Praktijkhandleiding microbiologie

mbo Life sciences niveau 3, Allround laborant

# Afbeelding met illustratie  Automatisch gegenereerde beschrijving*Afbeelding met tekst, tafel  Automatisch gegenereerde beschrijving*Inleiding

In deze periode krijg je te maken met microbiële technieken. Het is zaak dat je goed de veiligheidsregels in acht neemt. De docent zal bij de start van het practicum je op de veiligheidsregels wijzen en attent maken op de eventuele gevaren die specifiek zijn voor de handelingen die je uitvoert. Het zich niet houden aan veiligheidsregels betekent uitsluiting van het practicum.

Tijdens deze praktijklessen gaan jullie bacteriën kweken. Kweken houdt in dat jullie een bepaalde hoeveelheid bacteriën gaan laten groeien totdat er genoeg zijn om ze te kunnen zien. Hoe snel de bacteriën groeien is afhankelijk van de soort en de omstandigheden waarin ze groeien, maar het kost altijd tijd. Het gevolg hiervan is dat een practicumproef niet één les duurt maar meestal over meerdere lessen wordt uitgesmeerd. Dit heeft als gevolg dat er meerdere proeven door elkaar heen gaan lopen. Je zet een proef in en leest één of meerdere proeven af die je de weken daarvoor hebt ingezet. Het kan ook zijn dat je een experiment moet doorzetten. Dit alles betekent dat het zaak is dat je tijdens deze practica goed bijhoudt wat je gedaan hebt. ***Het labjournaal is hierbij dus van groot belang.***

Tijdens deze praktijkperiode ga je een aantal microbiologische basisvaardigheden leren die we VMT noemen. VMT staat voor Veilige Microbiologische Technieken. Deze technieken houden in dat je veilig en steriel kan werken met micro-organismen. Tijdens deze periode komen de volgende onderwerpen aan de orde:

* Kweken van micro-organismen
* Steriel overenten met controle
* Verdunningsreeks en tellen
* Ontstaan van aërosolen
* Het microbioom
* Overdracht van bacteriën
* Invloed van desinfectie
* Kleuring van bacteriën

De periode wordt in de laatste reguliere praktijkles afgesloten met een praktijktoets waarin je wordt beoordeeld op de volgende vaardigheden (zie bijlage Paspoort voor bekwaamheid technieken):

* Desinfectie
* Steriele verdunningsreeks maken
* Reinkweek maken
* (Gram / nat / droog) preparaat maken en bekijken onder microscoop
* (Steriel) gieten van agar

De herkansing van de VMT-toets is in de oogstweek.

Inhoudsopgave

[Inleiding 1](#_Toc94777881)

[Experiment 1: Voedingsbodem maken 5](#_Toc94777882)

[Experiment 2: Gramkleuring 8](#_Toc94777883)

[Experiment 3: Reikweken 11](#_Toc94777884)

[Experiment 4: Verdunningsreeks en kiemgetal 13](#_Toc94777885)

[Experiment 5: Luchtonderzoek 17](#_Toc94777886)

[Experiment 6: Huidflora 19](#_Toc94777887)

[Experiment 7: Hygiëne onderzoek 21](#_Toc94777888)

[Veilige microbiologische technieken (VMT) 26](#_Toc94777889)

[Bijlagen 27](#_Toc94777890)

[Bijlage 1: Checklist steriel gieten 27](#_Toc94777891)

[Bijlage 2: Checklist maken van een preparaat 29](#_Toc94777892)

[Bijlage 3: Checklist microscoop instellen 30](#_Toc94777893)

[Bijlage 4: Checklist reinkweek maken 31](#_Toc94777894)

[Bijlage 5: Checklist steriele verdunningsreeks 33](#_Toc94777895)

# Experiment 1: Voedingsbodem maken

**Doel**

Het maken van voedingsmedia en deze steriel gieten.

**Inleiding**

Om bacteriën, gisten en schimmels te kunnen kweken hebben zij voeding nodig. Deze voeding kunnen wij de bacteriën geven door middel van een voedingsbodem. Deze voedingsbodem bestaat uit **voedingsstoffen** en een speciaal bindmiddel, **agar**.

Er zijn heel veel verschillende soorten voedingsbodems te krijgen of te maken, die ieder een andere functie en toepassing. Op sommigen voedingsbodem kunnen bijna alle bacteriën groeien en op een andere maar 1 bepaalde soort. Ook zijn er andere voedingsbodems voor alleen gisten en / of schimmels. Vandaag gaan we 2 soorten agars maken; eentje voor bacteriën, **Nutrient Agar (NA)**, en eentje voor gisten en schimmels, **Malt Extract Agar (MEA).**

**Benodigdheden per tweetal**

* Lepels
* Rekenmachine
* Agarflessen
* Maatcilinders
* Autoclaafpan
* Bunsenbrander
* Petrischalen
* Permanente markeerstift





Afbeelding 1: Autoclaafpan

Afbeelding 2: Potten met agar zoals je deze op school vindt

**Werkwijze**

Let op: Noteer altijd in je labjournaal hoeveel agar je hebt afgewogen en hoe lang en bij welke temperatuur de agar is gesteriliseerd.

Voedingsmedia bereiden:

* Je werkt in tweetallen. Er wordt in totaal 60 ml nutriënt agar (NA) gemaakt en 60 ml Malt Extract Agar (MEA).

Om voedingsbodems te kunnen maken moet je uitrekenen hoeveel ml je wilt maken. Op de zijkant van potten met agar staat hoeveel gram je van de betreffende agar nodig hebt om 1000ml voedingsbodem te maken. Waarschijnlijk heb je niet altijd precies 1000ml nodig, en zal je dus moeten gaan omrekenen hoeveel agar je moet toevoegen.

**Voorbeeld:** Op de pot staat dat je 25 gram nodig hebt voor het maken van 1 liter. Stel je wilt 100 ml maken, dat kun je volgens onderstaande methode berekenen.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | : 1000 | X 100 |  |
| Aantal gr  | 25 gram | 0,025 gram | 2,5 gram |
| Aantal ml  | 1000 ml | 1 ml | 100 ml |
|  | : 1000 | X 100 |  |

* Wanneer je de benodigde hoeveelheid hebt berekend, ga je dit afwegen. Hiervoor maak je gebruik van een papiertje, waarop je de media afweegt. Wanneer je de juiste hoeveelheid hebt, stop je dit in de fles.
* Na afwegen vul je dit aan met de benodigde hoeveelheid demi-water.

