

## Forsøgsprotokol til larveforsøg: Tilsætning af 3 dage gamle larver til gødning inficeret med patogene bakterier

**Formål:** at undersøge udviklingen i mængden af tilsatte patogene bakterier til hønsegødning. Dette gøres ved at tilsætte en mærket bakterie til gødningen og kvantitativt bestemme udviklingen i gødningen og inde i larven med CFU tælling. Pilotforsøg har vist at mængden af tilsatte *Campylobacter jejuni* til hønsegødning falder eksponentielt med antallet af dage både med og uden gødning, men for at kunne undersøge larvens effekt tilsættes der dag 3 larver til gødningen opblandet blandet med en mærket bakterie.

**Stamme:** fremdyrkes fra glycerol stock på BAB med og uden AHB. Udsået i BHI broth.

**Test materiale:** gødning fra økologisk konsumægs producent. Fra Axel Månsson, Grarupvej 15, 7330 Brande, CHR. 20315. 85 gram i bøtter hvortil der tilsættes 15 ml væske således at DM bliver 30%.

**Larver:** 200 stk 3d DK larver / bøtte larver opvokset i lab medium

### Materialer der skal fremstilles til forsøget:

Gødning i bøtter a 85 g

BHI medium: vækst af inokulations kultur 240 ml	1 liter
Fysiologisk kogsalt: fortyndingsrækker	5 liter
Bolton broth	0,5 liter
BAB plader ca 200 plader	6 liter
BABrif ca 200 plader	6 liter
AHB plader ca 200 plader	6 liter

**NB! Alle AHB plader skal tørres før brug ved at de sættes ved 37 uden pose**

### Produktion af larver

- Check bakteriologisk status i DK fluekulturen onsdag
- For at få larver i den rigtige størrelse skal der sættes æghøst over torsdag.
- Fredag sæt æggene over i den lille mængde substrat
- Check mediet for bakterier en dag efter æg klækning

### Inokulations kulturer:

- Væk stammen (2C) fra -80C på AHB/BAB, inkuber mikroaerofilt/arofilt afh af stamme ved 42C natten over
- Subkultiver natten over ved 37C
- Tag en koloni og overfør den til hvert af 6 Nunc rør uden låg på med 40 ml med BHI, inkuber mikroaerofilt/aerobt ved 42C natten over
- Centrifuger rørene, fjern supernat og tilsæt 10 ml FK, bland de 6 rør i en flaske.
- Mix suspensionen meget grundigt med pipette eller andet, - kugler?
- Udtag 1 ml kultur der overføres til 9 ml FK (10-1). Efter blanding overføres der atter 1 ml til 9 ml (10-2), fortsæt til 10-8.
- Bestem CFU ved at overføre 5\*20 ul til en AHB BAB m AHB fra 10-5, 10-6, 10-7, 10-8. Inkuber plader mikroaerofilt ved 42 C i 2 døgn før aflæsning.

**Replikater:** 3 bøtter med larver og 3 bøtter uden, alle bøtter tilsættes bakterier

#### **Bestem tørstof i gødning:**

- Tø en dåse med 85 g gødning tilsæt samme væske mængde som de andre
- Udtag 25 g og overfør det til en ren dåse
- Udtør dette i en tørreovn
- Vej dåse

#### **Gødningsopsæt:**

- afvej 90 gram gødning i en bøtte med låg
- bland 10 ml *Campylobacter jejuni* i FK med gødningen, det hele blandes grundigt
- Lav 6 centrifugerør med 1 ml vand.
- udtag ca 0,5 g fæces og overfør det til centrifugerør der står i stativ på en vægt. Noter den præcise vægt af gødningen.
- Divider gødningens vægt med 0,11 og træk 1 ml fra. Tilsæt denne væske til røret (10-1 fortynding).
- Fortsæt med at fortynde 1:10 (overfør, 5 ml i 4,5 ml FK) indtil til den ønskede fortynding er opnået (10-9).
- Spred 100 ul fra fortyndingerne:
  - AHB 10-4, 10-5, 10-6 Inkuber plader mikroaerofilt ved 42 C i 2 døgn før aflæsning
  - BAB 10-7, 10-8, 10-9

#### **Tilsætning af larver**

- Fra en larvekultur (2-4 dage) udtages der 3 portioner af 200 larver som renses let
- Vej larver
- tilsæt larver til hver af bøtter
- Inkuber ved 25 C med papirlåg

#### **Måling af bakterier i gødning**

- der udtages dagligt prøver fra gødningen og larver (hver 24 time), og
  - gødning undersøges for *Campylobacter jejuni*, og total kim
  - larver undersøges for *Campylobacter jejuni*
- mål pH på 10-1 fortynding i L1 og N1 brug indikator strimler

#### **Opformering af *Campylobacter jejuni* i gødning med bolton**

når der kun er vækst i 10-1 testes med opformering

- overfør hhv 1000 ul fra en 10-1 fortynding til næsten fyldt bolton rør max 1 cm fra top
  - inkuber røret ved 2-4 timer ved 37C og herfter ved 42C hvis der er låg på røret kan det ske i atm luft
- spred 10 ul med en øjepodenål på en AHB plade

#### **Opformering af *Campylobacter jejuni* med bolton**

når der kun er vækst i 10-1 testes med opformering

- gem 500 ul fra en 10-1 fortynding på frys
- udtag 100 til at lave 10-2 fortynding
- spot 5X20 på en AHB
- overfør resten til et rør fyldt med Bolton
- inkuber røret ved 2-4 timer ved 37C og herfter ved 42C hvis der er låg på røret kan det ske i atm luft
- spred 10 ul med en øjepodenål på en AHB plade

