



Inleiding Biotechnologie

MODULE

1

European Initiative for Biotechnology Education

Aan de module hebben bijgedragen:

Eckhard R. Lucius (Coördinator)

Catherine Adley, Jan Frings, Cecily Leonard, Dean Madden, Marcus Müller, Uta Nellen, Patricia Nevers, John Schollar, Marleen van Strydonck, Paul Wymer.



Het Europees Initiatief voor Biotechnologische Educatie (EIBE) stelt zich tot doel vakkennis te verspreiden, inzicht en begrip te vergroten en het maatschappelijk debat te bevorderen door middel van verbeterd biotechnologisch onderwijs in scholen in de Europese Unie (EU).

EIBE Contactpersonen



BELGIË/BELGIQUE

Prof. Dr. Vic DAMEN/ Marleen van STRYDONCK, Universitaire Instelling Antwerpen (U.I.A.), Department Didactiek en Kritiek, Universiteitsplein 1, 2610 Antwerpen, email vdamen@uia.ua.ac.be, mvstryd@uia.ua.ac.be

Dr. Maurice LEX, EC, GD XII E-1, SDME 9/38, Rue de la Loi 200, 1049 Bruxelles, Fax 0032/2/299-1860



BULGARIA

Prof. Raycho DIMKOV, University of Sofia "St. Kliment Ohridski", Faculty of Biology, Dr. Tzankov blvd. No. 8, 1421 Sofia, email ray@biofac.uni-sofia.bg



ČZECHÁ REPUBLIKA

Dr. Hana NOVÁKOVÁ, Pedagogprogram co-op Pedagogiká Fakulta UK, Konevova 241, 13000 Praha 3. Fax +420/2/684 5071



DANMARK

Dr. Dorte HAMMELEV, Association of Danish Biologists, Sønderjyllands Alle 2, 2000 Frederiksberg, email dorte@centrum.dk
Mrs Lisbet MARCUSSEN, Association of Danish Biologists, Skolebakken 13, 5800 Nyborg, email lisbetma@post2.tele.dk



DEUTSCHLAND

Prof. Dr. Horst BAYRHUBER/ Dr. Jens FRIEDRICH/ Dr. Eckhard R. LUCIUS/ Mrs Renate GLAWE, Institut für die Pädagogik der Naturwissenschaften (IPN) an der Universität Kiel, Olshausenstr. 62, 24098 Kiel, email csec@ipn.uni-kiel.de, friedrich@ipn.uni-kiel.de, lucius@ipn.uni-kiel.de, glawe@ipn.uni-kiel.de

Dr. Ognian SERAFIMOV, INCS-Centre of UNESCO, c/o Jörg-Zürn-Gewerbeschule, Rauensteinstr. 17, 88662 Überlingen, email joergzuern.os@t-online.de, ognian.serafimov@t-online.de

Prof. Dr. Eberhardt TODT, Universität Giessen, FB Psychologie, Otto-Behagel Str. 10, 35394 Giessen, email Eberhard.Todt@psychol.uni-giessen.de

Prof. Dr. Michael SCHALLIES, Pädagogische Hochschule, Heidelberg, FB Chemie, Im Neuenheimer Feld 561, 69120 Heidelberg, email schallie@ph-heidelberg.de



EESTI

Prof. Dr. Tago SARAPUU, Science Didactics, Dept., University of Tartu, Vanemuise 46-211, Tartu 51014, email tago@ut.ee.



EIRE

Dr. Catherine ADLEY, University of Limerick, Biotechnology Awareness Centre, Dept. of Chemical and Environmental Sciences, Limerick, email Catherine.Adley@ul.ie

Mrs. Cecily LEONARD, University of Limerick, Dept. of Life Sciences, Limerick, email cecily.leonard@ul.ie



ELLADA

Prof. Vasilis KOULALIDIS/ Ass. Prof. Vasiliki ZOGZA-DIMITRIADI, University of Patras, Dept. of Education, Rion, 26500 Patras, email zogza@upatras.gr, Koulaidi@upatras.gr



ESPAÑA

Dr. María J. SÁEZ, Dr. Angela GÓMEZ-NIÑO/ Rosa VILLAMANAN, Universidad de Valladolid, Dept. de Biología Celular y Farmacología, Geologo Hernandez Pacheco 1, Valladolid 47014, email mariaj@redestib.es, Angela@biocel.uva.es, rvillama@dce.uva.es



FRANCE

Prof. Gérard COUTOULY, LEGPT Jean Rostand, 18, Boulevard de la Victoire, 67084 Strasbourg Cedex, email coutouly@cybercable.tm.fr

Prof. Laurence SIMONNEAUX, ENFA, Toulouse, Boîte Postale 87, 31326 Castanet-Tolosan Cedex, email laurence.simonneaux@educagri.fr



ITALIA

Prof. A. BARGELLESI-SEVERI/ Dr. Stefania UCCELLI/ Dr. ssa. A. CORDA-MANNINO, Centro di Biotecnologie Avanzate, Largo Rosanna Benzi 10, 16132 Genova., email dcs@ist.unige.it



LUXEMBOURG

Mr. John WATSON/ Mr. Laurent KIEFFER, European School, 23 BLVD Konrad Adenauer, 1115 Luxembourg, email laurent.kieffer@euroschool.lu, john.watson@ci.edu.lu



NEDERLAND

Dr. David J. BENNETT, European Federation of Biotechnology Working Party on Education, Cambridge Biomedical Consultants, Oude Delft 60, NL-2611 CD Delfte, email efb.cbc@stm.tudelft.nl

Dr. Fred BRINKMAN, Hogeschool Holland, Communication Project, P.O. Box 261, 1110 AG Diemen, email f.brinkman@hsholland.nl

Drs. Liesbeth van de GRINT, Hogeschool van Utrecht, Coördinatiecentrum van het Landelijk Network voor Educatiecentra voor Biotechnologie, Postbus 14007, 3508 SB Utrecht, email Liesbeth.vd.Grint@feo.hvu.nl

Dr. Jan F.J. FRINGS, Pr. Marijkelaan 10, 7204 AA Zutphen, email j.frings@hccnet.nl

Dr. Ana-Maria BRAVO-ANGEL, Secretariat of the Task Group on Public Perceptions of Biotechnology, Oude Delft 60, NL-2611 CD Delfte, email efb.cbc@stm.tudelft.nl



RZECZPOSPOLITA POLSKA

Dr. Anna STERNICKA, University of Gdansk, Dept. of Biology, AL. Legionow 9, 80952 Gdansk, Fax +48/58/341 20 16



SCHWEIZ

Dr. Kirsten SCHLÜTER, ETH, Institut für Verhaltenswissenschaften, ETH Zentrum TUR, Turnerstr. 1, 8092 Zürich, email schluter@ifv.huwi.ethz.ch



SVERIGE

Mrs. Margareta JOHANSSON, Föreningen Gensyn, P.O. Box 37, 26821 Svalöv, email margareta.johansson@gensyn.svalov.se

Dr. Elisabeth STRÖMBERG, Östrabogymnasiet, Kämpegatan 36, 451 81 Uddevalla, email es@ostrabo.uddevalla.se



THE UNITED KINGDOM

Dr. John GRAINGER/ Mr. John SCHOLLAR/ Dr. Caroline SHEARER, National Centre for Biotechnology Education, The University of Reading, Whiteknights, P.O. Box 228, Reading RG6 6AJ, email j.m.grainger@rdg.ac.uk, j.w.schollar@rdg.ac.uk, c.shearer@rdg.ac.uk
Mr. Wilbert GARVIN, The Queen's University of Belfast, School of Education, 69 University Street, Belfast BT7 1HL, email w.garvin@qub.ac.uk

Dr. Jill TURNER, The Queen's University of Belfast, School of Nursing and Midwifery, 1-3 College Park East, Belfast BT7 1LQ, email Jill.Turner@Queens-Belfast.ac.uk

Dr. Paul WYMER, 6 Park Way, Whetstone London N20 0XP, email paul.wymer@virgin.net

Dr. Jenny LEWIS, University of Leeds, Centre for Studies in Science and Mathematics Education, Leeds LS2 9JT, email j.m.lewis@education.leeds.ac.uk

Mr. Adam HEDGECOE, University College London, Dept. of Science and Technology Studies, Gower Street, London WC1E 6BT, email a.hedgecoe@ucl.ac.uk

E.I.B.E. co-ordinator

Prof. Dr. Horst BAYRHUBER, Institut für die Pädagogik der Naturwissenschaften (IPN) an der Universität Kiel, Olshausenstr. 62, 24098 Kiel, Deutschland. Tel.: ++49-431-880-3129, Fax: +49-431-880-3132 email: csec@ipn.uni-kiel.de.

E.I.B.E. secretariat

Dr. Jens FRIEDRICH/ Renate GLAWE, Institut für die Pädagogik der Naturwissenschaften (IPN) an der Universität Kiel, Olshausenstr. 62, 24098 Kiel, Deutschland. Tel.: +49-431-880 3151 and +49-431-880 5151, Fax +49-431-880 3132, email: friedrich@ipn.uni-kiel.de, glawe@ipn.uni-kiel.de.



Inhoudsopgave

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

Veiligheid, copyright en verantwoording	4
Over Module 1	
Inleiding	5
Modellen	
DNA bouwplaat	6
Bacteriofaag bouwplaat	8
DNA isolatie	
DNA isolatie uit bacteriën	10
DNA isolatie uit uien	12
Productie	
Amylase productie	14
Cellulase productie	16
Antibioticum productie	18
Micro-organismen in actie	
Brooddeeg	20
Geïmmobiliseerde gistcellen	22
Brandstofcel	25
Genoverdracht	
Bacteriële conjugatie	27
Genoverdracht door <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	31
Appendix 1	
Microbiologische media	34
Appendix 2	
Microbiologische technieken	35
Appendix 3	
Het openen van een ampul	40

World Wide Web

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

Er zijn maar weinig gebieden die zich zo snel ontwikkelen als de biotechnologie. De EIBE Modules worden elektronisch gepubliceerd om ze te kunnen actualiseren en ze dan zo goedkoop mogelijk te verspreiden.

Deze pagina's (en de andere EIBE Modules) zijn overal ter wereld beschikbaar via het World Wide Web. Ze zijn te vinden onder:
<http://www.eibe.rdg.ac.uk:8001/>

Alle EIBE Modules op het World Wide Web zijn Portable Document Format (PDF) Files. Dit betekent dat de kwaliteit van de illustraties, kleuren, lettertypen en lay-out van deze documenten gehandhaafd blijft, ongeacht welke computer wordt gebruikt (Macintosh -inclusief Power PC, Windows, DOS of Unix platforms).

Bovendien zijn PDF-files kleiner dan de oorspronkelijke files, zodat het minder tijd kost om de documenten te downloaden. Om deze EIBE Modules te kunnen bekijken, is wel een programma van *Adobe Acrobat*[®] (Reader) nodig. Het Reader programma van *Adobe Acrobat*[®] is gratis verkrijgbaar in diverse talen (Nederlands, Engels, Frans, Duits en Italiaans). Het kan worden gedownload van de EIBE of Adobe WWW site:

<http://www.adobe.com/>

Met behulp van deze software kunnen de EIBE Modules bekeken en uitgeprint worden. Verder is het mogelijk om rond te neuzen en rustig de documenten te doorzoeken. N.B.: *Adobe* en *Acrobat* zijn handelsmerken van Adobe Systems Incorporated die in bepaalde rechtsgebieden kunnen zijn gedeponeerd. *Macintosh* is een handelsmerk van Apple Computer Incorporated.

Veiligheid

We hebben geprobeerd alle EIBE Modules op alle mogelijke gevaren te controleren en van passende veiligheidsvoorschriften te voorzien. De wet - die in de EG geldt in de vorm van EG-richtlijnen - beperkt geen experimenten waarbij natuurlijk voorkomende parasexuele processen, zoals conjugatie, transductie of fagenkruising, in het laboratorium toegepast worden, op voorwaarde dat de gebruikte organismen geen gentechnologisch veranderd DNA bevatten.

De voorgestelde procedures zijn, indien mogelijk, in overeenstemming met de algemeen geldende risico-beoordelingsanalyses. Als er sprake is van een verhoogd risico is dit aangegeven.

Voor het werken met micro-organismen gelden kort onderstaande veiligheidsmaatregelen. Deze staan bekend als **VMT, Veilige Microbiologische Techniek**. Appendix 2 in deze Module geeft nog eens uitgebreid veiligheidsvoorschriften op microbiologisch gebied.

De tien geboden van VMT:

- Werk volgens de regels, speciaal als u denkt dat er geen risico is.
- Houd de deur dicht.
- Houd uw jas dicht en binnen de practicumruimte.
- Begin met schone handen en nagels, zonder ringen of armbanden. (Vuil vermindert de weerstand van de huid en verbruikt desinfectans. De huid onder ringen en banden kan niet worden gewassen of ontsmet.)
- Verzamel alles wat nodig is en stel dat ordelijk op voor u begint.
- Vermijd hand-mond contact: niet roken, niet eten, niet drinken.
- Vermijd aerosolvorming. Aerosolvorming kan optreden door:
 - gieten van vloeistof,
 - vallende druppels,
 - uitblazen van pipetten,
 - openen van vochtige stoppen,
 - centrifugeren van open buizen,
 - te warme entogen.
- Gebruik mechanische hulpmiddelen voor pipetteren.
- Deponeer gebruikte pipetten in een desinfecterende vloeistof.
- Besteed volle aandacht aan opruimen, desinfectie, afvoer van besmet materiaal en handen wassen.

© Copyright

Deze EIBE Module valt onder het copyright. De medewerkers van deze Module benadrukken hun recht om erkend te worden als copyright houders als omschreven onder sectie 77 van de Designs, Patents and Copyright Act, UK (1988).

Voor onderwijskundige doeleinden

Elektronische of schriftelijke kopieën van deze EIBE Module of pagina's mogen worden gemaakt voor klassikaal gebruik, onder voorwaarde dat de kopieën zonder kosten, of tegen reproductiekosten worden uitgedeeld, en dat de medewerkers van de Module worden erkend en genoemd als copyright houders.

Gebruik door derden voor andere doeleinden

Deze Module mag worden doorgegeven aan individuen voor *niet-commerciële* doeleinden, maar niet met behulp van elektronische distributielijsten, mailing lists (listserv), nieuwsgroepen, bulletin boards of ongeautoriseerde World Wide Web plaatsingen. Het is evenmin toegestaan om met andere bulkdistributie, toegangs- of reproductiemechanismen die een abonnement, of geautoriseerde individuele toegang vervangen, te gebruiken, of deze beperkingen anderszins te omzeilen.

Commercieel gebruik

Het gebruik van materiaal van deze Module voor commerciële doeleinden, zonder vooraf verkregen toestemming van de copyright houders, is strikt verboden. Indien u dit materiaal voor commerciële doeleinden wenst te gebruiken, in zijn geheel of een deel ervan, of indien u het in de een of andere vorm wenst te publiceren, dan dient u contact op te nemen met:

EIBE secretariaat (Ute Harms)
p/a Institut für die Pädagogik der Naturwissenschaften
Universität Kiel
Olshausenstraße 62
D-24098 KIEL 1
Duitsland

telefoonnummer: +49 (0)4318803166
faxnummer: +49 (0)4318803132
Email adres: harms@ipn.uni-kiel.de

Ontwikkelingsteam

- Catherine Adley, Universiteit van Limerick, Ierland
- Jan Frings, Educatiecentrum voor Biotechnologie, Hogeschool van Utrecht, Nederland
- Cecily Leonard, Universiteit van Limerick, Ierland
- Eckhard R. Lucius (coördinator), IPN, Kiel, Duitsland
- Marleen van Strydonck, Universiteit van Antwerpen, België
- Paul E.O. Wymer, Society for General Microbiology, Groot-Brittannië.

Ontwerp, illustraties, vormgeving, additionele teksten en editing:

Dean Madden, NCBE, The University of Reading, The United Kingdom. Illustrations and typography © Dean Madden, 1997.

Verantwoording en dank

De EIBE wil in het bijzonder de volgende personen bedanken voor hun hulp bij de productie van deze Module. Liesbeth van de Grint (Hogeschool van Utrecht, EcB). en John Schollar (NCBE, Reading, Engeland) hebben een multinationale workshop opgezet en begeleid, waarbij de materialen van deze Module zijn getest. De volgende docenten hebben deelgenomen en veel waardevolle commentaren geleverd op de concept versie: E. Vergauts, L. Daniels, L. Neels (België), Dorte Hammelev (Denemarken), Lucienne Diemer, Gérard Coutouly (Frankrijk), Thomas Jeb, Dr. U. Schnack; Dr. E. Lipkow (Duitsland), A. de Graaf, Guus Smid, J. Gradener (Nederland), Rebecca Weston, Jane Gent, Derek Mackie, Sarah Whitethread, Maggie Parson (Groot-Brittannië).

Over deze Module



Deze Module bestaat uit een verzameling van opdrachten die ontworpen zijn om, onafhankelijk van elkaar of in een serie, in het lesprogramma te worden gebruikt. Ze zijn ontworpen door leraren en onderwijskundigen uit diverse Europese landen, bijeen gebracht met ondersteuning en aanmoediging door DGXII van de Europese Commissie, onder auspiciën van EIBE, het *Europees Initiatief voor Biotechnologie Educatie*.

All onderdelen zijn uitvoerig getest tijdens praktijk-workshops, waaraan leraren uit diverse delen van Europa hebben meegewerkt. De onderdelen van deze Module bestaan uit:

1. Goedkope modellen van DNA moleculen en diverse micro-organismen. Deze zijn bedoeld om de belangrijkste kenmerken van deze systemen te demonstreren en de leerlingen de mogelijkheid te bieden om de relatieve afmetingen van micro-organismen te bestuderen.
2. Eenvoudige, veilige en goedkope DNA isoleermethoden die de leerlingen in aanraking brengen met de hierbij gebruikelijke basistechnieken en ze de mogelijkheid geven om het genetisch materiaal te bekijken.
3. Een reeks experimenten die benadrukt:
 - a) de aanwezigheid van micro-organismen in de omgeving en de selectie van bruikbare stammen en
 - b) een aantal producten die micro-organismen kunnen aanmaken (enzymen en antibiotica). Twee experimenten zijn kwalitatief van opzet; een derde levert een kwantitatieve enzymproductie analyse op.
4. Divers onderzoek naar de effecten van microbiële groei, gerangschikt van een eenvoudige proefje met brooddeeg, via fermentatie tot het direct meten van de metabolische activiteit van gist. In elk van deze onderzoeken is er ruime mogelijkheid voor verdere uitbreiding. Om de leerlingen te stimuleren, zijn proeven vanuit theoretische principes, maar met een biotechnologische toepassing uitgezocht.

5. Twee experimenten die de methoden van genoverdracht in de natuur demonstreren. Deze zijn bedoeld als een praktische introductie tot de principes van genetische modificatie.

De auteurs hebben geprobeerd een combinatie aan te bieden van zowel eenvoudige als meer geavanceerde experimenten, in de hoop dat elke biologieleraar iets van zijn of haar gading kan vinden. De gebruikte materialen zijn verkrijgbaar bij de gebruikelijke firma's. Bacteriën, gisten en schimmels zijn in Nederland te koop bij het Centraal Bureau voor Schimmelcultures (C.B.S.) te Baarn, tel (035) 548 12 11, E-mail: info@cbs.knaw.nl. Twee appendices geven de achtergrondinformatie over het gebruik van microbiologische technieken in het schoollaboratorium.

Aan- of opmerkingen op dit materiaal zijn zeer welkom, vooral van leraren, voor wie deze Module in eerste instantie is ontwikkeld. Vragen en opmerkingen over deze Module kunt u sturen naar:

Eckhard R. Lucius
 Institut für die Pädagogik der
 Naturwissenschaften
 Universität Kiel
 Olshausenstraße 62
 D-24098 KIEL 1
 Duitsland
 telefoonnummer: +49 (0)4318803137
 faxnummer: +49 (0)4318803132
 E-mail adres: lucius@ipn.uni-kiel.de

of (voor Nederland) naar:

Liesbeth van de Grint
 Educatiecentrum voor Biotechnologie,
 FEO
 Hogeschool van Utrecht, Postbus 14007
 3508 SB Utrecht
 Telefoon (030) 2547210
 E-mail: Liesbeth.vd.Grint@feo.hvu.nl

dan wel (voor België) naar:

Prof. Dr. Vic Damen / Marleen Van
 Strydonck
 Universiteit Antwerpen - Dept. DIKR
 Universiteitsplein 1, 2610 Wilrijk.
 Telefoon: 03 / 820 29 74
 Fax: 03 / 820 29 75
 E-mail: vdamen@uia.ua.ac.be
 mvstryd@uia.ua.ac.be

DNA bouwplaat



Doel

Inzicht krijgen in de belangrijkste eigenschappen van de structuur van DNA.

Benodigde tijd

Het maken van dit model kost ongeveer een half uur. Het eventueel inkleuren vergt wat meer tijd.