Voedingsmedia steriliseren:

* Op de pot staat ook hoe lang en op welke temperatuur moet worden gesteriliseerd. Na het mengen van je media met water kan je fles in de autoclaveer pan. Zorg ervoor dat de dop iets is losgedraaid, zodat de druk eruit kan.
* Check of er voldoende water in de pan aanwezig is. Het moet tot net boven het platvorm komen.
* Doe de deksel op de pan en zorg dat deze goed vastklikt. Nu kan het vuur aan.
* Wanneer de pan op de juiste druk is, komt er stoom uit het ventiel. Nu kan het gewichtje op de pan worden geplaatst, om deze druk te behouden en de temperatuur op te laten lopen. Pas op het moment dat het gewichtje danst, start je de sterilisatietijd. Zet ook het vuur iets zachter, maar zorg ervoor dat het gewichtje blijft dansen.
* Wanneer de tijd voorbij is zet je het vuur uit. Het gewichtje haal je er pas af wanneer de druk van de pan af is. Daarna kan de pan worden geopend en het medium uit de pan worden gehaald. Let op: draai de dop van de fles weer vast wanneer je deze uit de pan haalt.

Voedingsmedia gieten:

* Laat de agar afkoelen in het waterbad van 50 °C, om overmatige condensvorming tegen te gaan. Ondertussen kun je alvast 3 platen beschrijven voor de NA en 3 platen beschrijven voor de MEA. Zet hierop welk medium erin gaat, de datum en je naam.
* Wanneer het medium is afgekoeld kun je gaan gieten. We rekenen altijd 20 ml per petrischaal (dit is een erg ruime schatting). Zet je brander aan op de ruisende vlam.
* Haal de dop van je fles, flambeer voorzichtig de hals van de fles, en giet dit in de petrischaal tot ongeveer tweederde van de bodem is bedek.
* Sluit de schaal onmiddellijk, om luchtbesmetting te voorkomen. Zwenk voorzichtig de petrischaal zodat de agar de hele bodem bedekt. De petrischaal bevat nu een laagje van ±4 mm. Herhaal dit voor de andere petrischalen.
* Laat de agar goed afkoelen en hard worden, en stapel deze vervolgens op de kop op. Spoel je fles goed om met warm water.

# Experiment 2: Gramkleuring

**Doel**

Het kunnen maken van een gramkleuringspreparaat en het onderscheid kunnen maken tussen grampositieve en gramnegatieve bacteriën.

**Inleiding**

Hans Christian Gram, een Deense bioloog uit de 19e eeuw, deelde bacteriën in op basis van reacties van de celwand met kleurstoffen. Dit is de Gramkleuring. De Gramkleuring is een van de belangrijkste kleurtechnieken in de microbiologie. Met de Gramkleuring kunnen bacteriën worden ingedeeld in 2 groepen; grampositief en gramnegatief. Grampositieve bacteriën kleuren blauw en gram-negatieve bacteriën kleuren paars/rood. Dit verschil komt doordat er verschil zit in de celwand van beide typen bacteriën.

Grampositieve bacteriën hebben een zeer dikke celwand van peptidoglycaan en gramnegatieve bacteriën hebben een dunne celwand van peptidoglycaan met nog een buitenmembraan, zoals je kunt zien in afbeelding 4.

Bij de Gramkleuring wordt een bacterie gekleurd met kristalviolet en jodium, daarna volgt er een wasstap met ethanol en een tweede kleuring met saffranine. Kristalviolet en jodium vormen samen een complex met het peptidgoglycaan uit de celwand. Omdat de celwand van gram-negatieve bacteriën relatief dun is, kan dit complex worden weggespoeld met ethanol, waar die bij Gram-positieve bacteriën blijft zitten. Na deze wasstap met ethanol blijven er dus óf blauw gekleurde Gram-positieve bacteriën over of ontkleurde Gram-negatieve bacteriën. Deze worden vervolgens met saffranine roodgekleurd.

Afbeelding 4: Schematische weergave van de celwand van een grampositieve en gramnegatieve bacterie

**Voorbereidingsvragen:**

1. Welke typen bacteriën kunnen worden onderscheiden na de Gramkleuring?
2. Waarom wordt er nagespoeld met saffranine?
3. Waarom blijft het kristal-jodiumcomplex wel bij gram-positieve bacteriën hangen?
4. Wat is het effect van de ethanol op de bacteriën?

**Benodigdheden per persoon:**

* Objectglazen
* Entoog
* Kristalviolet
* Lugol (jodium)
* Ethanol (96%)
* Saffranine
* (Demi)-water
* Microscoop
* Immersie-olie
* Pincet of knijper

**Werkwijze:**

* Maak op het objectglas m.b.v. een steriele entoog een homogene suspensie van zeer weinig bacteriemateriaal in een druppeltje gedemineraliseerd water (bij melkproducten neemt men het onverdunde product). Strijk m.b.v. de entoog de suspensie uit over een oppervlakte van ± 1 cm2. Entnaald op zijn zijkant van glaasje halen i.v.m. ontstaan aërosolen.
* Laten drogen aan de lucht. Voorzichtig fixeren door het voorwerpglas drie maal door een brandende vlam te halen. De preparaatzijde is daarbij van de vlam afgekeerd.
* Zet het gefixeerde preparaat m.b.v. een pincet in de kristal-violet voor 1 minuut.
* Dompel daarna het preparaat 2x snel in een bekerglas met demiwater.
* Plaats het preparaat vervolgens in de lugol houder voor 1 minuut.
* Dompel daarna het preparaat 2x snel in een bekerglas met demiwater.
* Plaats het preparaat vervolgens in de alcohol houder voor 1 minuut.

Afbeelding 5: Schematische weergave van de werkwijze van een gramkleuring.

* Spoel het preparaat onder de kraan voor 15 sec.
* Plaats het preparaat vervolgens in de safranine houder voor 1 minuut.
* Dompel daarna het preparaat 2x snel in een bekerglas met demiwater, daarna overtollige kleurstof onder de kraan afspoelen.
* Dep het preparaat nu voorzichtig droog met een filtreerpapiertje of papieren handdoek.

