

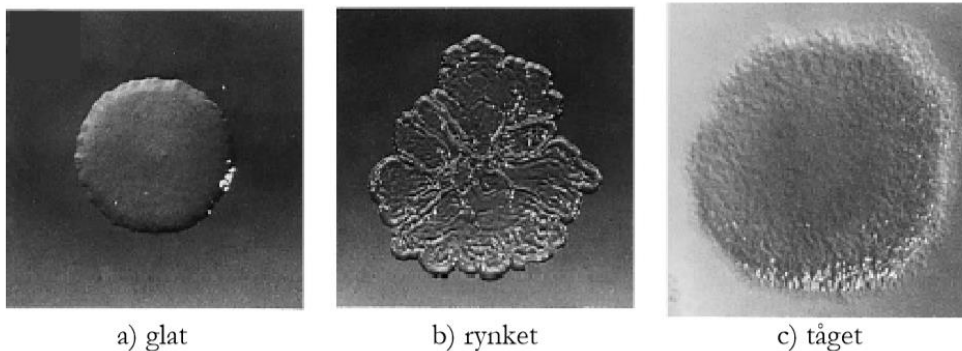
Forsøgsvejledning - Evolutionseksperiment Fra Darwin til bioteknologi

Introduktion

Dette eksperiment illustrerer evolution af den aerobe jordbakterie *Pseudomonas fluorescens*. Eksperimentet blev udført af Paul Rainey og Michael Travisano i 1998¹.

P. fluorescens udvikler sig hurtig i nye omgivelser. Når *P. fluorescens* dyrkes i et statisk medie, vil der være en højere oxygenkoncentration ved overfladen end ved bunden. Der vil derfor hurtigt opstå diversitet, idet der konkurreres om den begrænsede mængde oxygen.

Der vil blive dannet mutanter med en niche-specificitet forskellig fra den oprindelige stamme. Dette kan observeres ved, at de samtidig har en anden kolonimorfologi. Den oprindelige stamme (wildtypen, wt) har en "glat" og afgrænset kolonimorfologi, mens mutanterne vil vise andre kolonimorfologier betegnet henholdsvis "rynket" og "tåget".



Eksperimentet går derfor ud på at påvise, at der fremkommer kolonier med forskellige morfologier, når *P. fluorescens* spredes ud på en agar-plade efter at have vokset i 7 dage i et statisk medie. På 1. dag skal hver elev² dyrke tre kulturer med den oprindelige stamme af *P. fluorescens* (SBW25) i 6 ml flydende LB-medie. Kulturerne inkuberes derefter i 7 dage ved 30 °C uden ryst. Efter de er blevet inkuberet i syv dage rystes hver af kulturerne i 1 minut.

Herefter udføres en fortyndingsrække og 0,100 ml af hver af fortyndingerne 10^{-2} - 10^{-5} plades ud på LB-agar-plader, som derefter inkuberes (vokses i varmeskab) i 36 timer. Efter inkubering undersøges til sidst kolonimorfologierne.

Hvis du har spørgsmål af enhver art til øvelsen, er du meget velkommen til at skrive en mail til biotech@bio.dtu.dk. Så vil vi forsøge at hjælpe bedst muligt, hurtigst muligt.

Rigtig god fornøjelse!

¹ Kilde: Rainey P., Travisano M. 1998. "Adaptive radiation in a heterogeneous environment". Nature. Vol 394, p69-71

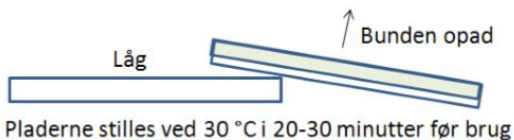
² Det er op til den enkelte lærer at vurdere, om hver elev skal lave sit eget forsøg, om der skal være grupper, eller om forsøget skal laves som demo af læreren.