Benodigdheden

per leerling of groepje leerlingen

- Scharen
- Papierlijm, lijmstick, plakband of een kleine nietmachine. *N.B. Dubbelzijdig plakband is ook geschikt, hoewel dat vaak na een poosje weer los laat.*
- Stuk touw (om het model aan op te hangen als het klaar is)

Opmerking: Het model wordt steviger als twee suiker-fosfaat strengen ruggelings op elkaar gelijmd worden.

Werkwijze

1. Knip de beide suiker-fosfaat strengen A en B uit.
2. Knip de baseparen uit.
3. Vouw de uiteinden van de baseparen zoals staat aangegeven op de pagina hiernaast.
4. Lijm het ene omgevouwen stuk van elk basepaar aan een nummer op streng A. De volgorde doet er niet toe. Welke kant van het basepaar ook niet.
5. Lijm het andere stuk van elk basepaar aan het corresponderende nummer op streng B. Dus wat aan nummer 1 op A was gelijmd, komt met de andere kant aan nummer 1 op B.
6. Hang het label met **DNA MODEL** met een stuk touw aan het model.

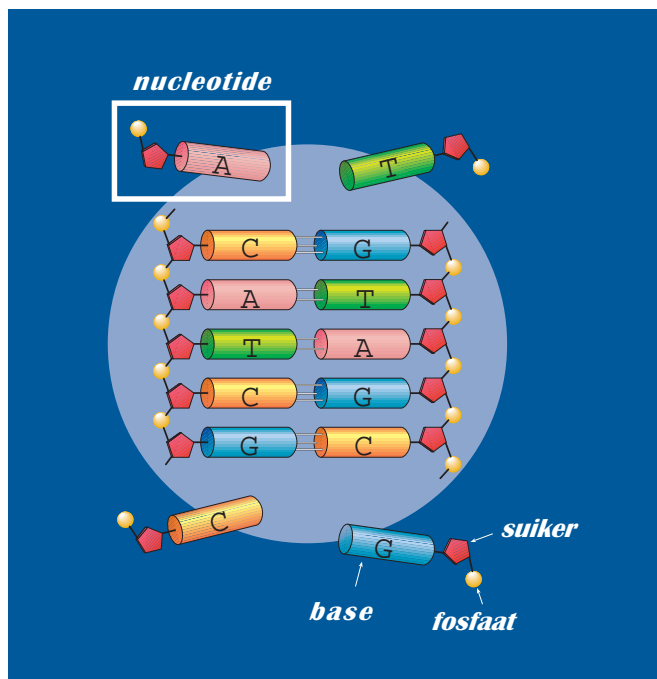
Herkomst

Dit model is een aanpassing van een model dat is ontwikkeld door de CSIRO in Australië voor hun 'Double Helix' Science Club. De EIBE dankt de CSIRO voor het oorspronkelijke idee en voor hun toestemming dit model te mogen gebruiken.

	N°1	N°2			N°3
	T	C	A	G	
T	PHE PHE LEU LEU	SER SER SER SER	TYR TYR STOP STOP	CYS CYS STOP TRP	T C A G
C	LEU LEU LEU LEU	PRO PRO PRO PRO	HIS HIS GLN GLN	ARG ARG ARG ARG	T C A G
A	ILE ILE ILE MET	THR THR THR THR	ASN ASN LYS LYS	SER SER ARG ARG	T C A G
G	VAL VAL VAL VAL	ALA ALA ALA ALA	ASP ASP GLU GLU	GLY GLY GLY GLY	T C A G

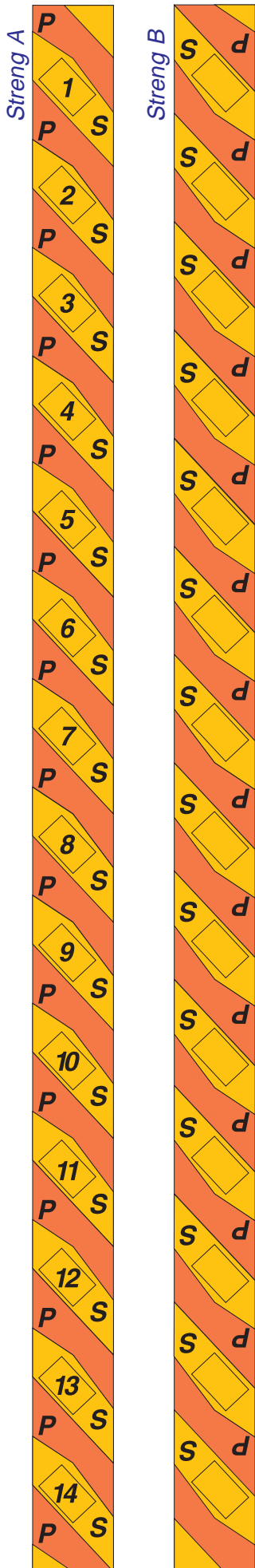
De genetische code

Elke opeenvolging van drie basen op de dubbele spiraal van het DNA codeert voor een van de twintig aminozuren. Deze worden -in het midden van de tabel- aangeduid met een drielettercode.

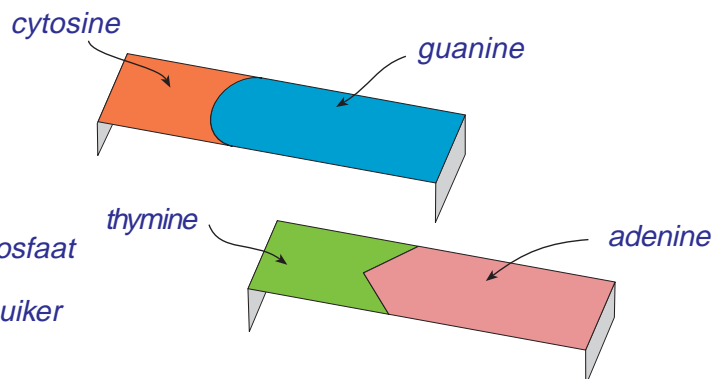
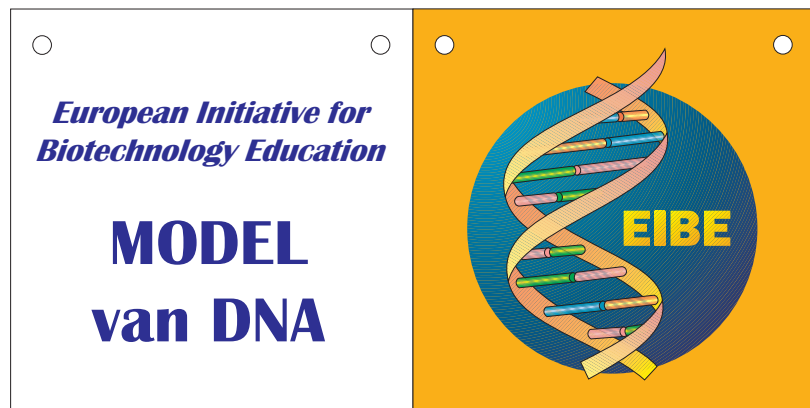
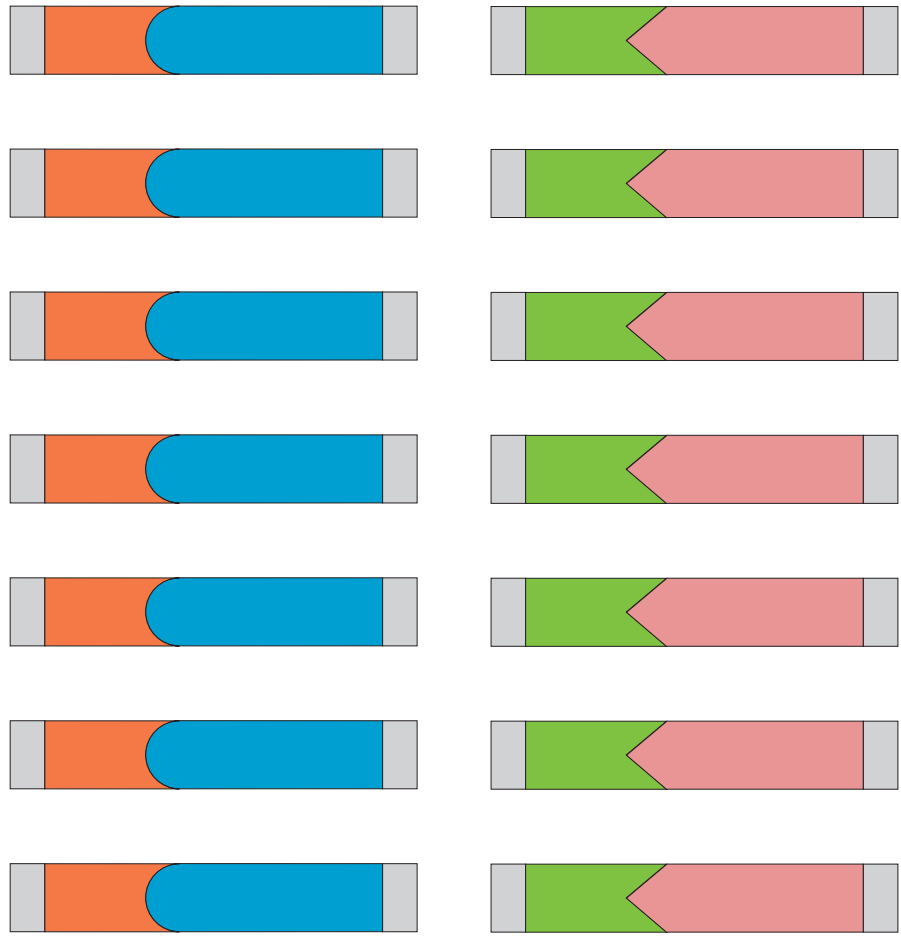


De structuur van DNA

Twee strengen van suiker- en fosfaatmoleculen vormen het 'geraamte' van het DNA. Daartussen zitten vier basen: thymine (T), cytosine (C), adenine (A) en guanine (G), twee aan twee verbonden door waterstofbruggen.



Baseparen



Bacteriofaag bouwplaat

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

Leerlingen vinden het nogal eens moeilijk zich een beeld te vormen van de orde van grootte van micro-organismen. Daarbij komt ook nog dat het moeilijk is een *driedimensionaal* beeld te krijgen op grond van een *tweedimensionaal* microscopisch beeld.

Het maken van modellen kan leerlingen helpen hier inzicht te krijgen; bovendien bevordert dit het zicht op de relatieve afmetingen van micro-organismen.

Deze activiteit zal meer resultaat boeken als de leerlingen de mogelijkheid krijgen om hun eigen modellen te ontwikkelen, dan wanneer ze een bepaald plan moeten volgen. Deze taak zal dan ook beter thuis kunnen worden uitgevoerd, waar een grotere verscheidenheid aan materiaal zal zijn, en vermoedelijk ook meer tijd.

Opmerking: Voor de beklagenswaardigen die menen dat het bouwen van modellen beneden hun waardigheid is, kan het nuttig zijn te wijzen op de lange, eerbiedwaardige geschiedenis van het modellen maken in de moleculaire biologie. Hoewel ook opgemerkt kan worden dat vandaag de dag mechanische modellen merendeels zijn vervangen door computermodellen

Doel

- Tonen van de meest essentiële onderdelen van de structuur van de lambda-bacteriofaag en van een aantal bacteriën.
- Inzicht verschaffen in de relatieve afmetingen van virussen en bacteriën.

Benodigde tijd

Het maken van het model van de bacteriofaag kost ongeveer 30 minuten. Eventueel inkleuren kost wat extra tijd. Het maken van bacterie-modellen kunnen wel een uur of meer kosten, afhankelijk van de aandacht die er aan besteed wordt.

Opmerking: Dit is een geschikte huiswerkopdracht.

Benodigheden

per leerling of groepje leerlingen

- Boeken met afbeeldingen van virussen en bacteriën
- Materiaal wat nuttig kan zijn bij het maken van modellen, zoals karton, gebruikt verpakkingsmateriaal, pingpongballen, touw, enz.
- Scharen
- Lijm, plakband of (kleine) nietmachine.
- Viltstiften in diverse kleuren.

Aanwijzingen voor de leerlingen

Virus, Bacteriofaag

Knip het model uit; knip en vouw dat tot een model van de lambda bacteriofaag.

Bacteriën

Gebruik het beschikbare materiaal om modellen te maken van verschillende bacteriën (coc en staaf).

Bij elk model:

1. Ga na welke de belangrijke onderdelen zijn en waar ze zich in de cel bevinden, zoals celmembranen en erfelijk materiaal.
2. Stel vast hoe groot het organisme is dat je model voorstelt.
3. Ga na op wat voor eenvoudige manier je de relatieve grootte van dit model aan een jongere leerling zou uitleggen, bijvoorbeeld: 'als echte bacteriën zo groot waren, dan zou jij zo groot als een huis zijn.'

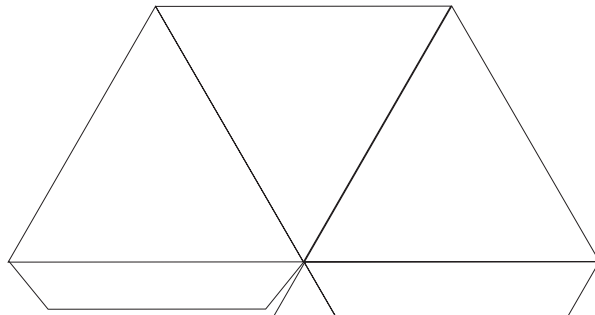
Uitbreiding

Leerlingen zouden modellen kunnen maken van planten- en/of dier-cellen. Deze kunnen dan gebruik maken om verschillen tussen prokaryoten en eukaryoten duidelijk te maken en om de endosymbiose theorie duidelijk te maken (met uitleg van de veronderstelde evolutionaire oorsprong van de eukaryoten).

Extra informatie

Het maken van modellen is (o.a.) beschreven in:

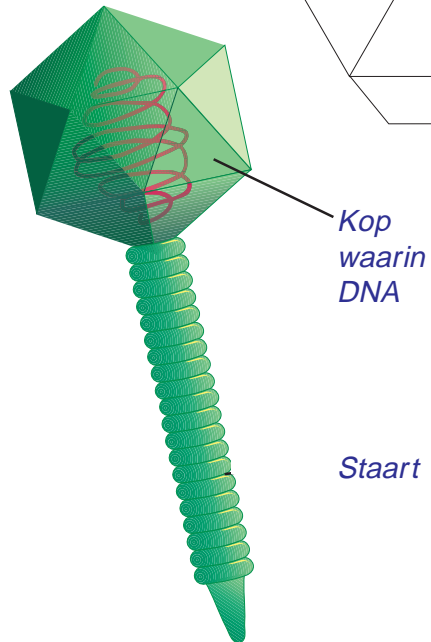
Nicholl, L. & Nicholl, D. (1987), Modelling the eukaryotic chromosome: a stepped approach. *Journal of Biological Education* 21 (2) 99-104.



Bouwplaat voor de kop van de bacteriofaag λ

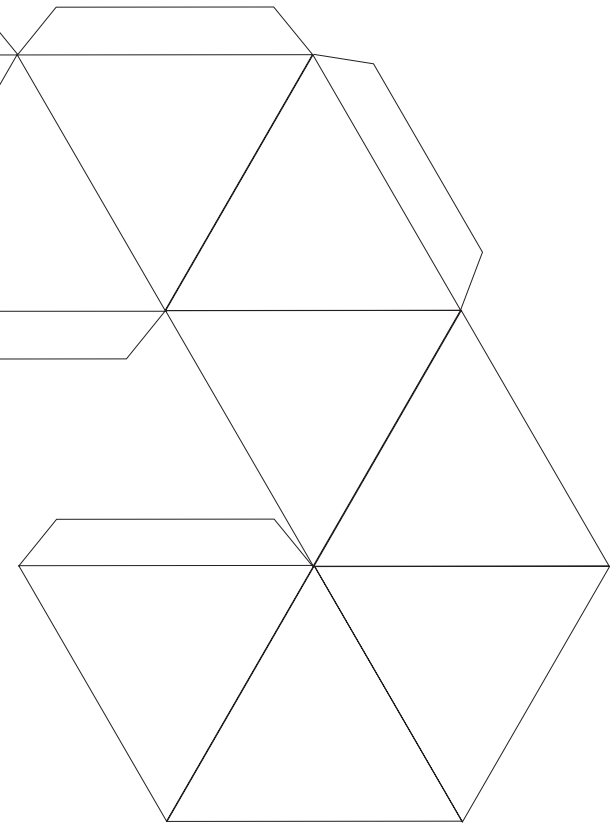
Fotokopieer dit op karton of op een sheet voor de overhead projector.

Knip uit langs de buitenkant. Vouw langs de lijnen. Plak dan de buitenste flappen vast met een goede, sneldrogende (papier)lijm.



De DNAstreng kan worden voorgesteld door een dikke draad.

Gebruik een limonaderietje voor de staart (het buigbare uitgetrokken stuk maakt het model heel realistisch).



DNA isolatie uit bacteriën

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

In dit voorschrift wordt lysozym (een enzym) gebruikt om bacteriecelwanden af te breken en een huishoudafwasmiddel om de membranen kapot te maken en zo de kernzuren (RNA en DNA) vrij te maken.

Doel

DNA (en RNA) isoleren uit de bacterie *Escherichia coli K-12*

Vorbereiding

Tenminste 4 dagen tevoren moeten bacteriecultures (op 'nutrient broth', ook wel bekend als Nährbouillon of voedingsbouillon dan wel basismedium, zie appendix 1) worden ingezet. (Alleen volgroeide cultures leveren behoorlijke hoeveelheden DNA op.) Minstens een etmaal tevoren ethanol in een vriesvak zetten.

Benodigde tijd

Het uitvoeren van deze activiteit kost ongeveer 50 minuten, inbegrepen een half uur waarin de bacteriën worden geïncubeerd met het enzym.

Benodigheden

Per leerling of groepje leerlingen

- Volgroeide cultuur *Escherichia coli K-12* (zie *Vorbereiding* hier boven)
- Lysozym poeder- een spatelpuntje is genoeg
- 6 ml ijskoude ethanol (mag gedenatureerde zijn)
- 0,5 ml huishoudafwasmiddel (de simpelste is de beste)
- Entoog
- 3 ml gedistilleerd water
- 2 reageerbuisen
- Pipetje om water en lysozym mengsel te pipetteren
- Waterbad 60 °C
- Incubator (broedstoof of waterbad) 37 °C

Werkwijze

- 1 Start een *Escherichia coli K-12* cultuur, tenminste 4 dagen voor u de DNA wilt isoleren.

- 2 Voeg een klein beetje lysozym toe aan 5 ml bacterie suspensie en meng goed.
- 3 Incubeer dit mengsel 30 minuten bij 37 °C.
- 4 Voeg 0,5 ml afwasmiddel toe aan de bacteriesuspensie
- 5 Incubeer dit mengsel 2 minuten bij 60 °C in een beker water.
- 6 Laat dit mengsel enkele minuten in koud water afkoelen.
- 7 Giet langzaam en voorzichtig een laag ijskoude ethanol op het oppervlak van het mengsel.
- 8 DNA en RNA slaan neer op de grens van beide lagen en trekken in de bovenste (ethanol)laag. Het is er dan uit te halen met behulp van een draaiende roerstaaf. Op grond van het uiterlijk staat het resultaat bekend als 'snotje'.

Uitbreiding

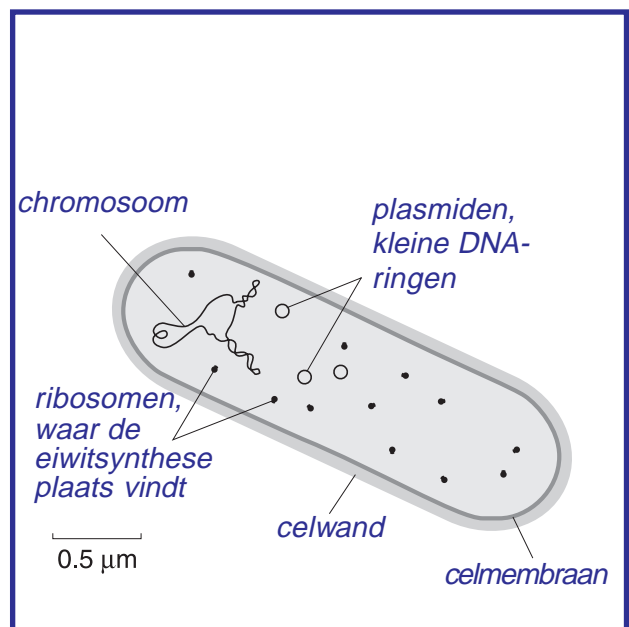
Kleur het DNA met bijvoorbeeld aceto-orceïne of methyleenblauw.