**Resultaten verwerking**

1. Bekijk je preparaat onder de microscoop en maak een tekening van het microscopisch beeld. Noteer duidelijk of je bacterie grampositief of -negatief is.

# Experiment 3: Reikweken

**Doel**

Het maken van een reinkweek, waarbij er losse kolonies zijn.

**Inleiding**

Elke bacterie heeft zijn eigen specifieke kenmerken waaronder de vorm van de cel, gramkarakter, beweeglijkheid en stofwisselingseigenschappen. Om achter deze specifieke eigenschappen van een bepaald micro-organismen te komen is het noodzakelijk om het micro-organisme in zuivere vorm te kweken. Omdat op een agarplaat vaak verschillende soorten kolonies voor komen, is het dus belangrijk om 1 specifieke kolonie te kunnen isoleren en opkweken zonder dat daarmee andere micro-organismen worden meegenomen.

Een dergelijke kweek noem je een reinkweek en is afkomstig van een enkele cel. Omdat een enkele bacteriële cel via de binaire deling uit kan groeien tot een kolonie van miljarden cellen, kan je aannemen dat alle cellen van zo’n cultuur dezelfde eigenschappen hebben en dus identiek zijn aan elkaar. Er zijn geen andere micro-organismen aanwezig die het onderzoek naar de gewenste bacterie kunnen verstoren. Je kunt dit met het blote oog niet zien dus je moet door je onderzoek en het reinkweken zelf de zekerheid krijgen dat al je gekweekte bacteriecellen gelijk zijn en er geen "mengseltje" is van cellen met verschillende eigenschappen. Dit zal je onderzoek namelijk verstoren. Een reincultuur is dus noodzakelijk voor de studie (identificatie) van micro-organismen, hieronder de methode om een reincultuur te maken.

Afbeelding 6: Foto van een reinkweek van een bacterie op een voedingsbodem, waarbij duidelijk te zien is dat losse kolonies zijn verkregen (microbiologie.info)

**Benodigdheden per persoon (reincultuur)**

* Agarplaat met verschillende koloniën
* Entoog
* Steriele agarplaat
* Bunsenbrander

**Werkwijze**

* Pak een entoog en steriliseer deze met de blauwe vlam.
* Wacht tot de entoog wat is afgekoeld en pak een losliggende kolonie van de agarplaat
* Strijk deze kolonie van buiten naar binnen uit tot ongeveer 1/4e van de plaat. (zie afbeelding)
* Steriliseer de entoog door de blauwe vlam en strijk de verspreide kolonie uit over de breedte van de plaat (zie afbeelding)
* Steriliseer de entoog door de blauwe vlam en strijk de vanaf het voorgaande gedeelte loodrecht over de lengte van de plaat (zie afbeelding)
* Steriliseer de entoog en herhaal stap 5. (zie afbeelding)

Afbeelding 7: Schematisch overzicht van de stappen voor het maken van een reinkweek.

* Zet de platen 3 dagen weg bij 30°C

**Resultaten verwerking**

1. Van de reinkweek wordt een tekening gemaakt in je labjournaal. Laat duidelijk in de tekening zien vanaf waar de kolonies losliggend zijn.
2. Controleer of alle kolonies hetzelfde zijn (vorm, kleur, oppervlak, etc.). Maak van tenminste 1 kolonie een gramkleuring zoals bij experiment 2. Zijn er kolonies die anders zijn, dan maak je daar ook een gramkleuring van. Maak in je labjournaal een tekening van je microscopisch beeld en noteer of de bacterie grampositief of -negatief is.

# Experiment 4: Verdunningsreeks en kiemgetal

**Doel**

Het maken van een steriele verdunningsreeks en deze inzetten in een mengplaat en het bepalen van het kiemgetal.

**Inleiding**

De verdunningsreeks is een decimale **verdunningsreeks**; onverdund, 10x, 100x, 1000x, 10.000x etc. Hiervoor wordt 1 ml van het monster verdund met 9 ml steriele verdunningsvloeistof (= 10x verdund = 10-1 verdunning), na vortexen wordt van deze verdunning weer 1 ml gepipetteerd in 9 ml steriele verdunningsvloeistof

(=100x verdund = 10-2 verdunning). Als verdunningsvloeistof wordt vaak fysiologisch zout (FZ) gebruikt. Dit is een oplossing van zout in demiwater met een concentratie van 0,9%.

Deze verdunningsreeks kunnen we onder andere gebruiken voor één van de routinebepalingen op een microbiologisch laboratorium, namelijk het bepalen van het kiemgetal. Het kiemgetal geeft het aantal levende cellen in een monster weer. Elke levende cel kan zich op een agarplaat ontwikkelen tot een kolonie. Hierdoor komt het aantal kolonies overeen met het aantal levende cellen in het monster. Cellen die aan elkaar zijn vastgeplakt kunnen zich ook ontwikkelen tot één kolonie. Daarom wordt de term kolonievormende eenheden (KvE) gebruikt (Engels CFU, colony-forming units). Het kiemgetal is dus het aantal levende cellen in het monster uitgedrukt in aantal KvE/ml of aantal KvE/gram.

Het kiemgetal kan worden bepaald als het totaal aantal bacteriën in het monster op een algemene voedingsbodem, of juist van een bepaalde groep bacteriën op een selectieve voedingsbodem. Voor het bepalen van het kiemgetal is vaak een verdunningsreeks nodig. Niet elke plaat is geschikt als telplaat. **Voor een betrouwbare telling moet het aantal kolonies tussen de 10 en de 300 liggen (10 ≤ n ≤ 300)!** Zijn er minder dan 10 kolonies aanwezig, dan is de kans op toevalsfouten te groot: één kolonie meer of minder betekent een afwijking van meer dan 10 %! Bij meer dan 300 kolonies is de kans op telfouten erg groot. Bovendien is de beschikbare hoeveelheid voedsel en ruimte voor de m.o. te klein waardoor wel aanwezige kiemen niet tot kolonievorming komen. Er is dan sprake van systematische fouten.

