Expertgroep 3: Laboveiligheid & opstellen van een protocol

Doelen

Na je onderzoek moet je kunnen:

- Veiligheid van situaties in een biologisch labo inschatten
- Maatregelen BSL-1 opsommen
- Bacteriën kunnen uitstrijken
- Protocol opstellen over opvolgen bacteriële groei

Onderdeel 1: *E. coli* in het labo

- Waarvoor staat *E. coli*? Waar komt het voor?

E. coli staat voor *Escherichia coli*. Het is een van de meest voorkomende bacteriën in de dikke darm van de mens en van warmbloedige dieren, zoals zoogdieren.

- (Verdieping) Is *E. coli* een ziekteverwekkende bacterie? Denk je dat het veilig is om in het labo hiermee te werken?

De meeste stammen zijn niet ziekteverwekkend en leven normaal in je darmen. Veel stammen zijn zelfs nuttig voor bijvoorbeeld vertering en vitamineproductie. Slechts enkele specifieke stammen zijn wel pathogeen en kunnen ziekten veroorzaken zoals diarree of voedselvergiftiging.

Werken met *E. coli* in het labo kan veilig zijn, maar hangt af van de stam. Meestal worden onschadelijke, gemodificeerde stammen gebruikt, die vallen onder de lage risicoklasse. Met standaard laboratoriumregels is het dan veilig.

- (Verdieping) In onderzoek wordt vaak "*E. coli* K12" gebruikt, een genetisch gemodificeerde *E. coli* stam. Wat is veranderd aan deze stam? Is het veilig om hiermee in het labo te werken?

De *E. coli* K-12-stam is een verzwakte stam die normaal gesproken de menselijke darm niet koloniseert, omdat K-12 de typische virulentiefactoren (zoals toxine-genen stx1/stx2) mist. Het is ook aangetoond dat deze stam slecht overleeft in het milieu, een geschiedenis van veilig commercieel gebruik kent en voor zover bekend geen nadelige effecten heeft op micro-organismen of planten. Daarom is het veilig om met deze stam in het labo te werken.

Onderdeel 2: Laboveiligheid

- Wat zijn biosafety levels (BSL)?

Bio safety levels — vaak afgekort tot BSL — zijn een reeks beschermingsmaatregelen die specifiek is voor activiteiten met autoclaven in biologische laboratoria. BSL zijn individuele veiligheidsmaatregelen die zijn ontworpen om laboratoriumpersoneel, het milieu en de gemeenschap te beschermen.

- Zoek op welke BSL geldt voor de *E. coli* K12 stam.

Voor *E. coli* K12 geldt BSL-1.

- Som 4 veiligheidsmaatregelen op binnen het BSL-niveau van *E. coli* K12.

- Verbod op voedsel en drinken
- Regelmatig handen wassen
- Mechanisch pipetteren (geen mond pipetteren toegestaan)
- Gebruik van persoonlijk beschermend materiaal: labojas, handschoenen, labobril
- Dagelijkse ontsmetting van alle werkoppervlakken wanneer werk compleet is
- Vermijden van spatten/aerosolen
- Labojas en handschoenen worden gedragen om blootstelling aan gevaren te minimaliseren.
- Alle besmet materiaal wordt ontsmet (autoclaven of chemisch).

Onderdeel 3: Steriel werken

- Wat betekent 'steriel' werken? Waarom is dit nodig?

Steriel werken is het volledig elimineren van alle micro-organismen (bacteriën, virussen, schimmels, sporen) op voorwerpen en in de omgeving. Dit is nodig om betrouwbare resultaten te bekomen (als er andere bacteriën bijkomen, kan je niet meer weten als je resultaat komt van *E. coli* of andere bacteriën).

- Wat is een entoog?

Een entoog is een klein metalen lusje (ringetje) aan het uiteinde van een staafje dat wordt gebruikt in de microbiologie om bacterieculturen over te brengen naar (andere) voedingsbodems.

- Som de 5 stappen op die je moet doorlopen bij het enten van bacteriën met een entoog.

- Entoog verhitten om de entoog te ontsmetten.
- Entoog laten afkoelen: om de bacteriën die zullen worden opgenomen niet te doden.
- M.b.v. het entoog een kleine hoeveelheid bacteriën opnemen uit de kweek-petrischaal.
- Bacteriën overbrengen op een nieuwe petrischaal en uitstrijken om ze te verdelen en kolonies te krijgen.
- Entoog opnieuw verhitting om besmetting te vermijden.

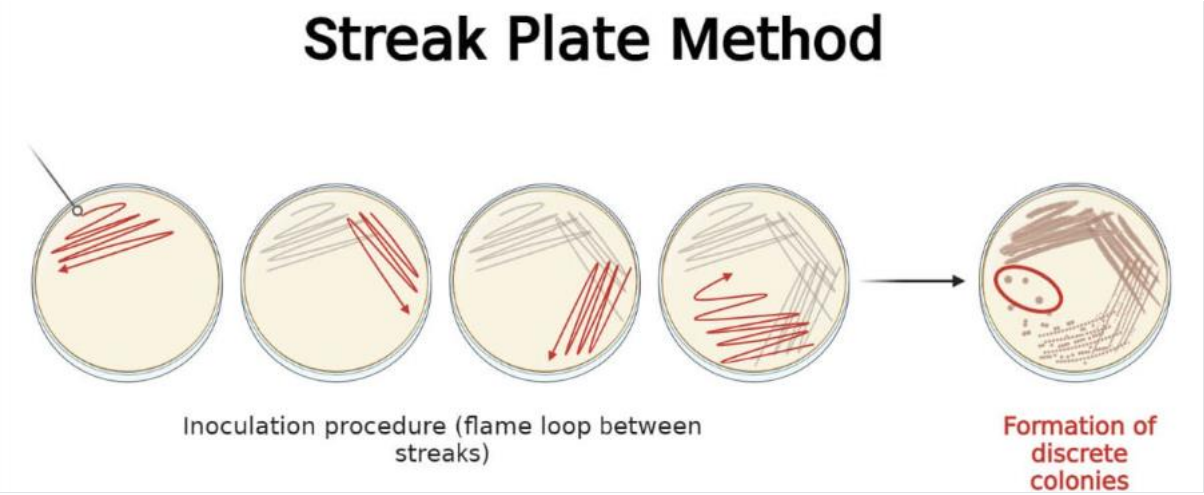
Onderdeel 4: Uitstrijken

- Wat is een voedingsbodem voor bacteriën?

