



Was wir von Viren lernen können

THOMAS HOPPE – UWE HOSSFELD – KARL PORGES

Online-Ergänzung

Erzeugung eines sterilen Arbeitsplatzes

Zum Arbeiten gehört auch eine möglichst keimfreie Umgebung, welche mit Hilfe eines Bunsenbrenners erstellt werden kann. Dabei wird der Bunsenbrenner auf einer zuvor mit Ethanol abgewischten Tischoberfläche aufgestellt. Durch die Flamme entsteht eine ständige Sogwirkung (Kamineffekt). Dadurch ist es Bakterienzellen oder Sporen nicht möglich, sich in der näheren Bunsenbrenner-Umgebung abzusetzen (50 cm). Hier aufgestellte, sterile Utensilien bleiben auch steril. Nicht benötigte Utensilien, wie z. B. Mappen oder Flaschen, stören den Luftzug, sorgen für ungewollte Verwirbelungen und sollten daher vermieden werden. Trotz der Verwendung schulgeeigneter Bakterien und Bakteriophagenstämmen ist auf ein sauberes mikrobiologisches Hantieren zu achten. Nicht weiter benötigtes Material oder Abfall sind in einem Dampfkochtopf für 20 min zu sterilisieren.

Ausgangshypothesen:

- Gibt es Bakteriophagen in unserer äußeren Umgebung?
- Sind alle Bakteriophagen gleich?

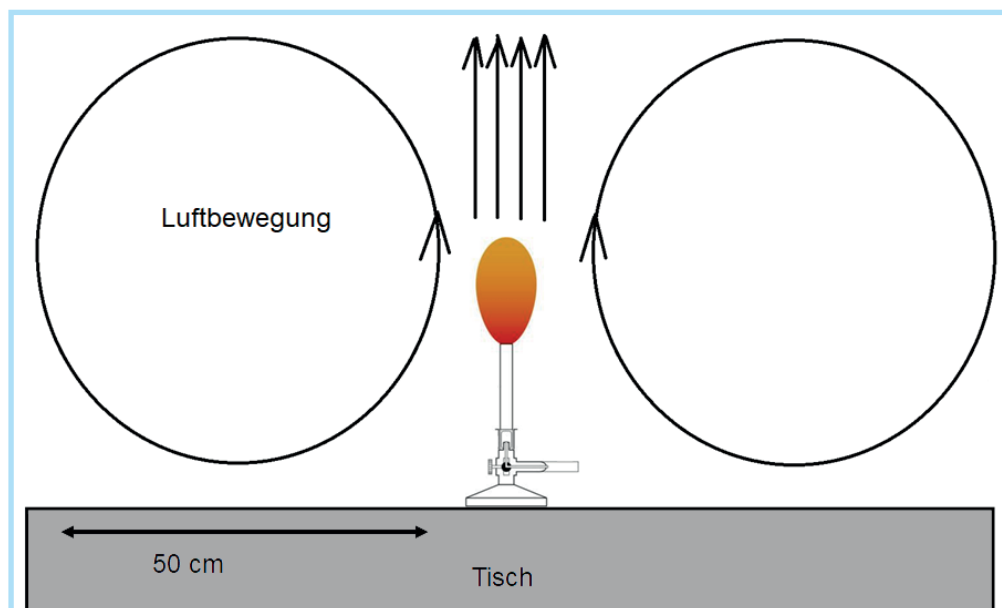


Abb. 1. Prinzip eines sterilen Feldes. Durch die erwärmte Luft entsteht ein ständiger Luftstrom über einer zuvor sterilisierten Arbeitsfläche und ermöglicht dadurch ein Arbeiten in einem keimfreien Raum (ca. 50 cm um die Bunsenbrennerflamme).