Bij het inzetten hiervan kan gebruik worden gemaakt van de **mengplaatmethode**, waarbij de bacteriesuspensie wordt opgemengt met het medium in de petrischaal, of de strijkplaatmethode, waarbij de bacteriesuspensie wordt uitgestreken over de plaat. Beide methoden hebben zo hun eigen voor en nadelen. De mengplaatmethode is een snellere methode en er wordt een groter volume gepipetteerd waardoor de betrouwbaarheid hoger is. Daarbij hebben kleine pipetteerfouten een kleiner effect (Waarom?) Ook is door het grotere volume de detectiegrens wat lager. Spreiders (m.o’s die snel over de plaat heen groeien) maken minder kans in het medium. Tevens is er minder kans op uitdroging, omdat de mó’s in het medium zelf groeien en er niet bovenop liggen. Maar de mengplaatmethode heeft als nadeel dat strikt aerobe micro-organismen slecht groeien in de agar. De strijkplaatmethode heeft ook als voordeel dat ook het uiterlijk van de kolonie bestudeerd kan worden

Steriel werken bij deze bepaling is van groot belang. Je wilt immers alleen het aantal levende cellen van het monster bepalen en niet bijvoorbeeld de uit de lucht gevallen micro-organismen.

**Benodigdheden per persoon**

* 8 buizen met 9 ml FZ
* Gistculture
* Pipet (met steriele rietjes)
* 7 lege petrischalen
* 140 ml vloeibare MEA
* Entoog

**Werkwijze**

Let op: Voor deze proef zet je ook een **blanco** in ter controle. Dit betekent dat je een ontbeënte plaat inzet, om te controleren of je medium steriel is.

Verdunningsreeks:

* Merk je buisjes goed met een marker, zodat je niet in de war raakt. Je werkt steriel bij de bunsenbrander.
* Maak een decimale verdunningsreeks van de gistsupsensie, volgens afbeelding 3. Haal 1 ml uit de suspensie 1 ml en pipeteer deze in de eerste buis. Dit is je 1:10 verdunning, of 1x10-1.
* Meng de buis goed, haal hier vervolgens weer 1 ml uit en pipeteer deze in de volgende buis. Dit is je 1:100 verdunning, of 1x10-2.
* Herhaal deze stappen, tot je een verdunning hebt tot 1x10-8.



Afbeelding 3: Pipeteerschema voor je verdunningsreeks

Mengplaatmethode:

* Nu ga je een mengplaat maken van de verdunning 10-6, 10-7 en 10-8. Dit ga je in **duplo** doen, dat betekent dat je alle verdunningen 2 keer inzet. Merk zeven petrischalen, met je initialen, de datum, het medium en de verdunning die erin gaat. Vergeet niet dat de zevende de blanco is.
* Voor het maken van een mengplaat pipeteer je 1 ml verdunning in de juiste petrischaal. Vervolgens giet je op steriele wijze, zoals je hebt gedaan in experiment 1, je medium.
* Meng nu zorgvuldig, vooral niet te ruw, volgens de volgende methode:
1. Plaats de vingers op de deksel van de plaat
2. Voer achtereenvolgens de volgende draaiende bewegingen uit:
* 5 maal met de klok mee (rechtsom)
* 5 maal oost – west
* 5 maal tegen de klok in (linksom)
* 5 maal noord - zuiden
* Herhaal dit voor de andere verdunningen en duplo’s.
* Laat de agar stollen, stapel de petrischalen op de kop op en incubeer voor 3 dagen bij 30 °C.

**Resultaten verwerking**

1. Tel het aantal kolonies op de platen met tussen de 10 en 300 kolonies. Neem onderstaande tabel over in je labjournaal. Bereken het kiemgetal per ml 1% gistsuspensie, volgens de berekening hieronder. Noteer ook of er iets is gegroeid op je blanco.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Monster** | **Verdunning** | **Kiemgetal****kve/ml** |
| **10-6** | **10-7** | **10-8** |
| *MEA* |  |  |  |  |  |  |  |

Voorbeeld: berekening kiemgetal

Stel je krijgt de volgende resultaten:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Monster** | **Verdunning** | **Kiemgetal****kve/ml** |
| **10-4** | **10-5** | **10-6** |
| *MEA* | >300 (±1000) | >300 (±850) | 97 | 81 | 9 | 7 |  |

Negatieve controle: geen groei Als telvoorwaarde geldt 10<n<300

**Berekening kiemgetal:**

We nemen de verdunning 10-5 voor de berekening (Lees in de inleiding waarom).

Het gemiddelde aantal kolonies is:

In 10-5,of 10000× verdunning, zitten dus 89 KvE/10-5 ml. Dit moet je dan omrekenen naar 1 ml. Omdat je 10000× hebt verdund kan je het gemiddelde dus vermenigvuldigen maal de verdunningsfactor:

In 1 ml zitten dus 89x105 KvE/ml = 8,9x106 KvE/ml, ook wel 8,9 miljoen bacteriën.

# Experiment 5: Luchtonderzoek

**Doel**

Het aantal micro-organismen in de lucht bepalen en bewustwording van de gevolgen van aërosolen.

**Inleiding**

Aërosolen zijn kleine deeltjes of vloeistofdruppeltjes die door de lucht zweven. Deze aërosolen kunnen vrijkomen in de luchtstroom bij het steriliseren van een öse of bij het werken met een hete entnaald.

Wanneer deze druppeltjes micro-organismen bevatten kunnen ze de omgeving besmetten met deze micro-organismen. Ook wanneer een niet voldoende afgekoelde öse in aanraking wordt gebracht met een kolonie of een bacteriesuspensie, kan dit effect van aërosolen ontstaan.

Tijdens dit practicum voer je twee experimenten uit. Een huidflora experiment (1) en een luchtinfectie experiment. De praktijkdocent geeft een demonstratie over het ontstaan en voorkomen van aërosolen 

Afbeelding 8: Verspreiding van aerosolen

**Vragen vooraf**

1. Wat kunnen aerosolen voor effect hebben op jou onderzoek?
2. Wat kunnen aerosolen voor effect hebben op jou gezondheid?
3. Beschrijf praktisch hoe je aerosolen kunt voorkomen.