Een agarbodem (voedingsbodem) is een vast of halfvast substraat, gemaakt van agar-agar, water en voedingsstoffen zoals bouillon en suiker

- Voor ons onderzoek moeten we bacteriën opgroeien op een voedingsbodem. Om onze bacteriën op de voedingsbodem te enten, gebruiken we de **kwadrantmethode (streak plate method)**. Hoe werkt deze methode? Maak een schets.

Bij de kwadrantmethode wordt de petriplaat in vier gelijke delen verdeeld. Vanuit het monster breng je bacteriën in het eerste kwadrant. Je gaat telkens een of twee keer door het einde van het vorige kwadrant, voor je uitstrijkt over het nieuwe kwadrant. Na elk kwadrant steriliseer je het entoog. Roteer het plaatje telkens een kwart. Label de bodem en niet het deksel.



- (Verdieping) Som het materiaal op dat nodig is voor deze methode.
  - Steriele Petrischaal met agarbodem
  - Te enten Monster
  - Entogen
  - Manier om entogen te steriliseren
  - Container voor scherp biologisch gevaarlijk afval
  - Marker
  - Persoonlijke bescherming

Onderdeel 5: Groei opvolgen

- Wat betekent incuberen van bacteriën? Bij welke temperatuur gebeurt dit voor *E. coli* ?

Incuberen is bacteriën laten groeien onder gecontroleerde omstandigheden (temperatuur, tijd, soms zuurstof). Hiervoor plaats je de petrischaal in een incubator zodat de bacteriën zich kunnen vermenigvuldigen. Voor *Escherichia coli* gebeurt dit bij 37 °C (lichaamstemperatuur, ideaal voor groei).

- (Verdieping) Waarom incuberen we onze agarplaatjes omgekeerd?

Dit betekent: deksel onderaan, agar bovenaan. Er vormt zich condens in het schaaltje, en wanner het plaatje normaal ligt, dan druppen die waterdrupels op de agar. Dit kan bacteriën verspreiden en kolonies verstoren.

- We groeien bacteriën in 2 verschillende condities. Hoe houd je de verschillende plaatjes uit elkaar binnen je team, en tussen de teams?

Door de onderkant van de petrischaal (niet het deksel) te labelen met je naam of initialen, de datum en de conditie.

- Stel een manier voor die toelaat de groei van bacteriële kolonies te volgen in de klas. Hoe pak je dit aan?

Elk uur een foto maken van de plaatjes en de grootte van de kolonies bepalen (via software). Door te werken met een tabel of grafiek zie je de groei evolueren in de tijd.

Onderdeel 6: Voorbereiding conceptmap

Noteer 4 veiligheidsregels die **absoluut** moeten gevolgd worden.

Leg het protocol van uitstrijken uit.

Leg uit hoe je denkt de bacteriële groei op te volgen.

1. Draag altijd een labojas en handschoenen
2. Eet of drink nooit in het labo
3. Werk steriel (materiaal ontsmetten, entoog verhitten)
4. Was je handen na het labowerk

Vanuit het monster breng je bacteriën in het eerste kwadrant van de agarbodem. Je gaat telkens een of twee keer door het einde van het vorige kwadrant, voor je uitstrijkt over het nieuwe kwadrant. Na elk kwadrant steriliseer je het entoog. Roteer het plaatje telkens een kwart. Label de bodem en niet het deksel.

Elk uur een foto maken van de plaatjes en de grootte van de kolonies bepalen (via software). Door te werken met een tabel of grafiek zie je de groei evolueren in de tijd.

Bronnen:

https://nl.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli#:~:text=Gram%2Dnegatieve%20bacterium,water%20met%20uitwerpselen%20is%20vervuild.

https://consteril.com/biosafety-levels-difference/

https://www.neb.com/en/-/media/catalog/msds/s/d/s/e/4/sdse4104-dch.pdf?rev=af0fb1f9e54a47d681fb49f0d35d6632&hash=A9EA8B29487D54A4C72DB2E57518F24C#:~:text=Bevat%200%20%25%20bestanddelen%20waarvan%20de,het%20aquatisch%20milieu%20onbekend%20zijn.&text=Volgens%20de%20richtlijnen%20van%20de,voor%20laboratoriumpersoneel%20en%20het%20milieu.&text=Dit%20product%20bevat%20geen%20bekende%20of%20verdachte%20hormoonontregelende%20stoffen.

https://nl.wikipedia.org/wiki/Entoog#:~:text=Een%20entoog%20is%20een%20oogje,en%20op%20voedingsbodems%20te%20enten.&text=Het%20wordt%20bijvoorbeeld%20gevormd%20door,worden%20als%20biologisch%20gevaarlijk%20afval.

https://microbenotes.com/streak-plate-method-principle-methods-significance-limitations/

https://reach.cdc.gov/sites/default/files/job-aids-resources/quadrant-streaking-for-isolation-508.pdf