

# Inverkan av UV-ljus på bakterier

UV-strålning används i många sammanhang, t.ex. vid sterilisering av ytor och avloppsvatten, för kontroll av eventuellt förfalskade sedlar och för att bli solbränd på ett solarium.

Men UV-strålning är inte ofarlig. Ozonskiktet högt uppe i stratosfären hindrar de mest energirika UV-strålarna från solen att nå jorden och skyddar på så sätt de levande organismerna. UV-strålningen från solen både bryter ned ozonmolekyler och gör att de nybildas. Det är nödvändigt att denna balans inte rubbas.

Miljöfarliga ämnen, t.ex. freoner, kan öka nedbrytningen av ozonskiktet. Resultatet blir att en ökad andel av den farliga UV-strålningen kan nå jordytan. Energirik UV-strålning skadar DNA och kan ge mutationer. Allt fler människor riskerar därför att drabbas av hudcancer.

Syftet med laborationen är att visa hur bakterier påverkas av UV-strålning och vad som händer om de exponeras för synligt ljus efter UV-bestrålningen. I samband med laborationen kan följande moment behandlas:

- UV-strålningens egenskaper, miljö- och hälsoeffekter,
- DNA-molekylens byggnad och reparationsenzymers betydelse.

## Tidsåtgång

Laborationen tar ca 80 minuter. Agarplattor bereds i förväg. Avläsning och utvärdering av resultatet görs efter 1–2 dagar och tar ca en timme.

## Säkerhet

UV-strålning är skadlig. Använd skyddsglasögon som skyddar mot UV-ljus.

Iaktta god laborativ mikrobiologisk teknik. Använd endast klass 1-organismer.

Var försiktig vid flambering av racklan. Ha alltid ett lock i närheten för att kväva eld i spritbehållaren.

## Materiel

- NA-plattor,
- bakteriekultur (*E. coli* eller annan bakterie från klass 1),
- 3–6 provrör med sterilt spädningsmedium (0,9 % NaCl),
- rackla,
- sterila pipetter eller spetsar,
- UV-ljusbord,
- skyddsglasögon mot UV-belysning,
- mörkrum,
- liten ljustät papplåda,
- kärl med lock och etanollösning,
- vortexapparat.

## Utförande      Förberedelser

- 1 Planera testserien med hjälp av följande uppgifter:

Agarplattor med bakterier utsätts för UV-ljus med konstant intensitet men under olika lång tid.

Belysningstiderna väljs beroende på vilken UV-belysning som används. För ett UV-ljusbord kan tiderna varieras mellan noll och ca en minut. Planera antalet belysningstider och hur många plattor som går åt. Två plattor behövs för varje belysningstid för att studera effekten av synligt ljus respektive mörker.

Beräkna hur mycket som går åt av NA. Autoklavera och gjut agarplattor.

- 2 Odla upp en övernattningskultur dagen innan försöket ska utföras:

*E. coli* (eller annan bakterie) tas från en platta och ympas med hjälp av en steril ympnål till rör med ca 10 cm<sup>3</sup> NB. Bakteriekulturen får tillväxa över natten i 37 °C.

## Genomförande

- 3 Blanda övernattningskulturen noga med vortexapparat.

- 4 Använd sterila pipetter/spetsar och ta 1 cm<sup>3</sup> av bakteriekulturen och överför till första spädningsröret. Blanda noggrant. Byt pipettspets mellan varje spädningssteg och fortsätt utspädningen på samma sätt tills 1 000 gångers utspädning uppnåtts. Var noggrann med att blanda om innehållet vid varje spädning med vortexapparat.

(Hur mycket bakteriekulturen behöver spädas beror på hur god tillväxten har varit. Den angivna utspädningsgraden (1:1000) brukar oftast ge bra resultat.)

- 5 Ta 50 µl från det rör som innehåller bakteriesuspension från spädningssteget 1:1 000 och häll på varje platta som ingår i serien. Stryk ut bakteriesuspensionen omedelbart med en rackla. (Racklan flamberas mellan varje utstrykning. Se till att racklan inte blir för varm – kyl den genom att hålla den mot steril agar.)

- 6 Låt bakteriesuspensionen torka in under några minuter.

- 7 Märk plattorna med de valda belysningstiderna.

**OBS!** Ta på UV-skyddsglasögon! Mörklägg lokalen.

- 8 Ta bort locken på två plattor som ska belysas samtidigt och placera dem upp och ned på UV-ljusbordet. Stäng plastlocket på ljusbordet, sätt på UV-belysningen och låt lampan lysa den bestämda tiden.

**VIKTIGT!**

Var noga med att göra exakt lika i samband med belysning av plattorna. Eftersom belysningstiderna bara varierar med någon sekund får det stor betydelse om UV-belysningen inte tänds och släcks vid exakt rätt tidpunkt.