**Benodigdheden per persoon (luchtinfectie)**

* 1 plaat nutriënt agar (NA, pH=6,8) (algemeen medium voor vrijwel alle bacteriën)
* 1 plaat moutagar (MEA, pH=5,4) (medium specifiek voor gisten en schimmels)

**Werkwijze (luchtinfectie)**

* Giet per persoon één plaat NA en één plaat MEA.
* Laat de platen stollen en codeer ze goed.
* Zet de gestolde voedingsbodems **naast elkaar** geopend neer op een door jezelf gekozen plaats met luchtstroming, bijvoorbeeld op de brug in het lab. Laat de platen daar 1 uur staan. Noteer in je labjournaal waar je de platen hebt neergezet.
* Sluit de petrischalen en incubeer: 3 dagen bij 30 0C.

**Resultaten verwerking**

1. Maak van beide platen een tekening in je labjournaal.
2. Nummer in deze tekeningen 4 zo verschillend mogelijke kolonies.
3. Beschrijf daarvan de koloniekenmerken en zet deze in een tabel zoals hieronder.
* Kleur: is de kolonie groen, geel, wit, crème, roze ….
* Grootte: is het een speldenknop, klein, matig groot, groot
* Vorm: punt-/spoel-/filamentvormig, rond, onregelmatig, wortelachtig
* Hoogte: plat, verheven, convex, kussenvormig, bol, uitspruitend
* Randen: gaaf, gegolfd, getand, gelobd, harig, gekruld
* Oppervlak: glanzend, dof, slijmerig, wollig, ruw, vulkaanachtig

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Kolonienr.**  | **Grootte** | **Vorm**  | **Hoogte** | **Rand** | **Kleur**  | **Oppervlak** |
| 1 | … | … | … |  |  |  |
| 2 | … | .. |  |  |  |  |

# Experiment 6: Huidflora

**Doel**

Kijken naar het aantal micro-organismen op de huid en wat het effect is van handen wassen daarop.

**Inleiding**

Micro-organismen kun je overal tegenkomen: in de grond, in de lucht, in water, op handen, voeten, kleren en natuurlijk ook op en in je lichaam. Er zijn een heleboel verschillende soorten micro-organismen en die hebben allemaal hun eigen favoriete milieu. De een houdt van warm en lichtzuur, de ander van koud en erg zuur, een derde van erg nat en pH-neutraal en zo kun je nog veel meer milieus bedenken die gunstig zijn voor het ene micro-organisme, maar ongunstig voor het andere. De meeste bacteriën houden van een pH-neutraal milieu. Zij vinden de omstandigheden op de NA-plaat dus prettig. Schimmels en gisten hebben zich aangepast aan een ietwat zuur milieu; dat is te vinden op de MEA-plaat. De micro-organismen op de hand zijn onder te verdelen in de volgende groepen:

Afbeelding 9: Micro-organismen op de hand

*Toevallige huidflora:* Wanneer je de handen een tijdje niet hebt gewassen zitten er allerlei micro-organismen op. Deze komen toevallig op de hand terecht vanuit de lucht en/of door de dingen die je beetpakt. Het kunnen steeds weer andere micro-organismen zijn. Meestal zijn ze eenvoudig te verwijderen door handenwassen.

*Blijvende huidflora:* De blijvende huidflora is altijd aanwezig en kan door handen wassen niet eenvoudig verwijderd worden. Slechts bij goed handenwassen met zeep gaan de huidporiën zo ver open dat ze naar buiten kunnen treden. Normaalgesproken is de blijvende huidflora onschadelijk, omdat het lichaam de micro-organismen in toom weet te houden. Bij een verminderde weerstand zoals bij ziekte, wondjes of ondervoeding kunnen ze wel voor problemen zorgen. Een voorbeeld daarvan is het ontstaan van (steen)puisten.

**Benodigdheden per persoon (huidflora)**

* Nutriënt agar (NA) plaat
* 1 lege petrischaal
* Brander
* Watervaste stift
* Kraan
* Zeep
* Sterilium

**Werkwijze (huidflora)**

* Verdeel de plaat in 4 kwarten door op de achterkant met een watervaste stift een kruis te zetten. Benoem de zones I, II, III en IV
* Druk een ongewassen vinger af in zone I.
* Was je handen vervolgens met water. Sla je handen af, dus niet afdrogen, en druk deze op zone II
* Was je handen vervolgens 1 minuut met zeep. Sla je handen af, dus niet afdrogen, en druk dezelfde vinger af in zone III.

Afbeelding 10: Schematisch weergave voor de verdeling van de petrischaal

* Was je handen nu eerst weer 1 minuut met zeep en gebruik daarna met sterilium. Sla de alcohol af en druk de vinger daarna af in zone IV.
* Incubeer de platen op de kop voor 3 dagen bij 30 °C.

**Resultaten verwerking**

1. Maak een tekening van de plaat en beantwoord de volgende vragen:
2. Welke soort micro-organismen vindt je vooral in zone I? Leg je antwoord uit.
3. Welke soort micro-organismen vindt je vooral in zone II? Leg je antwoord uit.
4. Welke soort micro-organismen vindt je vooral in zone III? Leg je antwoord uit.
5. Welke soort micro-organismen vindt je vooral in zone IV? Leg je antwoord uit.

# Experiment 7: Hygiëne onderzoek

**Doel**

De effectiviteit van toiletpapier en handen wassen na toiletbezoek bepalen.

**Inleiding**

In onze darmen, en vooral in de dikke darm, leven miljarden darmbacteriën. Met de ontlasting komen er dus ook miljoenen darmbacteriën naar buiten. Iedereen bezoekt vrijwel dagelijks het toilet voor deze grote boodschap en iedereen gebruikt daarna toiletpapier om de billen schoon te vegen. Het toiletpapier dient ervoor de vingers schoon te houden, zodat er geen faeces en daarmee geen darmbacteriën op terechtkomen. Voor het geval dat, worden vervolgens meestal ook de handen nog gewassen. In deze proef gaan jullie onderzoeken of het gebruik van toiletpapier en handen wassen na toiletbezoek voldoende effectief is.

Het toiletbezoek wordt nagebootst met een cultuur van *Serratia marcescens*. Deze bacterie behoort tot de familie van de *Enterobacteriaceae*. “Enteron” betekent darmen en zoals deze naam aangeeft komen vertegenwoordigers van deze familie vooral voor in het darmkanaal van mens en dier.