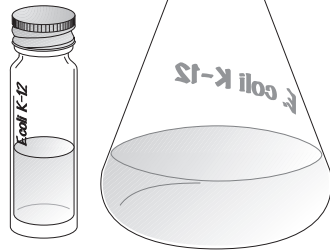
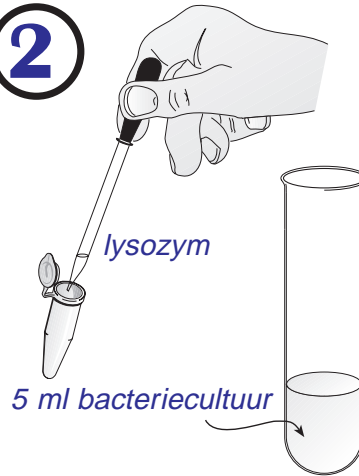
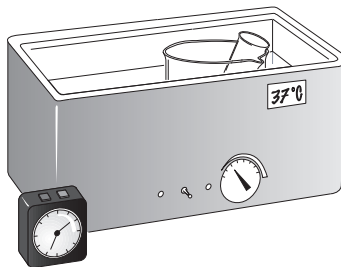
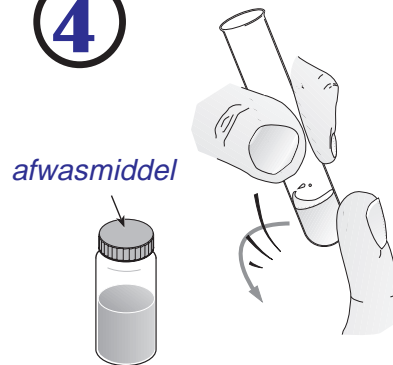
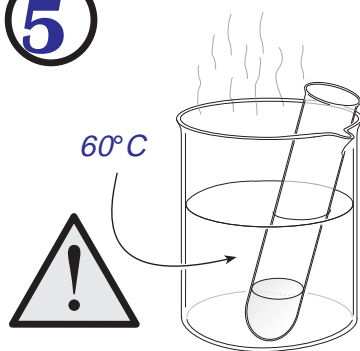
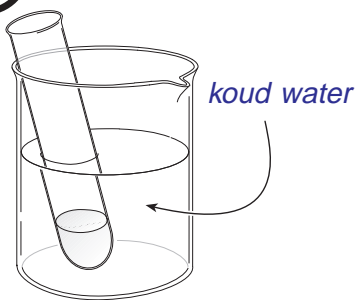
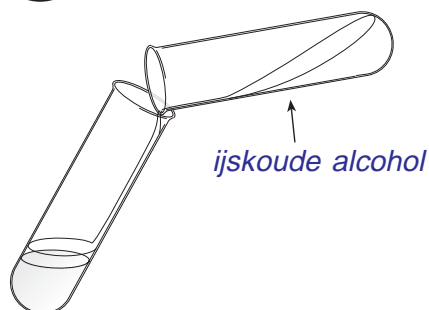
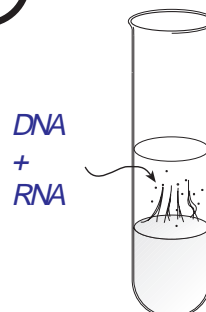
Veiligheid

Bij het omgaan met de bacteriecultures moeten de gebruikelijke microbiologische veiligheidsprocedures worden gevolgd. Wees ook voorzichtig bij gebruik van heet water (stap 5).

Herkomst

Dit voorschrift is gebaseerd op een procedure die is ontwikkeld door Hertel *et al.* en Süßmuth *et al.* (1987) die DNA uit *Bacillus subtilis* isoleerden. Dank is ook verschuldigd aan Prof. Joseph Lengeler (Osnabrück) voor zijn suggestie om huishoudafwasmiddel te gebruiken.



1**2****3****4****5****6****7****8**

1 Zet een *E. coli* K-12 cultuur in in basismedium (zie appendix 1).

2 Voeg een klein beetje lysozym toe aan 5 ml bacteriesuspensie en meng goed.

3 Incubeer dit mengsel 30 minuten bij 37°C.

4 Voeg 0,5 ml afwasmiddel toe aan de bacteriesuspensie

5 Incubeer dit mengsel 2 minuten bij 60°C (waterbad) in een bekersglas water.

6 Laat dit mengsel enkele minuten in koud water afkoelen.

7 Giet langzaam en voorzichtig een laag ijsskoude ethanol op het oppervlak van het mengsel.

8 de kernzuren (DNA en RNA) slaan neer op de grens van beide lagen en trekken in de bovenste (ethanol)laag.

Isolatie van DNA uit ui



Dit is een ruwe methode om DNA (en RNA) uit plantaardig weefsel te isoleren. Eerst wordt het weefsel mechanisch fijn gemaakt. Dan gebruiken we een huishoudafwasmiddel om de membranen om de cel en de kern af te breken. Door filtratie raken we brokstukken van de cellen kwijt en het DNA en oplosbare eiwitten blijven over. Die eiwitten worden dan met een enzym afgebroken en tenslotte laten we het DNA neerslaan in ijskoude ethanol.

Doel

DNA isoleren uit ui-weefsel.

Opmerking: De kernzuren die op deze manier verkregen worden zijn niet erg zuiver. Waar het hierbij echter om gaat is de hoofdlijnen te laten zien van het extraheren van DNA uit een weefsel.

Vorbereiding

De te gebruiken ethanol (mag gedenateerde zijn) moet echt ijskoud zijn. Zet daartoe een (plastic) fles ethanol *tenminste* 24 uur tevoren in een vriesvak.

Tijdsduur

Deze activiteit kost ongeveer 35 minuten inclusief een incubatietijd van 15 minuten.

Materiaal

Per leerling of groepje leerlingen

- Keukenmachine, 'blender', staafmixer of sapcentrifuge
- Groot, scherp mes en snijplank
- Grote plastic trechter
- Thermometer
- Waterbad 60 °C
- IJs, in een groot bekeerglas
- 2 bekeerglazen (250 ml)
- Koffiefilter (geen laboratorium filtreerpapier)
- Ui, ca 100 g
- 10 ml Wasmiddel (gebruik **niet** de dikke, geconcentreerde)
- 3 g keukenzout (NaCl)
- 100 ml gedistilleerd water
- Pipet of plastic spuit van 10 ml om hoeveelheden vloeistof af te meten
- Reageerbuis
- Glazen staaf
- 2 à 3 druppels protease (bijv. *Neutrase*)
- 6 ml ijskoude (gedenateerde) ethanol.

Werkwijze

- 1 Meng het zout met het wasmiddel. Vul aan met water tot 100 ml.
- 2 Hak de ui in kleine stukjes niet kleiner dan 10 mm x 10 mm.
- 3 Doe de stukjes ui in een beker en giet het wasmiddel-zout-mengsel er op.
- 4 Meng het geheel en zet het in een waterbad van 60 °C gedurende precies 15 minuten.
- 5 Koel het mengsel af door het bekeerglas gedurende 5 minuten in ijswater te zetten onder voortdurend roeren.
- 6 Giet het mengsel in een keukenmachine en draai 5 seconden (niet langer!) op hoog toerental.
- 7 Filtreer het mengsel in het andere bekeerglas. Pas goed op dat het schuim op het oppervlak het filtraat niet verontreinigt. Dit filtraat is het uienextract dat oplosbare eiwitten en DNA bevat.
- 8 Doe 4 druppels protease bij ca 10 ml uienextract in een reageerbuis. Meng goed.
- 9 Giet nu heel voorzichtig een laag ijskoude alcohol bovenop het extract-enzymmengsel door de alcohol langzaam in de schuin gehouden buis te gieten. Laat dit geheel 2 à 3 minuten staan zonder aan te raken.
- 10 Het DNA (en ook RNA) slaat neer op het grensvlak. Dit is als volgt beter zichtbaar te maken: Draai zachtjes met het glasstaafje op het scheidingsvlak. Probeer te voorkomen dat de lagen al te zeer verstoord worden of dat het fragiele DNA breekt. Er is een wit web van slijmerig DNA te zien die met een Pasteurse pipet uit de buis kan worden gehaald.

Uitbreiding

- Het DNA is te kleuren met bijv. karmijnazijnzuur, aceto-orceïne of methyleenblauw.
- Uit dierlijke weefsels (zoals kuit van vis, lever, kalfstymus) of micro-organismen kan op een dergelijke manier DNA worden gehaald. Een vijzel met stamper (met fijn zand) zijn dan geschikt als een wat elegantere methode dan de blender om het weefsel open te breken; er is dan minder kans dat het DNA kapot gaat.

Veiligheid

Dit voorschrift levert geen bijzondere gevaarlijke situaties op. Wel moet men natuurlijk zorgvuldig omgaan met het mes en de keukenmachine.

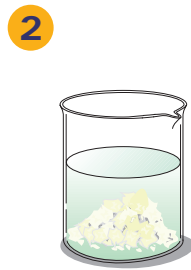
Herkomst

Deze methode is een bewerking van een voorschrift uit Alison Rasmussen en Robert Matheson (1990), *A Sourcebook of Biotechnology Activities*, National Association of Biology Teachers, North Carolina Biotechnology Center. ISBN: 0 941212 09 2. Dit boek is rechtstreeks verkrijgbaar bij: NABT, 11250 Roger Bacon Drive #19, Reston, Virginia 22090, USA.



1
10 ml afwasmiddel
3 gr keukenzout
100 ml water
1 ui (middelmaat)

Meng het zout met het wasmiddel. Vul aan met water tot 100 ml. Meng goed om het zout op te lossen.



2
Doe de stukjes ui in een beker en giet het wasmiddel-zout-mengsel er op.

Het afwasmiddel breekt de celmembranen af; daardoor komt het DNA vrij uit de kern die in elke cel zit.



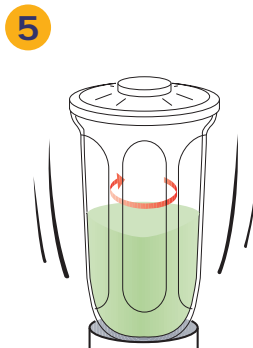
3
Zet het bekglas 15 minuten bij 60°C

*In de warmte gaan de processen sneller
 en wordt het DNase afgebroken dat anders het DNA zou afbreken*



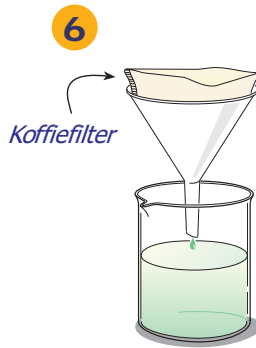
4
Koel het mengsel af door het bekglas gedurende 5 minuten in ijswater te zetten onder voortdurend roeren

..... maar dat moet ook weer niet te lang duren, anders gaat het DNA stuk ... daarom is een ijsbad nodig



5
Zet de machine 5 seconden aan; niet langer

NU worden de uicellen opengebroken. Maar als dit te lang doorgaat, gaat ook het DNA kapot



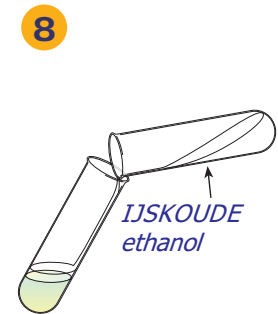
6
Filtreren

Hiermee scheiden we het celwandmateriaal van DNA en eiwitten die in oplossing zijn



7
Doe 2-3 druppels enzym bij ca 10 ml uienextract in een reageerbuis

De protease (er is maar heel weinig nodig) breekt het opgeloste eiwit af



8
Giet heel voorzichtig een gelijk volume aan ijsskoude ethanol bovenop het uienextract

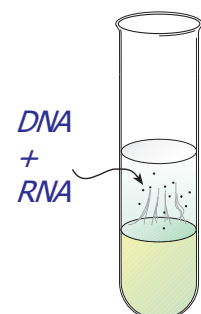
*De ethanol * MOET ijsskoud zijn; bewaar het een nacht tevoren in een vriesvak
 * mag gedenateerde zijn*

Isolatie van DNA uit uien

9

DNA wordt zichtbaar in de (bovenstaande) ethanollaag

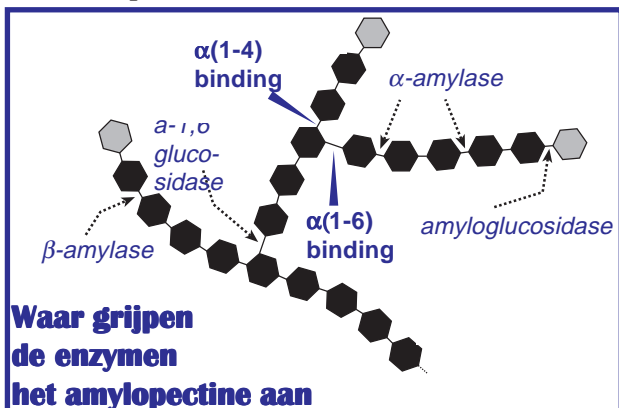
DNA lost niet op in de koude ethanol; het trekt uit de oplossing naar de bovenlaag



Amylase uit bodembacteriën



Zetmeel is een polymeer, dat bestaat uit glucosemoleculen die aan elkaar gekoppeld zijn. Het kan een polymeer in een rechte keten zijn, bijvoorbeeld amylose. Het kan ook een vertakte polymeer zijn: amylopectine. Deze polymeren kunnen worden afgebroken door extracellulaire polymerases. Die enzymen worden gemaakt door talloze organismen, waaronder bacteriën en schimmels. Veel microben zijn gescreend om na te gaan of ze geschikt zijn voor commerciële enzymproductie. In dit onderzoek worden bacteriën uit de grond gescreend op extracellulaire amylase productie.



De glucosemoleculen in amylose en amylopectine zijn aan elkaar gebonden door $\alpha(1-4)$ bindingen; de zijtakken in amylopectine zijn aan deze ketens gebonden door $\alpha(1-6)$ bindingen. De belangrijkste in de handel verkrijgbare amylases zijn:

α -amylase. Dit hydrolyseert $\alpha(1-4)$ bindingen in polymeren van glucose, maar alleen binnen ketens; dit leidt tot korte ketens (dextrinen). Op industriële schaal wordt het gewonnen uit bacteriën (o.a. *Bacillus* spp.)

β -amylase. Dit hydrolyseert $\alpha(1-4)$ bindingen in polymeren van glucose, zodanig dat aan het eind van een keten maltose wordt afgesplitst. Het kan $\alpha(1-6)$ bindingen niet passeren. In de industrie wordt het verkregen uit gerst en mout.

amyloglucosidase. Dit enzym breekt $\alpha(1-4)$ bindingen zodanig dat steeds glucose wordt afgesplitst van de einden van ketens. Het kan $\alpha(1-6)$ bindingen niet passeren. Industrieel wordt het verkregen uit de schimmels *Aspergillus* spp. en *Rhizopus oryzae*.

$\alpha(1-6)$ glucosidase. Dit hydrolyseert $\alpha(1-6)$ bindingen. Het wordt industrieel verkregen uit de bacteriën *Bacillus acidopullulyticus* en *Klebsiella pneumoniae*.

Doel

In de grond voorkomende bacteriën testen op de aanwezigheid van amylase productie.

Voorkennis

De leerlingen moeten op de hoogte zijn van elementaire microbiologische technieken, zoals steriel werken. Ook kennis van de zetmeel-jodium reactie wordt bekend verondersteld.

Vorbereiding.

Grondmonsters. Per leerling is 1 g grond nodig, gestoken van ca 10 cm diep. Het beste is het als de grondmonsters luchtdroog zijn.

Zetmeelvoedingsbodem. (Zie ook appendix 1) Ga uit van in de handel verkrijgbare 'Nutrient agar'. 'Nutrient Broth' (Nährbouillon of voedingsbouillon) kan ook, maar dan moet per liter extra 20 g agar worden toegevoegd. Volg de aanwijzingen die op de voorraadpot staan. Voeg per liter 2 g oplosbare zetmeel toe. Reken per leerling op 20 ml. In verband met het autoclaveren, afkoelen, steriel in de (steriele) Petrischalen schenken en verder afkoelen, moet dit ruim voor de les gedaan worden. Een snelkookpan is goed bruikbaar als autoclaaf.

Steriel water moet eveneens voor de les gesteriliseerd zijn. Reken per leerling op 15 ml.

Jodiumoplossing: Los 1 g jodiumkristallen en 3 g kaliumjodide op in 300 ml gedistilleerd water. Doe dit minstens een dag van tevoren; het oplossen van de jodiumkristallen kost tijd.

Steriele wattenstokjes. De plastic steeltjes van de in een winkel gekochte wattenstokjes smelten bij autoclaveren. Sommige typen kunnen worden behandeld met een antimicrobieel middel. U kunt voor deze proef uw eigen wattenstokjes maken door een plukje wattenprop de wikkelen op de punt van een cocktailprikker. Autoclaveer ze in een McCartney flesje of in losjes eromheen gewikkeld aluminiumfolie bij 121 °C gedurende 15 minuten.

Tijdsduur

Vorbereiding en beënden van de Petrischalen: 45 minuten.
Bekijken van de resultaten na 2-3 dagen: 15 minuten.

Benodigheden

Per student of groep studenten (aangenomen is dat gebruikelijk practicummateriaal beschikbaar is)

- 1 gram luchtdroge grond van 10 cm diep.
- Steriele Petrischaal waarin 15 à 20 ml steriele zetmeelvoedingsagar.
- 15 ml steriel water in een McCartney flesje.
- Jodiumoplossing.
- Een steriel wattenstokje.
- Markeerpen (om op Petrischaal te schrijven).

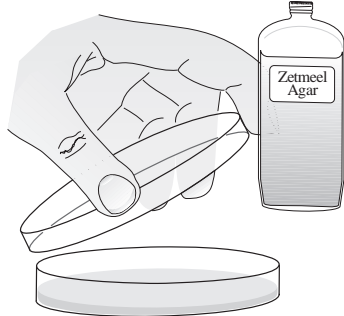
Werkwijze

- 1 Doe 1 gram droge grond in 15 ml steriel gedistilleerd water. Schud krachtig opdat de grond goed wordt verdeeld.
- 2 Doop het steriele wattenstokje in de zojuist gemaakte suspensie. Strijk dat vervolgens over de agar in de Petrischaal.
- 3 Zet een teken op de Petrischaal (bijv. de initialen) en de datum en waar het grondmonster vandaan kwam.
- 4 Zet de beënte plaat, op z'n kop, 2 à 3 dagen weg bij 30 °C.
- 5 Giet dan voorzichtig jodiumoplossing over de agar tot op het hele oppervlak een laagje van ca 1 mm staat. Waar nog zetmeel aanwezig is, wordt de agar blauwzwart (de jodiummoleculen kruipen in de spiraalvormige ketens van de zetmeelmoleculen). Er ontstaan lichtbruine gebieden (de kleur van jodium) langs de randen van kolonies als de bacteriën daar zetmeel hebben afgebroken.

Veiligheid

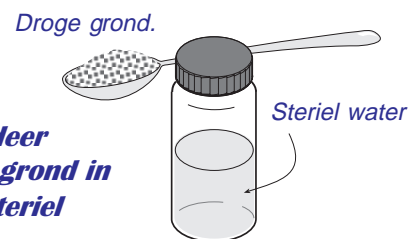
BELANGRIJK. Als het niet toegestaan is of niet wenselijk wordt geacht met onbekende organismen te werken kan een cultuur van *Bacillus subtilis* worden gebruikt in plaats van bodemorganismen. Bij de uitvoering van dit practicum en het opruimen van de platen moeten de gebruikelijke microbiologische veiligheidsvoorschriften in acht worden genomen, hoewel steriel werken niet echt nodig is tot op het moment van de beënting. Het is niet verstandig cultures te kweken vanuit de (niet bekende) organismen op deze platen. Jodium is vergiftig en moet met zorg behandeld worden.

①



Maak een Petrischaal met steriele zetmeelagar klaar.

②



Suspendeer 1 gram grond in 15 ml steriel water

③

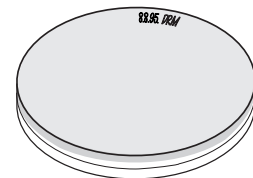


Veeg met een steriel wattenstokje grondsuspensie over de agar.

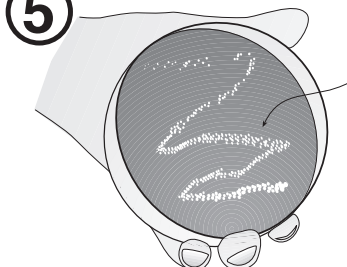
④

Laat de plaat 2 tot 3 dagen staan bij 30°C.

Zet de plaat op z'n kop



⑤



Geen zetmeel op de lichte plaatsen

Kleur de plaat met jodium om te kijken waar zetmeel is afgebroken.

Cellulase productie



Er is veel afval in de vorm van cellulose. Als men die zou kunnen omzetten in veevoer, zou goedkoop materiaal tot een waardevol product worden. De meeste cellulase in de handel is afkomstig van de schimmel *Trichoderma reesei* en wordt geproduceerd in fermentoren. In een Petrischaal groeit de bacterie *Cellulomonas* echter sneller. De productie van extracellulaire cellulase is daarin makkelijk meetbaar.