Versuchsdurchführung

Material

- Bunsenbrenner (am besten mit wechselbarer Kartusche für den mobilen Einsatz)
- Wasserbad
- 70 % Alkohol (vergällt)
- Pipette (100 µl)
- Klebeband zum Abkleben der Petrischalen
- Wasserprobe (50 ml), möglichst aus einem verschmutzten Gewässer, wie z. B. Ententeich
- 5 ml einer Übernachtskultur von *Escherichia coli* K12 wt (zu beziehen über die DSMZ)
- T4-Bakteriophagen (10⁶/ ml) Kontrolle (zu beziehen über die DSMZ)
- λ-Bakteriophagen (10⁷/ ml) Kontrolle (zu beziehen über die DSMZ)
- Sterilfilter und Spritze (zu beziehen über Carl Roth GmbH & Co. KG)
- Falcon-Röhrchen (zu beziehen über Carl Roth GmbH & Co. KG)
- 4 NZCYM-Weichagar in Falconröhrchen (auf 50 °C im Wasserbad temperieren)
- 4 NZCYM-Weichagarplatten
- Wasserprobe aus einem Ententeich
- Stift

Zusammensetzung der Kulturmedien (Puffer und Weichagar)

Die Medien können als Fertigmischung bestellt (Carl-Roth GmbH und Co. KG oder anderen Laborausstattern) oder nach der folgenden Anleitung selbst hergestellt werden.

Es genügt ein Liter Medium für ca. 25 Petrischalen. Die Medien werden nach dem Einwiegen mittels Einwecktopfs für 20 min sterilisiert. Sollen Petrischalen befüllt werden muss dies im handwarmen Zustand erfolgen. Dabei wird die Petrischale nur in der Nähe des sterilen Feldes geöffnet. Die Unterschale wird bis zur kurz unter die Hälfte des Randes befüllt und wieder geschlossen. Nach dem Abkühlen können die Petrischalen für ca. 4 Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Phagenverdünnungspuffer:

NaCl	5,8 g/ l		
MgSO ₄ * 7H ₂ O	2,0 g/ l		
1M Tris/HCl	50 ml/ l	pH-Wert	7,0

NZCYM-Weichagar

Caseinhydrolysat	10 mg/ l
NaCl	5 g/ l
Hefextrakt	5 g/ l
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	2 g/ l
Agar	15 g/ l

Durchführung**(Tag 1, Doppelstunde)**

1. Herstellen einer Phagenlösung aus einer Gewässerprobe

- 10 ml der Wasserprobe sterilfiltrieren und in ein Falcon-Röhrchen überführen

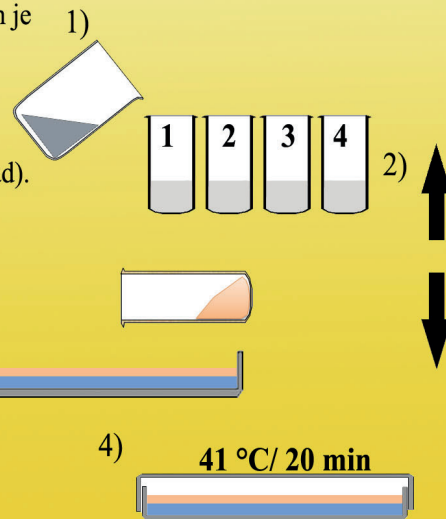


2. Bakteriophagentest

- Zu den vier Ansätzen von je 1 ml Bakteriophagenlösung werden je 200 µl Escherichia coli K12 wt gegeben.

(1. sterilfiltrierte Wasserprobe/ 2. T4-Bakteriophagenlösung/
3. λ-Bakteriophagenlösung/ 4. Phagenverdünnungspuffer)

- vorsichtig mischen und 15 min bei 37 °C erhitzen (im Wasserbad).
- Jede Phagen-E. coli Suspension zu je einem Weichagar geben.
- kurz schütteln (vorsichtig) – nicht erkalten lassen
- auf vorgewärmten NZCYM-Weichagarplatten gleichmäßig ausgießen (3 mm dick)
- Platten erstarren lassen
- Platten mit Klebeband zukleben
- 20 min auf 41 °C erhitzen (Wärmeschrank oder Heizung)
- Übernacht bei Raumtemperatur kultivieren

**(Tag 2, mind. 45 min)**

3. Auswertung

- Über Nacht sind die E. coli-Bakterien in dem Weichagar zu einer gleichmäßig trüben Kolonie herangewachsen. Phagen haben nun ausgehend der ersten Wirtszelle sich konzentrisch verbreitet und neue Bakterien infiziert/ lysiert. Daher erscheint der Agar in diesen Bereichen klarer (wie ein Loch). Man bezeichnet dies als von Phagen geschaffene Einheiten (PhagenFormingUnits - PFU)
- Zähle die Anzahl der verschiedenen PFU!
- Sind Unterschiede in Form und Größe zu erkennen?
- Vergleiche die Probe aus dem Ententeich mit den käuflich erworbenen Phagenstämmen.
- Rechne um: Wieviele Phagen sind in einem ml der Ententeichprobe enthalten gewesen?