Tot de *Enterobacteriaceae* behoren pathogene (= ziekteverwekkende) bacteriën als *Salmonella*, *Shigella* en *Yersinia* die allemaal ernstige ziektes kunnen veroorzaken. Ook zij komen van nature in de darmen voor, maar slechts in beperkte mate. Zij worden in toom gehouden door de grote meerderheid aan nuttige spijsverteringsbacteriën, zodat zij geen schade kunnen veroorzaken. Maar, krijg je een keer een grote hoeveelheid in binnen, bijvoorbeeld door het eten van besmet vlees, dan kan dat leiden tot voedselinfecties.

*Serratia marcescens* is niet pathogeen en veroorzaakt daarom geen ziektes. In aanwezigheid van voldoende zuurstof en bij een temperatuur van 10°C tot 35°C groeit deze bacterie in rode kolonies.

**Voorbereidingsvragen**

1. Zijn bacteriën van de familie *Enterobacteriaceae* gram-positief of gram-negatief?
2. Is *S. marcescens* een aerobe, anaerobe of micro-aerobe bacterie? Leg uit.
3. Op basis van zijn optimumtemperatuur, hoe zou je *S. marcescens* het beste kunnen omschrijven?
4. Denk je dat handen wassen na toiletbezoek een groot effect zal hebben op de groei? Waarom wel / niet?

**Benodigdheden per persoon – Deel I**

* 2 petrischalen met NA
* Toiletpapier
* Reincultuur van *Serratia marcescens*
* Afvalemmertje besmet materiaal

**Werkwijze – Deel I**

* Pak een NA-plaat, codeert die en deelt die in drieën en codeer deze met ‘links’ en ‘rechts’. Links wordt je ongewassen vinger en rechts wordt de ‘besmette’ vinger.
* Strijk de linker wijsvinger uit over de linkerhelft van de voedingsbodem.
* Je krijgt nu een voedingsbodem met een reincultuur *Serratia marcencens* en een nummer van de praktijkdocent.
* Persoon met nummer 1 drukt met 3 lagen toiletpapier om diezelfde linker wijsvinger 10 seconden op de voedingsbodem met de *Serratia marcescens*.
* Het toiletpapier wordt in een emmertje voor besmet afval gedaan.
* Persoon 1 drukt de wijsvinger tegen de linker wijsvinger van persoon 2.
* Daarna maakt persoon 1 met de linker wijsvinger een afdruk op de rechterhelft van de plaat.
* Persoon 2 drukt de wijsvinger tegen de wijsvinger van persoon 3 en maakt vervolgens van zijn/haar vinger een afdruk op de NA-plaat. Dit gaat door totdat de hele groep is geweest. Noteer duidelijk in je labjournaal welk nummer jij hebt.
* Was de handen tenslotte zeer goed met zeep en droog ze af.
* Zet de platen op de kop 3 dagen weg bij 30°C.

**Resultaten verwerking – Deel I**

**Benodigdheden per persoon – Deel II**

* 1 petrischaal met NA
* Toiletpapier
* Reincultuur van *Serratia marcescens*
* Afvalemmertje met besmet materiaal

**Werkwijze – Deel II**

Tijdens dit onderdeel word je in groep A (2 lagen toiletpapier), B (4 lagen) of C (6 lagen) ingedeeld. Noteer goed in je labjournaal bij welke groep je behoort.



* Pak een NA-plaat en verdeel deze in 3 zones door er met een watervaste stift op de onderkant 2 strepen op te zetten.
* Strijk de ongewassen wijsvinger uit in zone 1.
* Pak een stuk toiletpapier en wikkel dit om de wijsvinger (zie groep voor aantal lagen wc-papier).

Afbeelding 10: Verdeling van de petrischaal voor de handenwasproef.

* Druk met de met toiletpapier omwikkelde wijsvinger zacht 10 seconden op een plaat met *S.marcescens.*
* Doe het toiletpapier in een emmertje voor besmet afval.
* Strijk de wijsvinger uit in zone 2.
* Was de handen volgens de instructie van de docent. Je wordt hiervoor opnieuw ingedeeld in groep 1, 2 of 3. Zie wijze van handenwassen in het kader hieronder.

De 3 manieren van handen wassen zijn:

1. Handen alleen onder de kraan afspoelen.
2. Handen wassen met zeep zoals je gewend bent na toiletbezoek
3. Handen wassen en desinfecteren zoals je gewend bent vóór operaties
* Droog de handen niet, maar sla ze goed af. Strijk de wijsvinger uit in zone 3.
* Was de handen tenslotte zeer goed met zeep en droog ze af. (veiligheidsmaatregel)
* Zet de platen op de kop 3 dagen bij 30°C.

**Resultaten verwerking – Deel II**

Neem deze tabel over in je labjournaal noteer de resultaten, dit ga je samen doen met je klas. Beantwoord ook de vragen op de volgende pagina.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Naam** | **Aantal lagen** | **Wijze van****Handen-reiniging** | **Resultaat v. reiniging****Tot. aantal bact./ S*erratia*** | **Resultaat na reiniging****Totaal aantal bact./*Serratia*** |
|  | 2 lagen | Spoelen met water | Totaal:*Serratia*: | Totaal:*Serratia*: |
|  | 2 lagen | Wassen met zeep | Totaal:*Serratia*: | Totaal:*Serratia*: |
|  | 2 lagen | Desinfecteren | Totaal:*Serratia*: | Totaal:*Serratia*: |
|  | 4 lagen | Spoelen met water | Totaal:*Serratia*: | Totaal:*Serratia*: |
|  | 4 lagen | Wassen met zeep | Totaal:*Serratia*: | Totaal:*Serratia*: |
|  | 4 lagen | Desinfecteren | Totaal:*Serratia*: | Totaal:*Serratia*: |
|  | 6 lagen | Spoelen met water | Totaal:*Serratia*: | Totaal:*Serratia*: |
|  | 6 lagen | Wassen met zeep | Totaal:*Serratia*: | Totaal:*Serratia*: |
|  | 6 lagen | Desinfecteren | Totaal:*Serratia*: | Totaal:*Serratia*: |

**Vragen**

1. Welke bacteriën groeien er in zone 1?
2. Biedt 2, 4 of 6 lagen toiletpapier wel of niet voldoende bescherming tegen overdracht van Serratia? Hoe zit het met de bescherming tegen darmbacteriën in het algemeen? Dit moet je duidelijk uitleggen.
3. Welk effect heeft handenwassen op de groei van bacteriën in zone 3? Zie je duidelijke verschillen tussen de 3 verschillende manieren van handenwassen? Verklaar deze verschillen.
4. Is handenwassen nodig na toiletbezoek? Helpt het ook echt bij slecht c.q. goed wassen?
5. Mensen die in de levensmiddelenindustrie werkzaam zijn moeten naar de wc. Wat kan er gebeuren wanneer zij hun handen daarna niet of niet goed wassen? Leg dit uit. Noem enkele producten waarbij dat gevaar erg groot is en geef aan welke maatregelen je zou kunnen/moeten nemen om problemen te voorkomen.
6. Wat is je totale eindconclusie uit onderzoek A en onderzoek B?