Doel

Een kwantitatieve meting van cellulaseproductie door *Cellulomonas*.

Vorbereiding

Cellulomonas kan worden aangehouden in basismedium (zie appendix 1). Ter voorbereiding moeten **Cellulomonascultures** in basismedium (bijv. in McCartneyflesjes) twee à drie dagen tevoren worden klaargemaakt. De cultures moeten worden geïncubeerd bij 25-30°C. Per leerling is 1 ml voldoende.

CMC medium bevat per 100 ml:
0,5 g carboxymethylcellulose (een oplosbare vorm van cellulose); 0,1 g NaNO₃; 0,1 g K₂HPO₄; 0,1 g KCl; 0,05 g MgSO₄; 0,05 g gistextract; 0,1 g glucose; alles per 100 ml water. Voeg tenslotte per 100 ml water 1,7 g agar toe. Per leerling is ca 15 ml medium nodig. Steriliseer het mengsel en giet steriel 15 ml in elke steriele Petrischaal.

Steriliseer voldoende 1 ml pipetten

Zorg voor voldoende **desinfectans** bijv. 5% chlooroplossing.

Tijdsduur

Vorbereiding en beënten van de Petrischalen: 45 minuten.
Bekijken van de resultaten na 2-3 dagen: 15 minuten.

Benodigdheden

Per student of groep studenten (aangenomen is dat gebruikelijk practicummateriaal eveneens beschikbaar is)

- Cultuur van *Cellulomonas* sp. (suspensie)
- Steriele Petrischaal, waarin 15 ml CMC medium (zie *Vorbereiding*).
- Steriel water (in McCartneyfles).
- 2 Steriele 1 ml pipetten.
- Afvalbeker waarin een 5% chlooroplossing.

- Congorood oplossing (1 mg per ml water)
- 1M NaCl oplossing (5,85 g per 100 ml)
- Ethanol (om de kurkboor te steriliseren)
- Kurkboor, diameter 5 mm
- Markeerpen (om op de Petrischaal te schrijven)
- Broedstoof, 25-30°C

Werkwijze

- 1 Doop de kurkboor in alcohol. Houd de boor dan in een vlam en laat de alcohol verbranden. LET OP! Houd die boor horizontaal; anders gaan de vlammen door de boor heen als door een schoorsteen en verbranden de handen.
- 2 Til de deksel van een CMC plaat iets op en maak met de boor een gat in de agar. Sluit de deksel. Haal de agarprop weg, zonodig met een entnaald.
- 3 Herhaal deze stap, zo ontstaan twee gaten in de agar.
- 4 Markeer elk gat aan de onderkant van de Petrischaal. Een geschikte code kan zijn: **C** (*Cellulomonas*) en **W** (steriel water, de blanco).
- 5 Pipetteer in het juiste gat 0,2 ml *of* van de *Cellulomonas* suspensie *of* steriel water, telkens met een andere, steriele pipet. Zet de pipetten na gebruik in de afvalbeker met desinfectans.
- 6 Zet de platen ongeveer een week bij 25 à 30°C. Na 48 uur bij 30°C maakt *Cellulomonas* heldere zones van zo'n 16 mm doorsnee.

Na de incubatie

- 7 Giet wat Congorood-oplossing over de plaat. Laat 15 minuten staan. Ontkleur dan met de zoutoplossing gedurende 10 à 15 minuten. Waar de kleur weer verdwenen is, is de CMC afgebroken tot b-(1-4) glucaan. Deze stof bevat zeven of minder glucose-eenheden. De diameter van de heldere zone levert een kwantitatieve maat voor de activiteit van cellulase.

Uitbreiding

- 1 Pipetteer een grondsuspensie (eventueel voorgekweekt, bijv. in vloeibare CMC) in de gaten in de platen om microbiële flora te screenen op cellulase-activiteit.
- 2 Deze techniek is ook geschikt om commerciële cellulase producten te onderzoeken.
- 3 Het verloop van de afbraak door cellulase is te volgen door meer platen te gebruiken.

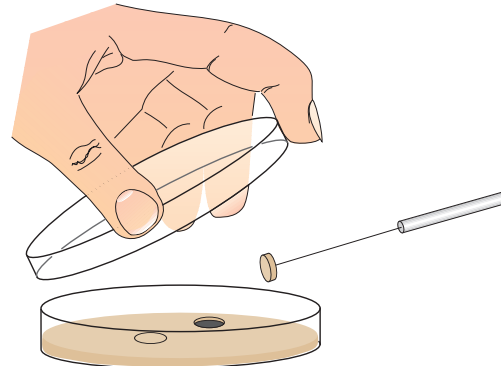
Cellulase

1. **Steriliseer een kurkboor door hem met alcohol te flamberen.**

PAS OP. Alcohol is brandbaar.

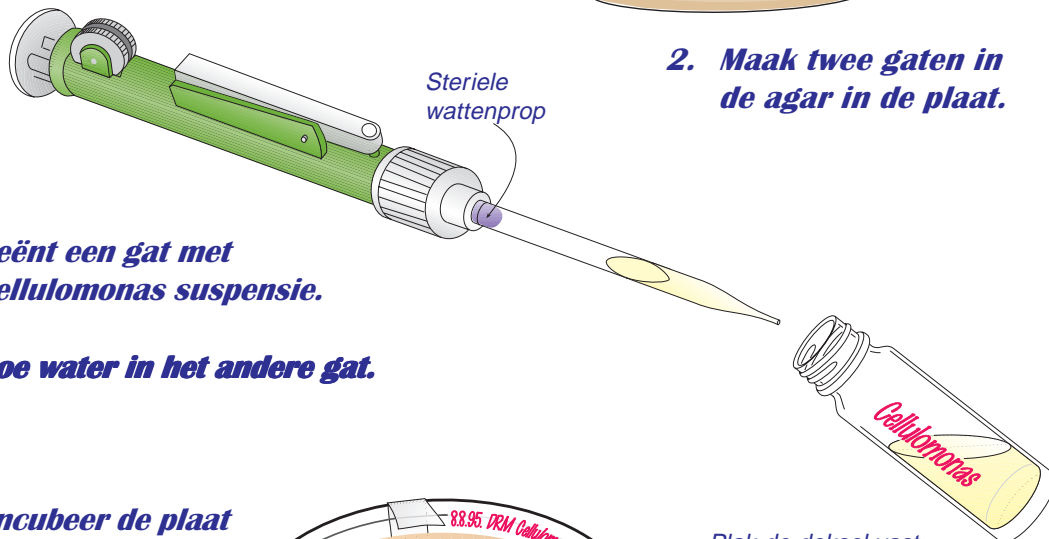


2. **Maak twee gaten in de agar in de plaat.**



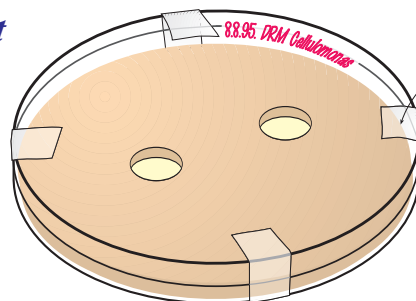
3. **Beënt een gat met Cellulomonas suspensie.**

Doe water in het andere gat.

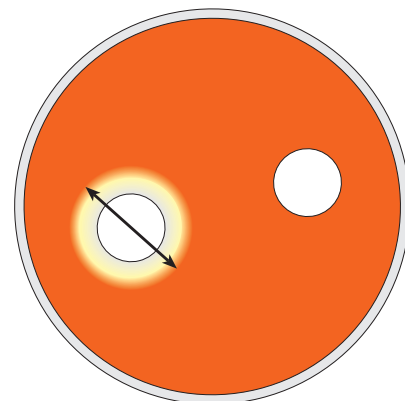


4. **Incubeer de plaat 48 uur bij 30°C**

Plak de deksel vast.



5. **Kleur de plaat**
Meet de diameter van het gebied
waar de cellulose is afgebroken.



Veiligheid

De gebruikelijke veiligheidsprocedures moeten in acht worden genomen.

Antibiotica



Veel micro-organismen maken antibiotica. Dat zijn stoffen die het groeien van concurrerende bacteriën verhinderen of ze zelfs kunnen doden. Vanaf de ontwikkeling van penicilline (gemaakt door de schimmel *Penicillium*) in de jaren 40 zijn deze stoffen met veel succes gebruikt bij de bestrijding van met name infectieziekten. Op het ogenblik zijn de belangrijkste antibiotica afkomstig van de bacterie *Streptomyces*.

Doel

De productie van het antibioticum streptomycine door *Streptomyces* en het effect ervan op enkele micro-organismen laten zien.

Voorkennis

Herkomst en werking van antibiotica; ontstaan en verspreiding van resistentie tegen antibiotica.

Voorbereiding

De te gebruiken cultures van *Streptomyces griseus* moeten in de groeifase zijn. Daartoe moeten ze 2 à 3 dagen worden gekweekt op Petrischalen met 15 à 20 ml basisagar.

Hieronder:

Een drie dagen oude cultuur van *Streptomyces griseus* (links, verticaal). De testorganismen zijn (van boven naar beneden):

***Candida utilis*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus mycoides*, *Escherichia coli*.**



Tevoren moet een cultuur worden gekweekt om deze platen te beënten. Dit doet men het beste als volgt. Neem een oogje *Streptomyces* van een schuine buis, suspendeer dit in 1 ml steriel basaal medium en pipetteer dit weer in een cultuurbuis met 5 ml steriel basismedium. Laat deze cultuur gedurende 24 uur bij 30 °C staan.

Beënt de Petrischalen met deze *Streptomyces* cultuur met één enkele verticale streep, zover mogelijk naar links; zorg dat de rechterkant steriel blijft.

Incubeer de platen gedurende 3 à 4 dagen bij 30 °C.

Zet bovendien overnachtcultures klaar van testorganismen. (Bijvoorbeeld *Bacillus mycoides*, *Candida utilis*, *Escherichia coli* K-12, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*).

Tijdsduur

Klaar maken media en cultuur: 60 min.

Incubatie van *Streptomyces* cultuur: Eerst 24 uur, daarna 72 - 96 uur.

Platen beënten: 20 min.

Incubatie 24-72 uur.

Benodigdheden

Per student of groepje studenten (aangenomen dat het gebruikelijke practicummateriaal beschikbaar is).

- Stoof van 30 °C
- Entoog
- Steriele Petrischaal met 15 à 20 ml basisagar, waarop geënt een streep *Streptomyces griseus* die 48-72 uur is voorgekweekt. (zie *Voorbereiding* hierboven)
- Een keuze uit de volgend testorganismen op schuine buizen:
 - *Candida utilis* (gist)
 - *Micrococcus luteus* (bacterie)
 - *Pseudomonas fluorescens* (bacterie)
 - *Bacillus mycoides* (bacterie)
 - *Escherichia coli* K-12 (bacterie)

Werkwijze

1. Beënt elke voorgekweekte *Streptomyces* plaat met de testorganismen als volgt:
 - a) Maak een entoog steriel door hem uit te gloeien in een brandende vlam (bunsenbrander); laat hem kort afkoelen.
 - b) Krab met deze steriele entoog wat af van een schuine buis van een testorganisme. Maak dan een horizontale streep op het open stuk van de plaat (rechts van de *Streptomyces*). Deze streep moet haaks staan op de *Streptomyces*streep en er zo dicht mogelijk bij beginnen.
PAS OP! Raak de *Streptomyces*streep zelf NIET met het oogje.
 - c) Maak de entoog weer steriel door hem weer uit te gloeien.
Herhaal a), b) en c) voor elk van de beschikbare testorganismen.
2. Zet de platen 2 dagen bij 30 °C.
3. Bekijk de platen.

Veiligheid

Dit werk moet in een practicumlokaal worden uitgevoerd. Men dient zich te houden aan de normale microbiologische veiligheidsvoorschriften bij het uitvoeren van dit practicum en bij het verwijderen van de gebruikte cultures. De hoeveelheid antibioticum die tijdens deze activiteit wordt geproduceerd levert geen gevaar op.

Uitleg

Streptomyces griseus produceert het antibioticum streptomycine. Dit diffundeert in het medium. Streptomycine en daarop gelijkende antibiotica storen de eiwitsynthese door een binding aan te gaan met het 30S-deel van bacterie-ribosomen. Sommige micro-organismen (*Bacillus mycoides*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*) zijn daar gevoelig voor, andere (*Pseudomonas fluorescens*) niet. Gisten (*Candida utilis*) zijn niet gevoelig voor streptomycine omdat dat eukaryoten zijn; die hebben een andere ribosoomstructuur.

Antibiotica

1 *Eén enkele streep links*

Maak 3-4 dagen tevoren een Petrischaal met *Streptomyces griseus* klaar.

2 *Testorganismen op schuine buizen*

Maak een entoog steriel

3 *Raak niet aan de Streptomyces*

Strijk een van de testorganismen uit op de *Streptomyces*plaat.

4

Doe dit ook met de andere testorganismen. Vergeet niet tussen twee uitstrijkjes de entoog te steriliseren.

5 *Plak de plaat dicht met plakband*

Merk de plaat

Zet de plaat 2-3 dagen bij 30 °C op de kop.

Brooddeeg maken



Brood bakken is een van de oudste vormen van biotechnologie. De vroegst bekende vermeldingen ervan dateren uit het oude Egypte, zo'n 4000 jaar voor Christus. Gewoonlijk maken we brood uit een deeg dat, behalve gist, tarwemeel, water en zout en eventueel wat vet bevat. Dit vormt samen een netwerk waarin de gist gevangen zit. In het meel zitten amylases, die zetmeel kunnen omzetten in suikers. En die suikers zijn weer voedingsmiddel voor de gist. De gistcellen hebben ook een stikstofbron nodig. Die komt van peptiden en aminozuren die ontstaan door gedeeltelijke hydrolyse van gluten (meeleiwit). De stofwisseling van de gist leidt tot de ontwikkeling van alcohol en kooldioxide. Gluten zorgt voor elasticiteit en plasticiteit van het deeg. Daardoor komt het dat de kooldioxide, een gas immers, gevangen blijft, grote bellen in het deeg maakt en zodoende zorgt dat het deeg rijst. Het zal duidelijk zijn dat eiwitrijk meel (het duurste meel) de meeste kans op succes geeft. De bakker gebruikt dit type meel voor krentenbrood; dit zou anders door alle andere ingrediënten slecht rijzen.

Doel

Dit is een globaal recept, bruikbaar om te onderzoeken welk effect diverse ingrediënten hebben.

Tijdsduur

Uitvoering: 1 lesuur, eventueel meer, afhankelijk van de gekozen uitbreidingen.

Materiaal

Basisrecept per portie deeg

- 1 g gedroogde gist
- 75 g (eiwitrijk) tarwemeel
- 50 ml water
- extra ingrediënten als ascorbinezuur, α -amylase, KBr.
- Kleine bekerglazen om deeg in te mengen

- Stevige spatels of lepels om in het deeg te roeren.
- 2 maatcilinders (100 ml)
- Klok

Opmerking: 75 g meel is ca. 125 ml volume, 1 portie deeg is ongeveer 175 ml.

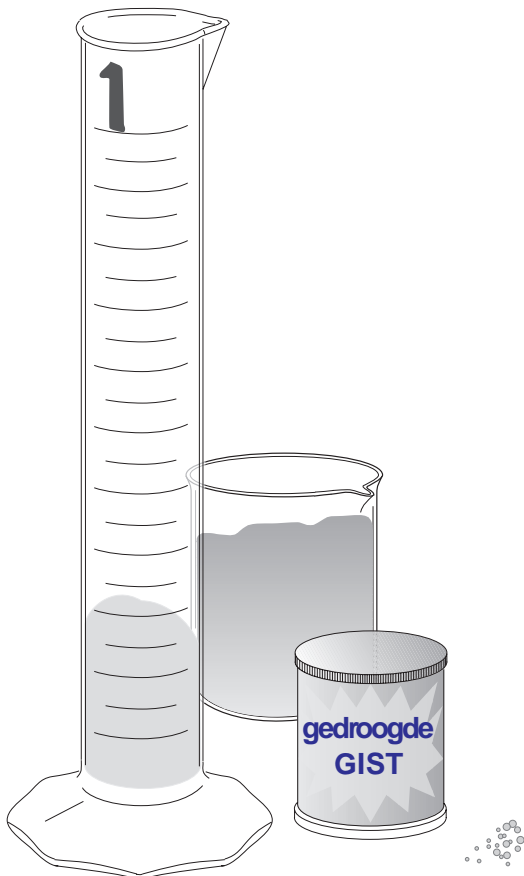
Werkwijze

1. Meng de gist met het water. Meng dan deze suspensie goed met het meel.
2. Rol het deeg tot een rol. Neem hiervan een stuk dat in een derde tot de helft van de maatcilinder past. Zet de rol in een van de maatcilinders.
3. Noteer de hoogte van elke rol deeg in de maatcilinders aan het begin van de proef en vervolgens om de 10 minuten gedurende een lesuur.

Uitbreidingen

1. Hebben verschillende typen gedroogde gist invloed op de rijssnelheid?
2. Hebben verschillende soorten meel effect? (bloem, volkorenmeel, rog-gemeel enz. Volkorenmeel is rijk aan amylase; sommige meelsoorten bevatten weinig amylase maar veel gluten.)
3. Wat is het effect van de broodverbeteraar ascorbinezuur (vitamine C) op de rijssnelheid? (Voeg per boven aangegeven portie deeg 1 g toe.)
4. Wat is het effect van α -amylase? Als er verschil is, hoe is dat te verklaren?
5. Kaliumbromide is ook een bekende broodverbeteraar. Het bevordert de vorming van sulfhydryl-bindingen tussen naast elkaar liggende eiwitten wat een elastischer, luchtiger deeg geeft. Maar teveel luchtigheid verzwakt het deeg weer. Wat heeft het voor effect?

6. Zout belemmert de activiteit van proteases. En daarmee stoort het de structuur van gluten waardoor weer het kooldioxide weer moeilijker wordt vastgehouden. Zout maakt gluten minder rekbaar doordat dan sterke ionbindingen ontstaan en dat leidt tot een stug deeg. Overmaat aan zout verstoort ook de groei van gistcellen. Probeer vast te stellen wat de optimale zoutconcentratie van het deeg is.



BASISRECEPT VOOR BROODDEEG

1. *Neem 1 g gedroogde gist op in 50 ml water.*
2. *Laat de gist water opnemen; voeg dan 75 g meel toe.*
3. *Meng goed.*

1. *Doe wat deeg in een maatcilinder.*
2. *Noteer het volume om de 10 minuten.*

Vragen

Gaat het uitzetten van het deeg wel gelijk op met de groei of de stofwisseling van de gist? Hoe is je idee hierover te testen?

Welke andere omstandigheden (behalve de activiteit van de gistcellen) zouden invloed kunnen hebben op het volume van het deeg?

Geïmmobiliseerde gistcellen

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

De gewone bakkersgist, *Saccharomyces cerevisiae*, kan melksuiker (lactose), niet verwerken. Het enzym β -galactosidase breekt lactose af tot glucose en galactose. Gist die samen met dit enzym is geïmmobiliseerd kan wel groeien in een medium met lactose. Van de beide suikers die ontstaan door de enzymwerking wordt glucose het gemakkelijkst opgenomen. Als nu de glucose is verbruikt stelt de gist zijn stofwisseling bij en gaat de galactose opnemen en vergisten. De activiteit van de gist is gemakkelijk te zien aan de hoeveelheid gas (koolstofdioxide) die bij de stofwisseling vrij komt.

Doel

Een inleiding geven op het kwantitatief bestuderen van fermentatie.

Vorbereiding

Natriumalginaat is slecht oplosbaar in water. Om het op te lossen moet het water warm zijn en ook moet u flink roeren. Daarom moet natriumalginaat van te voren klaargemaakt worden. Als u de oplossing wilt bewaren kan dat tot zeker een half jaar in de koelkast; anders is het verstandig de oplossing te autoclavieren.

Belangrijk: gebruik gedistilleerd of gedeïoniseerd water omdat calciumionen in kraanwater storen.

Benodigdheden

Per leerling of groepje leerlingen.