Sikkerhedshensyn

GENERELT OM MIKROBIOLOGISKE TEKNIKKER

Når man arbejder med bakterier, er det vigtigt at arbejde sterilt, da der ellers kommer andre bakterier på pladerne, end dem man ønsker. Alt udstyr (pipettespidser, podenåle, agarplader mm.) skal derfor holdes væk fra andre bakterier. Pladerne skal opbevares i lukkede poser, og man skal kun røre på de steder, der ikke kommer i kontakt med anvendte bakterier og medier.

Før man benytter agarplader er det vigtigt, at de er tørre, da bakterierne ellers vil kunne svømme rundt på overfladen af pladen. Alle de anvendte agarplader skal derfor sættes ind i et varmeskab (30 °C) i 20-30 minutter inden brug. Pladerne sættes med bunden opad på skrå hen over låget, så bakterier i luften ikke falder ned på pladen.



Når pladerne inkuberes er det vigtigt, at de stilles med bunden i vejret, så eventuel kondensvand ikke løber ned på agaren.

HUSK at skrive navn og dato på alle anvendte reagensglas, plader mm. På pladerne skrives der langs kanten på bunden, da lågene kan byttes om.

Det vigtigt ikke at indtage mad og drikkevarer, når der arbejdes med bakterierne. Husk at vaske hænder grundigt med sæbe inden I starter. Sprit bordet af og sørg for kun at have de ting fremme, som I skal bruge.

Alle laboratorietimer afsluttes med at vaske hænderne grundigt med sæbe.

Nu kan eksperimentet begynde.

1. Dyrkning af bakterier (dag 1)

Materialer

30 °C varmeskab

Plade med *Pseudomonas fluorescens* (SBW25)

Sterile podenåle

Sterile reagensglas

Flydende LB-medie

Bemærk wildtypens kolonimorfologi, der er rund og glat.

- a. Med sterile podenåle overføres 2 kolonier af *P. fluorescens* til hvert sit sterile reagensglas med 6 ml flydende LB. **Mærk reagensglassene med hold nr. samt dato.**
- b. Kulturerne inkuberes i 7 dage ved 30 °C uden ryst.

2. Udstrykning af bakterier (dag 8)

Materialer

30 °C varmeskab

1 ml pipetter

Drigalski spatel

Eppendorfrør

0,9 % NaCl

LB-plader

- a. Efter kulturerne har vokset i 7 dage, rystes de hver i 1 minut.
- b. Der udføres en fortyndingsrække af hver af kulturerne ned til 10^{-5} .

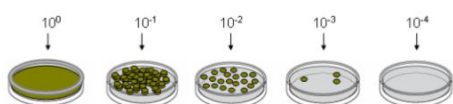
Fortyndingsrække

Fortyndingsrækken laves ved at overføre 0,1 ml af kulturen til et eppendorfrør med 0,9 ml 0,9 % NaCl

(fortynding 10^{-1}). Der blandes ved at suge op og ned et par gange med pipetten. Fra dette rør overføres

igen 0,1 ml til et nyt eppendorfrør med 0,9 ml 0,9 % NaCl (fortynding 10^{-1}). Proceduren fortsættes indtil den ønskede fortynding er opnået.

Grunden til at der laves så mange fortyndinger er, at der skal være et passende antal kolonier på pladen for, at kunne undersøge kolonimorfologien.



Sterilisering af drigalski-spatel

Dyp drigalski-spatlen i 70% sprit og før den hurtigt hen over en bunsel-brænder, så spritten damper af.

Sæt drigalski-spatlen i siden af agarpladen, for at nedkøle den. Drigalski-spatlen kan nu bruges til udpladning. Husk at sterilisere den før hver udpladning.

- 0,1 ml af hver af fortyndingerne 10^{-2} - 10^{-5} plades ud ved hjælp af en steril drigalski-spatel på tørre LB-agarplader. **Mærk pladerne med hold nr. samt den aktuelle fortynding, f.eks. 10^{-2} .**
- Pladerne inkuberes i 36 timer ved 30 °C.

3. Analyse af pladerne (dag 9)

Pladerne tages ud af varmeskabet. Kolonimorfologien undersøges, tegnes og beskrives.