UV-ljusbordet består av lysrör. Det är därför viktigt att placera plattorna på exakt lika ställen varje gång. Markera en ruta på UV-bordet med tejp där plattorna ska placeras.

Det är också viktigt att vara noga med hur plattorna hanteras efter UV-belysningen. Utsätt dem inte för vanligt ljus om detta inte ingår i försökets förutsättningar. Förvaring i ljus alternativt mörker inverkar på bakteriernas överlevnad.

- 9 Placera den ena plattan i starkt, synligt ljus i ett fönster och den andra plattan mörkt i en ljustät låda. Alternativt kan halva locket på en petriskål täckas med svart papper och hela plattan placeras i ett ljust fönster. Fortsätt på samma sätt med övriga plattor i serien.
- 10 *E. coli* inkuberas vid 37 °C i ett dygn.

## Resultat och utvärdering

Räkna bakteriekolonierna på de plattor där det är möjligt och avsätt antal kolonier mot belysningstid. (Säkrast resultat ger de plattor som har mellan 30 och 300 kolonier.) Utvärdera resultatet.

## Fördjupningsuppgifter

- 1 För att ta reda på hur stor andel av bakterierna som dör av UV-belysningen görs en utspädningsserie med ytterligare några steg från övernattningskulturen. Ta 1 cm<sup>3</sup> från varje spädningsslag och överför till en tom petriskål. Tillsätt ca 15 cm<sup>3</sup> NA (45 °C) och blanda in bakteriesuspensionen.  
  
Inkubera ett dygn vid 37 °C. Räkna därefter antalet kolonier på den eller de plattor som har mellan 30 och 300 kolonier. Beräkna, med hjälp av detta, antalet bakterier i ursprungssuspensionen. Använd resultatet för att beräkna andelen bakterier som dör vid UV-bestrålning under viss tid.
- 2 Testa UV-strålningens inverkan på andra levande organismer, som banan, andmat och bananflugor (se nedanstående referenser).
  - *Demonstrating the influence of UV rays on living things*, K. Morimoto, Journal of Biological Education (2002), 37(1).
  - *Växter klarar solbränna olika bra*, L-O. Björn, C. Gehrke, U. Johansson, Forskning och Framsteg 5/96.

- 3 Ta reda på hur olika reparationsenzymer fungerar och speciellt hur ljusberoende reparationsenzym (fotolyas, eng. *photolyas*) arbetar.
- 4 Hos människan förekommer en sällsynt, ärftlig sjukdom som heter *Xeroderma pigmentosum*. Ta reda på den medicinska bakgrunden till denna sjukdom och vilken betydelse UV-strålning har för patienter med denna sjukdom.
- 5 Ta reda på mer om de kemiska reaktioner som sker i ozonskiktet och hur ozonnedbrytande ämnen inverkar.
- 6 Studera livets utveckling på jorden och hur detta är kopplat till bildandet av ozonskiktet.

### UV-STRÅLNING OCH REPARATIONSENZYM

UV-strålning delas in i tre grupper beroende på våglängd; UV-A (315–400 nm), UV-B (280–315 nm) och UV-C (100–280 nm). Endast UV-A och UV-B når jordytan eftersom UV-C absorberas av ozonlagret. UV-A gör att huden blir brun medan UV-B ger brännskador. Vi skyddar oss mot UV-B-strålning genom att huden blir tjockare.

Solarier avger mest UV-A-strålning, men också en mindre andel UV-B-strålning. Genom att sola i ett solarium blir man brun utan att det yttersta hudlagret blir tjockare och man får därför inte heller ett skydd mot solens strålar.

UV-C har en starkt mutagen verkan eftersom våglängder runt 260 nm absorberas av DNA-baser så att dimerer bildas av två tyminmolekyler som är placerade intill varandra. Även UV-B har denna effekt men i mindre omfattning. UV-C och UV-B orsakar därför hudcancer. UV-B kan även

ge grå starr. När huden utsätts för normal solstrålning bildas tymindimerer, men de tas i allmänhet om hand av reparationsssystem.

Det finns flera typer av reparationsssystem varav ett kallas fotoreaktivering. Fotoreaktivering sker med hjälp av enzymet *fotolyas* som binder till pyrimidindimerer och använder synligt ljus för att bryta upp dimerringen och återbilda de ursprungliga, individuella pyrimidinbaserna.

Ljusberoende reparationsenzym (*fotolyas*) finns hos många levande organismer. T.ex. kan bakterier som utsätts för synligt ljus efter behandling med UV-ljus använda *fotolyas* för att reparera skador på arvsanlag som UV-ljuset åstadkommit. Det har inte säkert kunnat fastställas att *fotolyas* finns hos människan.