- 4% natriumalginatoplossing, 10-15 ml
- 1,5% calciumchlorideoplossing, 100 ml
- 10 ml wegwerpspuit zonder naald
- theezeefje
- 2 bekeerglazen van 200 ml
- 2 erlenmeyers van 250 ml
- 2 doorboorde stoppen met glasbuis en slangetjes voor op de erlenmeyers
- 2 grote bekers van ca 500 ml
- 2 maatcilinders van 100 ml
- desinfectiemiddel, b.v. natriummetabisulfit of een

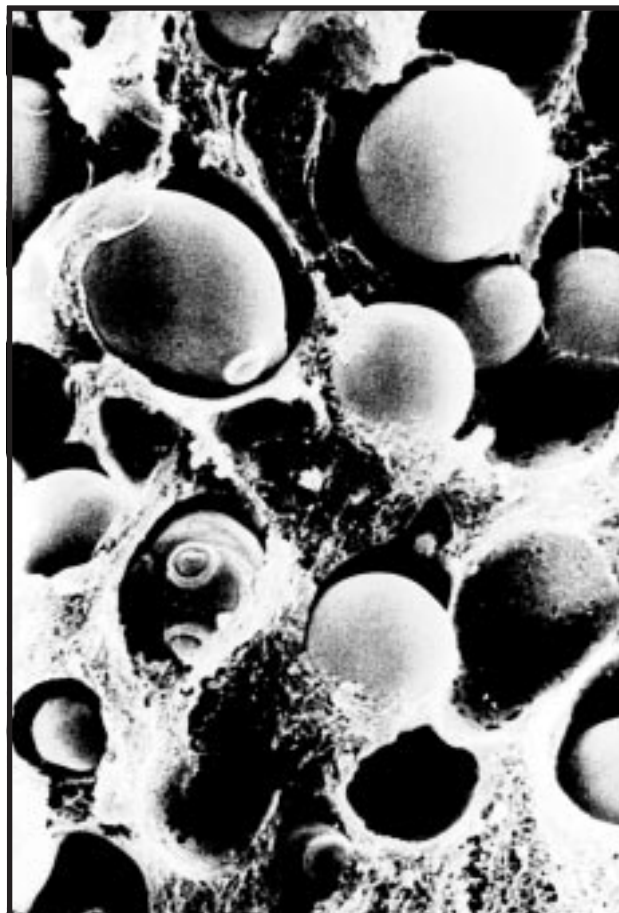


Foto: Dr Duncan Casson

Gistcellen geïmmobiliseerd in een matrix van calciumalginat

handelsprodukt als Milton (natrium hypochloriet oplossing, Procter & Gamble) of Stafilex chloortabletten (natrium dichloorisocyaanaat, Hospidex)

- 13% NaCl oplossing, ca 1 l. (gewoon keukenzout is geschikt)
- 100 ml medium waarin 2 g glucose, 1 g gistextract en 1 g pepton.
- 100 ml medium waarin 2 g lactose, 1 g gistextract en 1 g pepton.
- 2 ml β -galactosidase.
- verse of gedroogde bakkersgist.

Werkwijze.

Maak de bolletjes van geïmmobiliseerd enzym en gist als volgt:

- 1 Meng de gist met 25 ml gedistilleerd water in een klein bekeerglas. Dek het af en laat het 10 minuten staan.
- 2 Meng de natriumalginatoplossing met de β -galactosidase in het andere kleine bekeerglas. Roer daar 10 ml van de gistsuspensie door.
- 3 Zuig wat van het mengsel van alginat, gist en enzym op in de spuit en voeg dit mengsel druppel voor druppel toe aan de

calciumchlorideoplossing in een van de grote bekgelazen.

- 4 Laat de nu ontstane bolletjes een minuut of 10 uitharden.
- 5 Zeef de bolletjes uit de vloeistof met het theezeefje. Spoel ze met kraanwater.

De bolletjes kunnen zo nodig een dag of drie in een koelkast in steriel water bewaard worden.

Maak de fermentatievaten als volgt gereed:

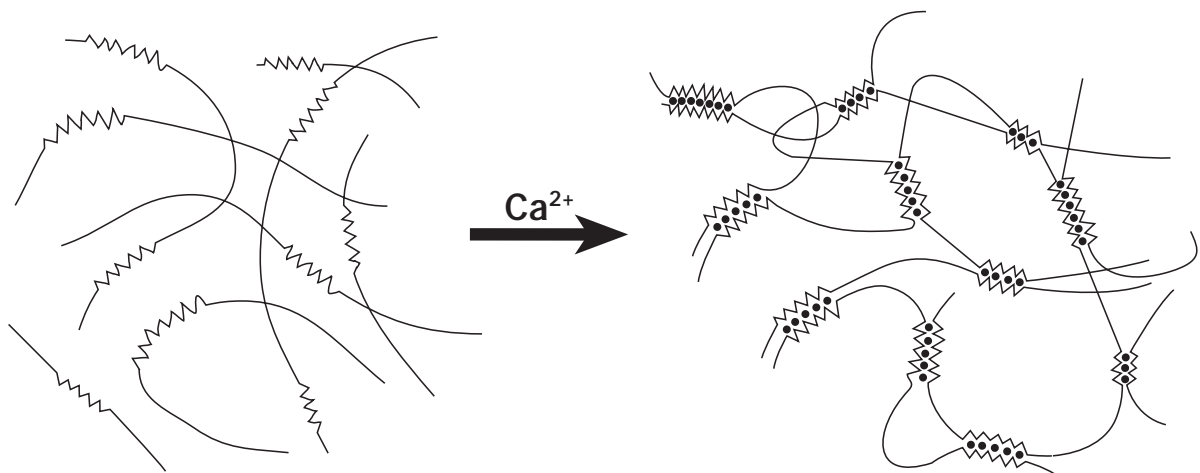
- 1 Steriliseer de erlenmeyers met het bisulfiet o.i.d.. Spoel daarna goed met water.
- 2 Doe de steriele media in de erlenmeyers, in de ene het glucosemedium (de blanco) en in de andere het lactosemedium.
- 3 Doe in beide vaten evenveel (of een gelijke massa) bolletjes.
- 4 Doe de stoppen (met buisjes en slangen) op de erlenmeyers. (zie figuur)
- 5 Zet ze weg bij 21-25 °C. Verzamel het gevormde gas boven een 13% NaCl-oplossing (kooldioxide lost hier niet in op). Meet de hoeveelheid gas op verschillende tijden (zie figuur).
- 6 Zet de resultaten in een grafiek (het gasvolume tegen de tijd).

Uitbreiding

Gebruik verschillende soorten gist (ze zijn o.a. verkrijgbaar bij winkels die gespecialiseerd zijn in thuisbrouwerij). Varieer de concentratie van β -galactosidase, incubatietemperatuur of andere variabelen.

Veiligheid

Als veel gas vrij komt in een fles, kan dat gevaarlijke situaties opleveren; er ontstaat druk en niet alle flessen kunnen daar tegen. Zorg er daarom voor dat eventuele overdruk kan ontwijken. Let bij het gebruiken van chemische sterilisatiemiddelen op aanwijzingen van de fabrikant.

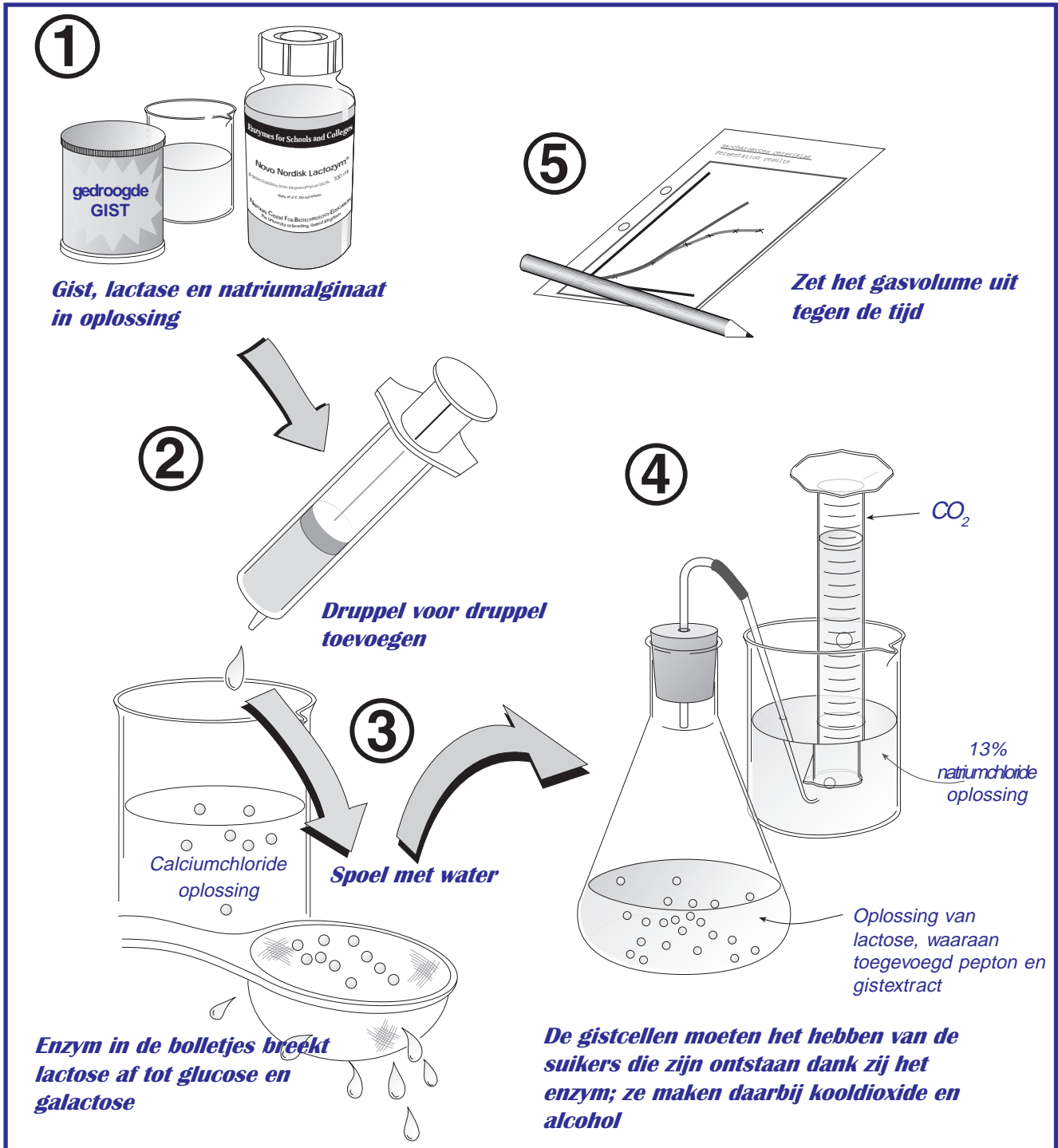


Vastzetten in calciumalginat is een zeer algemeen gebruikte techniek om cellen te immobiliseren. Het is heel geschikt voor levende cellen omdat die niet gauw beschadigd worden door deze behandeling. Toepassingen van deze techniek zijn onder andere de immobilisatie van levende of dode cellen in bioreactors, het vasthouden van plantenprotoplasten en van plantenembryo's ('kunstmatig zaad' of 'artificial seed') voor het opkweken, immobilisatie van hybridomacellen voor het bereiden van monoclonale antilichamen en het invangen van enzymen en andere stoffen (zie de tabel verderop).

De cellen of stoffen die moeten worden geïmmo-

biliseerd worden eerst gemengd met een oplossing van natriumalginat. Dit mengsel laat men dan druppelen in een oplossing met multivalente kationen, meestal Ca^{2+} . De druppels worden vanzelf bolletjes als ze in de oplossing komen, waarbij de in het alginat opgeloste cellen en/of enzymen terecht komen in een driedimensionaal netwerk van door ionen verbonden alginatstrengen. (zie het schema hierboven).

Meer informatie is te vinden in Smidsrød, O en Skjåk-Bræk, G. (1990), Alginate as an immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology* 8(3), 71-78.



Voorbeelden van gebruik van met algiinaat geïmmobiliseerde cellen (naar Smidsrød, O. en Skjåk-Bræk, G. 1990)

Cellen	Product/doel	Cellen	Product/doel
Bacteriën		Plantencellen	
Erwinia rhapontice	Isomaltulose	Chatharanthus roseus	Alkaloïden voor kankertherapie
Pseudomonas denitrificans	Drinkwaterzuivering	Diverse planten	Plantenembryos
Zymomonas mobilis	Ethanol	Protoplasten	Celbehandeling, microscopie
Blauwgroene Algen		Dierlijke cellen	
Anabena sp.	Ammonia	Hybridomacellen	Monoclonale antilichamen
Gisten, schimmels		Eilandjes van Langerhans	Insuline/Implantatie
Kluyveromyces fragilis	Lactose-splitsing	Fibroblasten, lymfoomcellen	Interferons (α en β)
Saccharomyces cerevisiae	Ethanol		
Saccharomyces bayanus	Champagne		
Algen			
Botryococcus braunii	Koolwaterstoffen		

Brandstofcel op gist



Eencelligen (bacteriën, protozoën) die elektriciteit produceren waren lange tijd een biologisch curiosum. Tegenwoordig zien onderzoekers mogelijkheden om ze te gebruiken in horloges en camera's, als energiebron in de Derde Wereld en als bioreactoren om afval uit de industrie om te zetten in elektriciteit. De brandstofcel die hier staat beschreven genereert een klein stroompje door elektronen af te tappen van de elektronentransportketen van gist. Daarmee is dit instrument geschikt om ademhaling te bestuderen op een geheel nieuwe en stimulerende manier. Meer informatie hierover is te vinden in *BIOtechnology Education* 1(4) pag. 163-168 (1989).

Doel

- Een stimulerende inleiding te geven bij het bestuderen van ademhaling.
- Gelegenheid te geven enkele factoren die gistademhaling beïnvloeden te onderzoeken.

Vorbereidingen

De verschillende oplossingen moeten vooraf klaar gemaakt worden. Laat de kation-uitwisselmembraan 24 uur van te voren weken in gedistilleerd water. Gedroogde gist kan tijdens het monteren van de cel in wat buffer worden opgenomen.

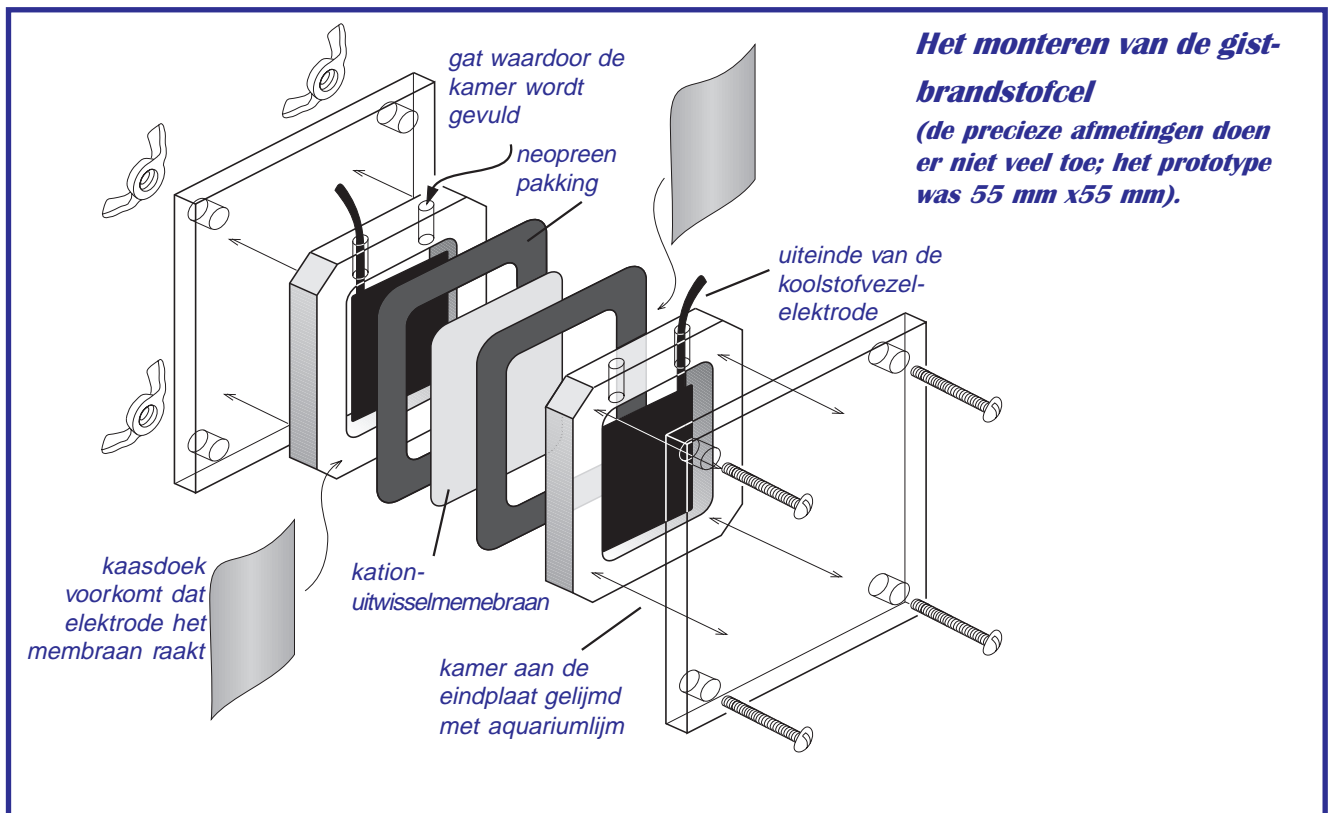
Tijdsduur

Montage (tot en met het genereren van elektriciteit) kost ongeveer 30 minuten.

Benodigheden

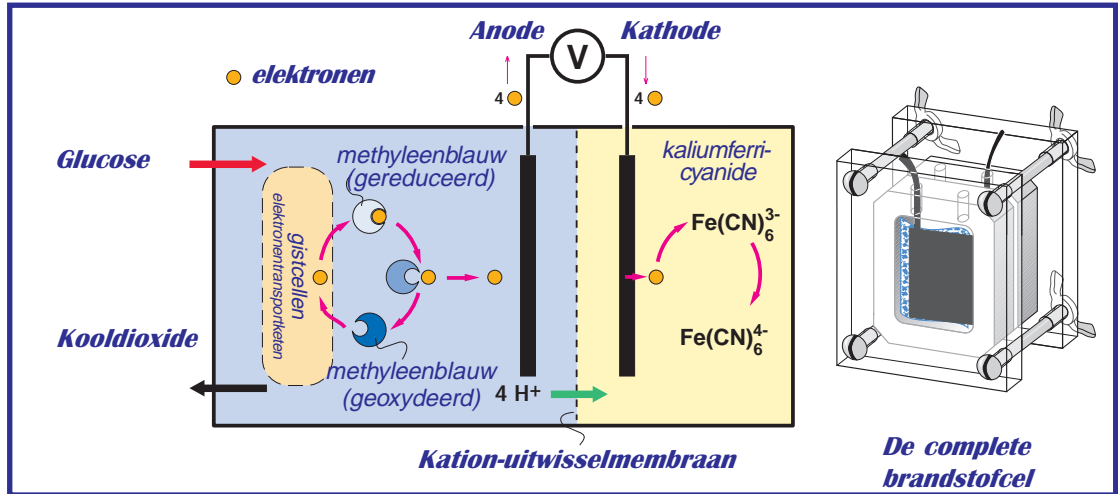
per leerling of groepje leerlingen

- Brandstofcel, gemaakt van 4 mm Perspex.
- 2 neopreen pakkingen.
- kation-uitwisselmembraan, op maat geknipt en passend tussen de kamers van de cel. Deze membraan kan hergebruikt worden, maar smelt bij autoclaveren.
- 2 koolstofvezel-elektroden.
- 2 stukken kaasdoek, of (stevige) tissue passend in de cel.
- 2 plastic injectiespuiten (10 ml), om vloeistoffen in de cel te injecteren.
- 1 Petrischaal om de cel in te zetten.
- 2 elektrische draden met krokodillebekken.
- 0-5 V voltmeter of motortje.
- Schaar.



Het monteren van de gist-brandstofcel
(de precieze afmetingen doen er niet veel toe; het prototype was 55 mm x 55 mm).

De werking



Alle oplossingen moeten gemaakt worden in 0,1 M fosfaatbuffer, pH 7,0, niet in water.

- Gedroogde gist, een dikke suspensie in 0,1 M fosfaatbuffer (geen glucose toevoegen voordat de gist goed actief geworden is in de buffer.)
- 5 ml 10 mM methyleenblauwoplossing.
- 5 ml 1 M glucose oplossing.
- 10 ml 0,02 M K₃Fe(CN)₆, kaliumferri-cyanide (rood bloedloogzout) oplossing.

Maken van 0,1 M fosfaatbuffer, pH 7,0:

Los 4,08 g Na₂HPO₄ en 3,29 g NaH₂PO₄ op in 500 ml gedistilleerd water.

Werkwijze

- 1 Knip twee koolstofvezel-elektroden, zoals is aangegeven op het schema.
- 2 Knip twee stukken kaasdoek, zodanig dat ze in de brandstofcel passen.
- 3 Zet de cel in elkaar zoals is aangegeven in bijgaand schema.
- 4 Zet de cel in een Petrischaal zodat bij eventuele lekkage het vocht in die schaal komt.
- 5 Meng de gistssuspensie, de glucose- en de methyleenblauwoplossingen. Injecteer dit mengsel in een van de kamers van de cel.
- 6 Injecteer de oplossing van bloedloogzout in de andere kamer van de cel.
- 7 Verbind de voltmeter, multimeter of motor via de krokodillebekken aan de elektroden. Brandstofcellen van dit type genereren 0,4 à 0,6 V. Er moet meteen stroom zijn. *Controleer de draden en de verbindingen als de meter 0 aanwijst of de motor niet draait. Let er goed op dat de elektroden niet in aanraking komen met de kation-uitwisselmembraan.*

Uitbreiding

- 1 Er kunnen meer cellen gekoppeld worden; dit levert een hogere spanning. Vergroten van de cel (of het oppervlak van de elektrode) leidt tot een sterkere stroom, maar niet tot een hogere voltage.
- 2 Er kunnen verschillende typen gist worden gebruikt. Uit veiligheidsoverwegingen is het gebruik van andere micro-organismen af te raden.
- 3 Onderzoek de invloed van temperatuur. Bedenk wel welke blanco's nodig zijn om vergelijkingen te maken.