# Veilige microbiologische technieken (VMT)

Na te hebben geoefend met het doen van een aantal klassieke microbiologische technieken, kunnen we gaan oefenen voor de VMT-praktijktoets. Je hebt twee lessen de tijd om te oefenen met deze technieken. Dit gaan we doen met behulp van onderstaande tabel. Elke keer dat je iets aftekent, doe je dit in overleg met je docent. In de bijlagen staan de checklists van de VMT-praktijktoets, lees deze ook goed door.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Technieken** | **Instructie gehad** | **Filmpje gezien** | **Geoefend m.b.v. voorschrift**  | **Laten zien aan medestudent** | **Beoordeeld door docent**  |
| *Media steriel gieten* |  |  |  |  |  |
| *Preparaat maken*  |  |  |  |  |  |
| *Microscoop instellen* |  |  |  |  |  |
| *Reinkweek maken*  |  |  |  |  |  |
| *Steriele verdunnings-reeks maken* |  |  |  |  |  |

**Filmpjes technieken**

Onderstaande filmpjes ga je gebruiken voor het bekwaam worden in de technieken. Deze filmpjes zijn opgenomen door Johan Vrijburg. Schrijf van elke techniek de belangrijkste 2 of 3 punten op die waar je op moet letten bij de uitvoering.

|  |  |
| --- | --- |
| *Media steriel*  | <https://www.youtube.com/watch?v=NfnynzHHZko>  |
| *Preparaat maken*  | <https://www.youtube.com/watch?v=_EojV1QZ8RM>  |
| *Microscoop instellen* | <https://www.youtube.com/watch?v=UJ4fNPK_gao> <https://www.youtube.com/watch?v=Gczth2AH_os>  |
| *Reinkweek maken*  | <https://www.youtube.com/watch?v=Sb-pLr7LHas>  |
| *Steriele verdunningsreeks* | <https://www.youtube.com/watch?v=pmqOr_q2h7g>  |

# Bijlagen

## Bijlage 1: Checklist steriel gieten

|  |
| --- |
| **VMT Praktijktoets** |
|
| **Onderdeel:** | Steriel gieten | **Student** |   |
|  |
| **Nr** |  | **OK** | **niet OK** |
|  | **Start** |  |  |
| 1 | De student wast de handen |   |   |
| 2 | De student maakt de werkplek schoon met 70% ethanol |   |   |
| 3 | De student codeert de platen en haalt hierbij de deksel niet van de plaat af |   |   |
| 4 | De student ontsteekt de vlam op de juiste wijze (gas aan, luchttoevoer uit, daarna luchttoevoer vermaximaal, bruisende blauwe blam) |   |   |
| 5 | De student legt de dop met de holle zijde naar boven naast de vlam |   |   |
| 6 | De student werkt in de buurt van de vlam |   |   |
| 7 | De student giet steriel |   |   |
| 8 | De student giet de plaat niet volledig vol |   |   |
| 9 | De student mengt de platen op rustige wijze zonder dat de agar tegen de deksel aan komt |   |   |
| 10 | De student wacht tot de platen gestolt zijn en levert deze in met de voedingsbodem naar boven gekeerd |   |   |
| 11 | De student was de handen en maakt de werkplek schoon met 70% ethanol |   |   |
|   | Beoordeeld door: | Datum van beoordelen: | Behaald niveau (alles ok): | Beoordelaar: |   |
|  |   |   |   |   |

## Bijlage 2: Checklist maken van een preparaat

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Onderdeel:** | Maken preparaat | **Student** |   |
|  |
| **Nr** |  | **OK** | **niet OK** |
|  | **start** |  |  |
| 1 | De student wast de handen |   |   |
| 2 | De student maakt de werkplek schoon met 70% ethanol |   |   |
|  | **Preparaat maken** |   |   |
| 3 | De student maakt het objectglas schoon met ethanol |   |   |
| 4 | De student pakt een druppel monsteroplossing met een pipet |   |   |
| 5 | De student pipetteert 1 druppel monsteroplossing op het objectglas |   |   |
| 6 | De student legt voorzichtig een dekglas op het preparaat |   |   |
| 7 | De student dept overtollige vloeistof af met een filtreerpapiertje |   |   |
| 8 | De student bekijkt het preparaat onder de microscoop |   |   |
|   | **Opruimen** |   |   |
| 9 | De student maakt de tafel schoon met 70% ethanol |   |   |
| 10 | De student wast zijn handen |   |   |
|   | Beoordeeld door: | Datum van beoordelen: | Behaald niveau (alles ok): | Beoordelaar: |   |
|  |   |   |   |   |

## Bijlage 3: Checklist microscoop instellen

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Onderdeel:** | Microscoop instellen | **Student** |   |
|  |
| **Nr** |  | **OK** | **niet OK** |
|  | **Start** |  |  |
| 1 | De student wast de handen |   |   |
| 2 | De student maakt de werkplek schoon met 70% ethanol |   |   |
|   | **Microscoop instellen** |   |   |
| 3 | De student pakt de microscoop met 1 hand via het statief en ondersteunt deze met zijn andere hand |   |   |
| 4 | De student draait de tafel naar beneden |   |   |
| 5 | De student zet het licht van de microscoop aan |   |   |
| 6 | De student zet het 4× objectief voor |   |   |
| 7 | De student stelt alleen scherp met grote schroef bij de 4× vergroting |   |   |
| 8 | De student draait met de revolver het 10× objectief voor |   |   |
| 9 | De student stelt scherp met de kleine schroef |   |   |
| 10 | De student gebruikt het diafragma om het contrast te verhogen |   |   |
| 11 | De student speelt met het licht om het contrast te verhogen |   |   |
| 12 | De student vergroot stelt scherp met het 40× objectief |   |   |
| 13 | De student kan vertellen waarom een nat preparaat niet 1000× vergroot kan worden |   |   |
|   | **Microscoop opruimen** |   |   |
| 14 | De student draait het 4× objectief voor |   |   |
| 15 | De student draait het objecttafel geheel omlaag |   |   |
| 16 | De student doet de lamp uit |   |   |
| 17 | De student plaatst de microscoop op juiste wijze terug |   |   |
|   | Beoordeeld door: | Datum van beoordelen: | Behaald niveau (alles ok): | Beoordelaar: |   |
|  |   |   |   |   |