### Måling af bakterier i larver

- Udtag 10 larver fra gødningen
- Vask disse let i vand og overfør dem til et eppendorff rør og tilsæt 1 ml 0,26% hypochlorit
- Inkuber i 4 min og fjern væsken med pipette
- Gentag desinfektionstrinnet i alt 3 gange
- Vask med FK i alt 5X
- Fjern alt vand med pipette og vej røret, divider vægten med 0,11
- Tilsæt 100 ul og mos larverne, tilsæt den resterende mængde væske og lav en fortyndingsrække ved at overføre 100 ul til 900 ul FK. Fortsæt til 10-4

#### når der kun er vækst i 10-1 testes med opformering

- gem 500 ul fra en 10-1 fortyndingen på frys
- udtag 100 til at lave 10-2 fortynding
- spot 5X20 på en AHB
- overfør resten til et rør fyldt med Bolton
- inkuber røret ved 2-4 timer ved 37C og herfter ved 42C hvis der er låg på røret kan det ske i atm luft
- spred 10 ul med en øjepodenål på en AHB plade

### Måling af bakterier i pupper

- Når der kommer pupper overføres de til en petriskål
- På dag 3 efter forpupning Udtages 10 pupper
- Vask disse let i vand og overfør dem til et eppendorff rør og tilsæt 1 ml 0,26% hypochlorit
- Inkuber i 4 min og fjern væsken med pipette
- Gentag desinfektionstrinnet i alt 3 gange
- Vask med FK i alt 5X
- Fjern alt vand med pipette og vej røret, divider vægten med 0,11
- Tilsæt 100 ul og mos larverne, tilsæt den resterende mængde væske og lav en fortyndingsrække ved at overføre 100 ul til 900 ul FK. Fortsæt til 10-5.
- Spred på BAB (totalkim) 10-3 >10-5 inkuber ved 37C
- Spred på AHB (Campylobacter jejuni) 10-1 >10-3 inkuber ved 44C

### Måling af bakterier i fluer

- Pupperne fra petriskålen overføres til et fluebur
- Lad dem klække med vand og mad
- dyrk fra vandpapiret
- lav evt opformering i bolton og test på AHB plader

## Arbejdsplan

Dag -5      sæt æglægningsmedium ind til DK fluer

Dag -4 overfør æg til larvemedium

Dag -2 tøj stamme fra -80

Dag -1 overfør 1 koloni til hvert af 6 nunc rør med BHI, tøj gødning

Dag 0 mandag

- høst *Campylobacter jejuni* kultur
- inficer gødning
- lav en fortyndingsrække med det inficerede gødning
- spred på BAB med AHB for at tælle *Campylobacter jejuni*
- spred på BAB for at tælle totalkim
- høst larver og tilsæt 200 til hver bøjtte (3 stk)
- vask og dyrk fra 10 larver på BAB med AHB

Dag 1 tirsdag

- aflæs totalkim på BAB T0
- udtag ca 0,5 gr gødning fra alle bøjtter
- lav en fortyndingsrække med det inficerede gødning
- spred på AHB for at tælle *Campylobacter jejuni*
- spred på BAB for at tælle totalkim
- høst 10 larver fra hver bøjtte (3 stk)
- vask og fortynd og dyrk disse på AHB og BAB

Dag 2 onsdag

- aflæs AHB plader fra T0, aflæs BAB dag T24
- udtag ca 0,5 gr gødning fra alle bøjtter
- lav en fortyndingsrække med det inficerede i gødningen
- spred på BAB med AHB for at tælle *Campylobacter*
- spred på BAB for at tælle totalkim
- høst 10 larver fra hver bøjtte (3 stk)
- vask og dyrk disse på BAB med AHB

### Dag 3 torsdag

- aflæs AHB plader fra T24, aflæs BAB dag T48
- udtag ca 0,5 gr gødning fra alle bølter
- lav en fortyndingsrække med det inficerede i gødningen
- spred på AHB for at tælle *Campylobacter jejuni*
- spred på BAB for at tælle totalkim
- høst 10 larver fra hver bølge (3 stk)
- vask og dyrk disse på BAB med AHB

### Dag 4 fredag

- aflæs AHB plader fra T48, aflæs BAB dag T72
- udtag ca 0,5 gr gødning fra alle bølter
- lav en fortyndingsrække med det inficerede i gødningen
- spred på AHB for at tælle *Campylobacter jejuni*
- spred på BAB for at tælle totalkim
- høst 10 larver fra hver bølge (3 stk)
- vask og dyrk disse på BAB med AHB

### Dag 7

- aflæs AHB plader fra T72 og T96, aflæs BAB dag T96
- udtag ca 0,5 gr gødning fra alle bølter
- lav en fortyndingsrække med det inficerede i gødningen
- spred på AHB for at tælle *Campylobacter jejuni*
- spred på BAB for at tælle totalkim
- overfør 1000 ul af 10<sup>-1</sup> til Bolton
- høst 10 larver fra hver bølge (3 stk)
- vask og dyrk disse på BAB med AHB

### Dag 8

- overfør 10 ul fra Bolton til AHB
- aflæs BAB dag T168

#### Dag 9

- aflæs AHB plader fra T168 T96,
- aflæs AHB fra Bolton

#### Dag 10

- høst pupper og overfør disse til et ret fluebur
- høst 10 pupper fra hver bøtte (3 stk)
- vask og dyrk disse på AHB

#### Dag 14

- dyrk fra filterpapiret hvor fluerne suger vand
- overfør papiret til en AHB plade

FORTRØLLELIGT