Veiligheid

K₃Fe(CN)₆ (afvalcategorie 2) is giftig. Werk in een zuurkast en gebruik een veiligheidsbril.



Als de oplossing in contact komt met de ogen, spoel dan met veel water en raadpleeg een arts. Als het wordt ingeslikt, geef dan zeer veel water te drinken en raadpleeg een arts. Zorg voor een zorgvuldige verwerking van stoffen en materialen die met deze stof in contact zijn geweest.

Dank

Deze gist-brandstofcel is ontwikkeld door Dr. Peter Benetto van King's College, Londen.

Alledaagse genoverdracht door conjugatie van bacteriën



Bacteriën wisselen in de natuur op verschillende manieren genen uit. Deze mechanismen maken het voor organismen mogelijk zich aan snel veranderende omgevingsfactoren aan te passen. De meest mobiele genen bevinden zich in het algemeen op plasmiden.

Plasmiden zijn DNA-ringen. Deze DNA-ringen vermenigvuldigen zich onafhankelijk van het bacteriële genoom. Plasmiden bevatten een paar genen voor eigenschappen die gunstig zijn voor de gastheer, zoals het kunnen afbreken van schadelijke stoffen in de omgeving, zoals zware metalen of antibiotica.

We onderscheiden drie typen van natuurlijke genoverdracht:

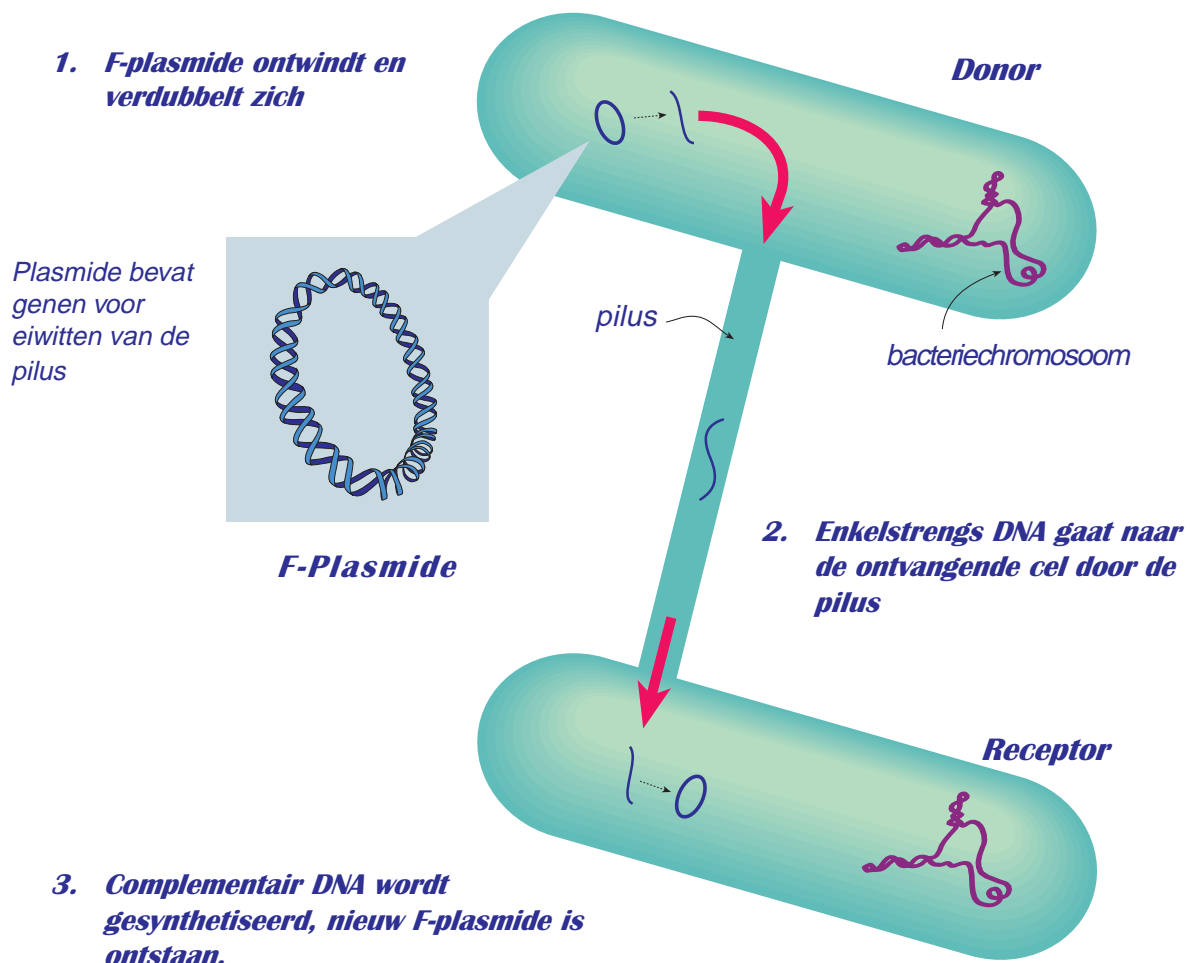
Transformatie is het opnemen van “naakt” DNA uit de directe omgeving van de cel;

Transductie is de verplaatsing van DNA van de ene cel naar de andere met behulp van een bacteriofaag;

Conjugatie is de overdracht van gespecialiseerde ‘F-plasmiden’ door een nauw buisje (pilus) dat twee bacteriecellen verbindt (zie Figuur 1).

Al deze mechanismen (en met name de transformatie) worden in het laboratorium gebruikt om geselecteerde genen in bacteriën te brengen.

Figuur 1. Conjugatie en overdracht van F-plasmiden tussen bacteriecellen



In het volgende experiment wordt de conjugatie tussen twee in de natuur voorkomende bacteriestammen bestudeerd.

Let wel: Deze proef wordt met gewone bacteriën en plasmiden, door middel van in de natuur voorkomende mechanismen uitgevoerd en is dus geen genetische modificatie.

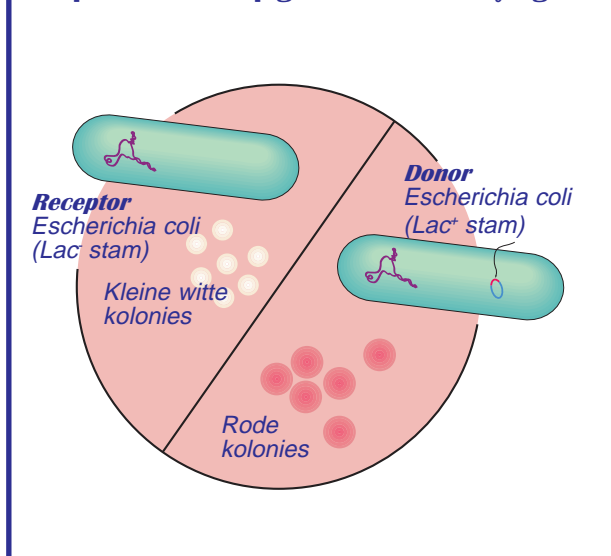
F-plasmiden

De zogenaamde F-plasmiden (F van fertiliteit = vruchtbaarheid) bevatten genen die het mogelijk maken om een kopie van het plasmide van een donorbacterie naar een ontvangende bacterie te brengen.

F-plasmiden kunnen ook nog andere genen bevatten. In het hier beschreven onderzoek bevat de donorstam een plasmide genaamd F *Lac*⁺. Dit plasmide heet zo omdat het genen bevat die de bacterie-gastheer in staat stelt lactose af te breken. De bacteriestam wordt een *Lac*⁺ stam genoemd. De ontvangende (receptor)stam daarentegen heeft geen plasmide, is niet in staat lactose om te zetten en is daarom een *Lac*⁻ stam. Op platen met MacConkey agar zien deze stammen er verschillend uit; de donorstam vormt rode kolonies en de receptorstam vormt witte kolonies (zie Figuur 2).

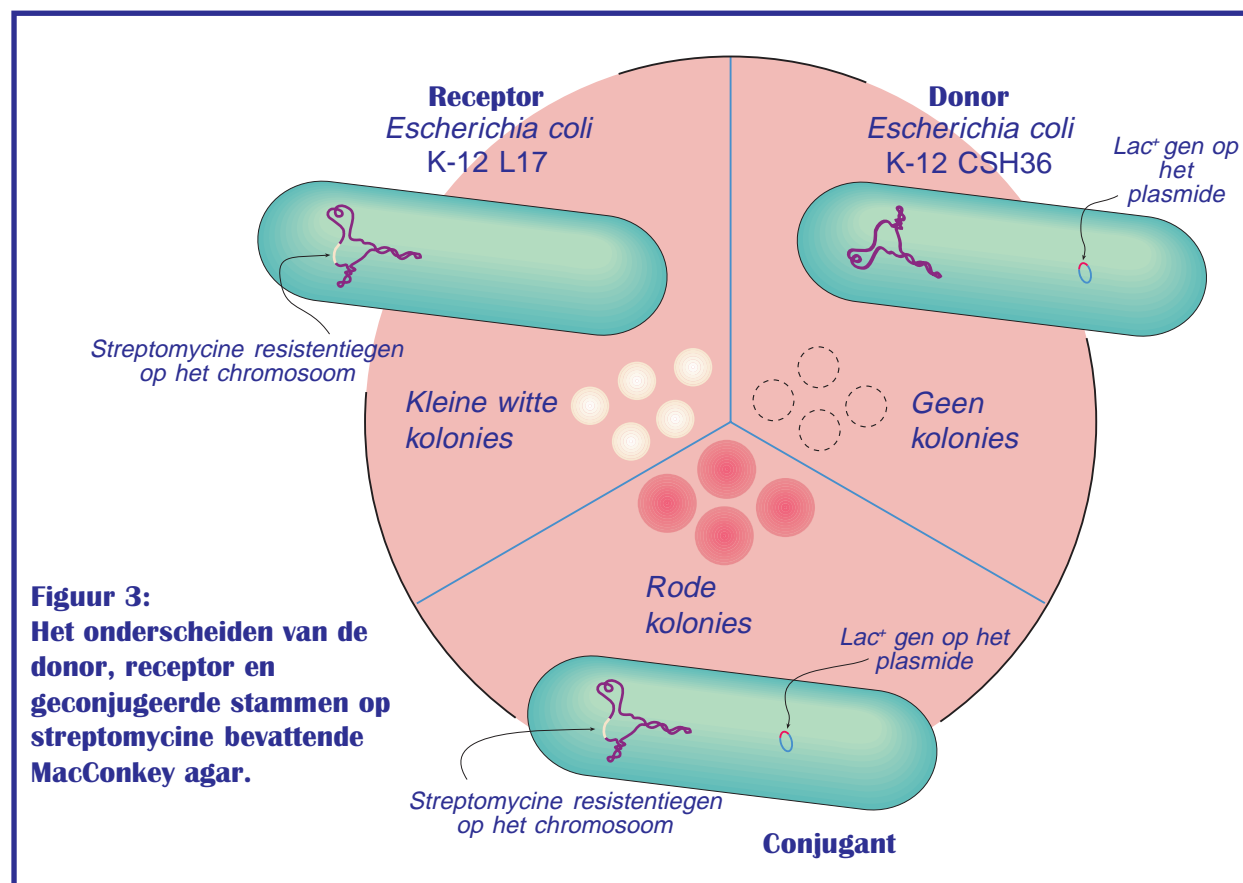
Wanneer beide stammen door elkaar worden gemengd, worden F *Lac*⁺ plasmiden overgegeven van de donor aan de ontvanger. Zo verkrijgt de

Figuur 2. Het beeld van donor- en receptorstammen op gewone MacConkey agar



receptorstam de mogelijkheid om lactose af te breken.

Om de donor, receptor en geconjugeerde (receptorstam met verkregen plasmide) stammen te kunnen onderscheiden, wordt gebruik gemaakt van een genetisch oefje. Voor de receptor wordt een stam uitgezocht met een chromosomaal gen dat de stam ongevoelig maakt voor het antibioticum streptomycine. De donorstam heeft zo'n gen niet en wordt geremd door streptomycine. Nu kunnen de receptor en geconjugeerde stammen worden geïdentificeerd.



Figuur 3: Het onderscheiden van de donor, receptor en geconjugeerde stammen op streptomycine bevattende MacConkey agar.

Alleen zij kunnen op een streptomycine bevattend medium groeien met kleine witte, respectievelijk rode kolonies (Figuur 3).

Doel

- Het aanbieden van een stimulerende kennismaking met de bacteriële genetica
- Leerlingen de mogelijkheid te geven om te discussiëren over onderwerpen die te maken hebben met de overdracht van genen in de natuur, zoals de verspreiding van resistentie tegen antibiotica en de risicobeoordeling bij gentechnologie.

Vorbereidingen

De volgende media dienen vooraf te worden gemaakt en gesteriliseerd:

- 3 kleine (100 ml) met een wattenprop afgesloten erlenmeyers, met daarin 10 ml vloeibaar voedingsoplossing (basismedium);
- Steriele MacConkey agar (1,5% agar) met toegevoegde streptomycine-sulfaat (eindconcentratie 200 mg/l). Nadat de agar is afgekoeld tot 50 °C (handwarm) dient het te worden verdeeld over steriele Petrischalen (ongeveer 15-20 ml per plaat).

De gebruikte cultures zijn:

Donorstam:

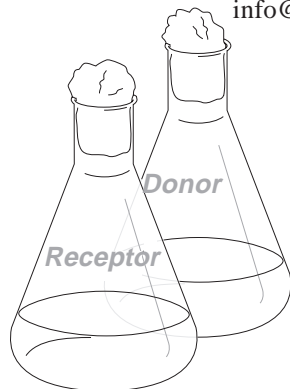
Escherichia coli K-12CSH36
(DSM 6253)

Receptorstam:

Escherichia coli K-12L17
(DSM 6254)

Deze in de natuur voorkomende stammen komen van de Duitse Verzameling van Micro-organismen en Celcultures (DSMZ). Het adres is: DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Duitsland, tel: 0049 531 2616 336, fax: 0049 531 2616 418, Email: dsmz@gbf-braunschweig.de, Web: <http://www.gbf-braunschweig.de/DSMZ/dsmzhome.htm>.

In Nederland kan men stammen kopen bij het C.B.S. te Baarn, tel (035) 548 12 11, email: info@cbs.knaw.nl.



Voor levering uit Duitsland moet men rekenen op 10 (werk)dagen. Beide cultures worden gevries-droogd in ampullen aangeleverd.

De ampullen moeten correct worden geopend om er zeker van te zijn dat de inhoud niet wordt besmet en dat de gebruiker niet aan onnodig gevaar wordt blootgesteld (zie appendix hiernaast en de bijgeleverde instructies). De donorstam gaat snel in kwaliteit achteruit, daarom is een vers gemaakte cultuur nodig.

Overnachtcultures van de donor- en de receptorstam worden als volgt gemaakt:

1. Inoculeer een van de drie erlenmeyers met de donorstam (en label die Donor) en een andere met de receptorstam (en label die Receptor);
2. Incubeer beide erlenmeyers overnacht bij 37 °C, bij voorkeur in een schudwaterbad.

Conjugeren van deze twee cultures:

1. Breng met een steriele pipet 0,8 ml (800 µl) van de donorcultuur over naar de derde erlenmeyer met 10 ml steriele voedingsoplossing.
2. Voeg met een steriele pipet 0,2 ml van de receptorcultuur toe aan dezelfde erlenmeyer.
3. Label deze erlenmeyer en incubeer 16-24 uur bij 37 °C. *Let op: Zwenk de erlenmeyer VOORZICHTIG tijdens het incuberen; bij al te krachtig schudden zullen de pili tussen de conjuganten breken.*

Steriele watten strijkstokjes worden gemaakt door een kleine propje watten om de top van een cocktailprikker te winden. Autoclaveer deze in een McCartney flesje of losjes gewikkeld in aluminiumfolie 15 minuten bij 121 °C (in een snelkookpan).

Tijdsduur

media maken:	60 minuten
incubatie 10 ml cultures:	48 uur
beënten van de platen:	15 minuten
incubatie platen:	24-48 uur
bestuderen van de resultaten:	20 minuten

Benodigdheden

Per student of groepje studenten (aangenomen dat het gebruikelijk practicummateriaal beschikbaar is).

- Waterbad/incubator van 37 °C
- Een steriele Petrischaal met 15-20 ml MacConkey agar en toegevoegde streptomycine
- De volgende voorgekweekte cultures:
 - Donorstam
 - Receptorstam
 - Geconjugeerde mix van de donor- en receptorstam

- 3 steriele zelfgemaakte watten strijkstokjes
- Een kleine beker met daarin een desinfecterend middel (bijv. Stafiflex chloortablet) om na gebruik de strijkstokjes in te plaatsen
- Markeerstift voor de Petrischalen

Werkwijze

1. Verdeel de streptomycine-MacConkey agarplaten met de markeerstift (op de onderkant van de platen) in drie gelijke delen.
2. Teken midden in elk segment een rondje met een diameter van ongeveer 1 cm. Markeer de rondjes met de letters D (voor de donorstam), R (voor de receptor) en M (voor het de mix van de twee stammen, waarin de geconjugeerde bacteriën zitten).
3. Gebruik een steriel strijkstokje om de gemarkeerde gebieden op de plaat te beënten. Denk eraan voor elke cultuur een nieuw stokje te gebruiken. Zet na gebruik de stokjes in de beker met desinfectans.
4. Laat de platen even staan tot de vloeistof niet meer zichtbaar is. Keer de platen om en incubeer ze een tot twee dagen bij 37 °C.

Uitbreidingen

Het experiment kan met verschillende kwantitatieve proeven worden uitgebreid, bijvoorbeeld:

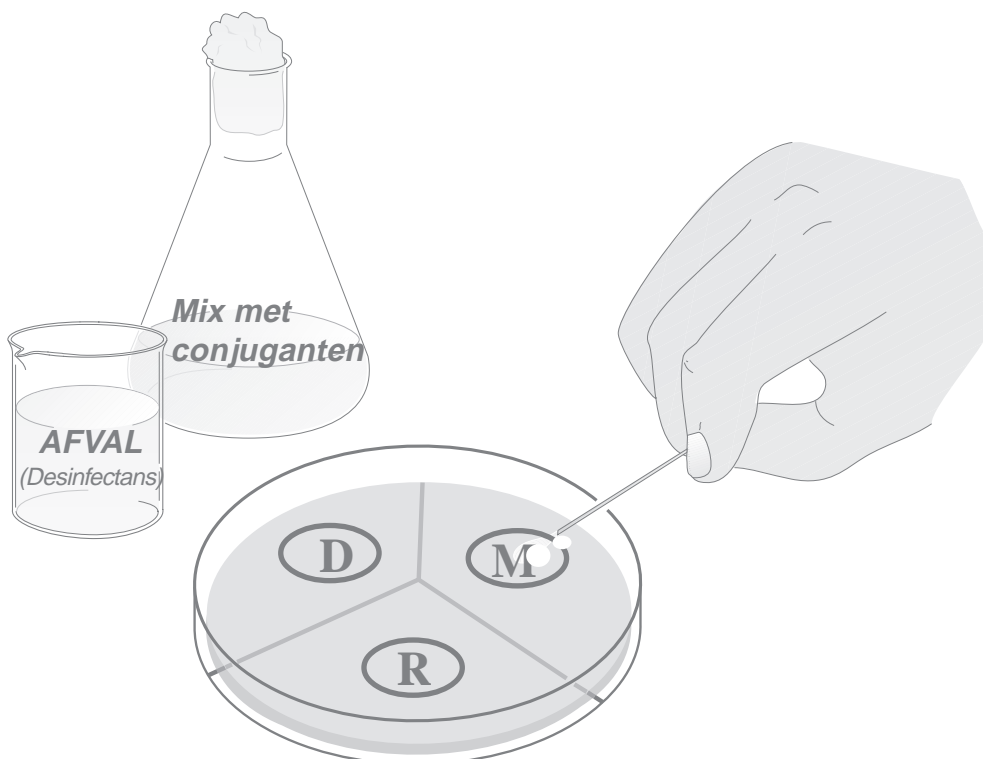
1. Het bepalen van de optimale verhouding tussen donor en receptor, door de donor en receptorcultuur in steriele Ringer's of 10^{-3} MgSO_4 -oplossing te verdunnen.
2. Het bepalen van de optimale mengtijd voor de conjugatie.