Abb. 2. Arbeitsblatt zur Versuchsdurchführung. Der Versuch erstreckt sich über 2 Tage, ca. 3 h.

Literatur

ANDERSEN, K. G., RAMBAUT, A., LIPKIN, W. I., HOLMES, E. C. & GARRY, R. F. (2020). The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat. Medicine* 26, 450–452. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9> (29.1.2021).

VBIO. (2020). *Der Stellenwert der biologischen Bildung angesichts der Herausforderungen von SARS-CoV-2 und Covid-19*. https://www.vbio.de/fileadmin/user_upload/news/pdfs/Stellungnahme_des_AK_Gesundheit___Biologie_im_VBIO.pdf (29.1.2021).

D'HÉRELLE, F. (1911). Sur une épizootie de nature bactérienne sévissant sur les sauterelles au Mexique. *Comptes rendus Acad Sci Paris*, 152, 1413–1415.

DOERR, H. W. & GERLICH, W. (2009). *Medizinische Virologie: Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen*. Stuttgart, New York: Georg Thieme.

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (2021). <https://www.dsmz.de/> (10.2.2021).

DUBLANCHET, A., & BOURNE, S. (2007). The epic of phage therapy. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 18(1), 15-18.

ECKERT, N. (2019). Infektionstherapie: Auf der Suche nach Alternativen. *Dtsch. Arztebl.* 116(45): A-2078 / B-1703 / C-1665.

International Committee on Taxonomy of Viruses. (2011). *The 9th Report of the ICTV: Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses*. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/. (29.1.2021)

Ji, Y., QIAN, H., YE, J, ZHENG, X. (2018). The impact of ambient humidity on the evaporation and dispersion of exhaled breathing droplets: A numerical investigation. *Journal of aerosol science.*, 115, 164–72.

KHADSE, N.A., WANKHADE, A. M., PATIL, S.R. & KATHALE, S.V. (2020). A review on corona virus disease. *EJBPS* (7)4.

LEVEN, K. H. (1997). *Die Geschichte der Infektionskrankheiten: Von der Antike bis ins 20. Jahrhundert*. Landsberg/Lech: Ecomed.

LIN, D. M., KOSKELLA, B. & LIN, C. H. (2017). Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*, 8(3): 162–173. <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v8.i3.162> (29.1.2021).

MADIGAN, M. T, BENDER, K. S., BUCKLEY, D. H., SATTLEY, W. M. & STAHL, D. A. (2020). *Brock Mikrobiologie*. München: Pearson-Studium.

MALAIYAN, J., ARUMUGAM, S., MOHAN, K. & RADHAKRISHNAN, G. G. (2020). *An update on the origin of SARS-CoV-2: Despite closest identity, bat (RaTG13) and pangolin derived coronaviruses varied in the critical binding site and O-linked glycan residues*. <https://doi.org/10.1002/jmv.26261> (29.1.2021).

MAYR, A. (2007). *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. Stuttgart: Enke.

RKI (2020). *Epidemiologischer Steckbrief zu SARS-CoV-2 und COVID-19*. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Steckbrief.html;jsessionid=2739D8A0882D12B11305363D3F1CEB59.internet062?nn=13490888#doc13776792body-Text15 (29.1.2021)

STADNYTSKYI, V., BAX, C. E., BAX, A. & ANFINRUD, P. (2020). *The airborne lifetime of small speech droplets and their potential importance in SARS-CoV-2 transmission*. <https://doi.org/10.1073/pnas.2006874117> (29.1.2021).

STRETE, D. & ALEXANDER, S. K. (2006). *Mikrobiologisches Grundpraktikum*. München: Pearson.

TWORT, F. W. (1915). An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *The Lancet*: Dec. 4: 1241–1243.