer væsken midt på pladen.
7. Fordel blandingen på vækstmediet med en steril drigalskispatel. Drigalskispatel dyppes i sprit og afbrændes før brug. Hold spidsen nedad, så brændende sprit ikke løber ned mod hånden. Husk at afkøle den i mediet før I spreder væsken ud.
8. Gentag punkt 7. og 8. med mikrocentrifugerørene og pladerne "1:1000" og "1:10000".
9. Lav kontrollen, hvor I vha. mikropipetten overfører 100µL sterilt vand til en kontrol-agarplade. Fordel blandingen på vækstmediet med en steril drigalskispatel.
10. Skriv navn og klasse på kanten petriskålene, stabel dem og vend dem med bunden opad. Sæt evt. tape om og pak jeres stabel ind i en plasticpose. Inkubér pladerne i en lukket plastikpose med bunden opad i ca. 2 døgn ved 37°C. Åbn ikke pladerne herefter, da der er risiko for at vi har opformeret skadelige bakterier.

Arbejdsdag 2:

Noter antallet og udseende af kolonierne på pladerne. Husk at pladerne ikke må åbnes.

Sæt evt. en prik med sprittuschen ud for hver koloni efterhånden som de bliver talt. Er der flere kolonier end det er muligt at tælle skrives blot "utællelig" i feltet. Tag desuden et billede af en plade med kolonier.

Resultater:

1) Indsæt billeder og værdier ift. antal kolonier.

Billede	Billede	Billede	Billede
1:100	1:1000	1:10000	kontrol
antal kolonier:	antal kolonier:	antal kolonier:	antal kolonier:
antal kolonier pr. mL:	antal kolonier pr. mL:	antal kolonier pr. mL:	antal kolonier pr. mL:

I skal udvælge resultaterne fra den eller de plader, hvor der er ca. 50-100 kolonier. Benyt resultaterne fra disse plader til beregningerne.

2) Beregn antallet af bakterier i:

a) 1mL vand fra drikkeflasken

b) 0,5 liter vand (typisk drikkeflaske)

(Husk mellemregninger og forklaringer). Indsæt resultaterne i skemaet nedenfor.

Type af vandprøve:	Antal kolonier pr. plade	Antal kolonier pr. mL	Antal kolonier pr. 0,5 liter
Plade (angiv fortyndingen)			

3) Resultaterne for hele klassen samles i følgende skema:

Vandprøve (type)	Gruppe (navne)	Antal kolonier pr. mL

4) Diskussionsspørgsmål:

- a) Angiv hvilken usikkerhed og fejlkilder der er forbundet med undersøgelsen og hvilken effekt dette vil have på resultaterne.
- b) Forklar hvorfor vi lavede kontrolplader?
- c) Hvis der påvises mere end 200 kolonier pr. mL ved 37°C, så bør vandet koges inden det anvendes som drikkevand. Vurder hvilke vandprøver der ifølge undersøgelsen kan drikkes uden kogning.
- d) Diskuter om et højt antal bakterier i drikkevand nødvendigvis betyder at vandet er farligt at drikke.

5) Konklusion:

Skriv en kort sammenfatning på hele rapporten med fokus på resultaterne.