Veiligheid

Dit experiment moet in een geschikt practicumlokaal worden uitgevoerd. Standaard microbiologische veiligheidsprocedures, waaronder het steriel werken, moeten worden gevolgd tijdens het uitvoeren van het experiment en bij het verwerken van het afval.

Met dank aan

Dit experiment is een vereenvoudigde versie van dat van professor Patricia Nevers van de Universiteit van Hamburg. Professor Nevers' protocol was weer gebaseerd op dat van E. Härle en R. Hausmann van de Universiteit van Freiburg.



Genoverdracht in de natuur door *Agrobacterium tumefaciens*



Plantentumoren vormen een ernstig probleem in land- en tuinbouw. Tumoren ontwikkelen zich in kleine beschadigingen aan de plant, die kunnen ontstaan bij grondbewerking, vorst of tijdens het enten.

Rond de eeuwwisseling constateerde men dat bepaalde tumoren altijd samen gingen met bacteriële infecties. De betrokken bacterie werd *Agrobacterium tumefaciens* genoemd (Grieks: agar = akker; Latijn: tumor = zwelling; facere = doen). Pas rond 1980 kreeg men uiteindelijk inzicht in de ingewikkelde relatie tussen de planten en *Agrobacterium*.

De infecterende bacteriën brengen een klein stukje van hun genetisch materiaal (een plasmide) in het genoom van de plantencellen. Dit zorgt ervoor dat elke geïnfecteerde plantencel zich gaat delen. Er ontstaat een tumor, die als habitat fungeert en zorgt voor de ongebruikelijke aminozuur derivaten, die de ongenode bacteriële gast nodig heeft.

De manier waarop *Agrobacterium* genen overdraagt wordt ietwat gewijzigd door veredelaars gebruikt om gewenste genen over te dragen zonder tijdrovende kruisingen. Daarmee zijn gemodificeerde vormen van *Agrobacterium* een belangrijk gereedschap in de gentechnologie geworden.

Agrobacterium is staafvormig en ongeveer even groot als *E. coli*; 1 tot 3 µm lang. De virulente *Agrobacterium tumefaciens* kan aëroob in de bovenste lagen van de grond leven. Het is een saprofiet, hoewel het anorganische stikstof kan benutten. *Agrobacterium* tast alleen dicotyle planten aan en kan uitsluitend een plant binnendringen en infecteren in bestaande wondjes. De bacterie kan namelijk geen intacte celwanden penetreren. Wondvocht van nabije beschadigde cellen trekt de bacteriën aan en activeert de genoverdracht. De bacteriën vermenigvuldigen zich rond de wond en penetreren het intercellulaire gebied, door zich aan de celwanden van de planten te hechten. Het plasmide van *Agrobacterium* wordt overgedragen aan en uiteindelijk geïntegreerd in het

chromosoom van de plant. Vanaf dit chromosoom dirigeert het de productie van opines, die *Agrobacterium* gebruikt als een koolstof- en stikstofbron.

Doel

In het volgende onderzoek wordt *Bryophyllum = Kalanchoë* sp (gemakkelijk te kweken en te vermeerderen) onder verschillende omstandigheden geïnfecteerd met een in de natuur voorkomende vorm van *Agrobacterium*. Binnen vier weken kan de groei van de tumor worden waargenomen. De volgende variaties binnen de proefopzet kunnen worden onderzocht:

A. De manier van infecteren:

- verwond de plant en infecteer de wond onmiddellijk met *Agrobacterium*
- verwond de plant en infecteer de wond de volgende dag met *Agrobacterium*
- verwond de plant en infecteer de wond met *Agrobacterium*. Dek de geïnfecteerde wond af met een vochtig papiertje.
- verwond de plant en infecteer deze **niet** met de bacterie
- breng *Agrobacterium* aan op niet verwonde plantedelen.

B. Plaats van de infectie

- stengel
- bladoppervlak
- spruittop

Vorbereidingen

1. Het vermeerderen van de waardplant (leerlingen kunnen dit doen - ook thuis)
2. Het maken van voedingsmedium en *Agrobacterium tumefaciens* cultures: er dienen tenminste twee weken voor gebruik verse cultures te worden gemaakt.

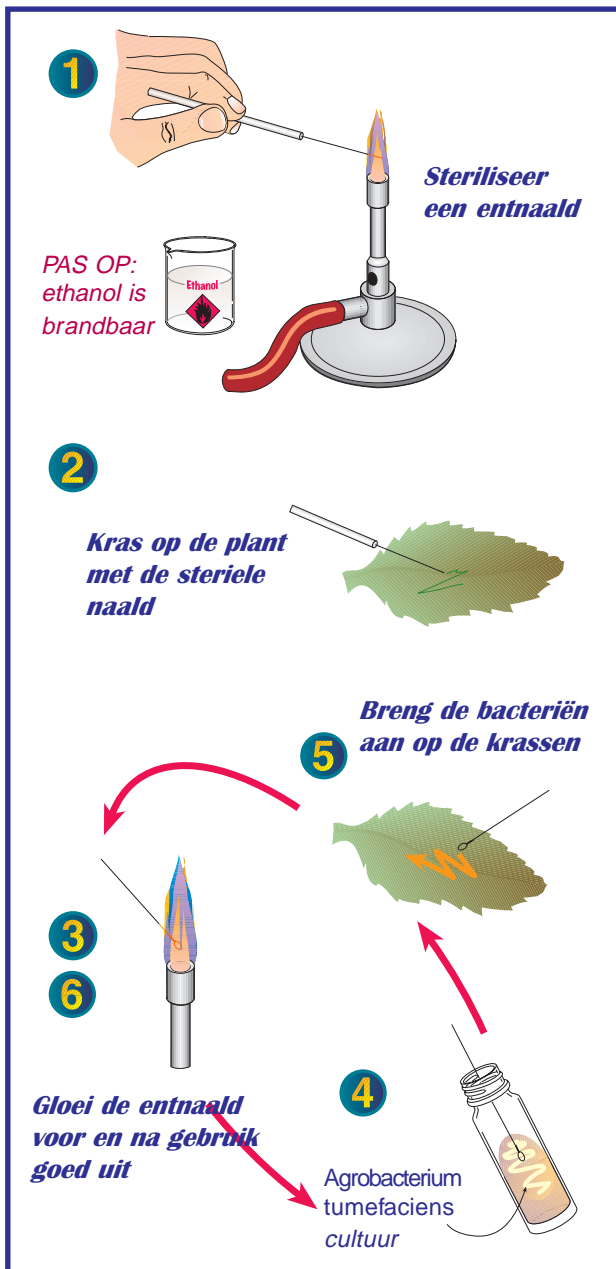
Tijdsduur

- Kweken van de waardplant (indien nodig) 4 maanden
- Bereiden van de *Agrobacterium* cultuur 2 weken
- Infecteren van de planten met *Agrobacterium* 20 minuten
- Observeren van de tumorgroei 3 tot 6 weken

Benodigheden

Per leerling of groep leerlingen is het volgende nodig (hierbij wordt aangenomen dat normale practicumuitrusting ook aanwezig is)

- Steriel water (in een flesje of Erlenmeyer)
- Entnaald
- Entoog
- Binoculair microscoop
- Schaar
- Labelkaartjes met touwtjes en markeerstift (of potlood)
- Papieren handdoekjes
- Plakband
- Ethanol, om de instrumenten in de vlam te steriliseren
- *Agrobacterium tumefaciens* cultuur (op voedingsagar)
- *Kalanchoë* (*Bryophyllum*) planten, circa 3 tot 4 maanden oud



Werkwijze

De planten in dit experiment worden op diverse manieren behandeld (zie de hierboven beschreven aanwijzingen in de introductie, en de instructies hieronder).

1. Markeer elke plant met datum en behandelingsmethode. Maak indien nodig onderscheid tussen de verschillend geïnfecteerde delen van de plant met behulp van de labelkaartjes.
2. Plaats de planten na de behandeling in een goed verlichte ruimte en houd ze vochtig (maar geef niet teveel water).
3. Observeer en noteer de ontwikkeling van de tumoren gedurende 3 tot 6 weken. Bestudeer een stukje tumorweefsel onder het binoculair en vergelijk dit met een stukje normaal blad.

Infectie methoden

Methode 1 (wonden direct geïnfecteerd)

1. Dip een entnaald in de alcohol, maak die gloeiend heet en laat de alcohol verbranden (uitgloeien). Kras een of meerdere keren over het bladoppervlak.
2. Infecteer de wonden met de *Agrobacterium* cultuur. Gloei hiervoor een entoog uit en laat deze eventjes afkoelen. Neem een klein beetje van de wittige bacterie cultuur op met het entoog en verspreid dit over de wond. Gloei het oog opnieuw uit.

Methode 2 (wonden na 24 uur geïnfecteerd)

1. Verwond de plant (zoals in methode 1).
2. Infecteer het verwonde gebied de volgende dag met *Agrobacterium* (zoals in methode 1).

Methode 3 (wonden na infectie afgedekt met een vochtig papiertje)

1. Verwond en infecteer de plant (zoals in methode 1).
2. Knip stukjes uit papieren handdoeken en bevochtig die met steriel kraanwater. Plaats de stroken op de wond en maak ze met plakband vast. Houd het papier twee dagen vochtig.

Methode 4 (wonden niet geïnfecteerd)

1. Verwond de (nieuwe) plant op dezelfde plaatsen als in methode 1 en op een nieuwe plaats- bedek de nieuwe plek met

vochtige papieren stroken. Infecteer de wonden **niet** met de bacterie.

Methode 5 (infectie zonder verwonding)

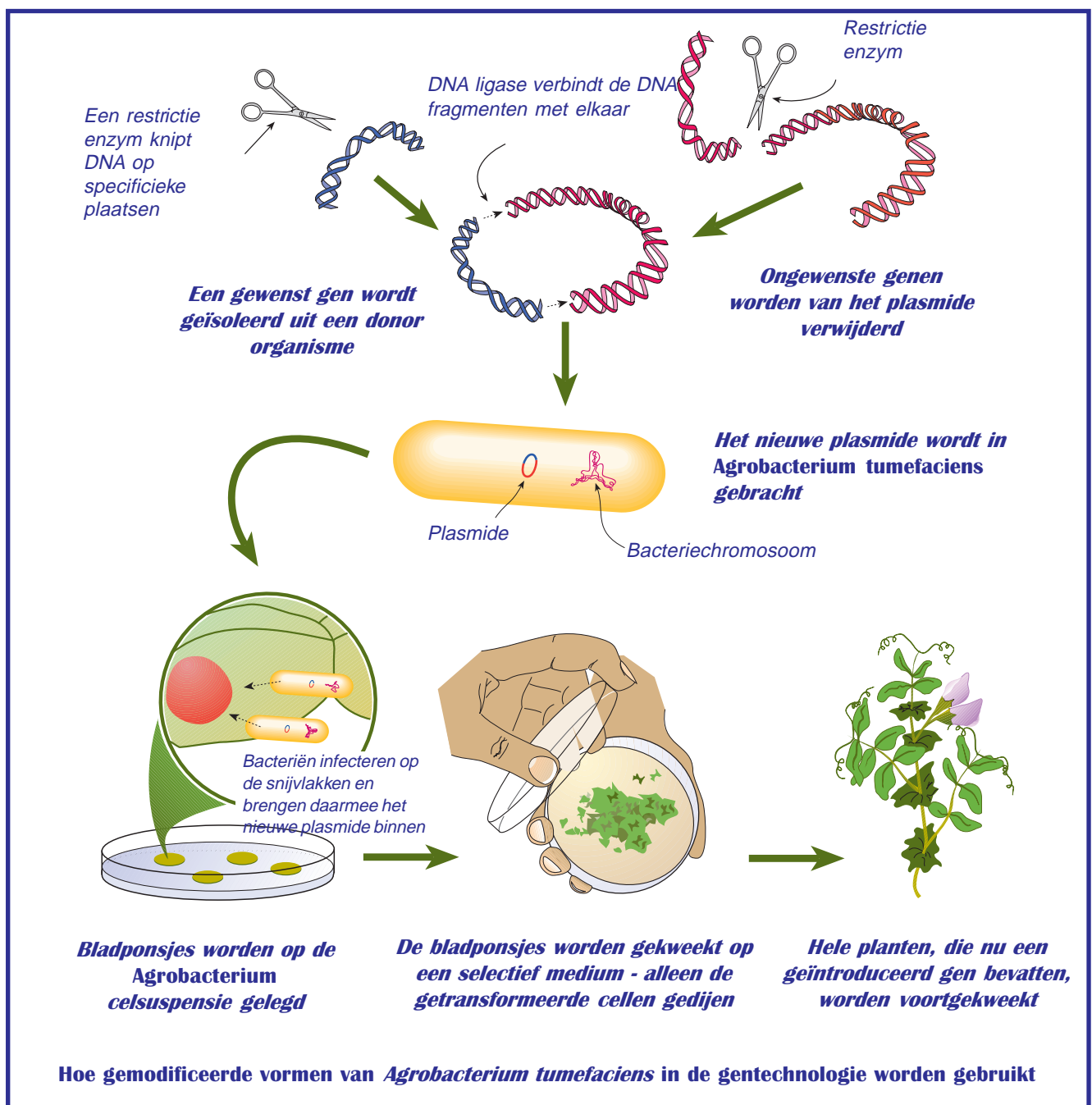
- 1 Verwond de plant niet.
- 2 Infecteer de plant op een of meer niet verwonde plekken met *Agrobacterium* (zoals in methode 1).

Veiligheidsvoorzieningen

Dit experiment moet in een practicumlokaal worden uitgevoerd. Standaard microbiologische veiligheidsprocedures, waaronder het steriel werken, moeten worden gevolgd tijdens het uitvoeren van het experiment.

Met dank aan

Uta Nellen van het Centrum voor School Biologie en Omgeving Voorlichting in Hamburg heeft dit experiment opgezet. EIBE is haar zeer dankbaar voor haar toestemming om dit materiaal te mogen gebruiken.





Appendix 1

Microbiologische media

European Initiative for Biotechnology Education

Voedingsmedia dienen te worden bereid met in de handel verkrijgbaar uitgangsmateriaal, waarbij de instructies van de leverancier moeten worden gevolgd. In de meest catalogi staan ze onder 'Nutrient Broth' of 'Nährbouillon' (voor vloeibare media), dan wel 'Nutrient Agar', of voedingsagar (voor vaste media), men kan zelfs platen met voedingsagar kant en klaar kopen. Het is ook mogelijk om, door 2 g/l agar toe te voegen aan 'Broth' zelf voedingsagar te maken. Doorgaans staan de benodigde hoeveelheden op de pot. De media moeten voor gebruik gedurende 15 minuten worden geautoclaveerd bij 121 °C. In het algemeen kunnen klaargemaakte media enkele maanden worden bewaard bij 4 °C.

Basismedium

'Nutrient Broth'	13,0 gram, toevoegen aan
Gedistilleerd water	1,0 liter

Voedingsagar of Basisagar

Basismedium, waaraan toegevoegd	
Agar	2,0 gram

Zetmeelagar

Voedingsagar waaraan toegevoegd	
Zetmeel, oplosbaar	2,0 gram

Autoclaveer 15 minuten bij 121 °C.

MacConkey agar met streptomycine

MacConkey agar	50,0 gram
Gedistilleerd water	990 ml

Laat dit na 15 minuten autoclaveren bij 121 °C afkoelen tot 50 °C en voeg

10 ml streptomycine sulfaat oplossing	200 mg/10 ml toe
(Eindconcentratie streptomycine	200 mg/l)

De platen moeten vers worden gemaakt. Ze kunnen slechts een paar dagen bij 4 °C in de koelkast worden bewaard.



Appendix 2

Microbiologische technieken

MODULE 1

European Initiative for Biotechnology Education

Microbiologische veiligheid, VMT

Bij verschillende experimenten worden micro-organismen gebruikt. Voor het werken met micro-organismen zijn speciale veiligheidsregels opgesteld. Deze regels, ook wel Veilige Microbiologische Technieken (VMT) genoemd, moeten strikt worden nageleefd. De VMT zijn er op gericht dat er geen besmetting vanuit het practicumlokaal naar de buitenwereld kan optreden. Dit is belangrijk ook al worden er geen ziekteverwekkende organismen gebruikt.

Micro-organismen zijn overal en je ziet ze niet. Dat is meteen het grootste gevaar van het werken met micro-organismen op een school. Iedereen moet zich ervan bewust zijn dat slordig en onzorgvuldig werken gevaar kan opleveren voor hem of haar zelf of voor groepsgenoten. Het spreekt vanzelf dat bij de keuze van de experimenten en de organismen gelet wordt op mogelijke gevaren voor de gezondheid. Niettemin is het werken volgens de VMT noodzakelijk. Dit slaat op het voorwerk, de handelingen tijdens het practicum en het verwerken van het microbiologisch afval.

Om voldoende grote aantallen bacteriën te krijgen, worden geschikte voedingsmedia beënt met een monster. In de meeste gevallen hebben we met voor de mens onschuldige soorten te maken. In principe wordt tijdens het practicum niet met pathogene micro-organismen gewerkt, maar alle cultures moeten beschouwd worden als potentieel gevaarlijk. Omdat het kweken niet selectief gebeurt, heb je nooit de garantie dat er geen ziekteverwekkende bacteriën opgehoopt zijn. De cultuur -en alles wat daarmee in contact komt- is altijd de besmettingsbron. Infecties zijn alleen te vermijden door VMT.

Daarom **moeten** de onderstaande veiligheidseisen in acht genomen worden.

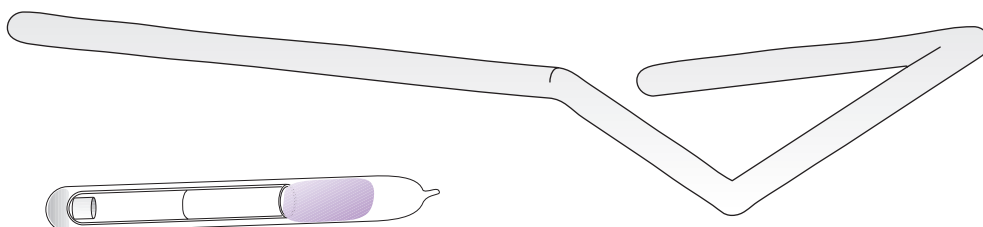
- Draag tijdens een microbiologisch practicum een dichte labjas.
- Maak aan het begin en aan het eind van het practicum de tafel schoon met een

chlooroplossing. Deze oplossing wordt gemaakt door het oplossen van chloortabletten (bijv. Hospidex). Bewaar de oplossing bij voorkeur in een spuitfles met gele band.

- Laat tijdens het practicum geen handleidingen en dergelijke op tafel liggen.
- Verzamel alles wat nodig is voor met het experiment begonnen wordt.
- Pipetteer **nooit** met de mond, ook geen water. Gebruik een pipetteerballon, of een automatische pipet.
- Veeg pipetten niet met papier af.
- Beschouw de voor kweken gebruikte media en materialen als mogelijke besmettingsbron.
- Open cultures alleen als het nodig is, bijvoorbeeld bij doorenten.
- Leg glaswerk dat in aanraking is geweest met bacteriën eerst in de chlooroplossing. Denk eraan dat pipetten nog nadruppelen en op die manier de vloer kunnen besmetten.
- Werk op en boven de tafel.
- Eet, drink noch rook in het lokaal.
- Was na afloop van het practicum de handen.
- Was ook de handen als deze besmet zijn geraakt.

Aërosolen

Aërosolen zijn kleine druppels met in ons geval microben die in de lucht kunnen komen, daar een half uur of langer blijven hangen en ingeademd kunnen worden. Ze vormen de belangrijkste potentiële infectiebron voor laboratorium infecties. Aërosolen van geknoeiende cultures kunnen oog- en huidinfecties veroorzaken en wanneer met de mond wordt gepipetteerd, kunnen microben worden ingeslikt.



Steriel werken



Het doel van steriel werken is:

- Reincultures van micro-organismen te krijgen en te houden;
- Veiliger met micro-organismen werken.

Een *reincultuur* bevat uitsluitend één soort micro-organismen terwijl een gemengde cultuur er twee of meer bevat.

De besmetting van een kweek is altijd een bedreiging omdat micro-organismen overal zijn; op de huid, in de lucht en op levenloze objecten. Om een reincultuur te krijgen, moeten steriele voedingsmedia en steriele voorwerpen worden gebruikt en moeten besmettingen worden uitgesloten. Dit zijn de basisprincipes van steriel werken.