## Bijlage 4: Checklist reinkweek maken

|  |
| --- |
| **VMT Praktijktoets** |
|
| **Onderdeel:** | Reinkweek | **Student** |   |
|  |
| **Nr** |  | **OK** | **niet OK** |
|  | **Start** |  |  |
| 1 | De student wast de handen |   |   |
| 2 | De student maakt de werkplek schoon met 70% ethanol |   |   |
|   | **Reinkweek maken** |   |   |
| 3 | De student ontsteekt de vlam op de juiste wijze (gas aan, luchttoevoer uit, daarna luchttoevoer vermaximaal, bruisende blauwe blam) |   |   |
| 4 | De student voert alle handelingen uit binnen 30cm van de brander |   |   |
| 5 | De student codeert de plaat |   |   |
| 6 | De student pakt een entnaald en gloeit deze vanaf de basis langzaam uit richting het oog |   |   |
| 7 | De student opent de petrischaal met monstermateriaal op steriele wijze |   |   |
| 8 | De student wacht tot de entoog is afgekoeld en dept deze voor de zekerheid op een steriel stukje agar op het monster |   |   |
| 9 | De student neemt met de entoog 1 kolonie vanaf het monster |   |   |
| 10 | De student smeert dit monstermateriaal uit over de gehele breedte van ongeveer van 1/3e van de te beënten agarplaat |   |   |
| 11 | De student steriliseert de entoog door deze vanaf de basis richting het oog uit te gloeien zonder dat er sprake is van aerosolvorming |   |   |
| 12 | De student koelt de entoog voldoede af |   |   |
| 13 | De student strijkt vanaf het beënte gebied loodrecht over de plaat en zigtzagt de entoog enkele malen. Hierbij raakt de entstreep geen eerder beënt gebied |   |   |
| 14 | De student herhaalt stap 11&12 |   |   |
| 15 | De student strijkt met de entoog door het in stap 13 beënte gebied en zigzagt weer. Hierbij raakt de entstreep geen eerder beënt gebied |   |   |
| 16 | De student herhaalt stap 11&12 |   |   |
| 17 | De student plaatst de deksel op de petrischaal |   |   |
| 18 | De student sluit de luchttoevoer van de bunsenbrander tot gele vlam zichtbaar is |   |   |
| 19 | De student maakt de werkplek schoon met 70% ethanol |   |   |
|   | Beoordeeld door: | Datum van beoordelen: | Behaald niveau (alles ok): | Beoordelaar: |   |
|  |   |   |   |   |

## Bijlage 5: Checklist steriele verdunningsreeks

|  |
| --- |
| **VMT Praktijktoets** |
|
| **Onderdeel:** | Reinkweek | **Student** |   |
|  |
| **Nr** |  | **OK** | **niet OK** |
|  | **Start** |  |  |
| 1 | De student wast de handen |   |   |
| 2 | De student maakt de werkplek schoon met 70% ethanol |   |   |
|   | **Steriele verdunningsreeks maken** |   |   |
| 3 | De student richt zijn werkplek geordend in.  |   |   |
| 4 | De student pakt de 1000µl dop voor de bagpipet |   |   |
| 5 | De student opent zo nodig een zakje met rietjes door een hoekje er af te knippen |   |   |
| 6 | De student ontsteekt de vlam op de juiste wijze (gas aan, luchttoevoer uit, daarna luchttoevoer vermaximaal, bruisende blauwe blam) |   |   |
| 7 | De student plaatst de rietjes op de bagpipet door deze vanuit het zakje op de pipet te drukken. Hierbij raken de vingers van de student het rietje niet. |   |   |
| 8 | De student homogeniseert het monster door zachtjes te zwenken |   |   |
| 9 | De student draait de dop van monstermateriaal los en legt deze met de holle kant naar boven naast de vlam |   |   |
| 10 | De student brengt het rietje tot onder het vloeistofniveau |   |   |
| 11 | De student homogeniseert het monster nogmaals door 3 maal 'op en neer' te pipetteren |   |   |
| 12 | De student pipetteert 1ml monstermateriaal uit de monsteroplossing |   |   |
| 13 | De student pakt een cultuurbuis met FZ en haalt de dop van deze eraf met de pink + evt. wijsvinger van de pipetterende hand |   |   |
| 14 | De student steriliseert de cultuurbuis door de top enkele malen door de bruisende vlam te halen |   |   |
| 15 | De student pipetteert 1ml monstermateriaal door de pipet tot de 2e weerstand in te drukken |   |   |
| 16 | De student steriliseert een cultuurbuis door de top enkele malen door de bruisende vlam te halen |   |   |
| 17 | De student plaatst de dop terug op de cultuurbuis |   |   |
| 18 | De student houdt de pipet boven de afvalbak en drukt met de pipet in tot het 3e weerstandspunt zodat het rietje los komt van de pipet |   |   |
| 19 | De student homogeniseert de buis door 3× 1 sec te vortexen |   |   |
| 20 | De student herhaalt stap 10 t/m 18 totdat de gewenste verdunning bereikt is |  |  |
| 21 | De student sluit luchttoevoer van bunsenbrander tot gele vlam zichtbaar is |  |  |
| 22 | De student sluit de gastoevoer af |  |  |
| 23 | De student maakt de werkplek schoon met 70% ethanol |  |  |
| 24 | De student wast de handen |  |  |
|   | Beoordeeld door: | Datum van beoordelen: | Behaald niveau (alles ok): | Beoordelaar: |   |
|  |   |   |   |   |