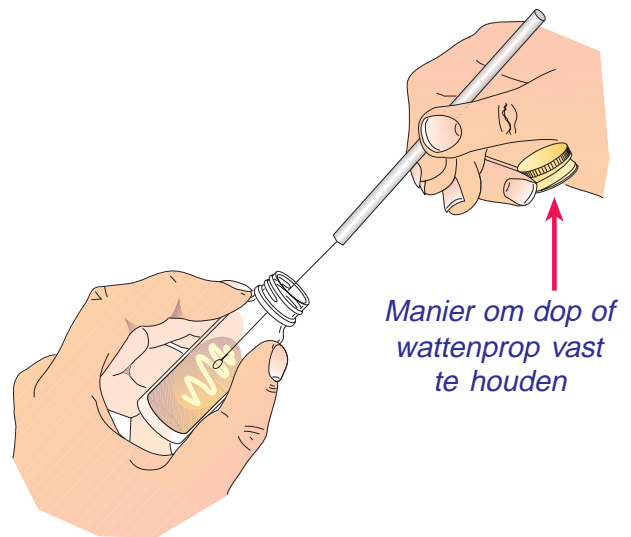
Het is niet realistisch om te verwachten dat jonge leerlingen volledig steriel kunnen werken. Toch moeten de leerlingen in sommige experimenten in deze module steriel cultures over brengen. Dan moeten de volgende procedures worden gevolgd.

Voedingsmedia moeten voor gebruik zijn gesteriliseerd met de autoclaaf. Steriele voorwerpen (flessen, Petrischalen, enz.) moeten worden gebruikt. Deksel moeten op potten blijven om besmetting te voorkomen.

Het werk dient vlak bij een bunsenbrander te worden uitgevoerd. De opstijgende lucht van de vlam zal microben die voedingsmedia en reincultures zouden kunnen besmetten, wegvoeren.

Als een dop van de fles is gehaald, dan moet die in de hand worden gehouden tot dat deze teruggeplaatst kan worden. Dit voorkomt besmetting van tafel en cultuur. Na het weghalen van de dop dient de nek van de fles 1-2 seconden in de vlam te worden gehouden. Dit doodt de aanwezige microben en de opstijgende lucht voorkomt een eventuele besmetting van de cultuur vanuit de atmosfeer. Na enige oefening is het mogelijk om de fles in de ene hand te houden en het entoo in de andere, op zo'n manier dat de pink vrij is om de dop te pakken en tegen de onderkant van de hand aan te houden (Zie de figuur). Het is

erg belangrijk dat de dop een beetje los wordt gedraaid vlak voor het oppakken van het entoo. Indien nodig kunnen twee leerlingen deze handeling samen uitvoeren. Entogen moeten worden verhit tot de hele draad rood gloeit. Dit moet zowel voor als na het overbrengen van de kweek worden gedaan. Om het sputteren en de kans op het vormen van aërosolen te verminderen, wordt het oog langzaam in de vlam van de bunsenbrander gebracht.



Manier om dop of wattenprop vast te houden

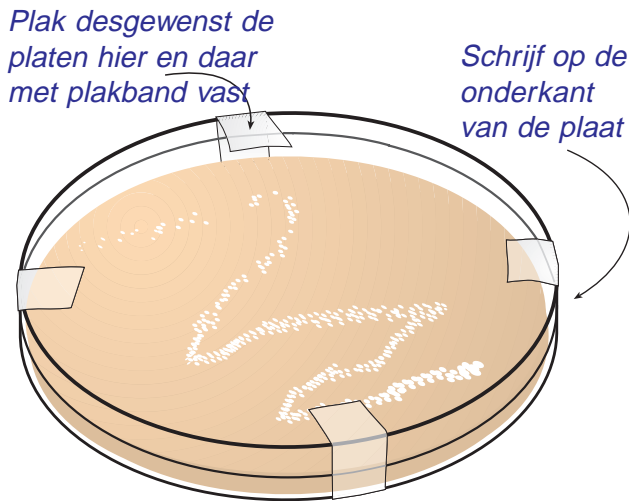
Als de bunsenbrander even niet nodig is, moet de vlam op geel worden gedraaid, zodat de vlam goed zichtbaar is. Een blauwe vlam van ongeveer 5 centimeter wordt gebruikt om de entogen en naalden uit te gloeien en om de flessehalzen te ontsmetten.

Vermijd het besmetten van het werkgebied. Instrumenten moeten direct na gebruik worden gesteriliseerd en gebruikte pipetten dienen direct na gebruik in pot met verse desinfectans te worden geplaatst.

Cultures op een voedingsbodem



Label voor het inoculeren de onderkant van de voedingsbodem. Naam, datum en de naam of bron van het gebruikte organismen maken het mogelijk dat de platen en hun inhoud later kunnen worden geïdentificeerd. Indien gewenst kan plakband gebruikt worden om de platen op de juiste manier dicht te plakken (zie figuur hier onder).



Het plakband zal ervoor zorgen dat de platen niet per ongeluk open gaan of worden besmet. N.B. Sluit de platen niet helemaal rondom met plakband af, dit kan een anaërobe situatie in de Petrischalen creëren.

Bacteriën

Bacterie cultures in Petrischalen moeten normaal gesproken op hun kop worden geïncubeerd, zodat eventuele condensdruppels op de deksel vallen en niet op de kolonies. (Als er voor de inoculatie sprake is van ernstige condensatie, dan dienen de platen voor gebruik te worden gedroogd. Dat kan door de platen, geopend maar omgekeerd en dakpansgewijs, ca. een half uur in een broedstof bij 50 à 60 °C of wat langer bij 30 °C te leggen.)

Na twee tot drie dagen incuberen bij 25-30 °C zijn de bacteriekolonies zichtbaar.

Schimmels

Schimmel cultures in Petrischalen hoeven niet op hun kop te worden geïncubeerd; toch is het raadzaam dit **ALTIJD** te doen. Schimmel-cultures moeten ongeveer 7 dagen incuberen. De schimmels kunnen bij kamertemperatuur (± 21 °C) groeien, maar een incubator geeft een grotere mate van zekerheid.

Verwerken van microbiologisch afval.



- Gooi de gebruikte voedingsbodems mogen niet zonder meer weg. Steriliseer ze in een autoclaaf of snelkookpan. Ze zijn immers besmet met bacteriën.
- Verzamel wegwerpmateriaal voor het steriliseren in een speciale zak. Glaswerk met inhoud wordt verzameld in speciale rekjes en mandjes.
- *Spoel nooit besmette reageerbuizen of ander glaswerk om bij de wasbakken. Het spoelen gebeurt pas na het steriliseren.*
- Pipetten gaan na gebruik in een bak met chlooroplossing. De wattenprop moet wel verwijderd worden. Dit gaat het beste met een pincet met scherpe punten of een paperclip.
- Maak de tafels worden na afloop schoon met een chlooroplossing. Aangezien die oplossing een tijdje moet inwerken, is het **niet** nodig de tafel na behandeling te drogen.
- Voer na steriliseren het afval in een speciale container af als chemisch afval (cat. 5).

Autoclaveren en Steriliseren



Steriliseren betekent het volledig vernietigen van micro-organismen en hun sporen.

Alle gereedschap moet voor gebruik worden gesteriliseerd zodat er geen kans op contaminatie is. Cultures en besmet materiaal dienen ook na afloop te worden gesteriliseerd om ze veilig weg te kunnen gooien.

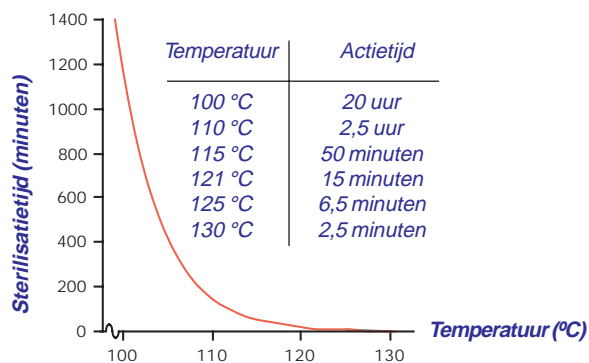
Autoclaveren is de beste methode om voedingsmedia, vloeibare oplossingen en afgedankte cultures te steriliseren. Het proces maakt gebruik van stoom onder hoge druk, meestal bij 121 °C. Microben worden in vochtige warmte beter vernietigd dan in droge, omdat de stoom de eiwitten denatureert. Autoclaveren kan zowel met een gewone snelkookpan als met een speciale autoclaaf. In een practicumlokaal kunnen snelkookpannen worden gebruikt, maar hun geringe capaciteit kan een bezwaar zijn wanneer het materiaal van een hele klas moet worden geautoclaveerd.

Principes van het autoclaveren

Twee factoren zijn cruciaal voor het effectief autoclaveren. Ten eerste moet alle lucht uit de autoclaaf zijn verwijderd. Dit waarborgt dat de hete stoom in contact komt met het te steriliseren oppervlak; als er lucht aanwezig is, is bij dezelfde druk de temperatuur lager. De materialen die gesteriliseerd dienen te worden, moeten losjes worden verpakt zodat de lucht eruit kan worden verdreven. Schroefdooppen moeten losjes op de flessen en potten worden geplaatst om de lucht te laten ontsnappen en om te voorkomen dat er binnenin een gevaarlijke druk wordt opgebouwd.

Ten tweede moet er voldoende tijd worden genomen om de hitte naar het midden van het medium in Petrischalen en andere reactievaten te laten penetreren (door geleiding). De tijd die nodig is om media en voorwerpen bij verschillende temperaturen te steriliseren is weergegeven in nevenstaande grafiek.

Merk op dat een klein verschil in de temperatuur een groot verschil in de benodigde sterilisatietijd kan geven. Het is ook van belang dat de temperatuur binnenin de materialen, die in de bepaalde tijd



gesteriliseerd moeten worden, wordt bereikt, bijvoorbeeld de voedingsoplossing in het uiterste puntje van een fermentorvat. De drie factoren die de tijdsduur van het autoclaveerproces bepalen, zijn dus:

- **de penetratie tijd**
de tijd die nodig is voordat alles in de autoclaaf de vereiste temperatuur heeft bereikt;
- **de actietijd**
de minimale tijd die, gegeven de temperatuur, nodig is om alle levende organismen te doden
- **de veiligheidstijd**
een veiligheidsmarge, meestal de helft van de actietijd.

Gewone snelkookpannen werken bij 121 °C. De totale sterilisatietijd wordt dan, de penetratietijd, bijvoorbeeld 5 min, plus 15 minuten actietijd, plus een veiligheidsmarge van ongeveer 5 minuten, dus totaal 25 minuten

Vat	Volume	Actietijd
Reageerbuis	20 ml	12-14 minuten
Fles	50 ml	12-14 minuten
Fles	200 ml	12-15 minuten
Fermentor	1 liter	20-25 minuten

Karamelliseren

Autoclaven werken soms boven de 121 °C. Hoewel de hierdoor bespaarde tijd een voordeel kan zijn, moet er rekening mee worden gehouden dat hoge temperaturen nadelig kunnen zijn voor sommige media. Glucose oplossingen bijvoorbeeld, karamelliseren bij hoge temperaturen en vormen componenten die toxisch voor de microben kunnen zijn. In het geval van glucose kan deze reactie worden vermeden door de pH op 4 te stellen. Na het steriliseren kan, indien gewenst, de pH weer worden terug gebracht.

Maillard reacties

Bruinkleuring (de Maillard reactie) kan ook worden veroorzaakt door de interactie bij hoge temperatuur tussen stikstofrijke componenten en koolhydraten in het medium. Ook hier worden componenten gevormd die voor sommige micro-organismen toxisch kunnen zijn, zodat het soms nodig kan zijn om de koolhydraten en de rest van het medium apart te autoclavieren, bijvoorbeeld bij het bereiden van melkagar.

Gebruik en onderhoud van autoclaven

De gebruiksaanwijzing van de leverancier dient altijd te worden gevolgd bij het gebruik van snelkookpan of autoclaaf. Speciale aandacht moet worden gegeven aan de minimale hoeveelheid water in de autoclaaf zodat deze tijdens het gebruik niet droog kan koken. Een snelkookpan heeft tenminste 250 ml water nodig. De grotere autoclaven hebben aanzienlijk meer nodig. Het gebruik van gedestilleerd of gedeïoniseerd water in de autoclaaf voorkomt de vorming van ketelsteen. Autoclaven moeten droog worden opgeruimd. De bodem van de autoclaaf kan vol putjes komen als dit niet wordt gedaan, daarbij verzwakt de bodem die dan onder druk bol naar buiten gaat staan.

Wanneer de autoclaaf wordt gebruikt, moet de stoom en lucht gedurende ongeveer 1 minuut uit de autoclaaf kunnen ontsnappen voordat het ventiel op de pan wordt gezet om zo alle

lucht te laten verdwijnen. Na de totale sterilisatietijd moet tijd worden gegeven om de inhoud af te laten koelen en op de normale atmosferische druk terug te komen. Open geen dop of ventiel terwijl de pan nog onder druk staat. Dit veroorzaakt brandwonden. Het voortijdig openen van de deksel en de daaropvolgende vermindering van druk zal elke vloeistof in de autoclaaf laten koken. De agar of voedingsvloeistof zal gaan schuimen en overkoken.

Droge hittesterilisatie

Glaswerk is goed te steriliseren door het een uur of twee bloot te stellen aan een temperatuur van 200 °C in een hittestoof. Pipetten rolt men daarbij het best in papier; aan het mondstuk een kleine wattenprop.

Filtersterilisatie

Stoffen die niet tegen verhitting kunnen, kan men steriliseren door ze door een speciaal filter te zuigen in een (vooraf gesteriliseerde) afzuigerlenmeyer. De poriegrootte van zulke filters is zo klein dat een bacterie er niet door kan. Deze filters zijn gewoon in de handel.

Chemische sterilisatie

Verschillende chemicaliën worden voor het steriliseren gebruikt, de meest gebruikte laboratorium ontsmettingsmiddelen zijn heldere fenolen en hypochloriden.

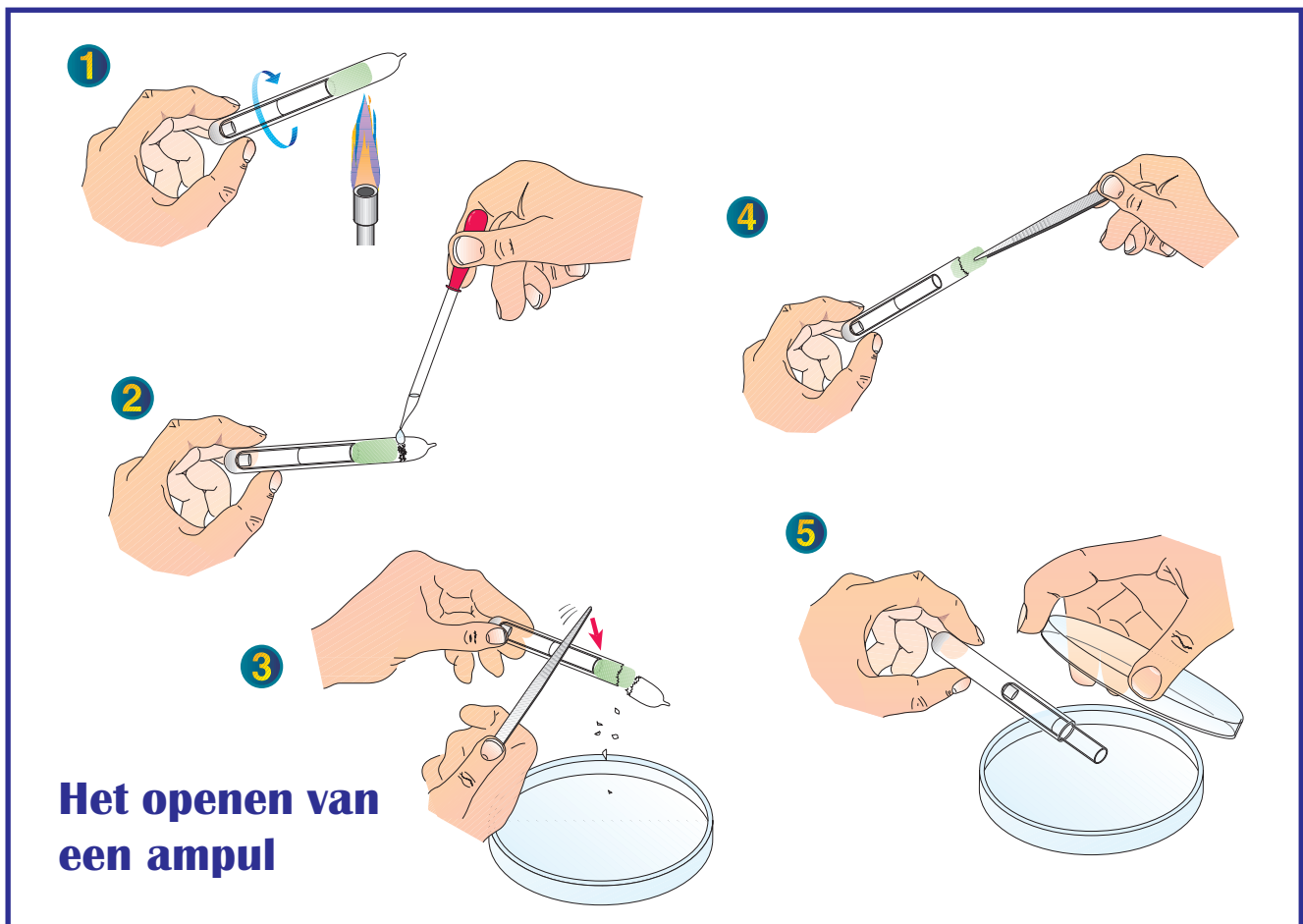
Heldere fenolen zijn effectief tegen bacteriën en schimmels, maar onwerkzaam bij sporen en sommige virussen. Ze worden tot op zeker hoogte geïnactiveerd door contact met rubber, hout en plastic. In het laboratorium kunnen de heldere fenolen worden gebruikt in afvalvaten en om oppervlakten te ontsmetten.

Hypochloriden (zoals bleekmiddelen) zijn niet ideaal voor het steriliseren van gebruikte Petrischalen e.d. aangezien ze door eiwit en plastic materiaal geïnactiveerd kunnen worden. Maar, een 5% oplossing van Domestos (Lever) of Chloraat I oplossing is geschikt om in afvalvaten te gebruiken.



Pas op!
Draag een veiligheidsbril. Er kunnen glassplinters rondvliegen bij het openen van de ampul.

- 1 Verhit de puntige kant van de ampul in een vlam. Draai hem rond tijdens het verhitten (zie figuur)
- 2 Druppel met een pipet of iets dergelijks enkele druppels koud water op het hete stuk glas. *Het glas moet nu versplinteren.*
- 3 Geef op deze kant van de ampul een stevige tik met een pincet, maar wel voorzichtig. Vang de glasbrokken op in een Petrischaal. Let er goed op dat het glas goed wordt verwijderd.
- 4 Haal met een pincet de prop glaswol weg, die de binnenbuis op z'n plaats houdt.
- 5 Tik voorzichtig deze binnenbuis eruit in een steriele Petrischaal, en doe daar onmiddellijk weer de deksel op.



Het opkweken van een cultuur vanuit een ampul met een gevriesdroogde cultuur

1. Verwijder met een pincet de wattenprop en houd de opening van de binnenste glazen buis kort in de vlam (uitgloeien).
2. Voeg 1 ml steriele voedingsoplossing toe aan de inhoud van de binnenste buis.
3. Gloei de opening van de buis nog een keer uit en stop de wattenprop weer terug. Laat de buis 20 minuten staan om de gedroogde cultuur weer tot leven te brengen.
4. Gebruik een uitgegloeid entooog om de inhoud van de buis te mengen en giet het geheel over in een steriele (reageer)buis waar al 5 ml voedingsoplossing in zit. Gloei het entooog opnieuw uit.
5. Laat de kweek overnacht bij 30 °C groeien.

De volgende dag

6. Gebruik een uitgegloeid entooog om een druppeltje van de bereide suspensie op het oppervlak van een voedingsbodem uit te strijken. Deze stap is om de reinheid van de cultuur te controleren -er mag slechts één soort kolonies op de plaat groeien.

Het opkweken van een cultuur vanaf een voedingsbodem met losse kolonies

1. Gloei een entooog uit en laat deze tenminste 30 sec. afkoelen.
2. Pak met behulp van het entooog een kolonie van de plaat en breng deze over naar een buis met 5 ml steriele voedingsoplossing en roer voorzichtig. Gloei het entooog opnieuw uit.
3. Laat de kweek overnacht bij 30 °C groeien, als het kan in een waterschudbad.

Het opkweken van een cultuur vanaf een ingevroren glycerolkweek

1. Gloei een entooog uit en laat deze minstens 30 sec. afkoelen.
2. Schraap met het entooog langs de bevroren cultuur en breng de onzichtbare cellen over naar een buis met 5 ml steriele voedingsoplossing en roer voorzichtig. Gloei het entooog opnieuw uit.
3. Laat de kweek overnacht bij 30 °C groeien, het mooiste is een waterschudbad.

De volgende dag

4. Gebruik een uitgegloeid entooog om een druppeltje van de bereide suspensie op het oppervlak van een voedingsbodem uit te strijken. Deze stap is om de reinheid van de cultuur te controleren -er mag slechts één soort kolonies op de plaat groeien.